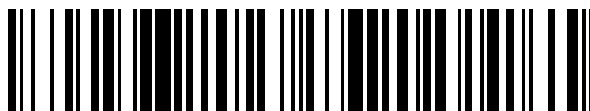


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 362**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/00** (2008.01)

**A01N 57/16** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2014 PCT/EP2014/064686**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015 WO15004174**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2014 E 14736841 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 3019609**

54 Título: **ARNi para el control de hongos y oomicetos fitopatógenos mediante la inhibición de la expresión de genes CYP51**

30 Prioridad:

**10.07.2013 EP 13175924**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**10.07.2018**

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)  
Carl-Bosch-Strasse 38  
67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:

**KOGEL, KARL-HEINZ**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 675 362 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

ARNi para el control de hongos y oomicetos fitopatógenos mediante la inhibición de la expresión de genes CYP51

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere al silenciamiento génico de genes CYP51 de un fitopatógeno del género *Fusarium* mediado por ARN de doble cadena. Por consiguiente, la presente invención se refiere a moléculas de ARNdc para la inhibición de la expresión de los genes CYP51 y el uso de tales moléculas de ARNdc inhibitoras para controlar hongos y/u oomicetos fitopatógenos; a secuencias de ADN que proporcionan un molde transcripcional para moléculas de ARNdc inhibitoras o ARN antisentido; y plantas transgénicas tolerantes a fitopatógenos que comprenden tales secuencias de ADN.

**Antecedentes de la invención**

Las enfermedades de plantas causadas por hongos y oomicetos fitopatógenos son un riesgo serio en el cultivo de plantas. Las enfermedades de los cultivos de cereales tales como la fusariosis de la espiga y la podredumbre de la raíz causadas por los hongos fitopatógenos del género *Fusarium* ejercen mayor impacto económico y agronómico sobre la producción global de los cereales y la industria de los cereales. Los daños causados por los hongos y oomicetos fitopatógenos deterioran la calidad y la producción de los productos agrícolas hasta la pérdida total de los cultivos y, por lo tanto, dan como resultado pérdidas económicas significativas. Además, se puede comprometer la seguridad de los alimentos por la contaminación de los productos agrícolas con micotoxinas, que se producen por hongos fitopatógenos durante la infestación de la planta y representan un grave amenaza para la salud de los seres humanos y de los animales. El riesgo de pérdidas devastadoras debido a los hongos y oomicetos fitopatógenos es particularmente alto en monocultivos, que actualmente representan el procedimiento predominante de producción de plantas de cultivos agrícolas.

En la actualidad, las principales estrategias en la gestión de hongos y oomicetos fitopatógenos incluyen la aplicación ampliamente usada de fungicidas, de estrategias de mejora de resistencia, control biológico e ingeniería genética. La última estrategia se basa en el uso de transgenes tales como quitinasa, defensinas, poligalacturonasa, y el uso de enzimas detoxificantes de micotoxina. Sin embargo, el uso de tales rasgos antifúngicos hasta ahora no ha proporcionado soluciones prácticas convincentes en términos de eficacia y fiabilidad en la práctica agronómica.

Los fungicidas, tales como los IDM (inhibidores de desmetilación) sistémicos, son actualmente esenciales para el control de enfermedades de plantas tales como fusariosis para lograr el nivel de producción que se puede alcanzar con las modernas variedades de cultivo de alto rendimiento. Los fungicidas IDM, tales como tebuconazol, triadimefon y procloraz, inhiben la biosíntesis de ergosterol al unirse a la lanosterol C-14  $\alpha$ -desmetilasa del citocromo P450 (CYP51), lo que da como resultado la alteración de la integridad de la membrana fúngica (Yoshida: Lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase. En: Schenkman, H., Grein, K. (Eds.), Cytochromes P450. Springer-Verlag, Berlín, 1993. páginas 627-639). Sin embargo, la gran dependencia de los fungicidas IDM desde su descubrimiento a mediados de la década de 1970 ha llevado a la aparición de muchas cepas de fitopatógenos resistentes a IDM durante los últimos años. Por estas razones, el control de enfermedades de plantas causado por hongos y oomicetos fitopatógenos continúa siendo un reto.

Liu y col. (Fungal Genetics and Biology 2011, 48, 113-123) han documentado que los genes parálogos *cyp51* en *Fusarium graminearum* median la sensibilidad diferencial a los inhibidores de la desmetilación del esterol.

El ARN de interferencia, también conocido como "ARNi", ha surgido como una herramienta genética que aceleró la investigación en biotecnología de plantas. El ARNi es una parte integral conservada de los procesos de regulación génica presentes en todos los eucariotas. Para el ARNi en plantas, se ha usado la expresión alternativa "silenciamiento génico postranscripcional" (SGPT). El SGPT comienza con el procesamiento o la escisión de un ARN de doble cadena precursor en ARN de interferencia (ARNip) de cadena simple o doble de aproximadamente 20-25 ribonucleótidos de longitud, o micro ARN (ARNmi) (Hamilton & Baulcombe, Science 286:950-952. 1999) mediante una enzima de tipo RNAsaIII llamada Dicer (Baulcombe, Nature 431:356-363. 2004). Los ARNip o ARNmi se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, del inglés *RNA-induced silencing complex*) que reconoce moléculas de ARN mensajero (ARNm) complementarias y las degrada, lo que resulta en niveles sustancialmente reducidos de traducción de proteínas y la desactivación de manera eficaz del gen correspondiente.

La expresión de ARN de doble cadena *in planta* se ha descrito recientemente para inducir el silenciamiento génico inducido por la planta hospedadora (HIGS, del inglés *host plant- induce gene silencing*) en células fúngicas. En la planta del tabaco, se documentó que el casete de interferencia del gen GUS ( $\beta$ -glucuronidasa) reduce de manera específica los niveles del transcrito en una cepa de *Fusarium verticillioides* que expresa GUS durante la colonización de la planta (Tinoco y col., BMC Biol. 31(8):27. 2011). Nowara y col. (Plant Cell 22:3130-41. 2010) prepararon cebada que expresa un ARN de doble cadena dirigido al gen efector fúngico Avra10 y documentaron números reducidos de haustorios funcionales dentro de las células epidérmicas de las hojas. El silenciamiento transitorio de *Puccinia triticina* (roya foliar) mediado por *Agrobacterium tumefaciens* de genes de patogenicidad proteína cinasa 1 activada por mitógeno (PtMAPK1), ciclofilina (PtCYC1) y calcinoulina B (PtCNB) se describió que suprimía parcialmente el crecimiento de *P. triticina*, *P. graminis* y *P. striiformis* en trigo (Panwar y col., Plant J 73:521-32.

2013). Los cereales transgénicos que expresan construcciones de ARNi diseñadas para silenciar determinados genes críticos en patógenos que provocan enfermedades en cereales se describen en el documento WO 2012/155112.

5 Fue un objeto de la presente invención proporcionar una estrategia basada en ARNi contra fitopatógenos fúngicos y de oomicetos, y en particular, proporcionar un procedimiento y medios para controlar tales fitopatógenos en la práctica agronómica.

### Sumario de la invención

10 Los inventores han descubierto que el ARNi dirigido a al menos un gen CYP51 de un hongo u oomiceto fitopatógeno es eficaz en el control de tales fitopatógenos. Por consiguiente, los productos de protección de la planta y las plantas transgénicas basadas en dicha nueva estrategia pueden ser útiles en la producción de plantas de cultivo.

La presente invención proporciona una molécula de ARNdc capaz de inhibir la expresión del gen CYP51A, del gen CYP51B y del gen CYP51C de un fitopatógeno del género *Fusarium*. La molécula de ARNdc de la invención comprende:

- 15 (i) una secuencia sentido que es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia codificante del gen CYP51A,  
 (ii) una secuencia sentido que es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia codificante del gen CYP51B,  
 (iii) una secuencia sentido que es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia codificante del gen CYP51C, y  
 20 (iv) una secuencia antisentido que es sustancialmente complementaria a las secuencias sentido (i), (ii) y (iii),

en la que la disposición de las secuencias en la molécula de ARNdc permite la hibridación de cada secuencia sentido con su secuencia antisentido sustancialmente complementaria.

25 La presente invención proporciona adicionalmente una secuencia de ADN o una multitud de secuencias de ADN que proporcionan un molde transcripcional de al menos las secuencias antisentido de la molécula de ARNdc de la invención.

La presente invención proporciona adicionalmente los procedimientos para la preparación de una planta transgénica que comprende la introducción de tal(es) secuencia(s) de ADN de la invención en la planta.

30 También se proporcionan plantas transgénicas que comprenden la(s) secuencia(s) de ADN de la invención así como los procedimientos para controlar un fitopatógeno fúngico y/o de oomiceto, en las que los procedimientos comprenden el cultivo de una planta transgénica de la invención permita la generación de ARN que comprende las secuencias antisentido de las moléculas de ARNdc de la invención por la planta.

35 La presente invención proporciona adicionalmente composiciones para controlar un fitopatógeno fúngico y/o de oomiceto que comprende la molécula de ARNdc de la invención y un vehículo compatible con la planta así como procedimientos para controlar un fitopatógeno fúngico y/o de oomiceto, en la que una planta infestada por o en riesgo de ser infestada por dicho fitopatógeno y/o la proximidad de dicha planta está en contacto con tal composición de la invención.

### Breve descripción de las figuras

40 **Figura 1:** Morfología de macroconidias de *Fusarium graminearum* (*Fg*) cultivadas en cultivo axénico tras el tratamiento con *CYP3RNA* o tebuconazol. **(a)** Se suspendieron cien macroconidias de *Fg* en 100 µl de medio SNA líquido y se trataron con **(i)** 1,5 µg de ARNdc de *CYP3RNA*, **(ii)** 5 mg/l de tebuconazol y **(iii)** simulación (50x de tampón de alineamiento) a temperatura ambiente. Las imágenes se tomaron 72 horas después del tratamiento. Las flechas apuntan al hinchamiento y redondeamiento de las puntas de las hifas. **(b)** Cuantificación de transcritos fúngicos *CYP51A*, *CYP51B* y *CYP51C* mediante RT-PCR usando las mismas muestras tratadas con simulacro y *CYP3RNA* que en **(a)**. Los datos se normalizaron a β-tubulina.

45 **Figura 2:** Inhibición del crecimiento de macroconidias de *Fg* mediante *CYP3RNA*. Se suspendieron cien macroconidias de *Fg* en 100 µl de medio SNA líquido y se trataron con diferentes concentraciones de ARNdc de *CYP3RNA* en el intervalo de 75 pg a 1 µg de ARNdc. Las densidades de los cultivos de macroconidias de *Fg* se midieron al comienzo del tratamiento y a las 72 horas tras el tratamiento.

50 **Figura 3:** Síntomas de la infestación en hojas de *Arabidopsis* tras la inoculación con *Fg*. **(a)** Las hojas arrancadas de plantas de 5 semanas de edad se trataron con  $5 \times 10^4$  macroconidias de *Fg* ml<sup>-1</sup> y se evaluaron las lesiones necróticas a los 3 días tras la inoculación (dti). **(i)** Col-0 ts, **(ii)** Col-0 de control con vector vacío (vv), **(iii)** Col-0 que expresa *CYP3RNA* (L8 *Col-0-CYP3RNA*), y **(iv)** Col-0 inoculada con simulacro (Tween en agua). **(b)** Cuantificación del área de la hoja infestada por *Fg* a 3 dti; los síntomas típicos de infestación se expresan como un porcentaje del área total de la hoja. Las barras representan los valores medios ± DT de tres experimentos

independientes, cada uno de los cuales usan 20 hojas recolectadas de 15 plantas diferentes de cada línea de planta transgénica, así como las plantas Col-0 ts y Col-0 vv. La reducción en los síntomas de infestación en hojas que expresan CYP3RNA en comparación con los controles Col-0 ts y Col-0 vv fue estadísticamente significativa (\*\* $p < 0,0001$ ; prueba de la t de Student). (c) Hojas de Arabidopsis inoculadas con *Fg* a 5 dti. (i) La hoja de Col-0 vv está muy infestada por *Fg*; (ii) Col-0 que expresa CYP3RNA no presenta síntomas de infestación, aunque los micelios fúngicos son capaces de crecer en el agar que rodea a la hoja intacta y sin síntomas.

**Figura 4:** Abundancia de transcritos del gen CYP51 y ARNip en hojas de Arabidopsis inoculadas con *Fg*. (a-c) Análisis específicos de gen de transcritos CYP51 a 3 dti mediante qRT-PCR usando  $\beta$ -tubulina fúngica como el gen de referencia. (a) CYP51A, (b) CYP51B y (c) CYP51C. Se generó ADNc del ARN total aislado de hojas inoculadas con *Fg* recolectadas durante el ensayo de las hojas arrancadas. Las barras representan los valores medios  $\pm$  DT de tres colecciones de muestras independientes. La reducción en la expresión génica de CYP51 en las hojas de Col-0-CYP3RNA inoculadas con *Fg* en comparación con el control de vv fue estadísticamente significativa (\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ; prueba de la t de Student). (d). Detección de ARNip de bajo peso molecular complementario a los genes CYP51 en tejido foliar agrupado de plantas Arabidopsis no infestadas e infestadas por *Fg* a 3 dti. El análisis por transferencia de Northern que usa CYP3RNA marcado con  $^{32}P$  se siguió mediante autorradiografía. No se detectó señal en las muestras de control de plantas Col-0 y Col-0-vv. El ARNr teñido con bromuro de etidio en el panel inferior sirvió como control de carga.

**Figuras 5-9:** Estrategia de combinación de fragmentos (apilado) en pGEM-T-CYP3 (Fig. 5) para generar CYP3RNA, una construcción diseñada a partir de secuencias parciales de CYP51A (SEQ ID NO:4), CYP51B (SEQ ID NO:5) y CYP51C (SEQ ID NO:6) para silenciar los tres genes CYP51. (Fig. 6) *p7U10-RNAi*, un vector binario con promotores CaMV35S de repetición invertida. (Fig. 7) *p7U10-CYP3RNAi*, generado mediante sustitución del fragmento GUS en *p7U10-RNAi* por el fragmento CYP3RNA (CYP51B-CYP51A-CYP51C) usando las enzimas de restricción HindIII/XmaI. (Fig. 8) *p7i-Ubi-RNAi2*, un vector binario con promotores CaMV35S de repetición invertida. (Fig. 9) *p7i-Ubi-CYP3RNAi*, generado mediante sustitución del fragmento GUS en *p7i-Ubi-RNAi2* por un fragmento CYP51ABC (CYP51A-CYP51B-CYP51C) usando las enzimas de restricción HindIII/XmaI.

**Figura 10:** Hojas de cebada transgénica que expresan CYP51ABC (L2-L9, L14, L42), de una planta de control de tipo silvestre (var. Golden Promise; GP) y de una planta de control transgénica que solo comprende el vector de transfección (vector vacío; vv) 7 días tras la inoculación (7 dti= con *Fg* tal como se describe en el ejemplo 4.

**Figura 11:** Abundancia de transcritos del gen CYP51 en hojas de cebada inoculadas con *Fg*. (a-c) Análisis específicos de gen de transcritos CYP51 a 7 dti mediante qRT-PCR usando  $\beta$ -tubulina fúngica como el gen de referencia. (a) CYP51A, (b) CYP51B y (c) CYP51C. Se generó ADNc del ARN total aislado de hojas inoculadas con *Fg* recolectadas durante el ensayo de las hojas arrancadas.

**Figura 12:** Inhibición de crecimiento fúngico pulverizando hojas de cebada con ARNdc de CYP3RNA. Las hojas arrancadas de cebada se pulverizaron recubriendo el área (A) o de manera sistémica (B) con ARNdc de CYP3RNA ("ARN"), solo con tampón TE ("control" o ARNdc-GFP ("GFP")), respectivamente. 48 h después de la pulverización, las hojas se inocularon gota a gota con *Fg*. 6 días tras la infección, se registraron los síntomas de la infección (A, B) y se midió la cantidad relativa de ADN genómico de  $\beta$ -tubulina fúngica en hojas pulverizadas recubriendo la zona (C) o pulverizadas de forma sistémica (D), respectivamente, usando la PCR cuantitativa (qPCR). Los gráficos C y D muestran la cantidad relativa de ADN genómico de  $\beta$ -tubulina fúngica normalizada a la cantidad de ADN genómico de ubiquitina de la planta.

### **Descripción detallada de la invención**

#### 1) Definiciones

La expresión "fitopatógeno fúngico o de oomiceto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un hongo u oomiceto que es parásito en una planta hospedadora.

Los hongos fitopatógenos incluyen hongos del filo Ascomycota y Basidiomycota. La etapa de reproducción asexual (anamorfo) de tal hongo se puede conocer con un nombre diferente al de su etapa de reproducción sexual (teleomorfo). Por ejemplo, *Fusarium graminearum* se refiere al anamorfo y *Gibberella zeae* al teleomorfo de la misma especie fúngica. Para el fin de la presente invención, los nombres de Ascomycota y Basidiomycota usados en el presente documento pretenden referirse a las especies fúngicas *per se* en lugar de a una etapa de reproducción particular de las mismas.

Los genes CYP51 son genes que codifican una esteroil 14 $\alpha$ -desmetilasa del citocromo P450 (CYP51) y homólogos de la misma. Un fitopatógeno fúngico o de oomiceto puede tener más de un gen CYP51. Los diferentes genes CYP51 se pueden agrupar en clados mediante análisis filogenético molecular tal como se describe, por ejemplo, por Becher y col. (BMS Genomics 12: 52. 2011). Se han identificado tres clados de CYP51 para hongos del subfilo Pezizomycotina: CYP51A, CYP51B y CYP51C (citado anteriormente). Los genes CYP51, las proteínas CYP51 y las correspondientes secuencias codificantes de los hongos y oomicetos fitopatógenos se conocen en la materia y se pueden identificar mediante búsquedas de homología, por ejemplo, basándose en FGSG\_04092.3, FGSG\_01000.3

y FGSG\_11024.3, mediante análisis de secuencia tal como se describe, por ejemplo, por Becher y col. (BMS Genomics 12: 52. 2011; véase la sección de bioinformática), y a partir de las bases de datos tales como la base de datos del citocromo P450 fúngico (<http://p450.riceblast.snu.ac.kr>).

5 La expresión "molécula de ARNdc", tal como se usa en el presente documento para designar una materia objeto de la invención, se refiere a una molécula que comprende una, dos o más hebras de polirribonucleótidos capaces de formar al menos una región de ARN de doble cadena. De ese modo, la expresión "moléculas de ARNdc de la invención" incluye moléculas, en las que solo parte del ARN, por ejemplo, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % o todo el ARN está presente como ARN de cadena doble. Por ejemplo, la expresión "molécula de ARNdc" incluye moléculas que consisten en uno, dos o más hebras de polirribonucleótidos. También se incluyen en 10 la expresión moléculas que además comprenden grupos químicos adicionales, por ejemplo, grupos que estabilizan las regiones de ARN de cadena doble tal como se describe en el presente documento.

Se asume que el efecto de las moléculas de ARNdc de la invención se debe al ARN de interferencia. Los términos "ARNi" y "ARN de interferencia", usados en el presente documento, se refieren a un proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de la secuencia mediado por ARN de doble cadena. En el proceso del ARNi, se 15 transforma un ARN de doble cadena en fragmentos relativamente pequeños, típicamente de 20-25 nucleótidos de longitud, que llegan a ser parte del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) que se une a y escinde el ARNm complementario y, por lo tanto, evita que se use el ARNm como un molde para la traducción.

La expresión "interferencia antisentido" también se refiere a un proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de la secuencia. En la interferencia antisentido, un ARN monocatenario antisentido (ARNmc antisentido) 20 que es sustancialmente complementario a al menos una parte de un gen diana provoca la inhibición de la expresión del gen diana. Se asume que en este proceso, se forma ARN de cadena doble que se forma mediante la hibridación del ARNmc antisentido que hibrida con el ARNm complementario e inhibe la expresión del gen diana usando el mecanismo del ARNi.

La expresión "al menos parte de", cuando se usa con referencia a una secuencia, por ejemplo, con referencia a la secuencia codificante de un gen CYP51, se refiere a al menos 20 nucleótidos contiguos de dicha secuencia. Por ejemplo, "al menos parte de" se refiere a al menos 25, al menos 50, al menos 100, al menos 150 y preferentemente al menos 200 nucleótidos contiguos de la secuencia.

Un "alto grado de identidad", tal como se usa en el presente documento para definir el grado de identidad de secuencia de una secuencia sentido para al menos parte de la secuencia codificante de un gen CYP51 o una 30 cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6 y 8-13, se refiere a una identidad de al menos el 70 %, tal como, por ejemplo, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90 % y preferentemente se refiere a al menos el 95 % o al menos el 98 % y lo más preferentemente se refiere a al menos el 99 % o el 100 %.

Con relación a la identidad de secuencia entre las secuencias de ARN y de ADN, se considera un uracilo en una secuencia de ARN "idéntico" a una timina en una secuencia de ADN. Los procedimientos y las herramientas tales como programas informáticos para calcular la identidad de secuencia son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, 35 el grado de identidad entre las secuencias de nucleótidos se puede determinar usando una herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST, del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*) tal como BLAST de búsqueda de similitud (alineamiento con huecos) disponible en la página web del Broad Institute ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium\\_graminearum/Blast.html?sp=Sblastn](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_graminearum/Blast.html?sp=Sblastn)).

40 Una "secuencia antisentido" tal como se comprende por las moléculas de ARNdc de la presente invención es una secuencia de ARN que es sustancialmente complementaria a la correspondiente secuencia sentido.

Los polinucleótidos "complementarios" son aquellos de emparejar sus bases de acuerdo con las reglas de complementariedad de Watson y Crick. Específicamente, se formarán pares de bases entre purinas y pirimidinas que incluyen el emparejamiento de guanina con citosina (G:C) y el emparejamiento de adenina bien con timina (A:T) 45 en el caso del ADN o bien el emparejamiento de adenina con uracilo (A:U) en el caso del ARN. Se entiende que dos polinucleótidos pueden hibridar entre sí incluso si no son completamente complementarios entre sí, siempre que cada una tenga al menos una región que es sustancialmente complementaria con la otra.

La expresión "sustancialmente complementaria", tal como se usa en el presente documento, por ejemplo, para caracterizar las secuencias antisentido de la molécula de ARNdc de la invención, significa que dos secuencias de 50 nucleótidos son complementarias en al menos el 80 % de sus nucleótidos. Preferentemente, las dos secuencias de nucleótidos son complementarias en al menos el 85 %, al menos el 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, y lo más preferentemente al menos el 99 % de los nucleótidos hasta su longitud completa. Como alternativa, "sustancialmente complementaria" se puede referir a dos secuencias de ácido nucleico que pueden hibridar en condiciones rigurosas.

55 El término "hibridación", tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier proceso mediante el cual una cadena de polinucleótidos se une con una cadena complementaria mediante emparejamiento de bases. (Coombs: Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, Nueva York, 1994). La hibridación y la fuerza de hibridación (es decir, la fuerza de asociación entre las dos cadenas complementarias) están influenciadas por factores tales como el grado

de complementariedad entre las cadenas, la rigurosidad de las condiciones implicadas, la temperatura de fusión de la doble cadena formada y la proporción de G:C en las cadenas. La temperatura de fusión (Tf) es la temperatura a la cual un grupo de polinucleótidos de cadena doble llega a estar semidisociada en cadenas simples. La Tf se puede calcular usando ecuaciones bien conocidas en la materia. Se da una estimación del valor de la Tf de un polinucleótido en una solución acuosa de NaCl 1 M mediante la ecuación:  $Tf=81,5+0,41(\% G+C)$  (véase, por ejemplo, Anderson y Young: Quantitative Filter Hybridization, en Nucleic Acid Hybridization, 1985). Las condiciones rigurosas son conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1989). En particular, la expresión "condiciones rigurosas", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una hibridación con ácido nucleico unido a un filtro en 6x de cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C seguido por uno o más lavados en 0,2x de SSC/SDS (dodecilsulfato de sodio) al 0,1 % a aproximadamente 50-65 °C.

El término "expresión", tal como se usa en el presente documento con respecto a una secuencia génica, se refiere a la traducción de la secuencia codificante a un polipéptido. La inhibición de la expresión génica puede llegar a ser detectable a nivel de ARNm, a nivel del polipéptido o ambos. Los procedimientos para evaluar cambios a nivel de ARNm o a nivel de proteína de un gen son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, el cambio a nivel de ARNm de un gen se puede evaluar mediante una PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) o análisis por transferencia de Northern.

El "control" de un hongo u oomiceto fitopatógeno, tal como se usa en el presente documento, incluye medidas de prevención de la infestación de una planta por dicho patógeno así como medidas para combatir o curar la infestación de una planta por el patógeno. El término "combatir" se refiere a la reducción de la infestación por el patógeno. El término "curar" se refiere a la erradicación de la infestación por el patógeno.

Un vehículo "fitocompatible", tal como se usa en el presente documento, es un compuesto o una mezcla de compuestos que, en condiciones de su uso, no genera una actividad fitotóxica inaceptable para la planta tratada.

El término "planta" se usa en el presente documento para designar una planta completa en cualquier etapa de desarrollo, así como una parte o derivado de la misma, y por lo tanto, incluye, por ejemplo, una célula vegetal, un grupo de células vegetales, un tejido vegetal (por ejemplo, un tejido meristemático, tejido calloso), un órgano vegetal (por ejemplo, tallo, hojas, raíz, óvulo, estambre), una forma reproductiva o una parte reproductiva de una planta (por ejemplo, una semilla, tubérculo, esqueje, gametofito, esporofito, polen, microspora, embrión). Una célula vegetal o un grupo de células vegetales puede estar aislado (por ejemplo, en un cultivo en suspensión) o comprendido en un tejido vegetal, en un órgano vegetal o planta completa de cualquier etapa del desarrollo.

Una planta "transgénica" es una planta completa o una parte de la misma que se ha alterado usando la tecnología del ADN recombinante para que contenga una secuencia de ácido nucleico que de otro modo no estaría presente en dicha planta o que se habría expresado en un grado considerablemente menor. El término "planta transgénica" también incluye la progenie transgénica de una planta transgénica. una planta transgénica de la presente invención puede ser resultado de un cruzamiento de una planta transgénica de la invención con una planta no transgénica o con otra planta transgénica de la invención o con una planta transgénica que tiene un transgen diferente. En particular, el término "planta transgénica" también comprende el cultivo de verdaderas plantas transgénicas que se obtienen mediante etapas repetidas de endogamia.

Un "molde transcripcional" de una secuencia de ARN es una secuencia de ADN que puede servir como un molde para la generación del ARN mediante transcripción de enzimas con una ARN polimerasa.

El término "promotor", cuando se usa en el presente documento en el ámbito de la(s) secuencia(s) de ácido nucleico de la invención, se refiere al singular así como al plural, salvo que se indique explícitamente lo contrario. Un "promotor", tal como se usa en el presente documento, es una secuencia de ADN que, cuando se une a una secuencia de ADN de interés, es capaz de controlar la transcripción de dicha secuencia de ADN en ARN. Un promotor se localiza típicamente en 5' (por ejemplo, aguas arriba) de la secuencia de ADN de interés cuya transcripción a ARNm controla (por ejemplo, próximo al sitio de comienzo de la transcripción), y proporciona un sitio para la unión específica mediante ARN polimerasa y otros factores de transcripción para la iniciación de la transcripción. Un promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor regulado.

Un "promotor regulado" es un promotor que dirige la transcripción de manera no constitutiva pero de forma temporal y/o espacialmente restringida. Un promotor es regulado si la cantidad de ARN producida bajo el control del promotor activado es al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 % o 300 % superior a la cantidad de ARN producida en partes de la planta o en períodos de tiempo, en los que el promotor no está activado. Los promotores regulados incluyen promotores inducibles, promotores específicos de tejidos y promotores específicos del desarrollo. Los promotores específicos de tejido o específicos del desarrollo facilitan la transcripción de una secuencia de interés en tejidos específicos, órganos o tipos celulares, o en diferentes etapas específicas del desarrollo mientras que dejan al resto del organismo sin modificar. En el caso de las plantas, tales promotores pueden influir de manera específica en la expresión de genes en las raíces, inflorescencia, espigas de cereales, frutos o semillas, o durante la etapa vegetativa, de florecimiento o de establecimiento de la semilla. Los promotores inducibles facilitan la transcripción de una secuencia de interés en presencia o ausencia de compuestos químicos

particulares (por ejemplo, un alcohol, tetraciclina, un esteroide o un metal) o dependiendo de las condiciones físicas particulares (por ejemplo, la presencia o ausencia de luz, bajas o altas temperaturas).

La expresión "tolerante para fitopatógenos" se usa en el presente documento para designar una planta transgénica de la invención capaz de reducir o prevenir el crecimiento y/o la propagación del fitopatógeno. La tolerancia al fitopatógeno puede ser transitoria, es decir, está presente durante un período de tiempo limitado, por ejemplo, debido a una expresión transitoria del ARNmc antisentido de la invención o la molécula de ARNdc descrita en el presente documento. Una planta que es "tolerante" a un fitopatógeno está infestada con menor gravedad y/o menor frecuencia por el fitopatógeno. La gravedad de la infestación del hongo u oomiceto se puede determinar basándose en los síntomas de la enfermedad observados después de que la planta se haya inoculado con o sea atacada por el fitopatógeno. Los síntomas de la enfermedad dependen de la naturaleza (especie, variedad) del fitopatógeno y de la planta. Los síntomas de infestaciones fúngicas o de oomicetos incluyen, pero sin limitación, el blanqueo prematuro de las espigas de los cereales y/o de las hojas; lesiones necróticas de la superficie exterior de los flósculos y de la gluma; atrofia del grano; deformación de la arista; decoloración de los granos y/o espiguillas; crecimiento del patógeno visible sobre las hojas, el tallo y/o las espigas de cereales.

## 2) Realizaciones particulares de la invención

La presente invención se refiere a moléculas de ARNdc y a secuencias de ADN que proporcionan moldes transcripcionales de ARNmc antisentido capaces de inhibir la expresión de genes CYP51 de un fitopatógeno del género *Fusarium*.

Además, las moléculas de ARNdc y el ARNmc antisentido descrito en el presente documento son capaces de reducir o evitar el crecimiento y/o la propagación de fitopatógenos fúngicos o de oomicetos. Específicamente, las moléculas de ARNdc y el ARNmc antisentido descritos en el presente documento son capaces de reducir o de erradicar la infestación de una planta por fitopatógenos fúngicos o de oomicetos, en los que dicha planta contiene y/o se trata con dichas moléculas de ARNdc o el ARNmc antisentido.

Las moléculas de ARNdc y el ARNmc antisentido descritos en el presente documento son útiles para controlar hongos y oomicetos fitopatógenos que incluyen, pero sin limitación, *Albugo* spp. (roya blanca) en plantas ornamentales, hortalizas (por ejemplo, *A. candida*) y girasoles (por ejemplo, *A. tragopogonis*); *Alternaria* spp. (mancha foliar de *Alternaria*) en hortalizas, colza (*A. brassicola* o *brassicae*), remolachas azucareras (*A. tenuis*), frutas, arroz, soja, patatas (por ejemplo *A. solani* o *A. alternata*), tomates (por ejemplo *A. solani* o *A. alternata*) y trigo; *Aphanomyces* spp. en remolachas azucareras y hortalizas; *Ascochyta* spp. en cereales y hortalizas, por ejemplo *A. tritici/c/* (antracnosis) en trigo y *A. hordei* en cebada; *Bipolaris* y *Drechslera* spp. (teleomorfo: *Cochliobolus* spp.), por ejemplo, tizón sureño de la hoja (*D. maydis*) o tizón norteño de la hoja (*B. zeicola*) en maíz, por ejemplo la mancha parda (*B. sorokiniana*) en cereales y por ejemplo *B. oryzae* en arroz y césped; *Blumeria* (formalmente *Erysiphe graminis* (oidio) en cereales (por ejemplo, en trigo o cebada); *Botrytis cinerea* (teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana*: moho gris) en frutos y bayas (por ejemplo, fresas), hortalizas (por ejemplo, lechuga, zanahorias, apio y coles), colza, flores, vides, plantas forestales y trigo; *Bremia lactucae* (mildió veloso) en lechugas; *Ceratocystis* (sin. *Ophiostoma*) spp. (podredumbre o marchitez) en árboles frondosos y árboles de hoja perenne, por ejemplo *C. ulmi* (enfermedad del olmo holandés) en olmos; *Cercospora* spp. (manchas foliares de *Cercospora*) en maíz (por ejemplo, mancha foliar gris: *C. zeaemaydis*), arroz, remolacha azucarera (por ejemplo *C. beticola*), caña de azúcar, hortalizas, café, soja (por ejemplo, *C. sojina* o *C. kikuchii*) y arroz; *Cladosporium* spp. en tomates (por ejemplo *C. fulvum*: moho foliar) y cereales, por ejemplo, *C. herbarum* (espiga negra) en trigo; *Claviceps purpurea* (cornezuelo) en cereales; *Cochliobolus* (anamorfo: *Helminthosporium* de *Bipolaris*) spp. (manchas foliares) en maíz (*C. carbonum*), cereales (por ejemplo, *C. sativus*, anamorfo: *B. sorokiniana*) y arroz (por ejemplo *C. miyabeanus*, anamorfo: *H. oryzae*); *Colletotrichum* (teleomorfo: *Glomerella*) spp. (antracnosis) en algodón (por ejemplo *C. gossypii*), maíz (por ejemplo, *C. graminicola*: podredumbre del tallo por antracnosis), frutos blandos, patatas (por ejemplo, *C. coccodes*: mancha negra), judías (por ejemplo *C. lindemuthianum*) y soja (por ejemplo *C. truncatum* o *C. gloeosporioides*); *Corticium* spp., por ejemplo, *C. sasakii* (tizón de la vaina) en arroz; *Corynespora cassiicola* (manchas foliares) en soja y plantas ornamentales; *Cyloconium* spp., por ejemplo, *C. oleaginum* en olivos; *Cylindrocarpon* spp. (por ejemplo, decaimiento del árbol frutal o declive de la vid joven, teleomorfo: *Nectria* o *Neonectria* spp.) en árboles frutales, vides (por ejemplo, *C. liriodendri*, teleomorfo: *Neonectria liriodendri*: Enfermedad del pie negro) y plantas ornamentales; *Dematophora* (teleomorfo: *Rosellinia necatrix*) (podredumbre de la raíz y del tallo) en soja; *Diaporthe* spp., por ejemplo, *D. phaseolorum* (marchitamiento fúngico) en soja; *Drechslera* (sin. *Helminthosporium*, teleomorfo: *Pyrenophora*) spp. en maíz, cereales, tales como la cebada (por ejemplo *D. teres*, mancha reticulada) y trigo (por ejemplo, *D. tritici-repentis*: mancha parda), arroz y césped; Esca (muerte regresiva, apoplejía) en vides, causados por *Formitiporia* (sin. *Phellinus punctata*, *F. mediterranea*, *Phaeoconiella chlamydospora* (antes *Phaeoacremonium chlamydosporum*), *Phaeoacremonium aleophilum* y/o *Botryosphaeria obtusa*; *Elsinoe* spp. en frutas pomáceas (*E. pyri*), frutos blandos (*E. veneta*: antracnosis) y vides (*E. ampelina*: antracnosis); *Entyloma oryzae* (tizón foliar) en arroz; *Epicoccum* spp. (moho negro) en trigo; *Erysiphe* spp. (oidio) en remolachas azucareras (*E. betae*), hortalizas (por ejemplo *E. pisi*), tales como cucurbitáceas (por ejemplo *E. cichoracearum*), coles, colza (por ejemplo, *E. cruciferarum*); *Eutypa lata* (decaimiento o muerte regresiva de *Eutypa*, anamorfo: *Cytosporina lata*, sin. *Libertella blepharis*) en árboles frutales, vides y árboles ornamentales; *Exserohilum* (sin. *Helminthosporium*) spp. en maíz (por ejemplo, *E. turcicum*); *Fusarium* (teleomorfo: *Gibberella*) spp. (marchitiz, podredumbre de raíz o tallo) en diversas plantas, tales como *F. graminearum* o *F. culmorum* (podredumbre de raíz, sarna o tizón de la espiga) en cereales

(por ejemplo, trigo o cebada), *F. oxysporum* en tomates, *F. solani* (f. sp. *glycines* ahora sin. *F. virguliforme*) y *F. tucumaniae* y *F. brasiliense* causando cada uno el síndrome de la muerte súbita en la soja, y *F. verticillioides* en maíz; *Gaeumannomyces graminis* (mal del pie) en cereales (por ejemplo, trigo o cebada) y maíz; *Gibberella* spp. en cereales (por ejemplo *G. zeae*) y arroz (por ejemplo, *G. fujikuroi*: enfermedad de Bakanae); *Glomerella cingulata* en vides, frutas pomáceas y otras plantas y *G. gossypii* en algodón; complejo de tinción de grano en arroz; *Guignardia bidwellii* (podredumbre negra) en vides; *Gymnosporangium* spp. en plantas rosáceas y enebros, por ejemplo, *G. sabiniae* (roya) en peras; *Helminthosporium* spp. (sin. *Drechslera*, teleomorfo: *Cochliobolus*) en maíz, cereales y arroz; *Hemileia* spp., por ejemplo *H. vastatrix* (roya de la hoja del café) en el café; *Isariopsis clavispora* (sin. *Cladosporium vitis*) en vides; *Macrophomina phaseolina* (sin. *phaseoli*) (podredumbre del tallo y de la raíz) en soja y algodón; *Microdochium* (sin. *Fusarium*) *nivale* (moho de nieve rosa) en cereales (por ejemplo, trigo o cebada); *Microsphaera diffusa* (oidio) en soja; *Monilinia* spp., por ejemplo, *M. laxa*, *M. fructicola* y *M. fructigena* (tizón de la floración y de las ramitas, podredumbre marrón) en frutos con hueso y otras plantas rosáceas; *Mycosphaerella* spp. en cereales, plátanos, frutos blandos y cacahuetes, tales como por ejemplo *M. graminicola* (anamorfo: *Septoria tritici*, mancha de Septoria) en trigo o *M. fijiensis* (enfermedad de Sigatoka negra) en plátanos; *Peronospora* spp. (mildiú lanoso) en coles (por ejemplo, *P. brassicae*), colza (por ejemplo, *P. parasitica*), cebollas (por ejemplo *P. destructor*), tabaco (*P. tabacina*) y soja (por ejemplo, *P. manshurica*); *Phakopsora pachyrhizi* y *P. meibomiae* (roya de la soja) en soja; *Phialophora* spp. por ejemplo en vides (por ejemplo *P. tracheiphila* y *P. tetraspora*) y soja (por ejemplo, *P. gregata*: podredumbre del tallo); *Phoma lingam* (podredumbre de la raíz y del tallo) en colza y col y *P. betae* (podredumbre de la raíz, mancha foliar y marchitamiento) en remolachas azucareras; *Phomopsis* spp. en girasoles, vides (por ejemplo, *P. viticola*: mancha de caña y hoja) y soja (por ejemplo, podredumbre del tallo: *P. phaseoli*, teleomorfo: *Diaporthe phaseolorum*); *Physoderma maydis* (manchas pardas) en maíz; *Phytophthora* spp. (marchitez, podredumbre de raíz, hojas, fruto y tallo) en diversas plantas, tales como pimentón y cucurbitáceas (por ejemplo, *P. capsici*), soja (por ejemplo, *P. megasperma*, sin. *P. sojae*), patatas y tomates (por ejemplo *P. infestans*: tizón tardío) en árboles frondosos (por ejemplo, *P. ramorum*: muerte súbita del roble); *Plasmodiophora brassicae* (hernia de la col) en col, colza, rábano y otras plantas; *Plasmopara* spp., por ejemplo, *P. viticola* (mildiú lanoso de la vid) en vides y *P. halstedii* en girasoles; *Podosphaera* spp. (oidio) en plantas rosáceas, lúpulo, pomo y frutos blandos, por ejemplo, *P. leucotricha* en manzanas; *Polymyxa* spp., por ejemplo, en cereales, tales como cebada y trigo (*P. graminis*) y remolachas azucareras (*P. betae*) y, por lo tanto, enfermedades víricas transmitidas; *Pseudocercospora herpotrichoides* (cercosporiosis, teleomorfo: *Tapesia yallundae*) en cereales, por ejemplo, trigo o cebada; *Pseudoperonospora* (mildiú lanoso) en diversas plantas, por ejemplo, *P. cubensis* en cucurbitáceas o *P. humili* en lúpulo; *Pseudopezizula tracheiphila* (enfermedad de fuego rojo o enrojecimiento parasitario, anamorfo: *Phialophora*) en vides; *Puccinia* spp. (roya) en diversas plantas, por ejemplo, *P. triticina* (roya marrón o foliar), *P. striiformis* (roya lineal amarilla), *P. hordei* (roya enana), *P. graminis* (roya negra o del tallo) o *P. recondita* (roya marrón o foliar) en cereales, tales como, por ejemplo, trigo, cebada o arroz, *P. kuehnii* (roya naranja) en caña de azúcar y *P. asparagi* en espárragos; *Pyrenophora* (anamorfo: *Drechslera*) *tritici-repentis* (mancha parda) en trigo o *P. teres* (mancha reticulada) en cebada; *Pyricularia* spp., por ejemplo, *P. oryzae* (teleomorfo: *Magnaporthe grisea*, añublo del arroz) en arroz y *P. grisea* en césped y cereales; *Pythium* spp. (marchitamiento) en césped, arroz, maíz, trigo, algodón, colza, girasoles, soja, remolacha azucarera, hortalizas y otras diversas plantas (por ejemplo, *P. ultimum* o *P. aphanidermatum*); *Ramularia* spp., por ejemplo *R. collo-cygni* (manchas foliares de Ramularia, manchas foliares fisiológicas) en cebada y *R. beticola* en remolachas azucareras; *Rhizoctonia* spp. en algodón, arroz, patatas, césped, maíz, colza, patatas, remolacha azucarera, hortalizas y otras diversas plantas, por ejemplo, *R. solani* (podredumbre de raíz y tallo) en soja, *R. solani* (tizón de la vaina) en arroz o *R. cerealis* (tizón de la primavera de Rizoctonia) en trigo o cebada; *Rhizopus stolonifer* (moho negro, podredumbre blanda) en fresas, zanahorias, col, vides y tomates; *Rhynchosporium secalis* (escaldadura) en cebada, arroz y triticale; *Sarocladium oryzae* y *S. attenuatum* (podredumbre de la vaina) en arroz; *Sclerotinia* spp. (podredumbre del tallo o moho blanco) en hortalizas y cultivos de campo, tales como colza, girasoles (por ejemplo, *S. sclerotiorum*) y soja (por ejemplo, *S. rolfsii* o *S. sclerotiorum*); *Septoria* spp. en diversas plantas, por ejemplo, *S. glycines* (mancha marrón) en soja, *S. tritici* (mancha de Septoria) en trigo y *S.* (sin. *Stagonospora*) *nodorum* (mancha de Stagonospora) en cereales; *Ucinula* (sin. *Erysiphe*) *necator* (oidio, anamorfo: *Oidium tuckeri*) en vides; *Setospaeria* spp. (tizón foliar) en maíz (por ejemplo, *S. turcicum*, sin. *Helminthosporium turcicum*) y césped; *Sphaerotheca fuliginea* spp. (tizón) en maíz, (por ejemplo, *S. reiliana*: tizón de la espiga), sorgo y caña de azúcar; *Sphaerotheca fuliginea* (oidio) en cucurbitáceas; *Spongospora subterranea* (sarna pulverulenta) en patatas y, por lo tanto, enfermedades víricas transmitidas; *Stagonospora* spp. en cereales, por ejemplo, *S. nodorum* (mancha de Stagonospora, teleomorfo: *Leptosphaeria* [sin. *Phaeosphaeria*] *nodorum*) en trigo; *Synchytrium endobioticum* en patatas (sarna verrugosa de la patata); *Taphrina* spp., por ejemplo, *T. deformans* (enfermedad de enrollamiento foliar) en melocotones y *T. pruni* (ciruela pequeña) en ciruelas; *Thielaviopsis* spp. (podredumbre negra de la raíz) en la planta del tabaco, frutas pomáceas, hortalizas, soja y algodón, por ejemplo, *T. basicola* (sin. *Chalara elegans*); *Tilletia* spp. (copo común o tizón apestoso) en cereales, tales como por ejemplo *T. tritici* (sin. *T. caries*, copo del trigo) y *T. cantraversa* (copo enano) en trigo; *Typhula incarnata* (moho de nieve gris) en cebada o trigo; *Urocystis* spp., por ejemplo, *U. occulta* (tizón del tallo) en arroz; *Uromyces* spp. (roya) en hortalizas, tales como judías (por ejemplo *U. appendiculatus*, sin. *U. phaseoll*) y remolachas azucareras (por ejemplo *U. betae*); *Ustilago* spp. (carbón desnudo) en cereales (por ejemplo *U. nuda* y *U. avenae*), maíz (por ejemplo, *U. maydis*, tizón del maíz) y caña de azúcar; *venturia* spp. (sarna) en manzanas (por ejemplo, *V. inaequalis*) y peras; y *Verticillium* spp. (marchitez) en diversas plantas, tales como frutales y ornamentales, vides, frutos blandos, hortalizas y cultivos de campo, por ejemplo, *V. dahliae* en fresas, colza, patatas y tomates.

En particular, las moléculas de ARNdc y el ARNmc antisentido descrito en el presente documento son capaces de



inhibir la expresión de al menos un gen CYP51 de un fitopatógeno fúngico o de oomiceto seleccionado de los géneros *Fusarium*, *Blumeria*, *Magnaporthe*, *Sclerotinia*, *Phakopsora*, *Botrytis*, *Puccinia*, *Pyrenophora*, *Phaeosphaeria*, *Fez*, *Cochliobolus*, *Ustilago*, *Rhynchosporium* y *Venturia*. Los fitopatógenos particulares de estos géneros y sus genes CYP51 se enumeran en la Tabla 1 a continuación. Preferentemente, el fitopatógeno es un hongo del género *Fusarium*.

5

Tabla 1: Fitopatógenos fúngicos y de oomicetos y genes CYP51 de los mismos

Fitopatógeno	Enfermedades	gen(es) CYP51 [SEQ ID NO de la secuencia codificante]
<i>Fusarium graminearum</i> (Fg)	tizón de la espiga en trigo, cenada y otros cultivos de cereales	CYP51A (FGSG-04092.3) <sup>1</sup> [1] CYP51B (FGSG_01000.3) <sup>1</sup> [2] CYP51C (FGSG_11024.3) <sup>1</sup> [3]
<i>Fusarium oxysporum</i>	marchitez de tomate y otros cultivos	CYP51A (FOXG_11545.2) <sup>1</sup> [8] CYP51B (FOXG_00394.2) <sup>1</sup> [9] CYP51C (FOXG_13138.2) <sup>1</sup> [10]
<i>Fusarium verticillioides</i>	podredumbre de la mazorca de maíz	CYP51A (FVEG_10277.3) <sup>1</sup> [11] CYP518 (FVEG_01123.3) <sup>1</sup> [12] CYP51C (FVEG_12391.3) <sup>1</sup> [13]
<i>Blumeria graminis</i>	oídio en céspedes	CYP51 [14]
<i>Magnaporthe grisea</i>	Tizón de la plántula del arroz, añublo del arroz, mancha foliar ovalada de gramínea, enfermedad de la picadura, añublo de la ballica y mancha de Johnson	CYP51A [15] CYP51B [16]
<i>Sclerotinia sclerotinium</i>	Moho blanco, podredumbre del algodón, podredumbre blanda acuosa, podredumbre del tallo, gotas, podredumbre de la copa y tizón de las flores	CYP51B [17]
<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	Roya de la soja asiática	CYP51 [18]
<i>Botrytis cinerea</i>	Tizón de las flores y podredumbre del fruto también como manchas foliares y podredumbre del bulbo	CYP51B [19]
<i>Puccinia triticina</i>	Enfermedad de la roya en cereales	CYP51 [20]
<i>Puccinia graminis</i>	Enfermedad de la roya en cereales	CYP51 [21]
<i>Puccinia recondita</i>	Enfermedad de la roya en cereales	CYP51 [22]
<i>Pyrenophora teres</i>	Mancha de la cebada, mancha reticulada, y mancha reticulada de forma puntuada	CYP51 [23]
<i>Pyrenophora tritici</i>	Mancha parda o helmintosporiosis en cereales	CYP51A [24] CYP51B [25]
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	Mancha de la gluma y mancha de Septoria nodorum	CYP51B [26]
<i>Septoria tritici</i>	Mancha foliar de Septoria	CYP51 [27]
<i>Cochliobolus sativus</i>	Mancha puntuada y podredumbre común de la raíz	CYP51B [28]
<i>Ustilago maydis</i>	Enfermedad del tizón en maíz	CYP51 [29]
<i>Rhynchosporium secalis</i>	Escaldadura de la cenada y del centeno	CYP51 [30]

(continuación)

Fitopatógeno	Enfermedades		
<i>Venturia inaequalis</i>	Enfermedad de sarna de la manzana	CYP51	[31]
<sup>1</sup> Las designaciones del gen se refieren a los loci en la base de datos comparativa de <i>Fusarium</i> accesible a través de, por ejemplo, la página web del Broad Institute ( <a href="http://www.broadinstitute.org">http://www.broadinstitute.org</a> ).			

La molécula de ARNdc es capaz de inhibir la expresión de una, dos, tres o todos los genes CYP51 de un fitopatógeno fúngico o de oomiceto y preferentemente es capaz de inhibir todos los genes CYP51 del fitopatógeno. La molécula de ARNdc de la invención es capaz de inhibir la expresión del gen CYP51A, el gen CYP51B y el gen CYP51C de un hongo fitopatógeno del género *Fusarium*.

Por ejemplo, el(los) gen(es) CYP51 a inhibir mediante la molécula de ARNdc descrita en el presente documento se selecciona(n) de los genes CYP51 de un fitopatógeno enumerado en la Tabla 1.

La molécula de ARNdc de puede estabilizar contra la degradación química y enzimática indeseada reduciendo la disociación del ARN de cadena doble en ARN de cadena simple no hibridado. Para este fin, las dos secuencias de ribonucleótidos de hibridación o las regiones adyacentes a las mismas se pueden unir de manera química entre sí tal como se describe, por ejemplo, en el documento US 2008/0171861 A1. Los grupos de unión química adecuados para las regiones de estabilización del ARN de cadena doble incluyen, pero sin limitación, análogos de purina que sustituyen purinas y análogos de nucleótidos ramificados que sustituyen nucleótidos. La molécula de ARNdc también se puede estabilizar contra la degradación enzimática indeseada mediante modificaciones de ribonucleótidos. Las modificaciones de ribonucleótidos adecuadas incluyen la sustitución del grupo 2'-hidroxilo de uno o más de un ribonucleótido mediante, preferentemente, un grupo 2'-amino o 2'-metilo; y la sustitución de uno o más de un ribonucleótido por el mismo número de nucleótidos bloqueados correspondientes, en los que el anillo de azúcar está químicamente modificado, preferentemente por un puente de 2'-O 4'-C metileno.

Las moléculas de ARNdc descritas en el presente documento comprenden una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la secuencia codificante de un gen CYP51 de un fitopatógeno fúngico o de oomiceto, y una secuencia antisentido que es sustancialmente complementaria con dicha secuencia sentido. En este contexto, una "secuencia sentido" se refiere a una o más de una secuencia sentido, y un "gen CYP51" se refiere a uno o más de un gen CYP51. Ventajosamente, las secuencias antisentido abarcan una secuencia antisentido sustancialmente complementaria para cada secuencia sentido comprendida por la misma molécula de ARNdc. Generalmente, las expresiones tales como "una secuencia sentido", "una secuencia antisentido", "un polinucleótido", "un gen CYP51", cuando se usan en el presente documento, se refieren al singular así como al plural, a menos que se indique otra cosa.

Por consiguiente, las moléculas de ARNdc descritas en el presente documento pueden comprender

una primera secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la secuencia codificante de un primer gen CYP51, y una segunda secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la secuencia codificante de un segundo gen CYP51,

en el que el primer gen CYP51 y el segundo gen CYP51 son diferentes genes CYP51 de un fitopatógeno fúngico o de oomiceto.

De manera más específica, las moléculas de ARNdc descritas en el presente documento pueden comprender

una primera secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la secuencia codificante de un primer gen CYP51, una segunda secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la secuencia codificante de un segundo gen CYP51, y una tercera secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la secuencia codificante de un segundo gen CYP51,

en la que el primer gen CYP51, el segundo gen CYP51 y el tercer gen CYP51 son diferentes genes CYP51 de un fitopatógeno fúngico o de oomiceto.

La secuencia codificante del al menos un gen CYP51, por ejemplo, el primer, el segundo y el tercer gen CYP51, se puede seleccionar de las secuencias codificantes de los genes CYP51 enumerados en la Tabla 1.

De acuerdo con un aspecto de la invención, la molécula de ARNdc es capaz de inhibir la expresión del gen CYP51A, del gen CYP51B y del gen CYP51C de *Fusarium graminearum*, y comprende (i) una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO:1 o 4, (ii) una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO:2 o 5, (iii) una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO:3 o 6, y (iv) secuencias antisentido que son sustancialmente complementarias a dichas secuencias sentido (i), (ii) y (iii); en la que la disposición de las secuencias en la molécula

de ARNdc permite la hibridación de cada secuencia sentido con su secuencia antisentido sustancialmente complementaria. De acuerdo con realizaciones particulares de dicho aspecto de la invención, la molécula de ARNdc:

- (a) es capaz de inhibir la expresión del gen CYP51A de *Fusarium graminearum* y comprende una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:4; y
- (b) es capaz de inhibir la expresión del gen CYP51B de *Fusarium graminearum* y comprende una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:5; y
- (c) es capaz de inhibir la expresión del gen CYP51C de *Fusarium graminearum* y comprende una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO:3 o la SEQ ID NO:6.

De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, la molécula de ARNdc es capaz de inhibir la expresión de al menos un gen CYP51 de *Fusarium graminearum* y comprende una secuencia sentido que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, preferentemente al menos el 95 % o al menos el 98 %, y lo más preferentemente al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la SEQ ID NO:7, y una secuencia antisentido que es sustancialmente complementaria a dicha secuencia sentido; en la que la disposición de las secuencias en la molécula de ARNdc permite la hibridación de dicha secuencia sentido y dicha secuencia antisentido correspondiente. De acuerdo con realizaciones particulares de dicho aspecto de la invención, la molécula de ARNdc consiste en dicha secuencia sentido y dicha secuencia antisentido. Por ejemplo, dicha molécula de ARNdc puede consistir en una primera cadena de ARN que tiene dicha secuencia sentido y una segunda secuencia de ARN que tiene dicha secuencia antisentido.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, la molécula de ARNdc es capaz de inhibir la expresión del gen CYP51A, del gen CYP51B y del gen CYP51C de *Fusarium oxysporum*, y comprende (i) una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO: 8, (ii) una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO:9, (iii) una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO:10, y (iv) secuencias antisentido que son sustancialmente complementarias a dichas secuencias sentido (i), (ii) y (iii); en la que la disposición de las secuencias en la molécula de ARNdc permite la hibridación de cada secuencia sentido con su secuencia antisentido sustancialmente complementaria. De acuerdo con realizaciones particulares de dicho aspecto de la invención, la molécula de ARNdc:

- (a) es capaz de inhibir la expresión del gen CYP51A de *Fusarium oxysporum* y comprende una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO:8; y
- (b) es capaz de inhibir la expresión del gen CYP51B de *Fusarium oxysporum* y comprende una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO:9; y
- (c) es capaz de inhibir la expresión del gen CYP51C de *Fusarium oxysporum* y comprende una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO:10.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, la molécula de ARNdc es capaz de inhibir la expresión de al menos un gen CYP51 de *Fusarium verticillioides*, y comprende (i) una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO: 11, (ii) una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO:12, (iii) una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO: 13, y (iv) secuencias antisentido que son sustancialmente complementarias a dichas secuencias sentido (i), (ii) y (iii); en la que la disposición de las secuencias en la molécula de ARNdc permite la hibridación de cada secuencia sentido con su secuencia antisentido sustancialmente complementaria. De acuerdo con realizaciones particulares de dicho aspecto de la invención, la molécula de ARNdc:

- (a) es capaz de inhibir la expresión del gen CYP51A de *Fusarium verticillioides* y comprende una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO:11; y
- (b) es capaz de inhibir la expresión del gen CYP51B de *Fusarium verticillioides* y comprende una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO:12; y
- (c) es capaz de inhibir la expresión del gen CYP51C de *Fusarium verticillioides* y comprende una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO:13.

La molécula de ARNdc de la invención es capaz de inhibir la expresión del gen CYP51A, del gen CYP51B y del gen CYP51C de especies fitopatógenas de *Fusarium*; y dicha molécula de ARNdc comprende

- (i) una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la secuencia codificante de dicho gen CYP51A;
- (ii) una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la secuencia codificante de dicho gen CYP51B;
- (iii) una secuencia sentido que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la secuencia codificante de dicho gen CYP51C; y
- (iv) secuencias antisentido que son sustancialmente complementarias las secuencias sentido (i), (ii) y (iii);

en la que la disposición de las secuencias en la molécula de ARNdc permite la hibridación de cada secuencia sentido con su secuencia antisentido sustancialmente complementaria.

En realizaciones en las que la especie fitopatógena de *Fusarium* es *Fusarium graminearum*, la secuencia codificante

de los genes CYP51 pueden ser las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:1 (CYP51A), SEQ ID NO:2 (CYP51B) y SEQ ID NO:3 (CYP51C).

5 En realizaciones en las que la especie fitopatógena de *Fusarium* es *Fusarium oxysporum*, la secuencia codificante de los genes CYP51 pueden ser las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:8 (CYP51A), SEQ ID NO:9 (CYP51B) y SEQ ID NO:10 (CYP51C).

En realizaciones en las que la especie fitopatógena de *Fusarium* es *Fusarium verticillioides*, la secuencia codificante de los genes CYP51 pueden ser las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:11 (CYP51A), SEQ ID NO:12 (CYP51B) y SEQ ID NO:13 (CYP51C).

10 De acuerdo con una realización particular adicional de la invención, la molécula de ARNdc de la invención es capaz de inhibir la expresión del gen CYP51A, del gen CYP51B y del gen CYP51C de *Fusarium graminearum*, y dicha molécula de ARNdc comprende

15 una secuencia sentido (i) que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO: 4,  
una secuencia sentido (ii) que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO: 5,  
una secuencia sentido (iii) que tiene un alto grado de identidad con al menos parte de la SEQ ID NO: 6, y  
secuencias antisentido (iv) que son sustancialmente complementarias a las secuencias sentido (i), (ii) y (iii);

en la que la disposición de las secuencias en la molécula de ARNdc permite la hibridación de cada secuencia sentido con su secuencia antisentido sustancialmente complementaria.

20 La expresión "al menos parte de" la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:6 se refiere a al menos 20 nucleótidos contiguos, por ejemplo, al menos 25, al menos 50, al menos 100, al menos 150 y preferentemente al menos 200 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6. De acuerdo con una realización particularmente preferida de la invención, el alto grado de identidad de las secuencias sentido (i), (ii) y (iii) pertenece a la longitud completa de la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6, respectivamente.

25 Debido a la homología de secuencia de los genes CYP51A, CYP51B y CYP51C de las especies de *Fusarium*, se pueden diseñar moléculas de ARNdc, en las que las secuencias sentido tengan un alto grado de identidad con al menos parte de las secuencias codificantes de los genes CYP51A, los genes CYP51B y los genes CYP51C, respectivamente, de más de una especie fitopatógena de *Fusarium*. Por ejemplo, las secuencias sentido de ARNdc pueden tener un alto grado de identidad con al menos parte de la secuencia codificante de los genes CYP51A, los genes CYP51B y los genes CYP51C, respectivamente, de dos o más especies de *Fusarium* seleccionadas de *F. graminearum*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*.

30 Las secuencias sentido y antisentido se disponen en la molécula de ARNdc en una manera que permite la hibridación de cada secuencia sentido con su secuencia antisentido sustancialmente complementaria, formando de este modo regiones de ARN de cadena doble.

35 De acuerdo con una realización preferida, cada secuencia sentido se localiza en una cadena diferente de ARN de la molécula de ARNdc que su secuencia antisentido sustancialmente complementaria. De ese modo, las secuencias sentido y antisentido se pueden localizar en dos o más de dos cadenas separadas de la molécula de ARNdc. Tras la hibridación de las secuencias sustancialmente complementarias, las cadenas se pueden unir mediante emparejamiento de bases para formar una o más de una región de ARN de cadena doble. Las secuencias sentido pueden estar en cadenas separadas de la molécula de ARNdc. De acuerdo con una realización particular, las secuencias sentido y antisentido sustancialmente complementarias de la molécula de ARNdc de la invención se localizan en dos cadenas sustancialmente complementarias de la molécula de ARNdc.

40 Como alternativa, las secuencias sentido y antisentido sustancialmente complementarias de la molécula de ARNdc de la invención se localizan en una única cadena de la molécula de ARNdc. Las secuencias sustancialmente complementarias se disponen en la cadena simple de ARN de tal manera que tras su hibridación, la cadena se enrolla sobre sí misma mediante emparejamiento de bases para formar una o más de una estructura de horquilla. Una estructura de horquilla consiste en un tallo de cadena doble formado mediante la hibridación de un primer segmento de polinucleótidos con un segundo segmento de polinucleótidos, y un bucle monocatenario que une los dos segmentos.

45 Las secuencias sentido y antisentido hibridadas de la molécula de ARNdc de la invención pueden estar comprendidas en una región contigua de ARN de cadena doble. De acuerdo con una realización preferida, la molécula de ARNdc de la invención comprende una región de ARN de cadena doble que consiste esencialmente (es decir, en al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 %) en las secuencias sentido y antisentido, lo más preferentemente consiste en una secuencia sentido (i), una secuencia sentido (ii) y una secuencia sentido (iii), cada una de ellas hibridada con una secuencia antisentido sustancialmente complementaria.

55 El orden de las regiones de ARN de cadena doble que comprende las secuencias sentido (i), (ii) y (iii) no está particularmente restringido. Por ejemplo, el ARN de cadena doble formado mediante la secuencia sentido (i) y su secuencia antisentido está flanqueado en un lado por el ARN de cadena doble formado por la secuencia sentido (ii) y

su secuencia antisentido y en el otro lado por el ARN de cadena doble formado por la secuencia sentido (iii) y su secuencia antisentido.

5 Las moléculas de ARNdc de la presente invención son capaces de inhibir la expresión de los genes CYP51 del fitopatógeno fúngico o de oomiceto. La inhibición de la expresión del gen CYP51 mediante moléculas de ARNdc de la presente invención llega a ser detectable a nivel de ARNm, a nivel del polipéptido o ambos. Por ejemplo, el cambio a nivel de ARNm de un gen CYP51 se puede evaluar mediante una PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) o análisis por transferencia de Northern.

10 Las moléculas de ARNdc de la presente invención son eficaces en la inhibición de la expresión del(los) gen(es) CYP51 del fitopatógeno fúngico o de oomiceto. La generación de moléculas de ARNdc de la invención en una planta inoculada con el fitopatógeno fúngico o de oomiceto puede dar como resultado niveles de ARNm del(los) gen(es) CYP51 que son al menos el 50 %, al menos el 60%, al menos el 70 % o, preferentemente, al menos el 75 % más bajos en comparación con los de una planta de control que no genera moléculas de ARN de la invención. Por ejemplo, tal cambio en los niveles de ARNm de CYP51 fúngico o de oomiceto (por ejemplo, niveles de ARNm de CYP51A, CYP51B y CYP51C de *Fg*) se puede determinar en hojas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas tres días antes con el hongo u oomiceto (por ejemplo macroconidia *Fg*) del que proviene(n) el(los) gen(es) CYP51 que definen las secuencias sentido de la molécula de ARNdc. Por ejemplo, tal cambio en los niveles de ARNm de CYP51 fúngico o de oomiceto (por ejemplo, niveles de CYP51A, CYP51B y CYP51C *Fg*) se pueden determinar como alternativa en hojas de cebada inoculadas 7 días antes con el hongo u oomiceto (por ejemplo, macroconidia *Fg*) del que proviene(n) el(los) gen(es) CYP51 que definen las secuencias sentido de la molécula de ARNdc.

20 Las moléculas de ARNdc de la invención son útiles para controlar fitopatógenos fúngicos o de oomiceto, por ejemplo, fitopatógenos como los listados en la Tabla 1. En particular, las moléculas de ARNdc de la invención son adecuadas para el control de hongos del género *Fusarium*. De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, el hongo fitopatógeno a controlar se selecciona de *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium verticillioides*.

25 Una molécula de ARNdc de la invención puede ser capaz de inhibir la expresión de dos o más fitopatógenos fúngicos y/o de oomicetos y, por consiguiente, pueden ser útiles para controlar dichas dos o más especies diferentes de fitopatógenos.

30 El control de un hongo u oomiceto fitopatógeno se refiere a medidas de prevención de la infestación de una planta por dicho patógeno así como medidas para combatir o curar la infestación de una planta por el patógeno. La infestación de una planta con un fitopatógeno fúngico o de oomiceto puede llegar a ser visible como una enfermedad de la planta. Por consiguiente, los usos y los procedimientos de la presente invención para el control de un hongo u oomiceto fitopatógeno son usos y procedimientos para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de la planta causadas por el hongo u oomiceto fitopatógeno, por ejemplo, los listados en la Tabla 1.

35 La presente divulgación también proporciona ARNmc antisentido que comprende las secuencias antisentido pero no las secuencias sentido de la molécula de ARNdc de la presente invención descrita en el presente documento. Tal ARNmc antisentido es capaz de inhibir la expresión de gen(es) CYP51 del fitopatógeno fúngico o de oomiceto y es útil para el control de dicho patógeno de forma comparable con las moléculas de ARNdc de la invención.

40 Para controlar un hongo u oomiceto fitopatógeno, se pueden aplicar las moléculas de ARNdc de la invención a una planta infestada por o en riesgo de ser infectada por el fitopatógeno y/o las proximidades de dicha planta. La molécula de ARNdc de la invención se aplica ventajosamente en la forma de una composición. Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición para controlar un hongo u oomiceto fitopatógeno que comprende la molécula de ARNdc de la invención y un vehículo fitocompatible.

45 Los vehículos fitocompatibles pueden ser líquidos, sólidos o mezclas de los mismos, por ejemplo, seleccionadas de agua, alcoholes (por ejemplo, disolventes orgánicos de butanol), glicoles, ácidos grasos, aceites minerales y vegetales, derivados de aceites minerales y vegetales, minerales naturales (por ejemplo, caolines, arcillas, talco, creta) y minerales sintéticos (por ejemplo, sílice finamente dividida, silicatos), ceras, fertilizantes sólidos, derivados de celulosa (por ejemplo, metilcelulosa), y mezclas de los mismos. El vehículo se elige ventajosamente para ser compatible con la aplicación de la composición a la planta a proteger o a curar, o a las proximidades de la misma. Por ejemplo, en composiciones líquidas, el vehículo puede incluir al menos un tensioactivo (es decir, un compuesto que modifica la tensión superficial) para modificar de manera positiva la dispersión, la suspensión o la precipitación de los ingredientes y/o mejorar la humectación y la dispersión de la composición.

50 De acuerdo con una realización de la presente invención, la composición comprende moléculas de ARNdc de la invención aisladas o purificadas. De acuerdo con realizaciones alternativas, la composición de la invención comprende células hospedadoras, por ejemplo, células bacterianas o de levadura, capaces de expresar moléculas de ARNdc de la invención, o un extracto de tales células.

55 La composición de la invención puede comprender agentes adicionales que incluyen

agentes de protección de ARN que reducen o evitan la degradación química y/o enzimática indeseada de las

moléculas de ARNdc, por ejemplo, inhibidores de RNasa;  
 compuestos que potencian o promueven la absorción de ARNdc por el fitopatógeno, por ejemplo, compuestos que generalmente promueven la absorción de ARN en células tales como lipofectamina; y  
 fitofármacos y/o compuestos que promueven el crecimiento de la planta, por ejemplo, seleccionados de  
 5 fungicidas, herbicidas, insecticidas, nematocidas, acaricidas, molusquicidas y sustancias activas de feromonas.

Las composiciones de la invención que comprenden tales fitofármacos y/o agentes que promueven el crecimiento de la planta pueden ejercer un espectro amplio de actividad biológica. Son particularmente ventajosas las composiciones que comprenden moléculas de ARNdc de la invención y un vehículo fitocompatible junto con uno o más de un fungicida adicional.

10 Las composiciones de la invención también son adecuadas para el control de hongos nocivos en la protección de productos almacenados o cosechas en la protección de materiales. La expresión "protección de materiales" se debe de entender que denota la protección de materiales técnicos y no vivos, tales como adhesivos, pegamentos, madera, papel y cartón, materiales textiles, cuero, dispersiones de pintura, plástico, lubricantes de enfriamiento, fibra o telas, frente a la infestación y la destrucción por microorganismos nocivos, tales como hongos. En cuanto a la protección  
 15 de madera y otros materiales, se presta una particular atención a los siguientes hongos nocivos: Ascomicetos tales como *Ophiostoma* spp., *Ceratocystis* spp., *Aureobasidium pullulans*, *Sclerophoma* spp., *Chaetomium* spp., *Humicola* spp., *Petriella* spp., *Trichurus* spp.; Basidiomicetos tales como *Coniophora* spp., *Coriolus* spp., *Gloeophyllum* spp., *Lentinus* spp., *Pleurotus* spp., *Poria* spp., *Serpula* spp. y *Tyromyces* spp., Deuteromicetos tales como *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Trichormia* spp., *Alternaria* spp., *Paecilomyces* spp. y Zigomicetos tales como *Mucor* spp., y además de la protección de productos almacenados y de cultivos, los siguientes hongos de  
 20 levadura son dignos de mención: *Candida* spp. y *Saccharomyces cerevisiae*.

La forma de la composición de la invención se adapta ventajosamente al modo de aplicación deseado. Las formas adecuadas incluyen composiciones listas para usar así como concentrados. Por ejemplo, la composición de la invención puede tener la forma de un líquido pulverizable, un polvo espolvoreable, un concentrado emulsionable,  
 25 gránulos (por ejemplo, gránulos recubiertos, encapsulados o impregnados), una pasta, un polvo dispersable en agua o soluble en agua para el tratamiento de semillas. Los procedimientos de preparación de tales composiciones se conocen en la materia.

La invención proporciona un kit que comprende moléculas de ARNdc de la invención, o una célula hospedadora capaz de expresar las moléculas de ARNdc de la invención, o los ingredientes de una composición de la invención, o  
 30 una composición de la invención. Se puede suministrar el kit con instrucciones adecuadas para su uso.

La presente invención proporciona el uso de moléculas de ARNdc de la invención, o una célula hospedadora capaz de expresar moléculas de ARNdc de la invención, o una composición de la invención para controlar el hongo u oomiceto fitopatógeno.

La presente invención proporciona adicionalmente procedimientos para controlar el hongo u oomiceto fitopatógeno,  
 35 en los que una planta infestada por o en riesgo de ser infestada por el hongo y/o las proximidades de dicha planta se ponen en contacto con la composición.

Los procedimientos de aplicación para poner en contacto una planta y/o las proximidades de la misma con una composición son conocidas en la materia. Los procedimientos de aplicación adecuados incluyen, pero sin limitación,  
 40 pulverizar una composición líquida, espolvorear una composición de polvo, incorporar una composición de polvo o granular en el suelo, embadurnar una composición pastosa, y recubrir o aplicar una película a las semillas de la planta con la composición.

La dosis de moléculas de ARNdc de la presente invención aplicada en el procedimiento de la presente invención es típicamente de 0,0001 a 10.000 g/ha, preferentemente de 0,0001 a 1.000 g/ha y más preferentemente de 0,001 a  
 45 300 g/ha para el tratamiento foliar; de 0,0001 a 200 g de composición por 100 kg de semilla, preferentemente de 0,001 a 150 g por 100 kg de semilla; y de 0,0001 a 10.000 g/ha y preferentemente de 0,0001 a 5.000 g/ha para el tratamiento del suelo.

Las moléculas de ARNdc de la invención se pueden preparar mediante procedimientos conocidos en la materia tales como síntesis química clásica, mediante procedimientos de transcripción *in vitro*, o mediante expresión heteróloga en, por ejemplo, microorganismos (bacterias, levaduras), cultivos celulares o plantas. Por consiguiente, la  
 50 transcripción puede estar mediada por una ARN polimerasa endógena de la célula hospedadora *in vivo*, o por una ARN polimerasa clonada para la transcripción *in vivo* o *in vitro*. Las moléculas de ARNdc de la invención pueden ser ARNdc purificado o aislado. Por ejemplo, el ARN puede purificarse a partir de una mezcla por extracción con un disolvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía o una combinación de los mismos. Como alternativa, el ARNdc puede usarse con ninguna o solo con un mínimo de purificación para evitar pérdidas debido al  
 55 procesamiento de la muestra. El ARN puede secarse para su almacenamiento o disolverse en una solución acuosa. La solución puede contener tampones o sales para promover el alineamiento y/o la estabilización de las regiones de ARN de cadena doble.

En el procedimiento de la presente invención para controlar un hongo u oomiceto fitopatógeno mediante la aplicación

- de una composición de la invención, la planta infestada por o en riesgo de ser infestada por el fitopatógeno y/o las proximidades de dicha planta se ponen ventajosamente en contacto con una cantidad eficaz de la composición. Una "cantidad eficaz" de una composición de la invención es una cantidad que comprende una cantidad de moléculas de ARNdc de la invención que es suficiente como para controlar el hongo. Tal cantidad eficaz puede variar en función del fitopatógeno a controlar, de la planta a proteger (especie, variedad, etapa de desarrollo), de las condiciones climáticas y de los componentes adicionales de la composición. La cantidad eficaz de la composición de la invención se puede determinar mediante ensayos de campo sistemáticos que son habituales y están dentro de las capacidades de un experto en la materia.
- La presente invención también proporciona medios y procedimientos para controlar un hongo u oomiceto fitopatógeno generando las moléculas de ARNdc de la invención o ARNmc antisentido que comprende las secuencias antisentido pero no las secuencias sentido de la molécula de ARNdc de la invención en una planta a proteger del hongo. Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una planta transgénica que es tolerante a un hongo u oomiceto fitopatógeno mediante la introducción en una planta de un molde transgénico de al menos las secuencias antisentido (iv) de la molécula de ARNdc de la invención.
- Una planta a proteger de o a ser tratada contra la infestación con un fitopatógeno de acuerdo con la invención, por ejemplo, una planta transgénica de acuerdo con la presente invención, puede ser una planta monocotiledónea o dicotiledónea.
- Los ejemplos de plantas monocotiledóneas son plantas que pertenecen a los géneros *Avena* (avena), *Triticum* (trigo), *Secale* (centeno), *Hordeum* (cebada), *Oryza* (arroz), *Panicum*, *Pennisetum*, *Setaria*, *Sorghum* y *Zea* (maíz).
- Los ejemplos de plantas dicotiledóneas incluyen algodón, plantas leguminosas, en particular, alfalfa y soja, colza, tomate, remolacha azucarera, patata, plantas ornamentales y árboles. Las plantas útiles adicionales incluyen frutos (en particular, manzanas, peras, cerezas, uvas, cítricos, piña y plátanos), calabaza, pepino, vid, palmeras oleaginosas, arbusto del té, árboles del cacao y arbusto del café, tabaco, sisal, así como, con plantas medicinales, *rauwolfia* y *digitalis*.
- La planta transgénica o no transgénica usada en los procedimientos de control del fitopatógeno de la presente invención en el presente documento se selecciona preferentemente de cebada, maíz, trigo, soja, avena, centeno, arroz, mijo, remolacha azucarera, colza, tomate, patata, algodón y tabaco; más preferentemente se selecciona de plantas de cebada, maíz, trigo, soja, avena, centeno y arroz; y lo más preferentemente se selecciona de plantas de cebada, de maíz y de trigo.
- La presente invención proporciona una secuencia de ADN o una multitud de secuencias de ADN que proporcionan un molde transcripcional de al menos las secuencias antisentido (iv) de la molécula de ARN de la invención. De acuerdo con una realización preferida, la(s) secuencia(s) de ADN de la invención proporcionan un molde transcripcional de la molécula de ARNdc de la invención, es decir, que incluye las secuencias antisentido así como las secuencias sentido descritas en el presente documento. Como alternativa, la planta transgénica de la invención comprende un molde transcripcional de solo las secuencias antisentido, es decir, un molde transcripcional del ARNmc antisentido de la invención.
- La(s) secuencia(s) de ADN de la invención pueden comprender adicionalmente al menos un promotor. El promotor comprendido por la(s) secuencia(s) de ADN de la invención está unido de manera operativa al molde transcripcional para permitir la generación de la molécula de ARNmc antisentido o de ARNdc de la presente invención mediante transcripción. Preferentemente, dicho promotor es un promotor que es funcional en una célula vegetal para permitir la generación de la molécula de ARNmc antisentido o ARNdc de la presente invención por una planta. El promotor se puede seleccionar a partir de promotores constitutivos y promotores regulados.
- Los ejemplos no limitantes de promotores constitutivos incluyen el promotor 35S y el promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S y CaMV19S; documento US 6255560), un promotor de ubiquitina tal como el promotor de ubiquitina-10 (UBQ10) de *Arabidopsis* (documentos EP 1210446, EP 342926) un promotor de opina (documento EP 729514), y un promotor activo tal como el promotor de actina 1 (Act-1) de arroz.
- Los promotores regulados incluyen promotores inducibles, promotores específicos de tejidos y promotores específicos del desarrollo. Los ejemplos no limitantes de promotores inducibles regulados químicamente incluyen el promotor del gen de alcohol deshidrogenasa I (alcA) (documento EP 637339); sistemas de promotores sensibles a tetraciclina, por ejemplo, sistemas de promotores que incluyen una proteína represora de tetraciclina (TetR), una secuencia operadora de tetraciclina y una proteína de fusión transactivadora de tetraciclina, que es la fusión de TetR y una secuencia de activación de proteína 16 de virus herpes simple (VP16) (documentos US 6242667 y US 6252136); promotores sensibles a esteroides, por ejemplo, promotores basados en receptores de ecdisona, receptor de estrógeno humano o receptor de glucocorticoide de rata (documentos EP 1232273, EP 1242604, US 6379945, EP 1112360); promotores regulados por metales, por ejemplo, derivados de la metalotioneína; y promotores derivados de proteínas relacionadas con la patogénesis, por ejemplo, de *Arabidopsis* o de maíz (documentos US 5689044 y EP 1056862). Los ejemplos no limitantes de los promotores inducibles físicamente regulados incluyen promotores inducidos por choque de frío y de calor (documentos EP 159884, EP 787194) así como promotores

inducibles por luz (documento EP 310619) y promotores represores de luz (documentos US 5639952 y EP 1077257). Los ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejidos incluyen los promotores específicos de la raíz (documento EP 1248850), promotores del fruto (documentos EP 316441, EP 968292, EP 973922), y promotores de semilla (documentos EP 255378, EP 781849, US 6642437, EP 1019517). Los promotores regulados particularmente adecuados para la presente invención son los promotores inducidos por la presencia de un hongo u oomiceto fitopatógeno, pero no mediante organismos útiles tales como la micorriza; y promotores que son activos en el sitio de entrada del hongo u oomiceto fitopatógeno, tal como los promotores específicos de la epidermis. Se pueden usar promotores inducibles para generar de manera transitoria el ARN<sup>mc</sup> o la molécula de ARN<sup>dc</sup> de la invención, por ejemplo, en momentos cuando hay un riesgo agudo o elevado de infestación por fitopatógenos fúngicos o de oomicetos.

La presente invención proporciona un polinucleótido aislado que tiene o que comprende la(s) secuencia(s) de ADN de la presente invención, o una multitud de polinucleótidos aislados que tienen o que comprenden las secuencias de ADN de la presente invención. Dichos polinucleótidos aislados pueden ser vectores de transformación útiles para introducir secuencias de ADN en una planta. Tales vectores de transformación en plantas incluyen plásmidos (por ejemplo, plásmidos Ti, plásmidos Ri, plásmidos de la serie pUC o de la serie M13mp, pBR322), vectores víricos (por ejemplo, derivados del virus X de la patata, del virus del cascabeleo del tabaco, del virus Gemini) y otros vectores conocidos en la materia de la ingeniería genética. Los vectores de transformación en plantas pueden comprender secuencias de ADN que facilitan la transformación y/o la selección de plantas, tales como secuencias que codifican los marcadores de selección en plantas (por ejemplo, el gen bar) y secuencias de T-ADN.

La presente invención proporciona procedimientos para preparar una planta transgénica que comprende la introducción de la(s) secuencia(s) de ADN de la invención en la planta. La(s) secuencia(s) de ADN se puede(n) introducir en la forma de polinucleótido(s) aislado(s) de la invención (por ejemplo, en la forma de vectores de transformación en plantas). Están disponibles una serie de procedimientos bien conocidos para introducir polinucleótidos en una célula vegetal. Los procedimientos adecuados de transformación en plantas incluyen, pero sin limitación, la transformación en plantas por medio de T-ADN y la transformación de plantas *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* (documento EP 0116718) usando vectores víricos e infección vírica (documentos EP 0067553, US 4407956, WO 9534668, WO 9303161), la transformación en plantas por medio de polen (documento EP 0270356), la fusión de protoplastos, la absorción de ADN inducida por polietilenglicol, la transformación mediada por liposoma (documento US 4536475), la introducción biolística de ADN (Fromm y col., Bio/Technology 8(9):833-9, 1990), la electroporación, la microinyección y la incubación de embriones de planta secos en solución que comprende ADN.

Una planta transgénica de la presente invención es una planta, en la que al menos una célula de la planta contiene una secuencia de ADN o multitud de secuencias de ADN que proporcionan un molde transcripcional de al menos la(s) secuencia(s) antisentido de la molécula de ARN<sup>dc</sup> de la invención (es decir, un molde transcripcional para el ARN<sup>mc</sup> antisentido o la molécula de ARN<sup>dc</sup> de la invención). Preferentemente, dicha(s) secuencia(s) de ADN de la invención se integra(n) de manera estable en un cromosoma o en un elemento extracromosómico estable de la planta transgénica, de manera que la(s) secuencia(s) de ADN se pueda(n) pasar a la progenie de la planta transgénica. La tolerancia a hongos y/u oomicetos fitopatógenos conferida por la(s) secuencia(s) de ADN de la invención pueden ser heredadas, por lo tanto, por la progenie de la planta transgénica. La planta transgénica de la presente invención es preferentemente un cultivo cereal, por ejemplo, una planta de cebada, capaz de generar ARN<sup>mc</sup> antisentido o moléculas de ARN<sup>dc</sup> para controlar uno o más de un fitopatógeno, en particular, seleccionado de hongos fitopatógenos del género *Fusarium*, por ejemplo, *F. graminearum*.

Además de la transformación directa de una planta con secuencia(s) de ADN recombinante de la invención, se pueden preparar plantas transgénicas autopolinizando plantas que tienen dicha(s) secuencia(s) de ADN, o cruzando una primera planta que tiene dicha(s) secuencia(s) de ADN recombinante con una segunda planta que carece de tal secuencia de ADN recombinante. La semilla resultante se puede usar para cultivar una progenie de plantas que incluyen líneas de plantas que comprenden la(s) secuencia(s) de ADN de la presente invención. Por ejemplo, la(s) secuencia(s) de ADN de la invención se puede(n) introducir en una primera línea de plantas que es modificable para la transformación para producir una planta transgénica que se puede cruzar con una segunda línea de plantas para introducir dicha(s) secuencia(s) de ADN en la segunda línea de plantas. Puede ser ventajoso expresar secuencias de ADN de la invención en una planta estéril masculina, por ejemplo, como un medio para reducir la preocupación sobre el flujo de transgenes a las plantas adyacentes. En la práctica, la presente invención se puede combinar con otros rasgos antipatógenos en una planta.

De acuerdo con una realización preferida, la planta transgénica de la invención es capaz de genera ARN<sup>mc</sup> antisentido o la molécula de ARN<sup>dc</sup> de la invención. Dicho ARN<sup>mc</sup> antisentido y la molécula de ARN<sup>dc</sup> de la invención son capaces de inhibir la expresión del(los) gen(es) CYP51 del fitopatógeno fúngico o de oomiceto, preferentemente, los genes CYP51A, CYP51B y CYP51C de un hongo fitopatógeno del género *Fusarium*. Los niveles de ARN<sup>m</sup> de dicho(s) gen(es) CYP51 en una planta transgénica de la invención inoculada con el fitopatógeno pueden ser al menos el 50 %, al menos el 60%, al menos el 70 % o, preferentemente, al menos el 75 % más bajos en comparación con los de una planta de control que no genera ARN<sup>mc</sup> antisentido o moléculas de ARN<sup>dc</sup> de la invención. Tal cambio en los niveles de ARN<sup>m</sup> del(los) gen(es) CYP51 se puede determinar, por ejemplo, en hojas de planta inoculadas tres días antes con el fitopatógeno (por ejemplo, macroconidia de *Fusarium*).



La planta de control es una planta que es sensible al fitopatógeno, y se cultiva e inocula con el fitopatógeno como la planta transgénica con la que se compara. La planta de control puede ser una planta que difiere de la planta transgénica de la invención en que carece de un molde transcripcional del ARNmc antisentido o la molécula de ARNdc de la invención. Por ejemplo, como planta de control, se puede usar una planta transgénica que comprende un vector vacío o un gen marcador pero no secuencia(s) de ADN de la invención o una planta no transgénica (es decir, tipo silvestre). Ventajosamente, los perfiles de expresión de la planta transgénica de la invención y la correspondiente planta de control difieren solo en la generación del ARNmc antisentido o de las moléculas de ARNdc de la invención, o la ausencia de las mismas.

La presente invención también proporciona procedimientos para controlar el hongo u oomiceto fitopatógeno, en los que los procedimientos comprenden el cultivo de una planta transgénica de la invención para permitir la generación del ARNmc antisentido o la molécula de ARNdc de la invención por la planta (es decir, la generación de ARN que comprende al menos la(s) secuencia(s) antisentido de las moléculas de ARNdc de la invención). La generación de ARNmc antisentido o moléculas de ARNdc de la invención mediante la planta transgénica puede conferir tolerancia al hongo u oomiceto fitopatógeno. En una planta transgénica tolerante a fitopatógenos de la presente invención, la gravedad y/o la frecuencia de la infestación con el fitopatógeno se puede reducir al menos el 5 %, al menos el 20 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, preferentemente al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o el 100 % en comparación con una correspondiente planta de control. Como alternativa, la tolerancia a los patógenos de una planta transgénica de la presente invención se puede describir en referencia a un índice de susceptibilidad relativa que compara la susceptibilidad de la planta transgénica a dicho patógeno con la susceptibilidad de una planta control a dicho patógeno, estableciéndose la última al 100 %. El índice de susceptibilidad relativa de plantas transgénicas de la presente invención puede ser menos del 95 %, menos de 80, menos de un 50 %, menos de un 40 %, preferentemente menos de un 35 %, menos de un 20 % o menos de un 10 %.

La tolerancia de una planta a las infestaciones fúngicas o de oomicetos se puede ensayar mediante inoculación experimental con una dosis de fitopatógeno del hongo u oomiceto (por ejemplo, poniendo en contacto la planta o parte de la misma con una suspensión de conidias fúngicas). La infestación fúngica o de oomicetos se puede evaluar, por ejemplo, comparando el grado de infestación fúngica o de oomicetos en la planta transgénica con el grado de infestación fúngica o de oomicetos en una correspondiente planta de control. Los parámetros cuantificables incluyen, pero sin limitación, el número relativo de plantas infestadas, el número total de plantas infestadas en un tamaño de parcela dado; el número promedio de síntomas de enfermedad; el tamaño relativo del área de la hoja que presenta decoloración inducida por el hongo, necrosis o crecimiento fúngico; el número promedio de granos y/o el peso por planta; o el rendimiento por área cultivada. Por ejemplo, tras un tiempo dado (tal como 3 o 7 días después) la inoculación con el fitopatógeno, el área de la hoja infestada de una planta transgénica de la invención puede ser al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, preferentemente al menos el 75 %, al menos el 80 o al menos el 90 % más pequeña que el área de la hoja infestada de una correspondiente planta de control que no genera ARNmc antisentido o moléculas de ARNdc de la invención.

Los procedimientos de control de un fitopatógeno descrito en el presente documento usando una composición y/o una planta transgénica de la invención son útiles para aumentar el rendimiento y/o la calidad de las plantas. Las ventajas particulares de estos procedimientos de la invención incluyen:

- El ARNmc antisentido o las moléculas de ARNdc de la invención son altamente selectivas para el hongo fitopatógeno a controlar. De ese modo, los organismos benevolentes tales como las micorrizas o las abejas no se ven afectados.
- Los seres humanos y los animales que consumen alimentos producidos a partir de una planta transgénica de la invención, o de plantas tratadas con moléculas de ARNdc de la invención no están afectados por el ARNmc antisentido o las moléculas de ARNdc de la invención que son altamente selectivas y, siendo ARN biodegradable, no persiste ni se acumula en el ambiente.
- El ARNmc antisentido o las moléculas de ARNdc de la invención se pueden expresar en o transportar hacia partes de la planta que son difíciles de alcanzar con tratamiento químico, proporcionando de este modo una protección comprehensiva de la planta.
- La actividad antifúngica de las plantas transgénicas de la presente invención no recae en la expresión de nuevas proteínas en la planta, lo que podría suponer un riesgo alergénico.
- Las plantas transgénicas de la presente invención pueden tener una elevada homología proteómica o incluso una identidad proteómica total con el parental correspondiente, por ejemplo, plantas de tipo silvestre.

**Ejemplos**

Tabla 2: Listado de cebadores útiles para estudios de PCR y de qPCR

N.º	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Aplicación	SEQ ID NO
1	CYP51A_F	CGGTCCATTGACAATCCCCGT	Clonación de CYP51A	32
	CYP51A_R	GCAGCAAACCTCGGCAGTGAG	Clonación de CYP51A	33

(continuación)

N.º	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Aplicación	SEQ ID NO
2	<i>CYP51B(AatII)_F</i>	GACGTCCAGCAAGTTTGACGAG TC	Clonación de CYP51B, Síntesis de ARNdc	34
	<i>CYP51B(NcoI)_R</i>	CCATGGAGAGTTCATAAGGTGC TTCA	Clonación de CYP51B	35
3	<i>CYP51C(BcuI)_F</i>	ACTAGTATTGGAAGCACCGTAC AAT	Clonación de CYP51C	36
	<i>CYP51C(SacI)_R</i>	GAGCTCCATTGGAGCAGTCATA AACAA	Clonación de CYP51C, Síntesis de ARNdc	37
4	<i>CYP51B(HindIII)_F</i>	AAGCTTCAGCAAGTTTGACGAG TC	Transformación de la planta	38
	<i>CYP51C(XmaI)_R</i>	CCCGGGCATTGGAGCAGTCATA AACAA	Transformación de la planta	39
5	T7_F	TAATACGACTCACTATAGG CAGCAAGTTTGACGAGTC	Síntesis de ARNdc	40
	T7_R	TAATACGACTCACTATAGGCA TTGGAGCAGTCATAAACAA	Síntesis de ARNdc	41
6	<i>CYP51A4_F</i>	CCTTTGGTGCCGGTAGACAT	RT-PCR en tiempo real	42
	<i>CYP51A4_R</i>	CCCATCGAATAAACGCAGGC	RT-PCR en tiempo real	43
7	<i>QCYP51B_F</i>	TCTACACCGTTCTCACTACTCC	RT-PCR en tiempo real	44
	<i>QCYP51B_R</i>	GCTTCTCTTGAAGTAATCGC	RT-PCR en tiempo real	45
8	<i>CYP51C2_F</i>	CGAGTCCCTGGCACTGAATG	RT-PCR en tiempo real	46
	<i>CYP51C2_R</i>	GCTCATCACCCAAAACCGT	RT-PCR en tiempo real	47
9	<i>qpcrBtubulin_F</i>	ATCTCGAGCCCGGTACCATGG	RT-PCR en tiempo real	48
	<i>qpcrBtubulin_R</i>	CTCGGTGTAATGACCCTTGCC	RT-PCR en tiempo real	49

## A) Procedimientos usados en los ejemplos

i) Construcción de moldes de *CYP51A*, *CYP51B* y *CYP51C* y síntesis de ARNdc

5 Las anotaciones de genes para *Fg* esterol 14 alfa-desmetilasas (*CYP51*) se obtuvieron de la base de datos del Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org>). Se diseñaron cebadores para generar amplicones de PCR de 200-300 pb de longitud que se corresponden con exones de genes seleccionados: 294 pb de *CYP51A* (SEQ ID NO:4), 220 pb de *CYP51B* (SEQ ID NO:5), y 238 pb de *CYP51C* (SEQ ID NO:6). El ADN genómico del molde se extrajo de *Fg* usando el minikit de plantas DNeasy (Qiagen). Los tres amplicones se apilaron en el vector de clonación pGEM-T Easy cloning (Promega) (Fig. 5). El clon apilado (*CYP51B-CYP51A-CYP51C*) se usó como molde para la síntesis de ARNdc (*CYP3RNA*; SEQ ID NO:7) usando los cebadores *cyp51B (AatII)\_F* y *cyp51C (SacI)\_R* (Tabla 2). La síntesis de ARNdc para estudios *in vitro* se realizó usando el kit de transcripción BLOCK-iT RNAi TOPO (Invitrogen) así como el kit de transcripción de alto rendimiento MEGAscript® Kit (Ambion). Siguiendo los protocolos de MEGAscript®, los pares de cebadores T7\_F y T7\_R con la secuencia del promotor T7 en el extremo 5' de ambos cebadores directo e inverso se diseñaron para la amplificación de ARNdc (Tabla 2).

15 ii) Preparación de macroconidias fúngicas y tratamiento de silenciamiento de ARN *in vitro*

20 Tanto la cepa *Fg* de tipo silvestre (wt, del inglés *wildtype*) como la cepa de *Fg* que expresa GFP, WT-GFP (Jansen y col., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 46:16892-16897. 2005) se cultivaron de forma habitual en medio nutritivo SNA sintético (Nirenberg, Can. J. Bot. 59:1599-1609. 1996). Las placas se incubaron a temperatura ambiente en iluminación constante de un tubo de UV cercano (Phillips TLD 36 W/08) y un tubo de luz blanca (Phillips TLD 36 W/830HF). Se recolectaron las conidias de cultivos de 1 semana con una varilla de vidrio estéril y agua estéril. Las

macroconidias se filtraron a través de 4 capas de miracloth estéril, se recolectaron y se lavaron tres veces con agua destilada estéril y finalmente se diluyeron a 100 macroconidias en un volumen de 100 µl de medio SNA líquido, y se colocaron en una placa de microtítulo de 96 pocillos. Se añadieron 1,5 µg de ARNdc (600 ng/µl) suspendidos en 2,5 µl de 50x de tampón de alineamiento a muestras fúngicas y se añadió el mismo volumen de 50x de tampón de alineamiento a la muestra de control. Las placas se incubaron a temperatura ambiente. Tras la incubación durante 72 h, se realizaron estudios microscópicos con un microscopio invertido (Leica DM IL). Cada experimento se hizo por triplicado. En paralelo, se llevaron a cabo experimentos con tebuconazol (Sigma Aldrich). Se suspendieron cinco mg de tebuconazol en 1 ml de etanol absoluto para obtener una solución madre de 5 mg/ml. La muestra de control incluía la adición del mismo volumen de disolvente (agua estéril y alcohol) sin tebuconazol.

#### 10 iii) Generación de plantas *Arabidopsis* transgénicas

La construcción de ARNdc *CYP3RNA* se amplificó mediante los cebadores específicos del gen *CYP51B-HindIII\_F* y *CYP51C-XmaI\_R* (Tabla 2) y se clonaron en el vector binario *p7U10-RNAi* (servicio de clonación de ADN) que contiene el gen del marcador seleccionable *bar* bajo el control del promotor de Ubiquitina-10 (UBQ10) de *Arabidopsis* y el promotor constitutivo *CaMV35s* (Fig. 5b). La construcción del plásmido resultante *p7U10-CYP3RNA* (Fig. 7) se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 (Lazo y col., Biotechnology (NY). 9:963-7. 1991) mediante electroporación. La transformación de la planta y la regeneración se realizó tal como se describe (Bechtold y col., C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences 316:1194-1199. 1993), y se seleccionaron los transformantes mediante Basta (7 mg/l, Duchefa Biochemies).

#### iv) Selección molecular de los transformantes de *Arabidopsis*

20 El ADN genómico de las hojas jóvenes de 5 semanas de edad de líneas de *A. thaliana* transgénicas (T1) y no transgénicas se extrajo usando el procedimiento CTAB (Chen y col., Plant Mol Biol Rep 17:53-57. 1999). La integración de *CYP3RNA* en el genoma de *Arabidopsis* se confirmó mediante PCR usando los cebadores específicos del gen *CYP51B-HindIII\_F* y *CYP51 C-XmaI\_R* (Tabla 2).

25 Para la detección de ARNip, se extrajo el total de ARN de las líneas de *Arabidopsis* usando el reactivo TRIzol (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Se separó un total de 15 µg de ARN en un gen de poliacrilamida al 16 %-urea 7 M y se transfirió a una membrana de nylon Hybond (Amersham, Reino Unido) usando un material absorbente semiseco (BioRad) a corriente constante (250 mA) durante 3 horas. El ARN se reticuló por UV a la membrana a 1200 x 100 µjulios de energía (UV Stratilinker). La membrana se prehibridó durante 45 minutos a 42 °C en 20 ml de PerfectHyb-Puffer (Sigma). El amplicón completo de PCR de *CYP3RNA* de 791 pb se usó como molde para marcar de manera aleatoria (marcado aleatorio de ADN del cebador con Kit, NEB), se añadió al tampón de hibridación y se hibridó toda la noche a 42 °C. La membrana se lavó dos veces a temperatura ambiente con 5x de SSC + SDS al 0,01 %. La membrana se expuso en pantallas de autorradiografía (*phosphorimaging*) y se detectaron las señales usando un generador de imágenes molecular y el programa Quantity One (BioRad). Se usó una carga paralela de marcador de ARN de rango bajo (Fermentas) como marcador de tamaño.

#### 35 v) Ensayo de infección de la planta *Arabidopsis*

Para el ensayo de infección de la hoja, se ajustó la concentración de conidias de *Fg* en el inóculo a  $5 \times 10^4$  conidias por ml. Para cada una de las plantas de la línea transgénica (T2) y de control (vector vacío y de tipo silvestre Col-0) se arrancaron veinte hojas en roseta de 15 plantas diferentes de 5 semanas de edad y se transfirieron a placas petri cuadradas que contienen agar al 2 % en agua. La inoculación se llevó a cabo tal como se describe por Koch y col., J Phytopathology 160(10):606-610. 2012. Para evaluar la progresión de los síntomas de la enfermedad, se midió el tamaño de la lesión (en cm) mediante 3 ppp de las imágenes digitales usando el programa informático gratuito Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). Se calculó el porcentaje de área de la hoja que presente síntomas de infestación en relación con la hoja no inoculada. Se recogieron las hojas infestadas a 3 ppp, se transfirieron en tubos de 2 ml que contenían 1 ml de solución de azul de tripano (10 g de fenol, 10 ml de glicerol, 10 ml de ácido láctico, 10 mg de azul de tripano, disueltos en 10 ml de agua destilada), seguido por un hervido durante 3 minutos. Las hojas se destiñeron después en 1 ml de solución de hidrato de cloral (2,5 g de hidrato de cloral disueltos en 1 ml de agua destilada) durante toda la noche, y se analizaron con un microscopio de luz (Zeiss Axioplan 2 Imaging). Se analizó la *Fg* marcada con GFP usando un microscopio confocal (Leica TCS SP2).

#### vi) Análisis del transcrito fúngico

50 Para evaluar el silenciamiento de los genes *CYP51* en *Fg*, se realizó un análisis de la expresión de ARNm usando una RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Para el ensayo *in vitro*, se cultivaron  $1,2 \times 10^5$  conidias de *Fg* en 2 ml de medio líquido SNA. Se añadieron 162 µg de ARNdc suspendidos en 200 µl agua sin nucleasa (810 ng/µl). Las muestras se cultivaron a temperatura ambiente mientras se agitaban (72 horas). Para el ensayo *in vivo*, las hojas de *Arabidopsis* arrancadas se inocularon con macroconidias de *Fg* y se recolectaron 3 días tras la inoculación (dti). La extracción de ARN de la muestra fúngica *in vitro* así como de las hojas enfermas se realizó con TRIzol® (Invitrogen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm recién extraído se usó para la síntesis de ADNc usando el kit de transcripción inversa QuantiTect® (QIAGEN, Alemania). Se almacenó ADNc a -20 °C. Para la qRT-PCR, se usaron 50 ng de ADNc como molde en el sistema de PCR en tiempo real 7500 FAST de Applied

Biosystems. Las amplificaciones se realizaron en 7,5 µl de SYBER green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich, Alemania) con 0,5 pmol de oligonucleótidos. Cada muestra tuvo tres repeticiones. Los cebadores se usaron para estudiar la expresión de los genes diana *CYP51* con referencia al gen de la beta tubulina (Tabla 2). Tras una etapa de activación inicial a 95 °C durante 5 minutos, se realizaron 40 ciclos (95 °C durante 30 segundos, 53 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos). Los valores de Ct se determinaron con el programa informático 7500 Fast suministrado con el instrumento. Los niveles de transcripción de genes *CYP51* se determinaron mediante el procedimiento  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y col., Methods 25:402-408. 2001) normalizando la cantidad de transcrito diana a la cantidad de beta tubulina.

vii) Pulverización de ARNdc y ensayo de infección de la hoja

Se arrancaron hojas de plantas de cebada de la variedad de cultivo Golden Promise de tipo silvestre de 2-3 semanas de vida y se transfirieron a placas de Petri cuadradas que contienen agar al 1 %. Las hojas se pulverizaron después con ARNdc. El ARNdc se generó usando el kit de ARNi MEGAscript® (Invitrogen). Siguiendo los protocolos de MEGAscript®, los pares de cebadores T7\_F y T7\_R con la secuencia del promotor T7 en el extremo 5' de ambos cebadores directo e inverso se diseñaron para la amplificación de ARNdc (véase la Tabla 2). Para la aplicación por pulverización, se diluyó el ARNdc en 500 µl de Tween 20 al 0,02 % (v/v) hasta una concentración final de 20 ng/µl. La pulverización de las hojas se llevó a cabo usando un matraz de pulverización (capacidad de 10 ml). Cada placa que contenía seis hojas arrancadas se pulverizó de manera uniforme con ARNdc de *CYP3RNA*, solo también TE o ARNdc-GFP, respectivamente, rociándolas 3-4 veces. A continuación, las placas se dejaron en reposo abiertas hasta que se secó la superficie de cada hoja (lo que llevó aproximadamente 2 horas) y después se recubrieron con tapas. 48 horas después de la pulverización, las hojas se trataron con una suspensión de conidias de *Fg* en Tween 20 al 0,02 % a una concentración de  $2 \times 10^4$  conidias por ml aplicando una gota de 20 µl de suspensión a cada una de las partes superior, media e inferior de la hoja. De nuevo, las placas se recubrieron con tapas y se incubaron durante 6 días a temperatura ambiente. Para evaluar la gravedad de la infección, se evaluó el crecimiento fúngico midiendo la cantidad relativa de expresión del gen fúngico usando la qPCR. A tal fin, se eliminaron las gotas de cada hoja usando un papel de filtro, las hojas se recolectaron en tubos de 15 ml y se almacenaron a -80 °C hasta que se extrajo el ADN.

viii) Extracción de ADN y análisis de PCR para la cuantificación fúngica

Para evaluar la inhibición del crecimiento fúngico se midió la cantidad relativa del ADN genómico fúngico usando una PCR cuantitativa (qPCR). El ADN se extrajo usando el procedimiento CTAB (Chen y col., Plant Mol Biol Rep 17:53-57. 1999). Para la qPCR, se usaron 50 ng de ADN como molde en el sistema de PCR en tiempo real 7500 FAST de Applied Biosystems. Las amplificaciones se realizaron en 7,5 µl de SYBER green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich) con 0,5 pmol de oligonucleótidos. Cada muestra tuvo tres repeticiones. Se usaron los cebadores para determinar la cantidad de ADN genómico de beta tubulina fúngica con referencia al ADN genómico de ubiquitina de la cebada. Tras una activación inicial de la etapa a 95 °C durante 5 minutos, se realizaron 40 ciclos (95 °C durante 30 segundos, 57 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos). Los valores de Ct se determinaron con el programa informático 7500 Fast suministrado con el instrumento. Los niveles de transcripción del gen de beta tubulina se determinaron mediante el procedimiento  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y col., Methods 25:402-408. 2001) normalizando la cantidad de ADN fúngico de beta tubulina a la cantidad de ADN de la planta de ubiquitina.

## B) Ejemplos

### 40 Ejemplo 1: Inhibición del crecimiento fúngico y silenciamiento de genes *Fg CYP51* mediante aplicación directa de ARNdc

Se generó un ARNdc de 791 pb (*CYP3RNA*) complementario con los tres genes fúngicos *CYP51* (Fig. 5). El análisis microscópico de las macroconidias de *Fg* tratadas con *CYP3RNA* reveló un hinchamiento de las puntas de las hifas en 48 h tras el tratamiento (htt, datos no mostrados). En 72 htt, los cambios morfológicos se habían vuelto más pronunciados, particularmente en las puntas de las hifas, (Fig. 1a,ii). En comparación, no se detectó tal hinchamiento en el control tratado por simulación (Fig. 1 a,i). Dado que las proteínas *CYP51* son la diana de los fungicidas de azol, también se controló el fenotipo de las macroconidias de *Fg* tratadas con tebuconazol. Las macroconidias de *Fg* tratadas con tebuconazol (5 mg/l) presentaron un fenotipo comparable con el generado mediante el tratamiento de *CYP3RNA* (Fig. 1 a,iii).

El fenotipo similar de *Fg* tratado con *CYP3RNA* y tebuconazol indicó que el ARNdc silenció la expresión de uno o más genes *CYP51*. Esto se confirmó mediante la cuantificación de los niveles de transcripción para *CYP51A*, *CYP51B*, y *CYP51C* en macroconidias de *Fg* de control y tratadas con ARNdc a 72 htt usando una qPCR con beta tubulina como el gen de referencia. Los transcritos para los tres genes se redujeron significativamente en macroconidias de *Fg* tratadas con *CYP3RNA* en comparación con los controles de simulación (Fig. 1b).

El crecimiento fúngico (determinado basándose en las densidades ópticas de cultivos de *Fg* a 600 nm a 0 htt y 72 htt) se inhibió fuertemente mediante *CYP3RNA* en una forma dependiente de la dosis (Fig. 2).

La capacidad de *CYP3RNA* para reducir el crecimiento de *Fg* y silenciar los genes *CYP51* en macroconidias de *Fg* indica que el hongo puede tomar hasta un ARNdc de 791 pb sin un soporte de administración adicional, tal como

polietilenglicol, cloruro de calcio, lipofectamina o electroporación.

### Ejemplo 2: La expresión de *CYP3RNA* in planta confiere resistencia a *Fg*

Las plantas Col-0 de *Arabidopsis thaliana* se transformaron bien con *p7U10-CYP3RNA*, que contiene dos promotores 35S invertidos que dirigen la producción constitutiva de copias sentido y antisentido de *CYP3RNA*, o un control de vector vacío (vv) (Figs. 7 y 8). La resistencia a *Fg* se evaluó mediante la inoculación de hojas arrancadas de plantas *Arabidopsis* T2 de 5 semanas de vida (que expresan *CYP3RNA*) y las respectivas plantas control Col-0 vv de *Arabidopsis* con  $5 \times 10^4$  macroconidias de *Fg* por ml (véase el procedimiento v) anteriormente).

A los 3 días tras la inoculación (dti), tanto el Col-0 de tipo silvestre (ts) como la línea de control de vv presentaron lesiones empapadas en agua con lesiones cloróticas o necróticas; estos son síntomas típicos de una infestación de *Fg* (Fig. 3a, i-ii). En marcado contraste, cuatro líneas T2 de *Arabidopsis* independientes que contienen la construcción de silenciamiento de *CYP3RNA* (L1, L8, L10, L11) no presentaron síntomas de la enfermedad y sus hojas eran indistinguibles de las de los controles inoculados con un simulacro (Fig. 3a, iii, iv). El porcentaje de área infestada de la hoja en las cuatro líneas transgénicas fue del 0,9 %, mientras que el de los controles de vv fueron del 77 % (Fig. 3b). Las líneas que expresan *CYP3RNA* permanecieron sin síntomas de enfermedad a 5 dti, a diferencia de las plantas vv Col-0 que presentaron síntomas sustanciales en ese momento (Fig. 3c). Las hifas fúngicas se deben a la germinación y al crecimiento de los hongos en el agar inoculado, no sobre la hoja (Fig 3b,ii). Además, el crecimiento fúngico fue más lento y el pigmento de la colonia fue amarillo o pardusco en placas con líneas que expresan *CYP3RNA* en lugar del típico rosa en placas de control (datos no mostrados).

El crecimiento fúngico se caracterizó mediante análisis microscópico de las hojas arrancadas teñidas con azul de tripano para visualizar las hifas fúngicas tal como se describe anteriormente. Sobre las hojas del control de vv Col-0, las macroconidias fúngicas germinaron y desarrollaron micelios en 3 dti (datos no mostrados). El crecimiento de hifas profusas se vio fuera y dentro de la hoja, y no se restringió al sitio de inoculación. El desarrollo exitoso del hongo se indicó adicionalmente mediante la formación de esporodoquia suelta formada por conidióforos ramificados. En marcado contraste, la formación de micelios fúngicos en hojas que expresan *CYP3RNA* se redujo fuertemente (a cerca del 100 %) y se limitó exclusivamente al área herida que rodea de los sitios de infección; no se detectó colonización fúngica en el tejido foliar de alrededor. El crecimiento del hongo y los sitios de la herida formaron rápidamente un gran número de esporodoquia, que es indicativo de que el hongo se está desemparejando por el estrés.

Los resultados del ensayo de las hojas arrancadas se confirmaron mediante microscopia confocal de hojas intactas del control vv Col-0 y de plantas que expresan *CYP3RNA* inoculadas con macroconidias de una cepa de *Fg* que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). Tal como se evidencia mediante la fluorescencia GFP, las hojas vv Col-0 de control colonizadas de manera eficaz por *Fg*, desarrollan micelios en 3 dti. En comparación, el crecimiento fúngico en hojas que expresan *CYP3RNA* se restringió al sitio de inoculación, en donde se observó una esporulación inducida por estrés.

Sorprendentemente, el nivel de resistencia alcanzado direccionando los tres genes parálogos *CYP51* de *Fg* para inducir HIGS fue sustancialmente mayor que el observado en los estudios de HIGS publicados anteriormente.

### Ejemplo 3: La resistencia a *Fg* en las líneas que expresan *CYP3RNA* se debe a HIGS de los genes *CYP51*

Para evaluar si el HIGS de los genes *CYP51* fue responsable de la resistencia a *Fg* en las líneas que expresan *CYP3RNA*, a 3 dti (véase procedimiento (vi) anteriormente) se realizó un análisis de RT-PCR cuantitativa del ARN total de las hojas inoculadas con *Fg* de plantas que expresan *CYP3RNA* y plantas control con vv. Los niveles relativos de transcripción de *Fg CYP51A*, *Fg CYP51B* y *Fg CYP51C* se redujeron en promedio al 92 %, 89 % y 77 %, respectivamente, en muestras de líneas que expresan *CYP3RNA* (L1, L8, L10 y L11), en comparación con la línea de control con vv (Figs. 5-7).

Se analizó adicionalmente si esta reducción en los transcritos de *Fg CYP51* estaba asociada con la producción de los correspondientes ARNip. En análisis por transferencia de Northern que usa *CYP3RNA* como la sonda, se detectaron los ARNip que se corresponden con las secuencias diana de *CYP51* tanto en hojas infestadas con *Fg* como en hojas no infestadas de plantas que expresan *CYP3RNA* (Fig. 8). Por el contrario, estos ARNip no se observaron en las hojas de plantas de ts o control con vv. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la expresión de *CYP3RNA* silencia de manera eficaz los tres genes *Fg CYP51*, posiblemente dirigiendo la maquinaria de silenciamiento de la planta hospedadora para producir los correspondientes ARNip.

### Ejemplo 4: Resistencia a *Fg* en hojas de cebada que expresan *CYP3RNA*

La cebada se transformó con *p7i-Ubi-CYP3RNAi* (Fig. 9). Se generó *p7i-Ubi-CYP3RNA* análogo a *p7U10-CYP3RNAi* sustituyendo el fragmento de GUS en *p7i-Ubi-RNAi2* (Fig. 8) por un fragmento *CYP51ABC* (*CYP51A-CYP51B-CYP51C*) usando enzimas de restricción HindIII/XmaI. El vector binario *p7i-Ubi-CYP3RNAi* contiene dos promotores 35S que dirigen la producción constitutiva de copias sentido y antisentido de *CYP51ABC*. Para preparar las plantas de control, se transformó la cebada con el vector vacío (vv) (Fig. 8). Las plantas de cebada transgénicas que expresan *CYP51ABC* se identificaron mediante RT-PCR usando cebadores específicos del gen. Para cada línea

transgénica (L2 a L9, L15 y L42) y las plantas de control (vector vacío y tipo silvestre var. Golden Promise) se arrancaron dos hojas de plantas de cebada de 2 semanas de edad y se transfirieron a placas de petri cuadradas que contienen agar al 2 % en agua. Cada hoja se inoculó en tres puntos diferentes (superior, medio, inferior) con gotas de 20 µl de una suspensión que comprende  $5 \times 10^4$  macroconidias de *Fg* por ml. Después de 7 días, se tomaron imágenes de las hojas (véase la Fig. 10) y se determinaron los niveles relativos de los transcritos de CYP51A, CYP51B y CYP51C análogo al procedimiento (vi) anterior (véase la Fig. 11). Las hojas de las líneas transgénicas (L2-L9, L14, L42) difirieron de manera significativa de las hojas de los controles (vv, GP) en relación con los síntomas de una infestación fúngica. Cuatro de las 10 líneas transgénicas (L2, L7, L9, L42) no presentaron síntomas de infestación fúngica (resistencia al 100 %). Las seis líneas restantes (L3-L6, L8 y L14) solo presentaron síntomas débiles y localmente restringidos. Por el contrario, las líneas de control presentaron una decoloración y un blanqueo significativo de las hojas inoculadas con *Fg* (véase Fig.10).

#### Ejemplo 5: Reducción del crecimiento de *Fg* tras la aplicación de ARNdc en hojas

Se generó un ARNdc de 791 pb (*CYP3RNA*) complementario con los tres genes fúngicos CYP51 (Fig. 5) y se aplicó a las hojas de cebada arrancadas y montadas sobre placas de agar. Como controles negativos, solo se aplicó tampón o una molécula de ARNdc no relacionada (ARNdc-GFP, que no tiene homología con genes fúngicos). 48 horas después de pulverizar las hojas de cebada con ARNdc *CYP3RNA* o los controles negativos, se infectaron las hojas con macroconidias de *Fg*. 6 días después de la inoculación (es decir, 8 días tras la pulverización), se observó una inhibición significativa del crecimiento fúngico con hojas tratadas con *CYP3RNA* ("ARNdc") en comparación con las hojas de control (que se pulverizaron solo con tampón ("control") o ARNdc-GFP ("GFP"), Fig. 12A). Estos hallazgos fueron consistentes con los resultados de la qPCR, en los que se descubrió que la cantidad relativa de ADN fúngico en hojas infectadas tratadas con *CYP3RNA* es significativamente menor que en hojas de control infectadas (Fig. 12C). Ni el tampón TE ni el ARNdc-GFP no relacionado tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento fúngico.

#### Ejemplo 6: Reducción del crecimiento de *Fg* tras la aplicación de ARN en áreas distales de la hoja

La parte superior de las hojas se pulverizó con ARNdc (*CYP3RNA*) o una muestra de control (solo tampón ("control") o ARNdc-GFP ("GFP")), mientras que las zonas media e inferior se recubrieron. Después de 2 días, la parte inferior de las hojas se sometió a inoculación fúngica. Se determinó la gravedad de la infección 6 días tras la inoculación midiendo la cantidad relativa del ADN fúngico. La inhibición del crecimiento fúngico en comparación con las hojas tratadas con control se observó no solo en la zona superior de la hoja tratada con *CYP3RNA*, sino también en el área inferior de la hoja de la misma hoja (Figs. 12B y 12D). Estos hallazgos indican que el ARNdc de *CYP3RNA* se toma por y se transporta en la hoja para proporcionar una protección sistémica de la infestación fúngica.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BASF SE

<120> ARNi para el control de hongos y oomicetos fitopatógenos mediante la inhibición de la expresión de genes CYP51

<130> 75207/JAB

<160> 49

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1524

<212> ADN

<213> *Fusarium graminearum*

<400> 1

ES 2 675 362 T3

atgttccatc tactcatcta tcccttatgg gtcttggtag cactctttgc tgtcataatt 60  
gccaacctat tgtatcagca gcttcctcga aggccggacg agcctccact agttttccac 120  
tggttccctt tctttgaaa cgcagtcgct tacggcctgg acccttgtgg cttctttgag 180  
aagtgccgag agaagcacgg agacgtcttc acctttatct tattcggctc gaaaaatcgtc 240  
gcttgccttg gcgtcgacgg caatgatttt gttctcaaca gtcgcctcca ggatgccaat 300  
gcagaagaag tttacggtcc attgacaatc cccgtctttg gtagcgatgt cgtatacgat 360  
tgtcccaact cgaagctcat ggaacaaaag aagtttgtca agtttggcct tacgcaaaaa 420  
gcactcgagt cacacgtcca gttaatcgag cgagaggttc ttgactacgt cgaaactgat 480  
ccatcctttt ctggcagAAC tagcaccatc gatgtcccca aggcaatggc tgagataaca 540  
atctttactg cctcacgttc tttgcagggt gaggaagttc ggagaaaact cactgccgag 600  
tttgctgctc tgtatcacga tcttgacctt ggatttagac ctgtcaactt tctgtttcca 660  
tggttgccac tgcoctcaca ccgaaaacga gatgctgctc atataaagat gcgggaagtc 720  
tatatggata tcatcaacga tcgaagaaaa gggggcattc gaacagaaga tggactgat 780  
atgatagcca acttgatggg ctgcacttac aagaacggac agcctgttcc tgacaaggaa 840  
atcgcccaca tgatgattac tctactcatg gcaggccagc actcttcac tctctgccagt 900  
tcttggatcg tgctgcacct tgcttcttct cccgacatta ccgaagaact ctaccaggag 960  
cagctcgtaa atttgagcgt taacgggtgct ctacctccc ttcagtactc tgacctgac 1020  
aagctccctc ttctccagaa cgtcgtcaag gagactctcc gcgtccactc ttccatccac 1080  
tcaatcctgc ggaaagtcaa gagaccatg caagttccca attcccctta cacgatcact 1140  
acagacaaag tcatcatggc ttcacctaca gttaccgca tgagtgaaga gtacttcgag 1200  
aacgccaaaa catggaacc tcatcgatgg gacaacagag caaaggagga ggttgacact 1260  
gaagatgtca tcgactatgg atatggggct gtgtctaaag gaacgaagag cccgtacttg 1320  
ccctttggtg ccggtagaca tcgctgcatt ggagagaagt ttgcctatgt caacttgggt 1380  
gtcattggtg ctactttggt gcgcaacttc agactttcga ccattgatgg aagacctgga 1440  
gtcccagaga cagactatac ttctttgttc tcacgacccg cccagcctgc gtttattcga 1500  
tgggagcgtg ggaagaagat atag 1524

<210> 2  
<211> 1581  
<212> ADN  
<213> Fusarium graminearum

5

<400> 2

ES 2 675 362 T3

atgggtctcc ttcaagaact ggcgggcat ccgctcgccc aacaattcca ggaacttccc 60  
 ctgggccagc aagttggaat tggctttgca gtcttcctcg tgctctccgt cgtcctcaat 120  
 gtcctcaacc agctcctctt ccgaaacccc aatgagcccc ctatggtctt cactgggttc 180  
 ccctttgttg gaagcaccat cacatacggg atggaccccc ccacgttctt cagagagaac 240  
 cgtgccaaagc acggcgatgt cttcaccttt atcctcctcg gaaagaaaac cactgtcgtc 300  
 gttggccctg ctggaaacga cttcatcctc aacggcaagc tcaaggatgt gtgtgctgag 360  
 gagatctaca ccgttctcac tactcctgtc tttggcaagg atgtcgtcta tgactgcccc 420  
 aacgccaaagc tcatggaaca gaagaagttc atgaagattg ccctgaccac cgaagccttc 480  
 cgatcctacg ttcccatcat ctccctccgag gttcgcgatt acttcaagag aagccccgac 540  
 ttcaagggca agtctggcat tgccgatatc cccaagaaga tggccgagat cactatcttt 600  
 actgcttccc atgctctcca gggcagcgcc atccgcagca agtttgacga gtcctggcc 660  
 gctctctacc acgacctoga tatgggcttc acccccatca acttcatgct tcaactggcc 720  
 cctctcccct ggaaccgtaa gcgcgaccac gccacgcga ctggtgcaa gatctacatg 780  
 gacactatca aggagcgccg cgccaagggc aacaacgaat ccgagcatga catgatgaag 840  
 caccttatga actctacata caagaacggg atccgtgtcc ctgaccacga ggttgccac 900  
 atgatgattg ccctccttat ggctggccag cactcttctt cttccaccag ctcatggatc 960  
 atgctccgtc tcgctcagta ccctcacatc atggaagagc tctaccagga gcaggtcaag 1020  
 aacctcggtg ctgatctgcc tcctctgact tacgaagacc ttgccaagct gcccttaac 1080  
 caggctatcg tcaaggagac ccttcgtctc catgctccta tccactccat catgcgcgcc 1140  
 gtcaagtctc ccatgcccgt ccctggcact aagtatgtca ttcccacttc gcacactctt 1200  
 ctcgctgctc ctgggtgctg tgctaccgac tctgccttct tccccaaccc tgatgagtgg 1260  
 gaccctcacc gatgggaggc agactctccc aacttcccc gcatggcttc caagggcgag 1320  
 gacgaggaga agatcgacta cggttacggc cttgtcagca agggttcagc ttctccctac 1380  
 ctgcctttcg gcgctggccg tcaccgatgc attggtgagc actttgcaa cgtccagctt 1440  
 caaaccattg ttgccgaggt tgttcgcgag ttcaagttcc gcaacgttga tggcggtcac 1500  
 accctgatcg ataccgacta cgcctcgtc ttctcccagc ctctggagcc cgccaacatt 1560  
 cactgggagc gacgccagta a 1581

<210> 3

<211> 1554

<212> ADN

<213> Fusarium graminearum

5

<400> 3



ES 2 675 362 T3

atggaatcgc tctacgagac tctgcggact ctaccgctct cagtctcaat ccctctaaca 60  
accagcatca tcatcatcct gtccatcgtc accaacgtgg tcaaacaatt atggtttccc 120  
aaccacatc gtccaccogt tgtattccat atcttcccct tcattggaag caccgtacaa 180  
tatggcatcg acccgtacgc ttttttcttc gactgcagag ataaatacgg cgactgcttt 240  
acctttattc tccttggcaa atcaacgact gtctttcttg gtcccaaggg caatgacttt 300  
atcctcaacg gcaaacacgc cgatctcaac gccgaggacg tttatgggaa acttaccacg 360  
cccgtgtttg gtgaggagggt tgtttatgac tgctccaatg ctcgtttcat ggaccaaag 420  
aggcttctca aacttggctc caccacagat tccttacggg gctacatccc aaagtctcgc 480  
aaagaagtcg aagactatgt taaaaactcg ccatacttca aggtgacac agaatcgtc 540  
aacattacag aagtcatggc cgaaatcaca atctacacag catccggatc cctcctagga 600  
aacgaagtcc gatctatggt tgacagcaca ttcgccactc tctaccgcca tctagatgat 660  
ggcttccaac ccattaattt cgtcatgcca ggtcttcccc tcccgcaaaa cttccgtcga 720  
aaccatgctc gaaaggtaat ggagaagctt ttcagcgata ttatttcaa gcgtcgcgag 780  
actggcaatc aaggcgacga gacggatatg atttggatgc ttatgaatgc acagtataag 840  
gatggggaac ctcttccgga tcaccatgct gcgcgtatgt tgattgctat cctgatgggt 900  
ggccagcata atactgctgt tagtggtgct tggcttcttc tcaatctggc ccataagcct 960  
catcttgctc aggaactgta cgaggaacag acccaggtcc ttggctcacc acaagagcct 1020  
ctgacatggg agaacttaca gaaattaact ctcaacggcc aagtcatcaa ggaaactctc 1080  
cgtcttcaca gtccaatcca ctccatcctc cgacaagtca aatcacccat gcgagtcctc 1140  
ggcactgaat gggtagtgcc accatcccac aactgcttt cgtctcccgg cacaatggcc 1200  
cgctcagaag aattcttccc tcgaccatca gaatgggatc ctcatcgttg ggacaagatt 1260  
gaacctctcg tgaagaccgc cgaagatggt caaacagtgg attacggttt tggggtgatg 1320  
agcaaatccg tcagcagtcc ttatttgccc tttggagctg gacgacatcg atgtgttggc 1380  
gagaattacg cttatgcaca gctgggagct attgttgcca cgtttatcag attggttcac 1440  
attgaacagc ctgaccogaa ggctcctctt ccggcaccag attattcttc catgttttct 1500  
cggcccatga accctgccga gatccgatgg cgtcgcgcgc agacagtaga atga 1554

<210> 4  
<211> 294  
<212> ADN  
<213> Fusarium graminearum  
<400> 4

ES 2 675 362 T3

	cgggccattg acaatccccg tctttggtag cgatgtcgta tacgattgtc ccaactcgaa	60
	gctcatggaa caaaagaagt ttgtcaagtt tggccttacg caaaaagcac tcgagtcaca	120
	cgtccagtta atcgagcgag aggttcttga ctacgtcgaa actgatccat ccttttctgg	180
	cagaactagc accatcgatg tccccaaaggc aatggctgag ataacaatct ttactgcctc	240
	acgttctttg caggggtgagg aagttcggag aaaactcact gccgagtttg ctgc	294
	<210> 5	
	<211> 220	
5	<212> ADN	
	<213> Fusarium graminearum	
	<400> 5	
	cagcaagttt gacgagtccc tggccgctct ctaccacgac ctcgatatgg gcttcacccc	60
	catcaacttc atgcttcact gggcccctct cccctggaac cgtaagcgcg accacgccca	120
	gcgactggt gccaaagatct acatggacac tatcaaggag cgccgcgcca agggcaacaa	180
	cgaatccgag catgacatga tgaagcacct tatgaactct	220
	<210> 6	
	<211> 238	
10	<212> ADN	
	<213> Fusarium graminearum	
	<400> 6	
	attggaagca ccgtacaata tggcatcgac ccgtacgctt ttttcttcga ctgcagagat	60
	aaatacggcg actgctttac ctttattctc cttggcaaat caacgactgt ctttcttggt	120
	cccaagggca atgactttat cctcaacggc aaacacgccg atctcaacgc cgaggacgtt	180
	tatgggaaac ttaccacgcc cgtgtttggt gaggagggtg tttatgactg ctccaatg	238
	<210> 7	
15	<211> 785	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> combina secuencias parciales de CYP51B-CYP51A-CYP51C de Fusarium graminearum	
20	<400> 7	
	cagcaagttt gacgagtccc tggccgctct ctaccacgac ctcgatatgg gcttcacccc	60
	catcaacttc atgcttcact gggcccctct cccctggaac cgtaagcgcg accacgccca	120

ES 2 675 362 T3

gcgcactggt gcccaagatct acatggacac tatcaaggag cgccgcgcca agggcaacaa 180  
cgaatccgag catgacatga tgaagcacct tatgaactct ccatggcggc cgcgggaatt 240  
cgatatcggg ccattgacaa tccccgtctt tggtagcgat gtcgtatacg attgtcccaa 300  
ctcgaagctc atggaacaaa agaagtttgt caagtttggc cttacgcaaa aagcactcga 360  
gtcacacgtc cagttaatcg agcgagaggt tcttgactac gtcgaaactg atccatcctt 420  
ttctggcaga actagcacca tcgatgtccc caaggcaatg gctgagataa caatctttac 480  
tgcctcacgt tctttgcagg gtgaggaagt tcggagaaaa ctactgccg agtttgctgc 540  
cactagtatt ggaagcaccg tacaatatgg catcgaccog tacgcttttt tcttcgactg 600  
cagagataaa tacggcgact gctttacctt tattctcctt ggcaaatcaa cgactgtctt 660  
tcttgggtccc aagggcaatg actttatcct caacggcaaa cacgccgatc tcaacgccga 720  
ggacgtttat gggaaactta ccacgcccggt gtttggtgag gaggttgttt atgactgctc 780  
caatg 785

<210> 8

<211> 1521

<212> ADN

<213> Fusarium oxysporum

<400> 8

5

ES 2 675 362 T3

atgtttctcac tcctatacta ccctctatgg gcctttgctt cctgcctagt tatcatcact 60  
 ctcaacgtct tataaccagaa gctccctcga aatgccaacg aacctccggt agtgttccac 120  
 tggcttccat tcgttgggaa tgctgttgct tatggactcg acccttatgg tttctttgtg 180  
 aagtgtcgag aaaagcacgg cgatgtcttc acctttatcc tcttcggtcg aaaaatcggt 240  
 gcctgtcttg gtggtgacgg caatgacttt gttctcaaca gtcgaattca ggacgccaac 300  
 gccgaagaaa tctacagtcc attgacaacg cctgtctttg gtagtgatgt cgtatacgat 360  
 tgtcccaact cgaagctcat ggagcaaaag aagtttgtca agtttggcct tacacaaaag 420  
 gctctcgagt cccatgtcca gttgatcgag cgagaggttc tggagtacat ccaagctgta 480  
 ccttcattct ctggaaagtc tggcacagtt gatgtatcca aggcaatggc tgagataacc 540  
 atcttcactg ctgctcgctc tctgcagggc gaagaagttc gacggaagct tacagctgag 600  
 tttgcagctc tgtatcatga ccttgacctc ggcttcactc ctgtaaactt cctgttcccc 660  
 tggctacctt tgccataa cgcagctcga gatgctgctc atgcaaagat gagagagatc 720  
 tacatggaca tcattaacgg acgaagaaga ggcgtagggg acttgagaaa aggaactgac 780  
 atgatcgcca acctgatgaa ttgcgagtac aaaaacgggc agccgattcc ggacaaaagag 840  
 atcgcgcaca tgatgatcac ccttctcatg gctggacaac actcttcgctc atctgctagt 900  
 tcatggatca tactacatct ggcttcatcc actgacattg ctgaggaact ctaccaagag 960  
  
 caactcatta acttgagtgc tgatggtggt ctccctcccc ttcagtacac cgacctcgac 1020  
 aagcttcccc ttcttcagaa tgcgtcaaaa gaaacactcc gtgttcattc ttccattcac 1080  
 tccattctgc gaaaggttaa gagacctatg caagcacctg gatcacctta caccatcacc 1140  
 acagacaagg ttctcctcgc ttcaccaact gttacagcgt tgagtgaaga aacttccacg 1200  
 gacgcccaga gatggaatcc tcatcgggtg gataacaaac cccaggagga ggccgtgacg 1260  
 gacgatgtca ttgactacgg ctacggcgct gtttctaaag gaacgaagag ccatactta 1320  
 ccctttggcg ctggtcggca tcgctgcacg ggggagaagt ttgcttatgt caacttgggc 1380  
 gttatcgtcg cgactttggt gcgcaacttc agactgtcga ctcttgatgg caagcctggt 1440  
 attccagcaa ctgactacac ttctctcttc tcaaggccag cccaacctgc atacataaac 1500  
 tgggagcgca ggagggctta a 1521

<210> 9  
 <211> 1584  
 <212> ADN  
 <213> Fusarium oxysporum  
  
 <400> 9

5

ES 2 675 362 T3

atgggtctcc tccaagaact tgcgagccac ccgctcgcac aacaatatca ggagctcccc 60  
ctgggccagc agattggaat tggcttcgga gcattcataa ttctctctgt cgttctgaat 120  
gtgctcaacc agctactctt caagaaccgc aatgaacctc ccctagtctt cacttggttc 180  
cctttcgttg gaagcactat cacatacggga atggaccccc ctaagttctt caaggagaac 240  
cgcgccaagc atggtgatgt tttcaccttt gtcctccttg gaaagaaaac cactgtcgcct 300  
gttggcccca ctggaaacga cttcatcctc aacggaaagc tcaaggatgt ctctgccgag 360  
gagatttaca ctgttctcac tactcctgtc tttggcaagg atgtcgtgta cgattgccct 420  
aatgccaaac tcatggagca gaagaagttc atgaaaatcg ccctcacgac cgaagccttc 480  
cgatcatacg tgcctattat ctccgccgag gttcgcgatt acttcaagaa gagccctgat 540  
ttcaagggca agtccggtat tgtcगतatt cccaagaaaa tggccgagat cactatcttc 600  
actgcttcgc atgcccttca gggcagcgtc attcgtaca agtttgacga gtctctggcc 660  
gctctctacc acgatctcga catgggtttc actcccatca acttcatgct tcaactgggct 720  
cctctcccct ggaaccgcaa gcgtgaccac gcccagcgcga ctggtgcaa gatctatatg 780  
gacaccatta aggagcgcag cgctaaggac aacgatgaca ccgagcacga tatgatgaag 840  
catctcatga actctactta caagaacggc acccctgtcc ctgatcatga ggtcgcaccac 900  
atgatgattg ctctcctcat ggctggccag cactcttctt cttctaccag ctcttgatc 960  
atgctccgtc tcgctcagta ccctcacatc atggaggagc tgtaccaaga gcaggtcaga 1020  
gaactcggtg ctgatttgcc tcccctgact tacgacaacc ttgccaagct gccctcaac 1080  
caggccatta tcaaggagac tctccgcctt cacgcccta tccactctat catgcgcgcc 1140  
gtcaagtctc ccatgcctgt ccctggaacc aagtacacca tcccgcctc gcacactctt 1200  
ctcgcgcccc ccggtgtcag cgctactgac tcggcctact tcccgaacc cgatgagtgg 1260  
gatcctcacc gatgggaggt cgactctccc aacttcccc gaatggctac ccgtggcgat 1320  
gacgaagaga agatcgacta tggctacggc cttgtcagca agggttccgc ctctccttat 1380  
ctgccctttg gtgctggctg tcaccgatgc attggcgagc actttgcaa cgcacagctt 1440  
cagacaattg ttgctgaggt tgtgcgtgag ttcaagttcc gcaatgtgga tggcggcaac 1500  
actctaactg acaccgacta cgcctcgcct ttctcgcgac ctttgagcc cgccaacatt 1560  
cactgggaga gacgccagca gtag 1584

<210> 10  
<211> 1149  
<212> ADN  
<213> Fusarium oxysporum  
<400> 10

ES 2 675 362 T3

atggatcaga agaggcttct caaacttggg ctcacaactg actcattgcg atgctacatc	60
cccaaattcg tcaaagaagt cgaagaatac atcgctactt caccctactt caaaggatca	120
actggcatcg tcaacatcac cgaagtaatg gccgagatca caatctacac cgcagcaggc	180
tccctcctcg gtaacgaagt ccgctccatg tttgacagca cattcgcaac cctgtaccgc	240
catctcgacg atggctttca acctatcaac ttcgtcatgc ctggtcttcc cctaccacaa	300
aacttccgtc gcgatcacgc acgaaaggtc atggaggaat tgttcagcga catcatccgc	360
aagcgtcgtg agattggaaa tcaaggcggg gagactgata tggtttgac gcttatgaat	420
gctaaataca aggatggtga ggacttgccg gatcatcatg cggcgaggat gttgattgct	480
attctgatgg gtgggcagca caaactgct gctagtggcg cctggctact tctcaatctt	540
gcgcataaac cgcctctcgt tcaagagttg tatgatgagc agcttgaggt tttgggatca	600
ccgcaagagc cgttgacgtg ggagaatttg cagaagttga cgctgaatgg acaggttatc	660
aaggagacct tgcgtcttca cagtccaatc cactctattc tccgacaggt caagtcacct	720
atgcgagttc ccggcacaga ctgggttggt ccgccgtctc atacactcct cgcttctccc	780
ggtacacaag cacgatctga ggaattcttt cctagaccta tggaatggga tcctcatcgg	840
tgggataaaa ttgagtctct tgaggactcg aagggtaatg gggagacagt tgattatggc	900
ttcggcgtga tgaacaagtc tgtgagcagc ccatatctac cctttggcgc gggacggcat	960
cgctgtgttg gagagaacta cgcgtatgcc cagttgggcg ccatcattgc aacgtttgtg	1020
agactgcttc atattgaaca gcctgatccc aatgcacctc tacctgcgcc tgactattcg	1080
tcaatgtttt ctcggcctat gaaccagcc gtcacccgat ggactcgtcg taacacggag	1140
 gccaattag	 1149

<210> 11  
 <211> 1338  
 <212> ADN  
 <213> Fusarium verticillioides  
  
 <400> 11

5

ES 2 675 362 T3

atggagctgg tgcacggcga tgtcttcacc tttgtcctct tcggtcgaaa gatcgttgcc 60  
 tgtcttggtg ttgatggcaa tgactttggt ctcaacagtc gaattcaaga cgccaacgcc 120  
 gaagaaatct acggggcatt gacaacgcct gtctttggca gcgatgtcgt atacgattgt 180  
 ccaaactcaa agctcatgga gcaaaaaaag tttgtcaagt ttggtcttac caaaaaggct 240  
 cttgagtccc atgttcagtt gatcgaacga gaggttttag agtacatcca agcagtacct 300  
 tcattctctg agaagtctgg cacagttgat gtatccaaag cgatggctga gatcaccatc 360  
 tttactgctg cccgttctct gcaaggtgaa gaagttcgac ggaagcttac cgctgagttt 420  
 gcagctctgt atcatgacct cgatctaggc tttactccgg tcaacttcct gttcccctgg 480  
 ctacctctgc ctcaaacccg acgtcgagac gctgctcatt caaagatgag agagatctat 540  
 atgggcatta tcaatgaacg aagaagaggc ggaggagact tggaaaaaag aaccgatatg 600  
 atcgccaact tgatgagttg tgcctacaag aacaggcagc ccattcctga caaggagatc 660  
 gcacacatga tgatcactct tctcatggcc ggacaacact cttcatcatc tgctagtcca 720  
 tggatcgtac tgcactctggc ttcattcccct gatatcactg aggaactcta ccaagagcaa 780  
 gtcactcaact tgagtgctag cggcgctctc ccacccctgc agtactccga cctcgacaag 840  
 ctcccgcttc tccagaatgt tgtcaaagaa aactccgag ttcattcttc tatccactct 900  
 attctgcgaa aggtcaagag acccatgcaa gcacctggcc caccttacac catcaccacc 960  
 gacaaggtta tcctcgcttc accaactggt acagcgttga gtgaagaaca cttcccagac 1020  
 gcccaaagat ggaatcctca tcggtgggat aataagcccc aggaggaggc cgtgacggac 1080  
 gaagtcattg actacggcta cgggtgctgtc tctaaaggaa caaaaagccc atatttacc 1140  
 tttggtgctg gccggcatcg atgtatcgga gagaagtatg cttatgtcaa cttaggagtt 1200  
 atcgtcgcga cgttggtgct taacttcaga ctgtcgactc ttgatggcaa gcctggtggt 1260  
 ccagcaaccg acttcacttc tctcttctcg agaccagccc aacctgccta catcaaatgg 1320  
 gaacgcagga aggcttag 1338

<210> 12

<211> 1584

<212> ADN

<213> *Fusarium verticillioides*

5

<400> 12

ES 2 675 362 T3

atgggtctcc tccaagaact tgcgagccac ccgctcgcac aacaatatca ggagcttccc 60  
 ctggcccagc aaattggaat tggctttgga gctttcgtag ttctctctgt cgttctcaat 120  
 gtactcaacc agctactctt caagaaccgc aatgaaccac ccctggctctt ccaactggttc 180  
 cccttcgttg gaagcactat cacatacggga atggaccccc ctaaattctt cagggagAAC 240  
 cgtgccaagc atggtgatgt cttcaccttt gtccctcctcg gaaagaaaac cactgtcgcct 300  
 gttggcccca ctggaaacga cttcatcctc aacggaaagc tcaaggatgt atctgccgag 360  
 gagatttaca ctgttctcac tactcctgtc ttcggcaagg atgtcgtgta tgattgcccc 420  
 aatgccaaac tcatggagca gaagaagttc atgaaaatcg ccctcacgac cgaagccttc 480  
 cgatcatatg tgcctattat ctccctccgag gttcgcgatt acttcaagaa gagccccgat 540  
 ttcaagggca agtccggtat tgtcgcacatt cccaagaaaa tggccgagat cactatcttc 600  
 actgcctcgc atgccctcca aggcagcgtt atccgtaaca agtttgacga gtctctggcc 660  
 gctctctacc acgatctcga catgggtttc actcccatca actttatgct tcaactgggct 720  
 cctctgccct ggaaccgcaa gcgcgatcac gccacgcgca ctggtgccaa gatctatatg 780  
 gacaccatta aggagcgcgc gcctaaggac aacgatgaca ccgagcacga tatgatgaag 840  
 catctcatga actctactta caagaacggc acccctgtcc ctgatcacga ggtcgcaccac 900  
 atgatgattg ctcttctcat ggctggccag cactcttctt cttctaccag ctcttggatt 960  
 atgctccgtc tcgctcagta ccctcacatc atggaagagc tgtaccaaga gcaggttaga 1020  
 gagctcggtg ctgatttgcc tcccctgact taogacgacc ttgccaaagct gccctcaac 1080  
 caggccatta tcaaggagac tctccgcctt cacgctccta ttcaactccat catgcgcgcc 1140  
 gtcaagtctc ccatgcctgt tcctggaacc aagtacacca tcccgcacctc gcacactctt 1200  
 ctgcgcgctc ctggtgtcag cgctaccgac tcggcctact tccccaaacc cgatgagtgg 1260  
 gatcctcacc gatgggaggc cgactctccc aacttcccc aacttcccc gaatggctaa ccgtggcgat 1320  
 gacgaagaga agatcgacta cggctacggt cttgtcagca agggttctgc ctctccttat 1380  
 ctgccctttg gtgctggtcg tcaccgatgc attggcgagc actttgccaa cggccagctt 1440  
 cagacaattg ttgctgaggt tgtgcgtgag ttcaagttcc gcaatgtgga tggcggcaac 1500  
 actctgatcg acaccgacta cgcctcgtt ttctcacgac ccttggagcc cgccaacatc 1560  
 cactgggaaa gacgacagca gtag 1584

<210> 13

<211> 1146

<212> ADN

<213> Fusarium verticillioides

5

<400> 13



ES 2 675 362 T3

atggatcaga agaggcttct taagctcggg ctcacgactg agtcggtgcg atgctacatc 60

cccaaattcg tcaaagaagt agaagactac atcgccacgt caccatactt caaaggtaac 120

accggaatcg tcaacatcac cgaagtaatg gccgagatca caatctacac tgcagcaggc 180

tccctcctcg gcaacgaagt ccgctccatg ttcgatagca cattcgcaac gctttaccga 240

catctcgacg atggtttcca gcccataaac ttcgtcatgc ctggtcttcc cttaccacag 300

aacttccgac gcgatcatgc gcgaaaggtc atggaagagc ttttcagcga tatcattcgc 360

aagcgtcgtg agatgggcaa tcaaggatgat gagactgata tggtttgac gcttatgaat 420

gctaaataca aggatggtga ggatctgccg aatcatcatg ccgcgaggat gttgattgct 480

attcttatgg gtggacagca taacactgct gcgagtggtg cttggctact tctcaacctt 540

gcgcataaac cgcactcggg caaggaattg tatgacgaac aagttgaggt tttgggatca 600

ccgcaggagc ccttgacgtg ggagaattta cagaaattga ccctcaatgg acaggtcatc 660

aaggaaactc tacgtcttca cagtccaatt cattctattc tccggcaggt caaatcacct 720

atgcgagttc ccggcacaga ctgggtagtt cctccatctc atacacttct cgcttcacct 780

ggtacacaag ctcgatctga ggaattcttc cctcggccta tggaatggga tcctcatcga 840

tgggataaga tcgagtctct tgatgatgcc aagaatgggg agacagtcga ttatgggttc 900

ggtatgatga gcaagtccgt cagcagcccg tatctgcctt ttggtgcagg gcgacatcgt 960

tgtgttgggg agaactacgc atatgcacag cttggtgcga ttattgcatc gtttgtgaga 1020

ttgcttcata ttgagcagcc tgatcctaag gcacctcttc ctgcgccaga ttattcttca 1080

atgttttctc ggcctatgaa ccagccgctc atccgatgga ctgcgccgtaa cgccggagact 1140

ggttag 1146

<210> 14  
 <211> 1593  
 <212> ADN  
 <213> Blumeria graminis  
 <400> 14

5

ES 2 675 362 T3

atgggaatat cagaaagctt tatgtctcca tacttgcagc cgttgctcca attcggcttt 60  
 agcattgcgt tggctagtgg aattataagt ttattattac tattaacctt cttgaatgta 120  
 ttgaagcagc tactattcaa aaatccaaat gagccaccga tcgtgtttca ttggattcct 180  
 atcattggta gtacaatttc atatggaatg aatccctata aattctttca tgaatcccaa 240  
 gccaaagtacg gaaatatttt cactttcata ttactgggta aaaagacgac agtatatcta 300  
 ggtcgacagc gaaacaattt tattcttaat ggaaaactga gggatgtaa tgctgaagaa 360  
 gtttattcag tcttaacgac tcctgtcttc gggactgatg tagtgtatga ctgtcctaata 420  
 tcaaaattaa tggaacaaaa gaagtcatg aaagcagccc ttacaactga ggccttccgc 480  
 tcttatgtac ctatcatcca aaatgaagtg gagagcttta taaataaatg cgacgatttt 540  
  
 cgaaaatcag aaggtatcat caatatcgct gccgtaatgg ctgaaattac gatataatcc 600  
 gcttcacaca ccctacaagg aaaagagggt cgcgatagat ttgattcttc tttggcagtt 660  
 ttgtatcatg acctagatat gggctttacc ccaatcaatt tcatgcttca ctgggcacca 720  
 cttccgcaca atcgagctcg tgatcatgcc caacggacag tcgcaaaaat atacatggag 780  
 attatcaaca gccgtcggac gcagaaagaa actgataatt ccaatttaga tatcatgtgg 840  
 caattaatgc gctcttccta caaagatggc actcccgtac cggataaaga aattgcacat 900  
 atgatgatcg cgctcctgat ggctgggcaa cattcttcgt cctcgtccag cacatggatc 960  
 atgctgtggc ttgctgctcg accagatatc actgaagaac tctaccaaga acagctagaa 1020  
 atattgggat cagaattacc tcctgctaaa tatgaagatc tctcgaaaact tactctgcat 1080  
 caaaatgtag tgaaagaggt cctccgtctg catgctccca tacattcgat cttacgaaaa 1140  
 gtaaagaatc caatgcccggt tccaggaact agttatgtaa tacctaagac caattctctc 1200  
 ttggcggccc ctgggtggac aagtcgagac gcctcatact tccctaatac gcttacgtgg 1260  
 gaccacatc gttgggacac tggatctagt ggggtgatag gcacggatat ggaggatgaa 1320  
 aaattcgact atgggtatgg attaattagc acaggggagc caagccctta cttaccgttt 1380  
 ggggcccggac ggcacgctg cataggcgag cagtttgcaa cggtgcaatt agttacaatc 1440  
 atggccacca tggttcgcag tttcaagttt cacaaccttg acggaagga gggcgttgcc 1500  
 gaaactgatt actcaagtat gttttctcgg ccaatggcac ctgccataat tgcattggag 1560  
 aagagggaca aaaaggaca aacggagtgt taa 1593

<210> 15  
 <211> 1581  
 <212> ADN  
 <213> Magnaporthe grisea

5

<400> 15

ES 2 675 362 T3

atgggccttc tacaggacac caccggcccc ctggtagatg ccttctacca gctgggcact 60  
 ggggcgcagg ttggtgttgc cttcgtcagc ttcattctcc tctcggctctt tttccacgta 120  
 gcgcagcaga tcttcttcaa gaacccccat gagccgcccc tcgtcttcag ctggttcccc 180  
 gtcgtcgggtt cgacggtcac gtatggaaaag gacccgccac agttcttccg ggacatggcc 240  
 aagaagtacg gcaacatctt taccttcatt ctccctcgga agaagacaac cgtctacatc 300  
 ggcaccgaag gcaacgagtt catcctcaac ggcaagctgc gcgatgtcaa tgcagaggag 360  
 atctacggac ccatgaccac tcccgtgttc ggcaaggacg tcgtctatga ctgccccaac 420  
 gccaaagctga tggagcaaaa gaagtttatg aagatcgccc tcaccaccga ggccttccgt 480  
 tcttacggtt cstatcattgc cgacgagggtt tcgagctacc tgaagcggac ccccgcttc 540  
 aagggcccgt cgggcgtcgt caacatcccc cccaagatgg ccgagattac catcttcacc 600  
 gcctcgcacg ccctccaggg taaggagatc cgcgaccagt tcgacgagac cctggccgat 660  
 ttgtaccacg acctcgacat gggcttccac ccggtcaact tcaagcttca ctggctaccc 720  
 ctcccccgca acatccgccg cgacaaggca caaaagacca tcgccaagat ctacatggac 780  
 accatccagc gccgcccgtc gaagggtaaag gactccgagg ccaaggatat gatgtaccac 840  
 cttatgaact cgacctaaa aatggcacc cccgtccctg accacgagat cgcccacatg 900  
 atgatcgctc tctgatggc cggacagcac tcgtcgtcgt ccaccagctc ctggatcatg 960  
 ctccgcctcg ccagccgcc ggatattatg gaggaactgt accaggagca ggtccgcgcg 1020  
 ctgggtgccc acttgcccc tctccgctac gaggacctcg ccaatctgcc tctccacctc 1080  
 gccgtcatca aggagactct ccgcctccac gctccgatca actccattct ccgcgccgtg 1140  
 aagcaggacc tccccgttcc gggtagcaac tacgtcatcg ccaaggacac caccgtcctc 1200  
 gccgcccccg gatactcggc cggtagcccc aaccacttcc ctgagccgga actttgggag 1260  
 ccgcaccggtt gggaggccga ctgcgcctg gctccacgca tctcgatgag caacgacaac 1320  
 gatgaggagg agaagattga ttacggatac ggcctcgtca gcaagggtac tacctctcct 1380  
 tacttgccct ttgggcgcgg tcgccaccgc tgcacgggtg aacacttcgc caacgtccag 1440  
 cttcagacca ttgtgccat gattgtgcgc gagttcaagt tccgcaacgt cgacggcagc 1500  
 ggcaaggctc tcggcaccaa ctacgcctcg ctcttctcca ggcctgagga gcccgcaaaa 1560  
 atttactggg agaggcgcta a 1581

<210> 16  
 <211> 1548  
 <212> ADN  
 <213> Magnaporthe grisea  
 <400> 16

ES 2 675 362 T3

atggctttct tcttcccatc tgccccagtc tgggtttact cagccggcgc agccctactc 60  
 ttcatcattg gctccataat actcaacttc atctggcagc aactgccccg tcccaaactcg 120  
 gaaccaccgc tggttttcca ctggttgccc ttcacggca acgccgtctc ctacggcatg 180  
 gaccctacc gcttctactc tcaatgccgg gaaaagcacg gcgatgtctt tacgtttgtc 240  
 ttgttcggca ggcgcatgac cgtcttctta ggcgtccagg gcaacgactt catcctgaac 300  
 ggcaagctgc aggacctcaa tgctgaggag atatacagcc ctctcaccac accagttttc 360  
 ggaagtgata ttatctacga ctgccccaac tccaaactca tggagcaaaa gaagtttgtc 420  
 aagtttggcc tgacgcaaaa ggctctggat tcctacgtcc ccctgatcga gagggaggtc 480  
 ctcgactaca tagagtctc acccgtcttc caagccggca accacggcat cgtagacatt 540  
 cccagcatga tggccgagat aaccattttc acagccagtc gtacctgca aggccccgag 600  
 gtcaggaaga agctgactgg agaattcga cgactctatc acgacttga cctgggtttc 660  
 cgccccatca acttctagc cccgtgggcg ccccttcccc agaaccgccg acgcgacgtt 720  
 gctcatgctc gaatgcgcga tgtttacatg gacctcatca acaaacgccg ccgacagaag 780  
 gacgatcaag aagaagaaga agaagcagag ccagacatga tccgccacct gatgggcagc 840  
 tgcgtgtaca aaaacggcca agccctcccc gacaaggaaa tcgcccacat gatgatcacg 900  
 cttctcatgg caggccagca ttcttctctc tcttcgagcg cgtggatcat gctccgcctc 960  
 gcgtcgcggc ccgacatcgc cgaggagggtg taccaagaag tgacgcggct cgggcacgca 1020  
 tccttcgagc actcggacct cgacaagctg ccgctgctcg caaacgtggt caaggagacg 1080  
 ctgcccgtgc actcgtccat ccaactccatc atgcgcaagg tgaagcggcc gatgcggatt 1140  
 ccgggcagcg actacgtcgt cccccgggc aaggtgctcg tgtccgcgcc catcatgacg 1200  
 cacctggacg aggagcactt ccgcgacgcg cgggcttggg agccgcatcg gtgggatgac 1260  
 gccgtcgacg cccaggacga cgagattgtc gattacggct acggggccac gtccaagggc 1320  
 accaagagtc cttacctgcc ctttggcgcc ggtcggcatc gctgcatcgg tgaaaagttt 1380  
 gcctatctca acctggcggc catcgtcagc accttggtcc ggaacttcaa gttctccacg 1440  
 ctggatggca aggccaccgt gccgcccact gattacactt ctatgttctc tcggcctatg 1500  
 cagcctgcga cggtgagggtg ggagcgacgc agcccgaaga ctgcgtag 1548

<210> 17  
 <211> 1569  
 <212> ADN  
 <213> Sclerotinia sclerotinium  
 <400> 17

ES 2 675 362 T3

atgggtattc tcgaaacaat tgccgggcca ttggctcaag agatttcgca aaggtcaacc 60  
 ttgctgttg ttgctgctgg cgtggcagca ttcgctggtc tatctgtcat tctcaatgct 120  
 ctgaatcaag tggtatttgc gaacccaat gaaccaccag tggctctcca ctggtttcca 180  
 atcattggta gcaccgtcac ttatggatg gacccttata aattcttctt cgagtgtcgc 240  
 gcaaagtacg gtgatatttt cacatttgtc ttgctcggaa agaagaatac agtatatctt 300  
 ggacgaaatg gcaatgactt tattctcaat ggcaagctta aggatctcaa tgcggaggaa 360  
 atatatactg ttttgacaac tcccgtgttt ggaaaggatg tagtctacga ttgccccaat 420  
 gcgaaattga tggagcaaaa aaagttcatg aaaattggct tgtctactga agctttccga 480  
 tcctacgtcc caattataca aatggaagtg gaaaacttca tgaaacgttc ttcggtattc 540  
 aagggacaaa agggaaactgc cgatattggg cccgctatgg ctgaaatcac catctatacc 600  
 gcttcgcata ctctacaagg aaaggaagtc cgtgatcgat ttgatactac tttcgcctct 660  
 ctctaccacg accttgatat gggctttagt cccatcaact ttatgcttca ctgggctcct 720  
 cttcctcaca accgtgcccg cgaccatgcg cagagaactg tcgcagcaac atatatggat 780  
  
 attattaanaa aacgacgtgc tcaggctacg gaagccgact tcaaatccga cattatgtgg 840  
 caattgatgc gctcgtccta caaagatgga acccccgttc cagaccgaga gattgctcac 900  
 atgatgatcg ctcttctcat ggccggacag cactcttctt catcttctat ctcttggatt 960  
 ctgcttcgtc ttgcctcacg cccagatata atggaagaac tctatcaaga acaaatccaa 1020  
 gttctgggcg ccgatctccc tgctctcaag tacgaggacc tggccaaaact tcctcttcat 1080  
 caaaacatct tgaaggaaac tctccgcata cacactccca tccattctat tatgctgcaaa 1140  
 gtcacaacac caatgccaat tagcgggaaca aaatatgtca ttccaacctc gcatactctt 1200  
 atggcatctc ctggttgtag aagtcgagac gcggattact tcccagagcc acttgagtgg 1260  
 gaccctcata gatgggacat tggctcgggc cgtgtaattg gcaatgatca ggacgaagaa 1320  
 ttccaagatt atggctatgg aatgatcagc aaagggtgctt ctagtcctta ccttccattc 1380  
 ggtgctggca gacacagggtg tatcggtgaa caattcgcca atgtacagct catcactatc 1440  
 atggccactg tggttagaat gttcaaattc aagaacggtg atggcagcaa ggatgtcatt 1500  
 ggtactgatt acaccagttt attcaccagg ccattggcgc cagcagttat agcatgggag 1560  
 cgacgataa 1569

<210> 18  
 <211> 1587  
 <212> ADN  
 <213> Phakopsora pachyrhizi  
 <400> 18

ES 2 675 362 T3

atgtcttcca gcgttataat cgatcagctc tactcattct caactaccag tctcatcatc 60  
 acatcgctaa cttccatcct cacaatcatc gtcacccctca atgtcactaa tcagttgttg 120  
 ttcaaggaca ggaatacccc accgctagtc ttccacatat ttccggtgct cggctctgtg 180  
 ataagctatg gcatggatcc gtaccaattc tttgaggact gtcggaggaa gcatggaaat 240  
 gtgtttacgt ttgtgctggt gaacaagaag gtcaccgtag ctctcgggcc ggagggaaac 300  
 acgttggctc taaatggaaa gctctcagag gtcaatgccg aagaagctta caccatttc 360  
 actacacctg tctttggtaa ggatgtagtc taygatgtac ccaactcgat cctaatgcag 420  
 cagaaaaagt tcatcaaggc tggccttact actgagaaat ttaagaaata tgtggggata 480  
 attgtagag aarcaacaag ttacctgga gatcatttat tctgctctcc aatgtaaaa 540  
 tctgtcacta aggacgtcca tgatattact tctgagataa cgatttgtac tgcagcagca 600  
 actctacagg gaaaagaagt cagagaaggc ctagacaaat cctttgctaa actctatcac 660  
 gacctagatg gtggatttac accgttgaac tttgtttttc cgaacctgcc cttaccctcc 720  
 tacagacgta gggacaaggc acaggtctcg atgacaaact tttatctgaa cattctaaag 780  
 aaaaggagag ccgaaaacag gcaggatgag ttcaatgaca tgttgatgt cttgcaggrg 840  
  
 cagcactaca aggacggcag agctttatcg gacagggaaa ttgctcacat aatgattgcc 900  
 gtccttatgg ctggtcaaca cactagtgtc gcgaccggcg cctggttatt gaccatctg 960  
 gctcattgcc ctgacttgggt tgatagactg aggcgtgaac aggycgaggt ctttggttaag 1020  
 ggggatggtg gtggagaggt ggaagatcta gattacgatc gactccaaac acctctatta 1080  
 aattcttgta tcaaagaggt cttacgtcta caccctcca ttcattcaat cttgcgcaaa 1140  
 gttaagtcac cgatccttgt tccccaaaaca ctctcctcaa ttgacaagaa caaccaatac 1200  
 atcataccct cttcccacta cgtcctagcc gcacctggcg tctctcagat tgatccatcg 1260  
 gtttgggacc atccaaaaga gttcagacca gagagatggc tatcgaactt taagaaagat 1320  
 aagcaggaac aggaggagga gatggttgac tacggctttg gagcgatcag cagcggagcc 1380  
 aattcgccct atctaccctt tggggctggt cgacatcggt gtatcggaga gcagtttgcg 1440  
 tacatccagt tggccgccgt tgctgttgct gtcattagga actgcgacct cgagctcgtc 1500  
 agaaaggagt tccctctacc tgattatacc acgatgttag ttggaccag gaaacctaca 1560  
 actgtgaagt ttactagaag aaattaa 1587

<210> 19  
 <211> 1569  
 <212> ADN <213> Botrytis cinerea

5 <400> 19

ES 2 675 362 T3

atggggattc ttgaagctgt aaccgggcca ttggctcagg aaatttcgca gcggtcaact 60  
 ggcgttggtg tagctgctgg cgtggcagca ttcacgtttt tatctgtcgt tctcaatgtt 120  
 ttgaaccaag tgttatttgc aaacccaat gagcctccca tggctctcca ctggctccca 180  
 gtaattggca gcactatcac ttatggatg gacccttaca aattcttctt cgattgtcgc 240  
 gcaaagtatg gtgacatttt cacatttgtc ttgcttgga agaagaccac cgtatatctc 300  
 ggacgcaagg gcaacgactt tattctcaat ggcaagctca aggatctcaa cgcggaggag 360  
 atatatactg ttttgacaac ccccgatattt ggcaaagatg tagtttacga ctgcccacaa 420  
 gcgaagttga tggagcaaaa gaagttcatg aaaattggct tgtctacaga agctttccga 480  
 tcctacgtcc caatcataca aatggaggtg gaaaacttta tgaagcgttc ttcggcgttc 540  
 aaaggtcaa agggaaactgc tgacattggt cccgctatgg ctgaaatcac catctacact 600  
 gcttcgcaca ctctgcaagg aaaggaagtc cgcgatcgat tcgatacctc ctttgcctct 660  
 ctctaccacg acctcgacat gggcttcagt cctatcaact ttatgcttca ctgggcccct 720  
 ctccctcaca accgtgcccg cgatcatgcc cagcgaactg tagccaaaac ctatatggat 780  
 atcattcaaa accgacgtgc tcaagctacg gaagcagagt tcaaactga tattatgtgg 840  
 cagttgatgc gctcgtctta caaggatgga actccagttc cagataagga aatcgctaac 900  
  
 atgatgattg ctcttctcat ggccggacaa cattcttctt catcttctat ctcgtggatt 960  
 atgcttcgcc tcgcctcacg cccagacatt atggaagaac tctaccaaga acaaatccaa 1020  
 gtcttaggtg ctgatctccc tgctctcaag tatgaggatt tgtccaaaact ccctctccat 1080  
 cagaacgttc tcaaggaaac tctacgcctc cacaccccaa tccattctat catgcgcaaa 1140  
 gttaccacac caatgccaat cagcgggaacc aaatatgtca ttccaacatc acatacactt 1200  
 atggcatctc ctggttgcac aagtcgagat gacgaattct tccccgaagc acttgagtgg 1260  
 gatcctcaca gatgggatct tggttccggc cgtggtggtg gaaatgatca ggatgaggaa 1320  
 ttccaagatt atggttacgg aatgattagc aaaggcgctt ccagtcctta ccttccattt 1380  
 ggtgctggca gacatagatg cattggtgaa caattcgcga ctgtacagct tgtcacgatc 1440  
 atggcaactg tcgttagatt gttcaaattt aagaacattg atggcagcaa ggatgtgatt 1500  
 ggtaccgatt acgcaagttt attcaccagg ccattggcgc cagccgttgt agcttgggag 1560  
 cgacgataa 1569

<210> 20  
 <211> 1569  
 <212> ADN  
 <213> Puccinia triticina

5

<400> 20

ES 2 675 362 T3

atgtcttctg tgatcggctc gctgctcgag cccatcggat ccttctcaac tttcaaccaa 60  
 gtgctcatct acttgggtgct agccggttgc tcgatcatct cgatcaacat cttcgaccaa 120  
 ttggctattc ccaaagatcc gacggctcca ccagtgggtg ttcatttgtt tccgttcatt 180  
 ggctcggccg tgtcctacgg aatcgacccc tacgctttct tggaatcatg caggaagaag 240  
 tatgggaatg tgttcacctt cgtcctcttg aacaagaaag tcaccgtcgc tctcggctctc 300  
 gaaggaaacg cactggctct caacggaaaa ctatctcaag ttaatgctga agaagcttac 360  
 acagcactca caatcttgat gcaacaaaaag aaattcgtca agtctgggtt gactaacgaa 420  
 aactttcggg aatacgtatc actgattgcg gaggagacga taagctatct tgaagatcat 480  
 gtatttgaga accccaaaac gcaacagact gtgaaagata cttcaaagt ggcttctgag 540  
 attactatct gcacggcctc agccaccctc caagggcccg aagtccgaga agctctcaac 600  
 aatcattcg cccagttata ccatgactta gatggcgggt ttacccttt gcatttcgct 660  
 ttccccaaact tgcccttacc atcatatcgg cgtcagagacc gggcgcaact ggcgatgca 720  
 aacttctata tgaacatcat caagaagaga cgagaagatg acagagaggg ccagcttggg 780  
 gacatgatcg atagcttaca gggccaaaacg tacaaggatg gccgcccttt gaacgataaa 840  
 gagatcgccc acattatgat tgcccttctg atggccggcc aacacaccag tgctgctact 900  
 ggctcctggc tactcctgca tctcgttctc cgtcccgaca tcgtcgtga attgagacag 960  
  
 gagcagatcg acttgtttg caaacggggc caaactgacg atcaagaact cgaccctcta 1020  
 gaccttgaac gtgtccagag tcccttaatg attgcatgca tcaaggaagt cctcaggctt 1080  
 catcccccaa tccattctat catgcgaaag gttaaatcgc ctatcaccgt gccgaggact 1140  
 ttggcgtcac gcaacgagga tacaccatac ataatccctt caagcaactt tgtcttggca 1200  
 gcgccgggaa cagcccagct cgacggatcg atctggagct cgccccacga gttcgacccg 1260  
 agccgatggc tgaagctcca gtctcctttc aaggccggag agacgcagga agagatggtc 1320  
 gattacggct tcgggatgat cagcagtggg gctaattcgc cttcctgcc cttcggcgcc 1380  
 ggccgtcatc gctgtatcgg tgaacagttc gcttacatcc agctgtctac tttcggcgct 1440  
 accgtcatca ggaactgcga tctogaatta actgccctg agttccctaa acctgattat 1500  
 accgttcggt tatctctctg tctctcacac atttcgatta tcagccgtca agttgaagct 1560  
 catctctga 1569

<210> 21  
 <211> 1524  
 <212> ADN  
 <213> Puccinia graminis  
  
 <400> 21



ES 2 675 362 T3

atgtcttccc tcatcgacce actgatcgag ttcattggct cattctcaac cttcaatcaa 60  
atcctcatct acttcctact ctccatcacc togatcatct ccatcaacat cttcaaccaa 120  
ttggctattc ccaaagatcc gaccacccca cctgtgggtct tccatctatt cccattcatc 180  
ggctcagctg tgtcctacgg aatcgaccct tacgctttcc togaatcttg tcggaagaaa 240  
tacgggaatg tcttcacctt cgtcctcttg aataaaaaag tcaccgtcgc actcggcttc 300  
gaaggaaacg cattgatcct caacggaaaa ctgtctcaag ttaatgctga agaagcttac 360  
acagcactca ctacacctgt gttcggaaact aaaatgggtct atgatacgat aagctacctc 420  
gaagaccatg tatttgagaa accgaaaacg cagcaagctg tcaaagactg cttcaaagtg 480  
gcatctgaga tcactatctg cacagcctca gccacccttc aagggtcccga agtccgcgaa 540  
ggactcaaca aatcatttgc caatctatac cacgatttag acggcggggt taccctacta 600  
catttcgcat tccccaacct acccttacca tcatatcgac gacgagatcg ggcgcaagtg 660  
gcgatgcgca acttctacat gaacataatc cagaagagac gagaggacaa ccgagaaggc 720  
cagctcggag acatgatcga cagcttgagc ggccaaaact acaaggatgg gcggccgttg 780  
accgacaagg agatcgctca tatcatgatt gcccttctga tggccggcca acataccagt 840  
gctgccactg gatcatggct cctcctccac ctgcctctc gccagatat tgttgccgaa 900  
ttgaggcagg aacagatcga agtgttcggc aaacctggac aaactgatga taaagaactc 960  
gaccctctag acctcgaacg tgtgcagagt cccttgatgc tcgcttgcat caaggaggtc 1020  
ctcagacttc atccgcccac ccattcaatc atgcgaaagg tcaaatacacc gatcactgtc 1080  
ccgcgaacat tagcatccca taacgaagat acgccataca tcattccgtc gagtaacttt 1140  
gtcttagcag cgccggggggc atcgagatc gaccgggcaa tctggagctc acctcacgag 1200  
ttcgagccca gtcgatggct gaagctcacc tggcccttca aggccggcgg gggagagaca 1260  
caagaagaga tggtcgacta cggcttcgga atgatcagca gcggcgccaa ctgcaccttc 1320  
ctccccctcg gcgcaggccg tcatcgctgt atcggcgaac agttcgctta ccttcagctc 1380  
tctactctcg gcgctaccgt cattaggaac tgcgaactcg aactagtctc caatcagttc 1440  
cctaaacctg attatactac tatgttggtc tgtcctatca aaccaagaga cgtcaagttt 1500  
actaggagga acaccactc gtaa 1524

<210> 22  
<211> 1611  
<212> ADN  
<213> Puccinia recondita  
<400> 22

ES 2 675 362 T3

atgtcttctg tgatcggctc gctgctcgag cccatcggat ccttctcaac tttcaaccaa 60  
 gtgctcatct acttgggtgt agccgttgct tcgatcatct cgatcaacat cttcgaccaa 120  
 ttggctattc ccaaagatcc gacggctcca ccagtgggtt ttcatttgtt tccgttcatt 180  
 ggctcggccg tgtcctacgg aatcgacccc tacgctttct tggaatcatg caggaagaag 240  
 tatgggaatg tgttcacctt cgtcctcttg aacaagaaaag tcaccgtcgc tctcggctctc 300  
 gaaggaaacg cactggctct caacggaaaa ctatctcaag ttaatgctga agaagcttac 360  
 acagcactca cgaccctgtt attcggaaact gatgttgctt atgatgtccc caacgcaatc 420  
 ttgatgcaac aaaagaaatt cgtcaagtct gggttgacta acgaaaactt tcggaaatac 480  
 gtatcactga ttgocggagga gacgataagc tatcttgaag atcatgtatt tgagaacccc 540  
 aaaacgcaac agactgtgaa agataccttc aaagtggctt ctgagattac tatctgcacg 600  
 gcctcagcca ccctccaagg gcccggaagtc cgagaagctc tcaacaaatc attcggccag 660  
 ttataccatg acttagatgg cggttttacc cctttgcatt tcgctttccc caacttacc 720  
 ttaccatcat atcggcgtcg agaccgggcg caactggcga tgcgaaactt ctatatgaac 780  
 atcatcaaga agagacgaga agatgacaga gagggccagc ttggagacat gatcgatagc 840  
 ttacagggcc aaacgtacaa ggatggccgc cctttgaacg ataaagagat cgcccacatt 900  
 atgattgccc ttctgatggc cggccaacac accagtgctg ctactggctc ctggctactc 960  
 ctgcatctcg cttctcgtcc cgacatcgtc gctgaattga gacaggagca gatcgacttg 1020  
 tttggcaaac cgggccaac tgacgatcaa gaactcgacc ctctagacct cgaacgtgtc 1080  
 cagagtccct taatgattgc atgcatcaag gaagtcctca ggcttcatcc cccaatccat 1140  
  
 tctatcatgc gaaaggtaa atcgcctatc accgtgccga ggactttggc gtcacgcaac 1200  
 gaggatacac catacataat cccttcaagc aactttgtct tggcagcgcc gggaacagcc 1260  
 cagctcgacg gatcgatctg gagctcggcc cacgagttcg acccgagccg atggctgaag 1320  
 ctccagtctc ctttcaaggc cggagagacg caggaagaga tggtcgatta cggcttcggg 1380  
 atgatcagca gtggggctaa ttcgcccttc ctgcccttcg gcgccggccg tcacgctgt 1440  
 atcgggtgaac agttcgtta catccagctg tctactttcg ccgctaccgt catcaggaac 1500  
 tgcgatctcg aattaactgc ccctgagttc cctaaacctg attataccac catgttggtt 1560  
 tgtcctctga aaccaaggga catcaaattt actcgaagaa accatctctg a 1611

<210> 23  
 <211> 1584  
 <212> ADN  
 <213> Pyrenophora teres

5

<400> 23

ES 2 675 362 T3

atgggtctct tcgctgatgt cgccggccct ctggctaact ttacatccaa gtcgtccacg 60  
cctgtcgtcg ctgccgcgcg cttgcctcc tttatcctgc tctccgtcgt cctcaatgta 120  
ctcaagcagt tgctgttcaa gaaggcgaat gagccgccca tggctttcca ttggctgcct 180  
ataattggca gtacagtcac atatggcatg gatccgtatg ccttcttctt tgcgaaatcac 240  
aagaagtatg gcaatgtctt cacatattatt ctccttggcc gcaagatgac cgtgtgcctt 300  
gacacggcgg gcaacaactt catcctaaac ggaaagatca aggacgtcaa cgccgaggag 360  
atttactctc cgctgaccac ccccgctctt ggcaaggacg tcgtgtacga ctgtccaaac 420  
tcgaaactca tggagcagaa aaagtttgc aagtatggac tcacgcagga ggccctccgt 480  
tcctacgtca ccctcatcac acaagaatgc gaagacttca tgaagcgcca caaagctttc 540  
aagggacaac ggggcacttt tgacgtgacc aaggatcatg ctgagctcac catctacact 600  
gcctctcgtt cgctccaggg cgaggaaatc cgcaagtcgt tcgattcaaa gtttgccgaa 660  
ctgtaccacg acctcgacat gggcttttca cctgtcaact ttatgctctc atgggccccg 720  
cttccccaca accgcgcacg cgacaatgca cgcgagacta tgataaagct atactctgat 780  
ctggttcgca agcgcaggtc gggcgccgtg aagaaggact cacacgacat gatttggcac 840  
ctgatggaat gcaagtacaa ggacggcacc caggtgccgg aacacgagat tgctggcatc 900  
atgattgccc tgctcatggc tggacagcat tcgtcttctt cgaccatcgc atggatcctc 960  
ctccgcctcg cgcagaacct gcacattatt gacgaactgc ttgcggagca aacgtccatc 1020  
ctaggcaaaa acctccccgc ccttacctat gacgacctcc agaagcttcc ccttcacgcc 1080  
caagtcgtca aggaaacct ccgatatccac gccccatcc actccatcat gcgcaaggtc 1140  
aagcaacctc tggttgtcga tggaaacaaat tacgttgttc ccaacttccca cacactcatg 1200  
tcctcgcccc gtttctctgc acagctcgat acccactttg tcaacccccg tgtctgggac 1260  
ccccaccgtt gggatccaga ccaaaacaac tacgacgaag agcgcgacga cgccgatcag 1320  
gagaagattg actatggctg ggggtgctg tccaaggga ccaactcgc atacttccc 1380  
tttggcgtg gacggcatcg ttgcattggt gagcaatttg cctacttgca attacagact 1440  
atcctagtag cgtttgtgag agagttcaag ctcaggaatg ttggtgtag taaagacatt 1500  
gttggcaccg actactccag tctcttctcc cgcccactag cacctggcat agttgagtgg 1560  
gagaggcggc agaaggaatg ttag 1584

<210> 24  
<211> 1584  
<212> ADN  
<213> Pyrenophora tritici

5

<400> 24

ES 2 675 362 T3

atgggtctct tcgctgatgt cgccggccct ctggctaact ttacatccaa gtcgtccacg 60  
cctgtcgtcg ctgccgcgc cttgcctcc tttatcctgc tctccgtcgt cctcaatgta 120  
ctcaagcagt tgctgttcaa gaaggcgaat gagccgccca tggctttcca ttggctgcct 180  
ataattggca gtacagtcac atatggcatg gatccgatg ccttcttctt tgccaatcac 240  
aagaagtatg gcaatgtctt cacatcttatt ctccttggcc gcaagatgac cgtgtgcctt 300  
gacacggcgg gcaacaactt catcctaaac ggaaagatca aggacgtcaa cgccgaggag 360  
atttactctc cgctgaccac ccccgctctc ggcaaggacg tcgtgtacga ctgtccaaac 420  
tcgaaactca tggagcagaa aaagtttgtc aagtatggac tcacgcagga ggccctccgt 480  
tcctacgtca ccctcatcac acaagaatgc gaagacttca tgaagcgcca caaagctttc 540  
aagggacaac ggggcacttt tgacgtgacc aaggtcatgg ctgagctcac catctacact 600  
gcctctcgtt cgctccaggg cgaggaaatc cgcaagtcgt tcgattcaaa gtttgccgaa 660  
ctgtaccacg acctcgacat gggcttttca cctgtcaact ttatgctctc atgggccccg 720  
cttccccaca accgcgcacg cgacaatgca cgcgagacta tgataaagct atactctgat 780  
ctggttcgca agcgcaggtc gggcgccgtg aagaaggact cacacgacat gatttggcac 840  
ctgatggaat gcaagtacaa ggacggcacc caggtgccgg aacacgagat tgctggcatc 900  
atgattgccc tgctcatggc tggacagcat tcgtcttctt cgaccatcgc atggatcctc 960  
ctccgcctcg cgcagaacct gcacattatt gacgaactgc ttgctggagca aacgtccatc 1020  
ctaggcaaaa acctccccgc ccttacctat gacgacctcc agaagcttcc ccttcacgcc 1080  
caagtctca aggaaacct ccttatccac gccccatcc actccatcat gcgcaaggtc 1140  
aagcaacctc tggttgtcga tggaaacaaat tacgttgttc ccacttccca cacactcatg 1200  
tcctcgcccc gtttctctgc acagctcgat acccactttg tcaacccccg tgtctgggac 1260  
ccccaccgtt gggatccaga ccaaaacaac tacgacgaag agcgcgacga cgccgatcag 1320  
gagaagattg actatggctg ggggtgctgtg tccaagggaa ccaactcgcc atatcttccc 1380  
tttggcgtcg gacggcatcg ttgcattggt gagcaatttg cctacttgca attacagact 1440  
atcctagtag cgtttgtgag agagttcaag ctcaggaatg ttggtgtag taaagacatt 1500  
gttggcaccg actactccag tctcttctcc cgcccactag cacctggcat agttgagtgg 1560  
gagaggcggc agaaggaatg ttag 1584

<210> 25  
<211> 1512  
<212> ADN  
<213> Pyrenophora tritici  
<400> 25

ES 2 675 362 T3

atgccctctc cccttctcct cgcattccggt ttctctgccc tctgcatcgc ctacatcttc 60  
gccaacatca tccgccagct gcttcttcca aacaccaaag aaccacccgt cgtcttccac 120  
tggcttccct ggcttgggag cgccatcacc tacggcaaag acccctataa gtttctgttc 180  
gccgccagag agaagcatgg agatgtcttc acctttgtcc tgctaggccg caacgtcacc 240  
gttcaacttg gcgttgccgg aaacgatttt gtcttcaacg gcaaagagac acatgtcaat 300  
gccgaggaaa tctacggtcc cctatgtaac cccgtcttcg gcgagggcgt cgtgtacgac 360  
tgtcccaatt ccaagctcat ggaacagaaa aaattcgtca agtttggctt gacaaccgac 420  
gctctcaagg cacatgtgca actgattgag caagaggctg tagactacat caaagcctcc 480  
cgagagttca agggacaatc aggcaccatc aatgtgcccc ccgtcatggc tcaaatcacc 540  
atcttcaccg ccgccatcgc cttacaaggg cctgaagtgc gcagcaagct cacaacgag 600  
tttgcaagcc tataccacga tctcgacggc ggttttagtc ccatcaattt tgttctccct 660  
cgcgcgccct tccccacaa catcaagaga gatcgggccc agctaaagat gcgcaagatt 720  
tacgagacca tcatcgcaga acgccgcgct ggcaagatcc ctcccaccac cgacatgatc 780  
agtcatctca tgcagtgtc gtataaagac ggccgtcctg tgccagactc ggaaatcgca 840  
aacatgatga ttaccattct aatggcgggc cagcacaact cctccaacat tgcgtcttgg 900  
atcatgttgc accttgccaa caagccgcaa ctctgcgaag agctatacca ggaacagctt 960  
gatcaactgg ctgatgagca tggcaacttg cccaagctcg acctgcagac cttggagaag 1020  
ctcaagctgc attctaattg cgtcaaagag acgcttcgca tgcacaactc cattcactct 1080  
atcatgcgcc ttgtcaaaca gccactcccc gtcccccaata cgtcgtggac cataccgcct 1140  
ggccatgccc ttctcgttcc acctggtatc tcagcaaaca gcgaagaata cttctataac 1200  
ccggataagt ggaatccaca tcgctgggac gaccgcgtca tcgaagaaga cgatgagagc 1260  
gagatggtgg actacggcta tggacgcatg tccaggggta caaagagcgc ctacctccc 1320  
ttcgggtggag gtcgccatcg ctgcattggc gaaaagtttg cttacctca cttggaagtc 1380  
atcacggcga ttatggtgcg aaacttttgc tttagaatc tcgatggtag ggaggggtgtt 1440  
ccaggcaccg attacagcac catgttttctg cgtccgctag agcctgccga gattgtttgg 1500  
cagaggcgat ga 1512

<210> 26  
<211> 1599  
<212> ADN  
<213> Phaeosphaeria nodorum  
<400> 26

5

ES 2 675 362 T3

atgggaattc tgcgtgatgt cgccggaccc gtggggaact tcacctctca atcgtccacc 60  
 gccactctca ttgccgcggy cttgcctcc tttatcgtcc tctccgctgt tctcaacggt 120  
 ttgaagcagc tgctgtggaa ggatcccact gcgcccccg tgcgtcttcca cctgttcccc 180  
 atcatcggaa gcaccgtcac gtacggcatc gacccgtaca agttcttctt cgcgcagcag 240  
 aagaagaagg cgcaagctaa caagagacag tatggcgatg tcttcacctt catccttctc 300  
 ggccgcaaga tgaccgtgtg tctcgacacc aagggcaaca acctcatcct gaacggaaag 360  
 ctcaaggagg tcaatgccga ggagatctac tcgccgtca ccacaccctt cttcggcaag 420  
 gatgtcgtct acgactgcc gaactcgaag ctcatggagc agaagaagtt cgtcaagttt 480  
 ggtctgaccc aggaagccct ccgctcctac gttggcatca tcaccaaga atgcgaggat 540  
 tttttcaagc gtcacaaggc tttcaaggga caaaagggca cttttgatgt gaccaaggtc 600  
 atggccgagc tcaccatcta caccgcctcc cactctcttc agggttaagga gatccgcaag 660  
 tcgttcgact ccaagtttgc cgaccttac cacgatctcg atatgggctt ctctcccgtc 720  
 aacttcatgc tgtcatgggc cccccttccc cacaaccgcg cccgcgacgt cgctcgcgag 780  
 acaatgatca agctatactc cgagattgtg cgcaagcgaa gggctggcaa cgtcaagaag 840  
 gactcgcagc acatgatctg gcacttgatg gactgcaagt acaaggatgg cacacaggtt 900  
 cctgaacacg agatcgtgg tatcatgatt gcgctgctga tggctggaca aactcctct 960  
 tcctccacaa tcgcctggat tattctccgt ctggcacagt accctcacct tctcgaagag 1020  
 cttcttgagc agcagaaggc ggtcatgggc gaggaccttc cagcagtcac ctacgaagac 1080  
 ctcaacaagc tgccgttaca cgccaggtt gtcaaggaga ctcttcgcat ccacgctcct 1140  
 atccactcaa tcatgcgcac cgtcaaactc cctatcgttg ttgagggaaac aaactacggt 1200  
 atccccactt cgcacaacct catgtcctcc cccggctact ccgcactcct cgacagctac 1260  
 tttgtcaacg ctgcaacctg ggaccacat cgatgggacg cccggccagca caactacgac 1320  
 gaggctgaga acgacgacga cgagaagatc gactatggct ggggtgttgt ctccaaaggc 1380  
 acaaactcgc cttacctacc atttgggtgct ggaaggcatc gatgcattgg cgagcagttc 1440  
 gcctacctgc agctccagac gatcctcgtc gcatttgtca gggagttcaa gttcaggaac 1500  
 gttaacggta gcaaggacat tgttgggtaca gattacacaa gtctgttctc gagaccgctt 1560  
 gcacctggta cggtcgagtg ggagcgcagg gaatcatag 1599

<210> 27

<211> 1635

<212> ADN <213> Septoria tritici

5 <400> 27

ES 2 675 362 T3

atgggtctcc tccaggaagt cctcgcgcag ttcgacgcgc aattcggcca gaccagcctc 60  
 tggaaacttg tcggacttgg attcctcgcc ttcagcacgc tcgccatcct cctcaatgtc 120  
 ctctcacaac ttctcttccg tggcaagttg tccgatccgc cactcgtatt cactggtgtg 180  
 cccttcatcg gaagcaccat cacatacggc atcgacccat acaagttctt cttctcctgt 240  
 cgggaaaagt atggagatgt ctttacattc atcctgctgg gaaagaagac gacggtgtgc 300  
 ttgggcacca agggcaatga ttttattttg aatggaaaac tgaaggacgt caacgcggag 360  
 gagatataca gcccgctgac cactcctgtc tttggcaagg atgtggttta tgattgtccc 420  
 aattcgaagc tcatggagca gaagaagttc gtcaagtacg gcctcacaac ctctgccctc 480  
 cagtcctacg tgaccttgat cgccgccgag acccgccagt tcttcgaccg caacaaccct 540  
 cataagaagt tcgcatcgac cagcggcacg atcgatctcc caccagccct cgccgaactt 600  
 acgatctata ctgccagccg atcattgcaa ggaaaggaag tccgcgaggg cttcgactcg 660  
 tctttcgcgg acctctacca ctacctgat atgggattca caccgatcaa ctttatgctt 720  
 ccgtgggcgc cccttcccc gaaccgacgc cgcgattatg cgcagaagaa gatgtccgag 780  
 acatacatgt cgatcattca gaagagacga gagtccaaaa cgggcgaaca tgaggaagac 840  
 atgatccaca acttgatgca gtgcaaatac aaggacggca atgccattcc cgacaaggag 900  
 attgctcata tgatgattgc gctgctcatg gccggccagc actcttcatc tgcgaccgag 960  
 tcctggatca ctctccgcct cgcatcccgc cccgacatcc aagacgaact cctccaagaa 1020  
 caaaaggata tgctcgggtg gaacgccgac ggcagtatca aggagctcac atacgccaac 1080  
 ctctcgaaac taccctcct caatcaagtc gtcaaagaaa cccttcgtat tcacgctcca 1140  
 atccactcca ttctgcgcaa ggtcaagtct cccatgcca tcgaaggtag ggcatacgtc 1200  
 attccaacca ccacactct tctggccgct ccgggcacaa cgagccgcat ggacgagcac 1260  
 tttcccgaact gcctccattg ggagccgcat cgatgggacg agagcccgtc cgagaaatac 1320  
 aagcacctgt ccccgacgac tgccttagga agcatcgccg aggagaaaga agactatggc 1380  
 tacggcctgg taagcaaggc cgcggcgtcg ccatacttac cttttggtgc gggacgacac 1440  
 agatgtatcg gcgagcaatt cggtacgtg caattgcaga ccattacagc gacgatggtt 1500  
 cgcgatttca agttttacaa tgtggatggc agcgacaacg tggtaggtac ggattacagc 1560  
 agtttgttca gccggccgct gtcgccggca gtagtaaagt gggagaggag ggaggagaag 1620  
 gaggagaaga actga 1635

<210> 28  
 <211> 1581  
 <212> ADN  
 <213> Cochliobolus sativus  
 <400> 28

ES 2 675 362 T3

atgggtctcc tggctgatgt caccggccct ctggccaact ttacatccca gtcgtccacg 60  
cctgtcgtcg cttctgccgc cttcgcctcc tttatcctgc tctccgtcgt cctcaatgta 120  
ctgaagcagt tgctgttcaa gaaggcgaat gagccgccca tggctcttcca ttggctgcct 180  
ataattggta gtacagtcac atatggcatg gatccgtatg ccttcttctt cgcgaaatcac 240  
aagaagtatg gcaatgtctt tacatattatt cttctcggcc gcaagatgac tgtgtgtctg 300  
gacacggcgg gcaacaactt catcctaaat ggaaagatca aggacgtcaa cgccgaggag 360  
atttactctc ccctcaccac acccgtcttc ggcaaggacg tcgtgatga ttgtccaaac 420  
tcgaaactca tggagcagaa aaagtttgtc aagtacggtc tcacgcagga ggccctccgt 480  
tcctacgtca ccctcatcac acaagaatgc gaagacttta tgaagcgcca caaggctttc 540  
aaggagaaa agggcacttt tgacgtgacc aaggatcatg ctgagctcac catctacacc 600  
gcctctcgtt cgctccaggg cgaggaaatc cgcaagtctt tcgattcaaa gtttgccgaa 660  
ctgtaccacg acctcgatat gggcttttcg cctataaact ttatgctctc atgggccccg 720  
cttcctcaca accgcgcacg cgacaatgca cgcgagacca tgataaagct atactcggat 780  
ctggttcgca agcgcaggtc gggcgccgtg aagaaggact cgcacgacat gatttggcac 840  
ctgatggact gcaagtacaa ggacggcacc caggtgcccc aacacgagat tgctggcatc 900  
atgattgccc tgctcatggc cggacagcat tcgtcttcct caaccatcgc atggatcctt 960  
ctccgcctcg cgcagaacct gcacgttatt gaggaattac ttgccgagca aaagtccatc 1020  
ctaggcaaaa acctccccgc cctaacctac gacgacctcc agaagcttcc cctccatgcc 1080  
caggttgta aggaaacct ccgtatccac gccccattc actccatcat gcgcaaggtc 1140  
aagcaacctc ttgttgctga tggaaacaaac tacgttggtc ccaacttcca cacactcatg 1200  
tcctcgcccg gtttctccgc acagctcgat acccactttg tcaacccccg tgtctgggac 1260  
ccccaccgtt gggatccaga ccaaaacaac tacgacgaag agcgcgacga cgccgaccag 1320  
gagaagattg actatggctg ggggtgctgt tccaagggaa ccaactcacc atatcttccc 1380  
tttggcgctg gacggcatcg ttgtattggg gagcaattcg cctacctgca actacagact 1440  
attctagtag catttgtgag agagttcaag ttcaggaacg ttggtggtag caaagacatt 1500  
gtagcaccg actacaccag tctcttctcc cgcccactag cacctggcat agttgagtgg 1560  
gagagcgggc agaacctata a 1581

<210> 29  
<211> 1686  
<212> ADN  
<213> Ustilago maydis

5

<400> 29



ES 2 675 362 T3

atggtggcct cctcgtcttc ggcgacagcg tcgttgctcg accagctggt tgcgcttacg 60  
 cctctcgccg attcttcggc ctggatcaaa accatcacgg tgctcgtttt gcttcccttg 120  
 ctcgcggtcg ttctcaacgt agcatcgcag cttctgcttg cgactcccaa gaatcatcct 180  
 ccggtggtgt ttcactttgt gcctgtgatt ggatcggcga tctactatgg tatcgaccct 240  
 tacaagttct ttttcgaatg ccgcgaaaag tatggcgatg tgttcacggt tgttctgctc 300  
 ggacgcaaga tcacggtggc gttgggaccc aagggaaagca atctcgtctt taacgccaag 360  
 catcagcagg tgacggcaga ggacgcgtat acgcacctca ccacgcccgt gtttggcaaa 420  
 gaggtggtat acgatgtgcc taatgcggtg tttatggagc agaaaaagtt tgtcaagggtg 480  
 ggtctgtcga tcgaaaactt tcgcgctctac gtgccgcaga tcgtggatga agtgcgagag 540  
 tacatcaaga gcgatgcgcg tttcagcgcga ctcaagacgc gcaagacgat cacagtcgat 600  
 atttttcaag ccatgtcggg actcatcatc ctgaccgcat ccagaacgct gcagggcaag 660  
 gaagtccagc agggctctga caagtcattt gcgcaactgt atcacgatct cgactcgggc 720  
 ttcactccga tcaactttgt gattcccaac ctgccgctgc cgagcaactt taaacgcgac 780  
 agggcgcaga agaaaatgtc gcagttctac caggacattg tggcgaaaacg acgagctgcy 840  
 ggtgcatcca cgtctgccga cgacgccagt ggcgaaaacg atatgatcgc agcactgatc 900  
 gagcaaaagt acaagaacgg acgtgcactc agcggcgtcg agattgcaca tatgatgatt 960  
 gcactcttga tggcgggtca gcacacgagc agcggccacgt cgtcgtgggc gtttctgctg 1020  
 ctggctagtc gaccogaaat catcgaggag ctatacgagg agcagctcaa cgtgtactct 1080  
 gacggacacg gtggtttgag ggaactcgac tacgagacgc aaaagacgtc ggtgcctctg 1140  
 ctggatgctg tggtaaaaga gacgttgcga ctgcacccgc ctctgcacag catcatgcca 1200  
 tatgtgaaat ccgaccttgc cgttccacct acgctctcgt cgccgacgtc gactaaatcc 1260  
 gagccggatg cccactatgt gattcccaag ggccactaca ttatggctgc acctggcgtg 1320  
 tcgcaagtgg atcctcagat ttggaagtca tcggaccagt ttgatccaca ccggtggttg 1380  
 gacgctacga ccgctgcggc gatgcaggac tcgggcgagg acaagcaaga ctttggcttc 1440  
 ggaatgatct ccaccggtgc caatagccca taccttccct ttggcgccgg aagacatcgg 1500  
 tgcacgggag agcagttcgc ctatctccag atcggcgtca tcctagccac cttcgtccgc 1560  
 atcttcaaat ggcacctcga ctccaaattc cccgatcccg actaccaaaag catggtcgtc 1620  
 cttcccagca aaaacggttg cgccatcgtc ctcaccccc gagccgaatc cctccacctc 1680  
 gactag 1686

<210> 30  
 <211> 1588  
 <212> ADN

ES 2 675 362 T3

<213> Rhynchosporium secalis

<400> 30

atgggaattt ttgaaggctg ttacagtccc gctggctcag caggtctcgc agcgcggatt	60
gggcgttgat atcgccgctg gtttcgcagc cttcttggtc gtttctgta ttctcaatgt	120
cctgagccag atactgttca agaaccctca tgagcctcgc attgttttcc acttcttccc	180
tatcattggt agcacagtta catacgggat tgacccttac aaattcttct tcgacaacaa	240
ggcaaagtat ggcgaagtct ttacctttat cctgctcggc aagaagacga ctgtgtacct	300
tggtagccac ggaaacgaat tcattctcaa tggaaagatt aaggatgta atgcggagga	360
ggtctacacg gtcctgacca ccccagtctt tggaaaggat gtggtttacg attgtccgaa	420
ctataagggg agggagcaga aaaaagttaa tgaaaaatcg ggactttcca cagaagcctt	480
cagacttacg ttccaatcat tcaggacgaa gtcgaaacat ttatcaaggg ctcggcagca	540
ttcaaggggc ataaaggcac tgtcaacatt cctgctcaaa tggctgaaat cacaatctat	600
accgcttctc acgccctcca aggaaaggat tgccgagaca aattcgacca ctcatgtgct	660
gagctwtayc acgcmctsga catgggcttt agcccgataa attttatgct tcaactggct	720
cctcttcccc ataatcgcg cggggaccac gcacagcgaa ctgtcgcca agcctacatg	780
gaaatcatgg agacgcgccg aaaagacaag aagagcctcg acaatatgga catcatgtcc	840
cagctcatgc gctccactta caagaatgga gttccggctc cggatatgga aatcgcgcac	900
atgatgattg ccctgctcat ggctggacaa cattcgtcct ctctctcaag tacctggatc	960
atactcagac ttgccgctag accagatata ttggaggagc tataaccagga gcaactcgaa	1020
gtgctcggat ctgatctacc agccctacaa tacgaagatc tcgccaaact caccaagcac	1080
caaacgctt tgaaggaggt cctgagactt cacactccta tccactccat catgcgaaaa	1140
gtcaagagcc ctatgccaat tgcaggactt aagtttgtca tcccacctc acacgtcctc	1200
ctcgcatcac ctggtttttc cagccgagag gctacctatt ttccctgacc cgctaaagtg	1260
gracccccay cgatgggaac ccgaatctgg tggagtctg ggtactgagg tcgaggaaga	1320
gagctacgat tacggatacg gtcttattag caaggggtgcc aagagtccat accttccatt	1380
cggagctggt agacataggt gtatcggaga gcaatttgcc aatgtgcagc tgatcactat	1440
cacagctgtc atggtacgat atttcaaatt caggaacctc gatggaagct cgaaggttgt	1500
tgagactgat tatacagatc tattctcgag acctctagca ccggcggtgg ttgagtggga	1560
gaagagagaa aaagttaagg tttgaagg	1588

<210> 31

<211> 1575

<212> ADN

<213> Venturia inaequalis

5

ES 2 675 362 T3

<400> 31

atgggactcc tctctccttt gctcgcctcg ttaccgggca gcgaccgcag ttggttat	60
tacactcttg cctccttcgg cttcacggtt gcaatcgtcg ccgccaacct tgtcaagcaa	120
ctcttattct caaacccaaa cgaacctcca gtagtcttcc actggtttcc cttcttcggc	180
aacacggtcg tctacggcat cgatcctatc aagtttttcg ccgagtgcaa ggaaaagcat	240
ggcgatatct ttaccttcat tcttcttggc aggaaaacaa cagtctacat tggtaaaaag	300
ggaaacgaat tcattctcaa tggcaaacag agccatgtca acgcagagga aatctatagc	360
cccctgacga cgcccgtctt cggctccgat gttgtctatg attgccc aaa ctcgaaattg	420
atggagcaaa agaagttcgt caagtacggt ctcaccaccg aagctctcaa atcctatgtc	480
accctcatcc aacaagaagt cgaagactat accaaacgct accctcaatt caaaggcgaa	540
aagggcagct tcgatgtttg cgcttccatg gccgaaatca caatcttcac tgcttcccgc	600
tactacaag gcaaggaggt tcgcgacaag tttgacgcca gctttgcaga cctcttccac	660
gatttgata tgggcttctc tcctatcaac ttcattgctc cctgggcccc tcttccacac	720
aatcgtcgcc gagatgccgc gaacaaaaag atgacggaga catatttgga aattatccaa	780
tcgagaaaag cagagggcgt caaaaaggat tcagaggaca tgatttgga tttgatgcag	840
tgtgtataca agaatggcac tcccatcccg gacaaagaaa tcgcccacat gatgatcgcg	900
ctgctcatgg ccggccagca ctcgtcctct agcacctcgt cctggattct acttcgacta	960
gctaccagac ctgatatcca ggaagaacta taccagaac aaattcgggt ttgaggcgt	1020
gatcttccac cgttgcagta cgaagatctt gctcgcctgc ctctccacaa ccagattatc	1080
aaagaaactc ttcgcatgca ttcgccaatt cacagcatct tgcggtgccgt caaacagcct	1140
atgcctgtcg aaggaactcc ttacaccatc cccacctcgc atgttctcct tgctgctccc	1200
atcgcctctg gaggctcgcc aatgtacttt ccagctcctg agaagtggga gcctcaccgt	1260
tgggacgaag gatcaggagg aaccaacatc tcgggcgggc aaaacggtgg cgaagagaaa	1320
gaggattacg gctatggact catcaciaaag ggcgccagct cgccgtacct tccgttcggc	1380
gctggaagac ataggtgtat cggcgaacaa tttgcatata tgcagttgaa cacggttctc	1440
gcgacgcaag ttcgcaatt caagttcagt ttgaggggaag gagagtcgtt cccaagacc	1500
gacttctctt ctctatcttc tggacctcta cgccccgcgt ggttgaactg ggaacgtaga	1560
 gagaagtcct catga	 1575

<210> 32

<211> 21

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador  
 <400> 32  
 cgggccattg acaatccccg t 21  
 5  
 <210> 33  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 10  
 <400> 33  
 gcagcaaact cggcagtgag 20  
 <210> 34  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 15  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 34  
 gacgtccagc aagtttgacg agtc 24  
 20  
 <210> 35  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 25  
 <223> cebador  
 <400> 35  
 ccatggagag ttcataaggt gcttca 26  
 30  
 <210> 36  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 36  
 35  
 actagtattg gaagcaccgt acaat 25  
 <210> 37  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 40  
 <223> cebador  
 <400> 37  
 gagctccatt ggagcagtca taaacaa 27  
 45  
 <210> 38  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

ES 2 675 362 T3

<220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 38  
 aagcttcagc aagttgacg agtc 24  
  
 5 <210> 39  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 10 <223> cebador  
  
 <400> 39  
 cccgggcatt ggagcagtca taaaca 27  
  
 <210> 40  
 <211> 38  
 15 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 40  
 20 taatacgact cactataggg cagcaagtt gacgagtc 38  
  
 <210> 41  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 41  
 taatacgact cactataggc attggagcag tcataaaca 40  
  
 <210> 42  
 30 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 35 <400> 42  
 cctttgtgc cggtagacat 20  
  
 <210> 43  
 <211> 20  
 40 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 43  
 cccatcgaat aaacgcaggc 20  
  
 45 <210> 44  
 <211> 22

<212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 5 <400> 44  
 tctacaccgt tctcactact cc 22  
  
 <210> 45  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 45  
 gcttctcttg aagtaatcgc 20  
  
 <210> 46  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 15 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> cebador  
  
 <400> 46  
 cgagtccctg gcactgaatg 20  
  
 <210> 47  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 47  
 30 gctcatcacc ccaaaccgt 20  
  
 <210> 48  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 35 <400> 48  
 atctcgagcc cggtaccatg g 21  
  
 <210> 49  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 45 <400> 49  
 ctcggtgtaa tgacccttg cc 22

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ARNdc capaz de inhibir la expresión del gen CYP51A, el gen CYP51B y el gen CYP51C de un fitopatógeno del género *Fusarium*, comprendiendo el ARNdc:
- 5 i) una secuencia sentido que es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia codificante del gen CYP51A;
  - ii) una secuencia sentido que es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia codificante del gen CYP51B;
  - iii) una secuencia sentido que es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia codificante del gen CYP51C; y
  - 10 iv) secuencias antisentido que son sustancialmente complementarias a las secuencias sentido (i), (ii) y (iii);
- en la que la disposición de las secuencias en la molécula de ARNdc permite la hibridación de cada secuencia sentido con su secuencia antisentido sustancialmente complementaria.
2. La molécula de ARNdc de la reivindicación 1, en la que el fitopatógeno es *Fusarium graminearum*, y la secuencia sentido (i) es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:1; la secuencia sentido (ii) es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:2; y la secuencia sentido (iii) es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:3.
3. La molécula de ARNdc de la reivindicación 2, en la que,
- la secuencia sentido (i) es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:4;
  - la secuencia sentido (ii) es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:5; y
  - 20 la secuencia sentido (iii) es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:6.
4. La molécula de ARNdc de la reivindicación 1, en la que el fitopatógeno es *Fusarium oxysporum*, y la secuencia sentido (i) es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:8; la secuencia sentido (ii) es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:9; y la secuencia sentido (iii) es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:10.
- 25 5. La molécula de ARNdc de la reivindicación 1, en la que el fitopatógeno es *Fusarium verticillioides*, y la secuencia sentido (i), es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:11; la secuencia sentido (ii) es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:12; y la secuencia sentido (iii) es al menos el 70 % idéntica a al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:13.
- 30 6. La molécula de ARNdc de la reivindicación 1, que comprende una secuencia sentido que es al menos el 70 % idéntica a la SEQ ID NO:7, y una secuencia antisentido que es sustancialmente complementaria a dicha secuencia sentido, en la que la disposición de las secuencias en la molécula de ARNdc permite la hibridación de dicha secuencia sentido con dicha secuencia antisentido.
7. La molécula de ARNdc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la identidad de secuencia de cada secuencia sentido pertenece a al menos 25, al menos 50, al menos 100, al menos 150, al menos 200 o todos los nucleótidos contiguos de su respectiva secuencia de referencia.
- 35 8. La molécula de ARNdc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la identidad de secuencia de cada secuencia sentido con su respectiva secuencia de referencia es de al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 100 %.
9. La molécula de ARNdc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que cada secuencia sentido se localiza en una cadena de ARN diferente de la molécula de ARNdc que su correspondiente secuencia antisentido.
- 40 10. La molécula de ARNdc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que las secuencias sentido y las secuencias antisentido se localizan en una única cadena de ARN que se enrolla sobre sí misma para formar una estructura de horquilla.
11. Una secuencia de ADN o una multitud de secuencias de ADN que proporcionan un molde transcripcional de al menos las secuencias antisentido de la molécula de ARNdc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 45 12. La(s) secuencia(s) de ADN de la reivindicación 11 que proporciona(n) un molde transcripcional de la molécula de ARNdc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
13. La(s) secuencia(s) de ADN de la reivindicación 12, en la(s) que el molde transcripcional está unido de manera operativa a al menos un promotor.
- 50 14. La(s) secuencia(s) de ADN de la reivindicación 13, en la(s) que el al menos un promotor es funcional en una célula vegetal.
15. Un polinucleótido aislado que comprende la(s) secuencia(s) de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones

- 11-14 o una multitud de polinucleótidos aislados que comprenden las secuencias de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 11-14.
16. Una planta transgénica que comprende la(s) secuencia(s) de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 11-14 o el polinucleótido de la reivindicación 15.
- 5 17. La planta transgénica de la reivindicación 16, en la que la planta es capaz de generar al menos las secuencias antisentido de la molécula de ARNdc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
18. La planta transgénica de la reivindicación 17, en la que la planta es capaz de generar moléculas de ARNdc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 10 19. La planta transgénica de una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, en la que la planta transgénica es un cultivo cereal.
20. Un procedimiento de control de un fitopatógeno fúngico o de oomiceto, en el que una planta transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-19 se cultiva para permitir la generación de ARN que comprende las secuencias antisentido de la molécula de ARNdc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, y dicho ARN inhibe el crecimiento y/o la propagación de dicho fitopatógeno.
- 15 21. Una composición para controlar un fitopatógeno fúngico o de oomiceto que comprende la molécula de ARNdc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, y un vehículo fitocompatible.
22. Un procedimiento de control de un fitopatógeno fúngico o de oomiceto, en el que una planta infestada por o en riesgo de ser infestada por dicho fitopatógeno y/o la proximidad de dicha planta, se pone en contacto con una cantidad eficaz de la composición de la reivindicación 21.

20



Figura 1

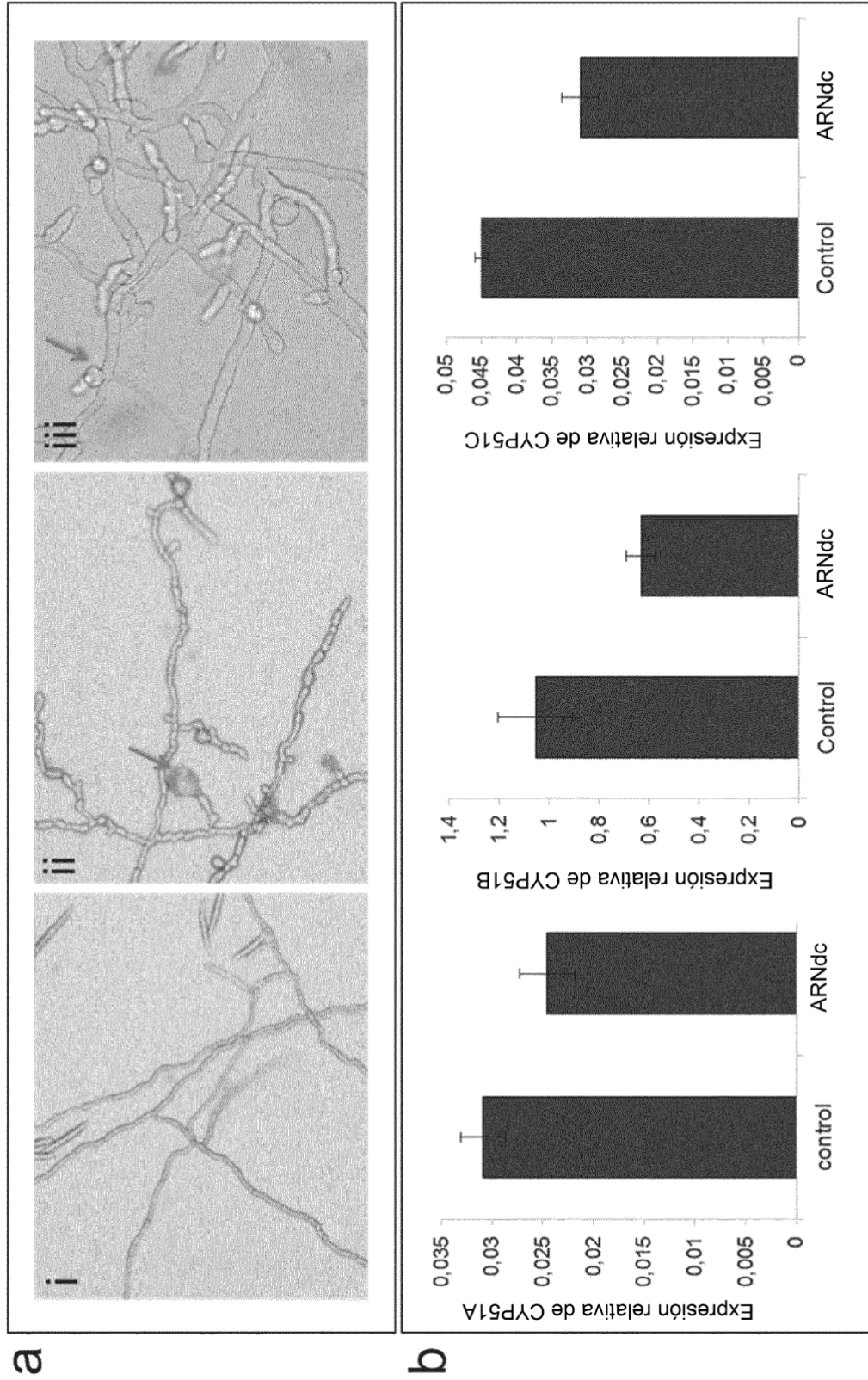


Figura 2

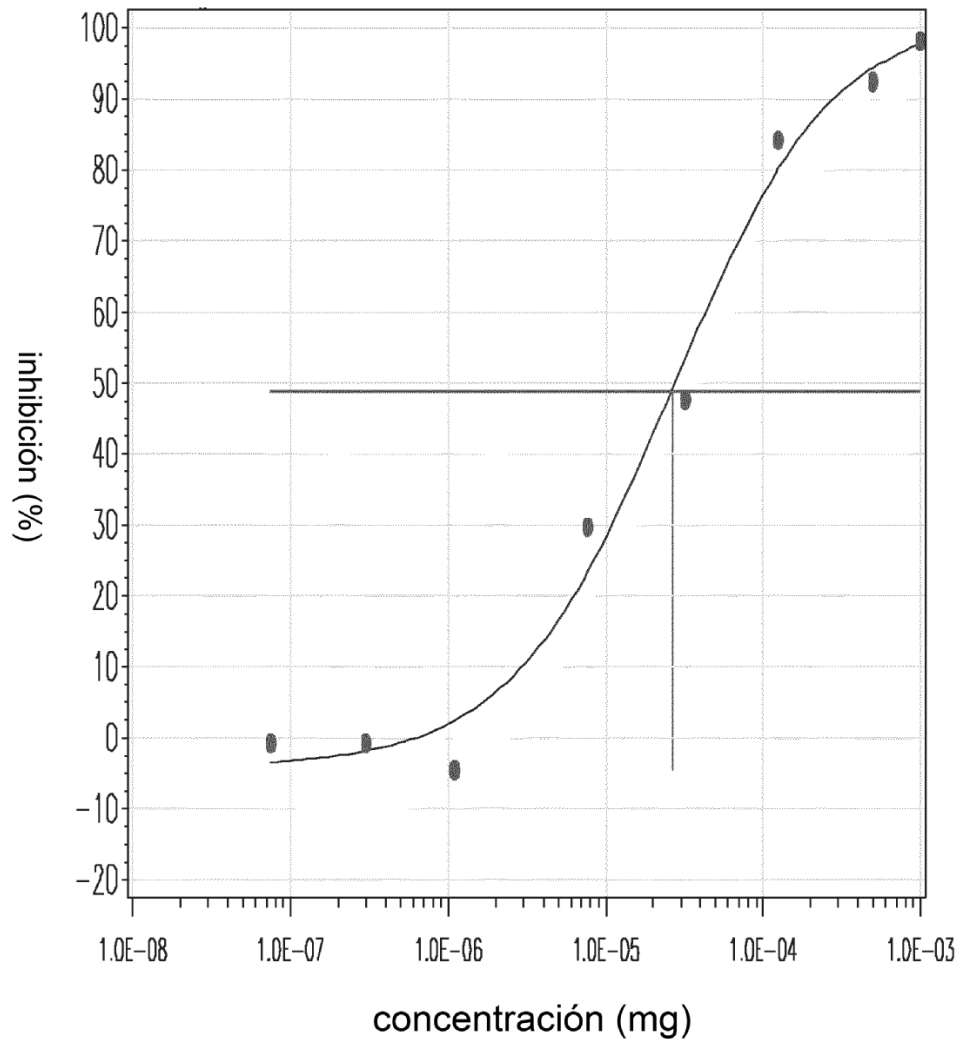


Figura 3

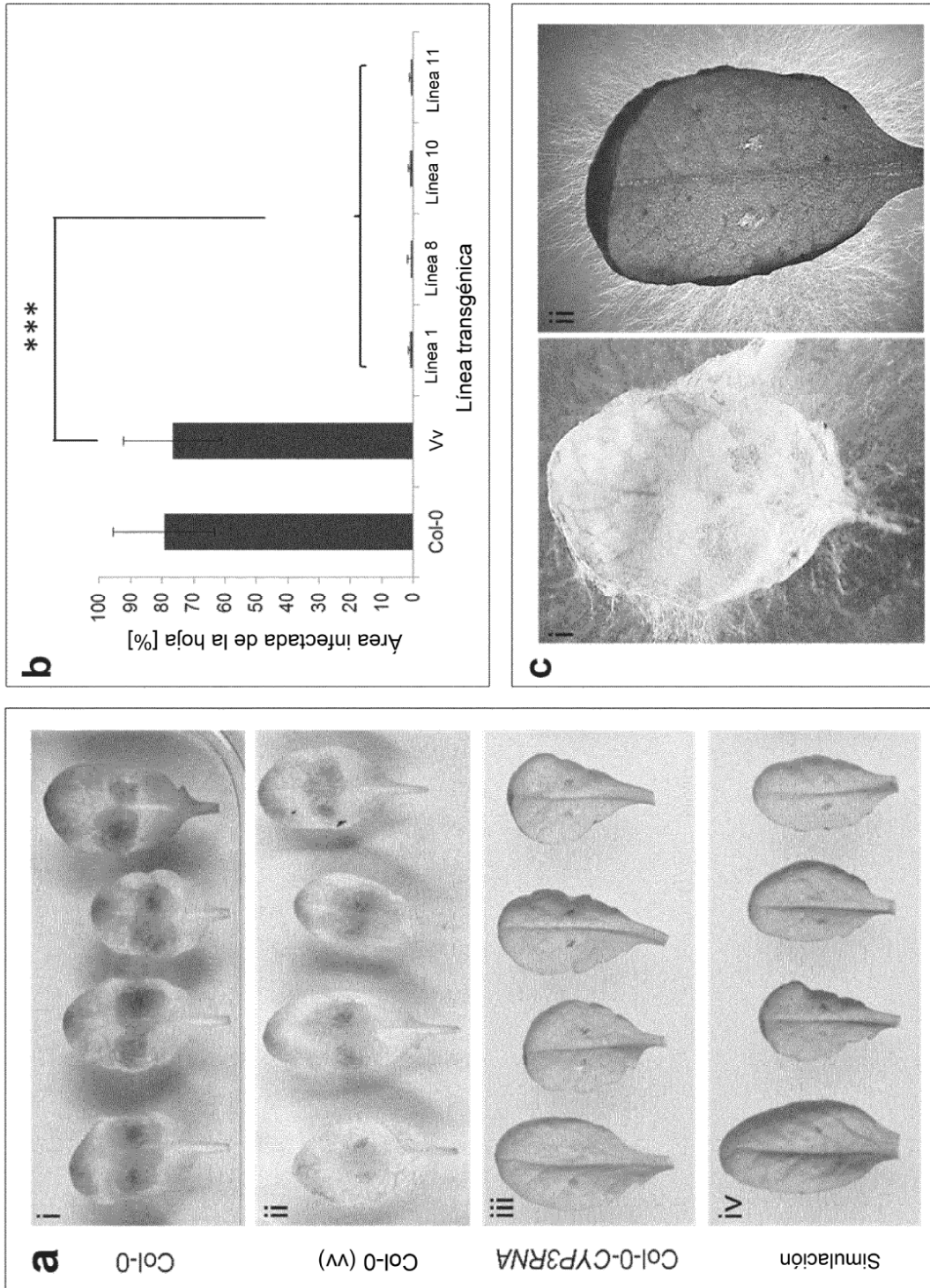


Figura 4

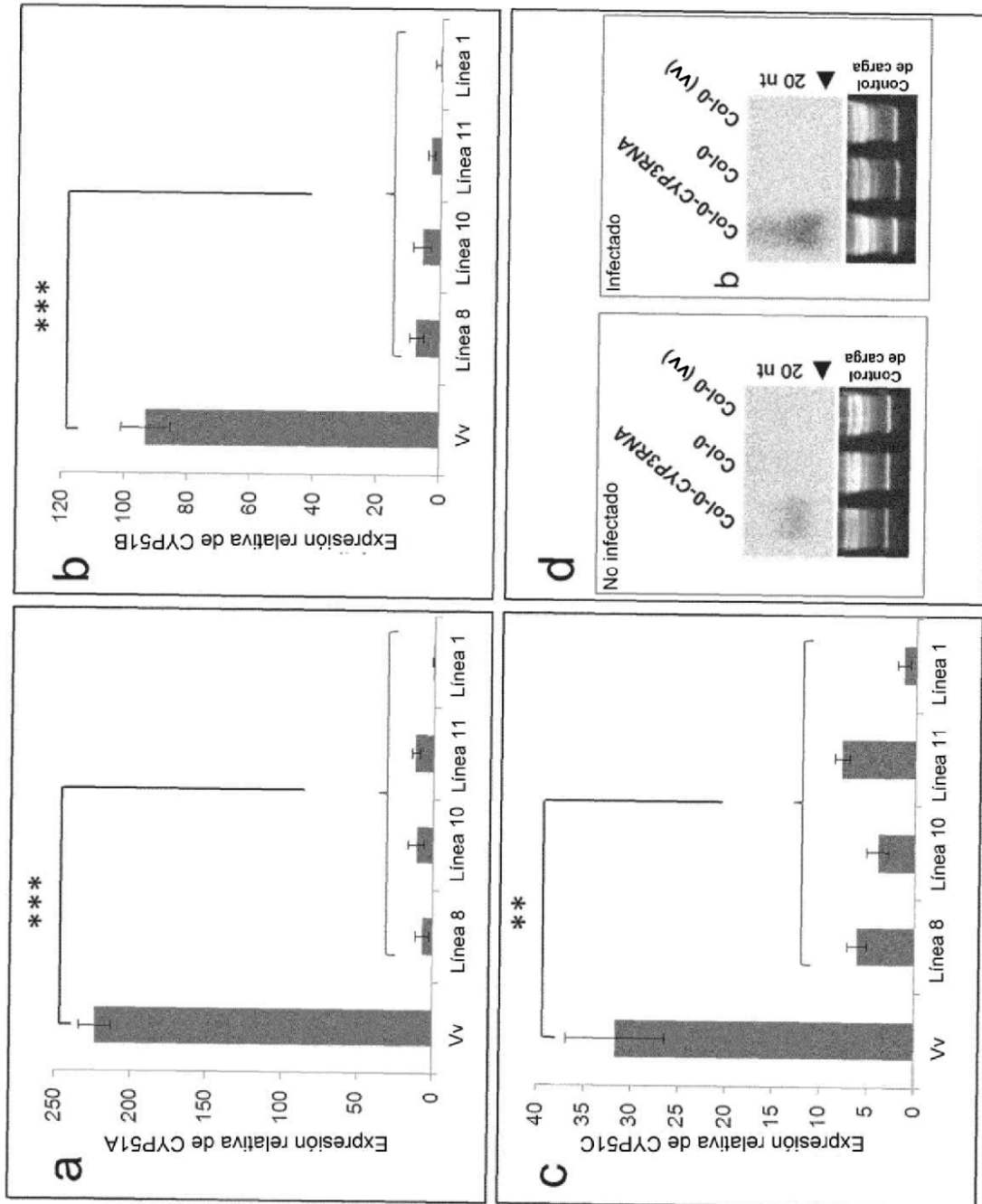


Figura 5

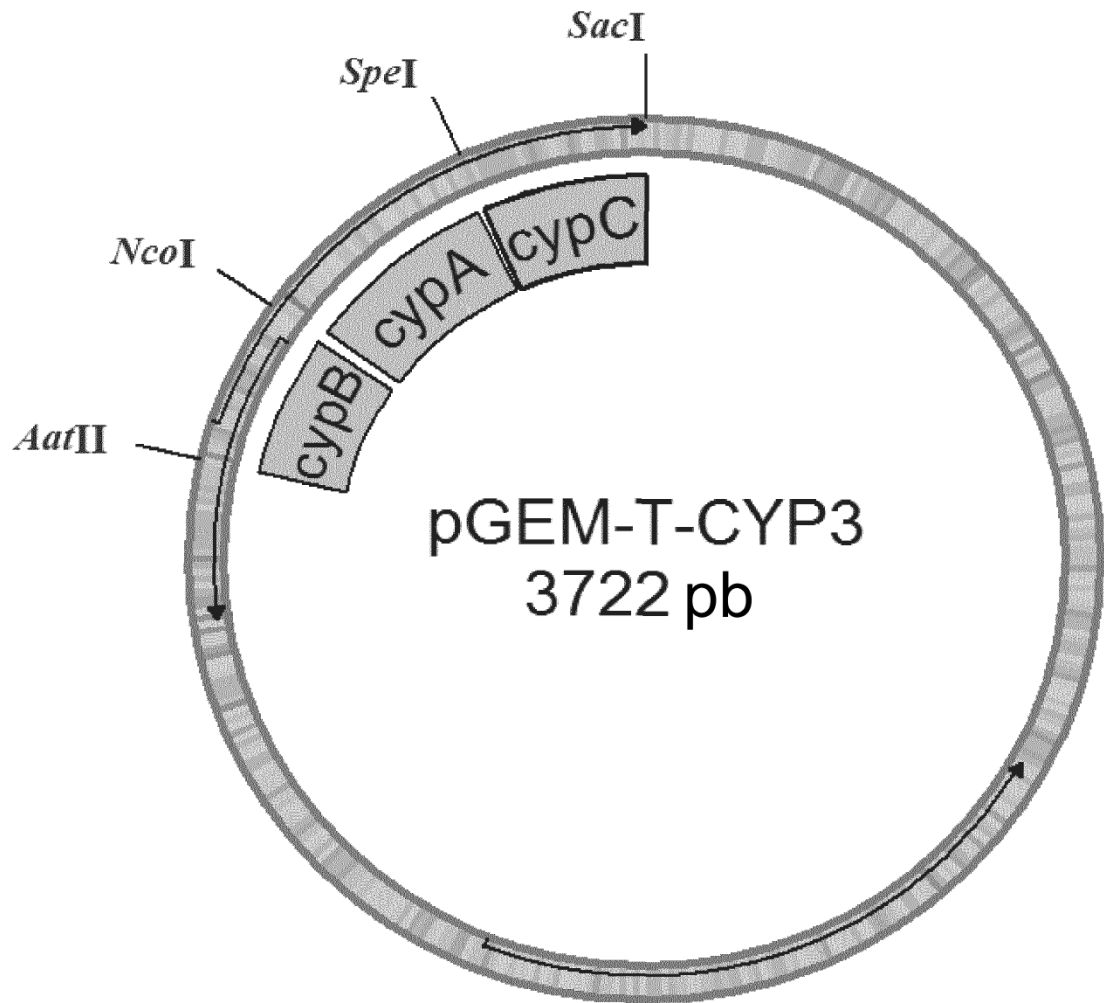


Figura 6

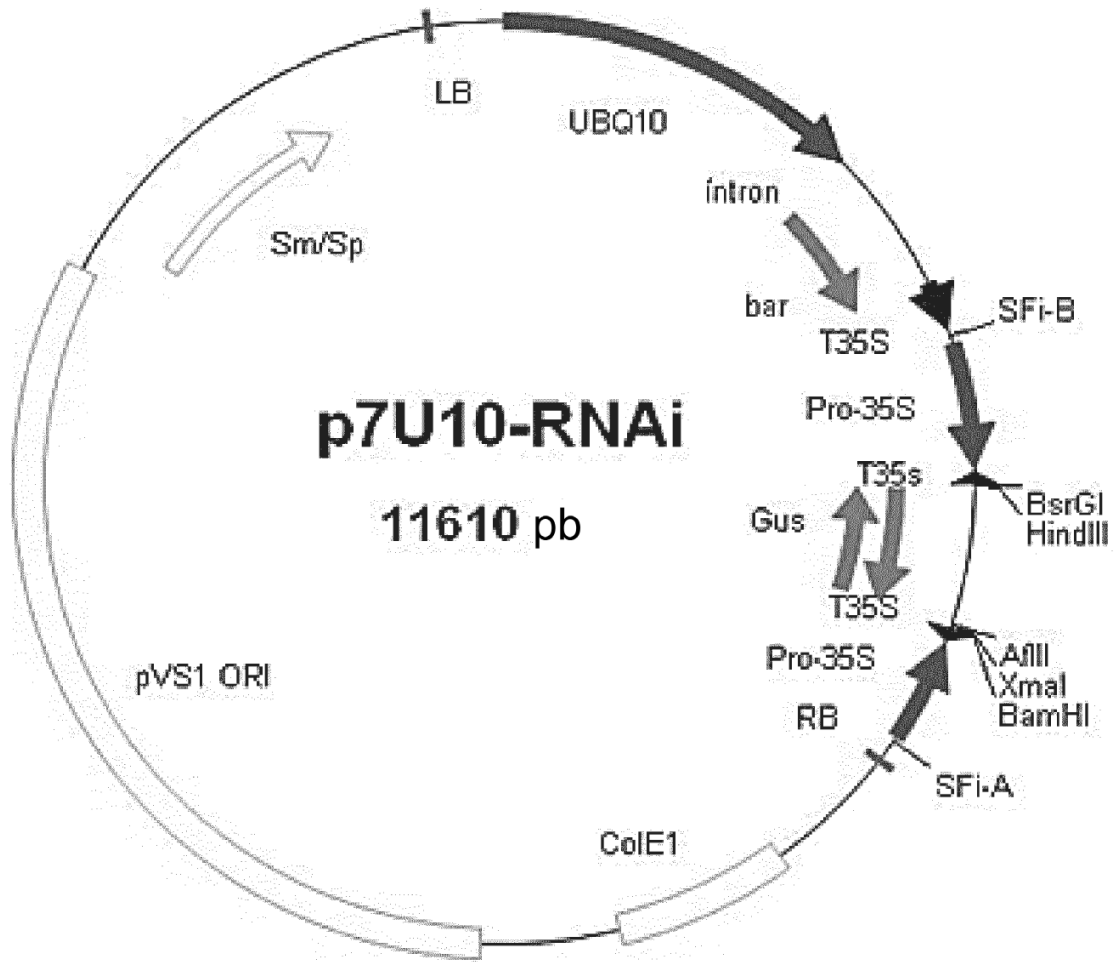


Figura 7

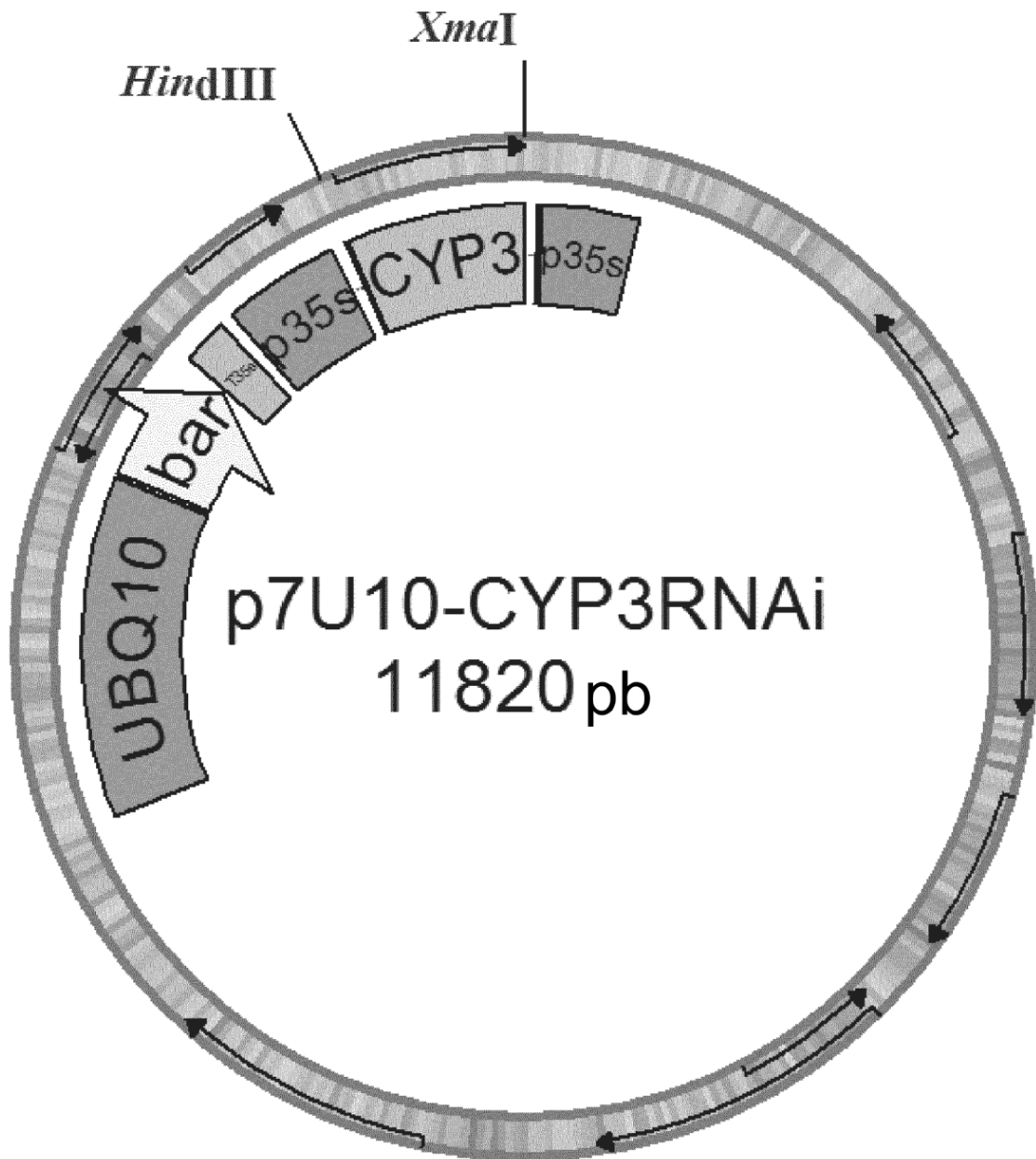


Figura 8

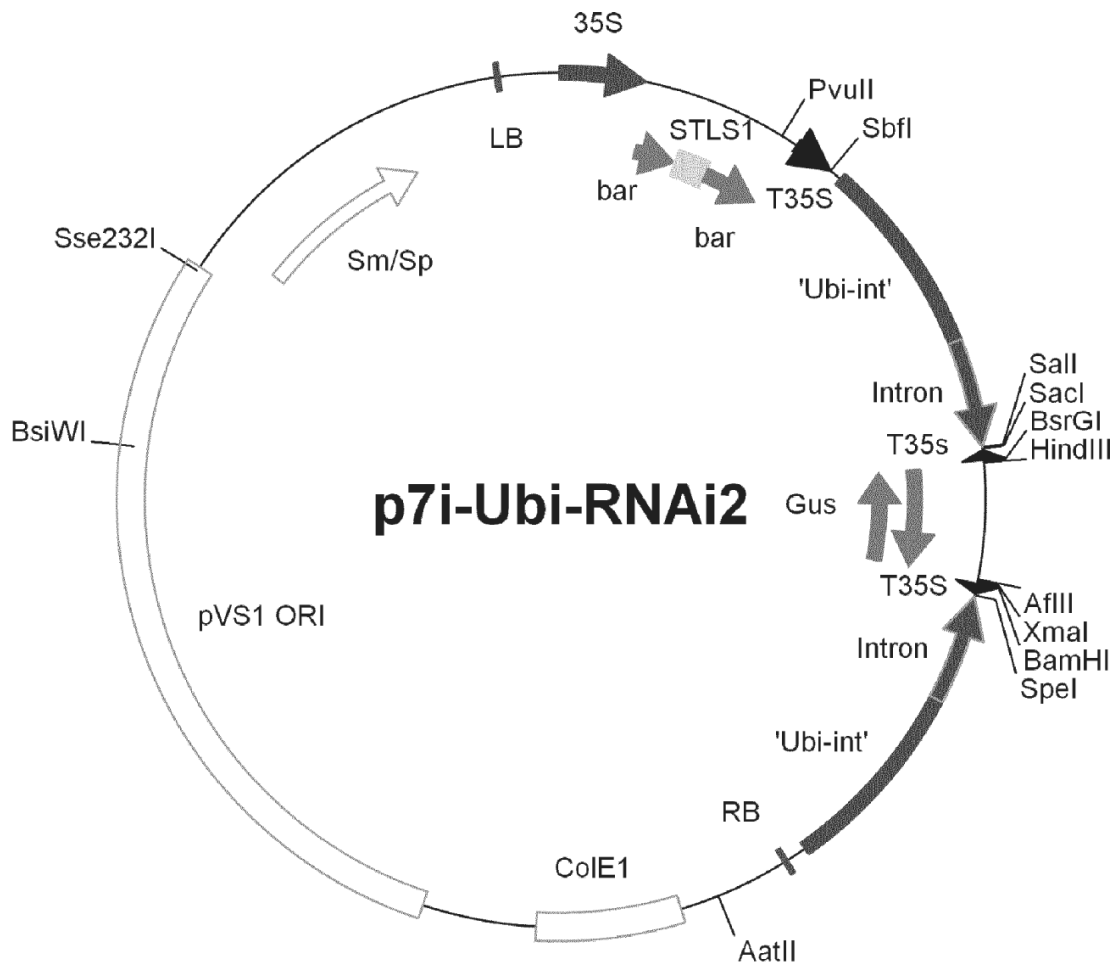




Figura 9

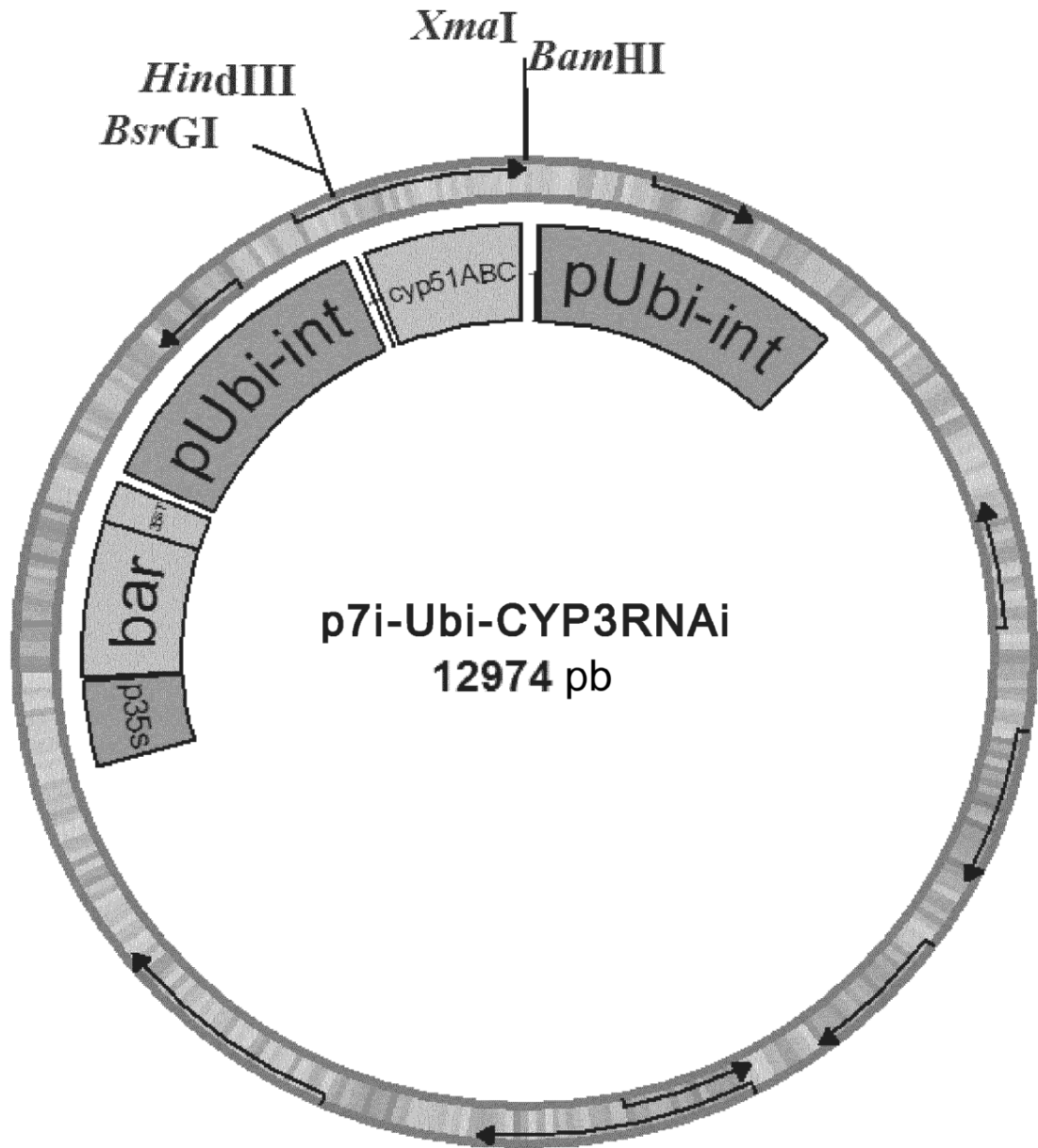
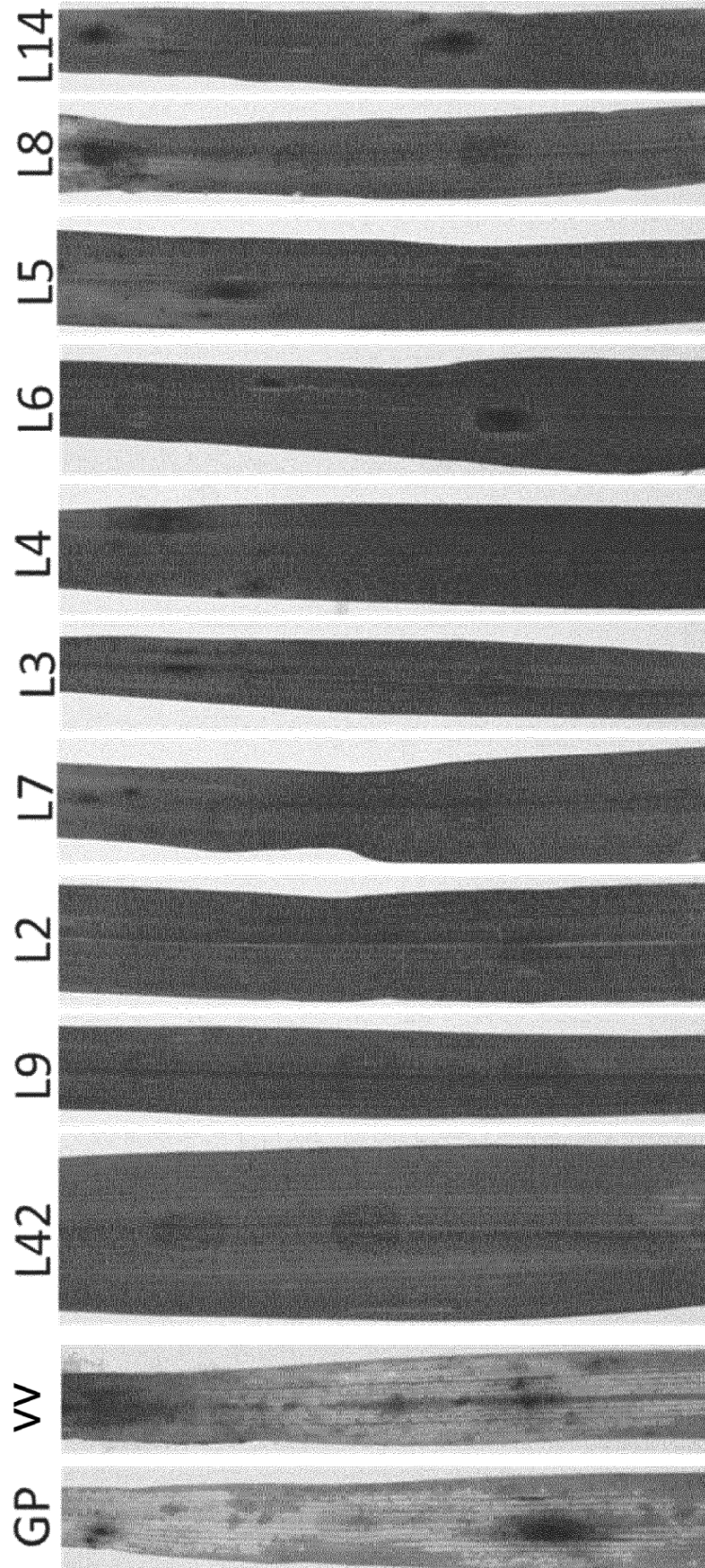
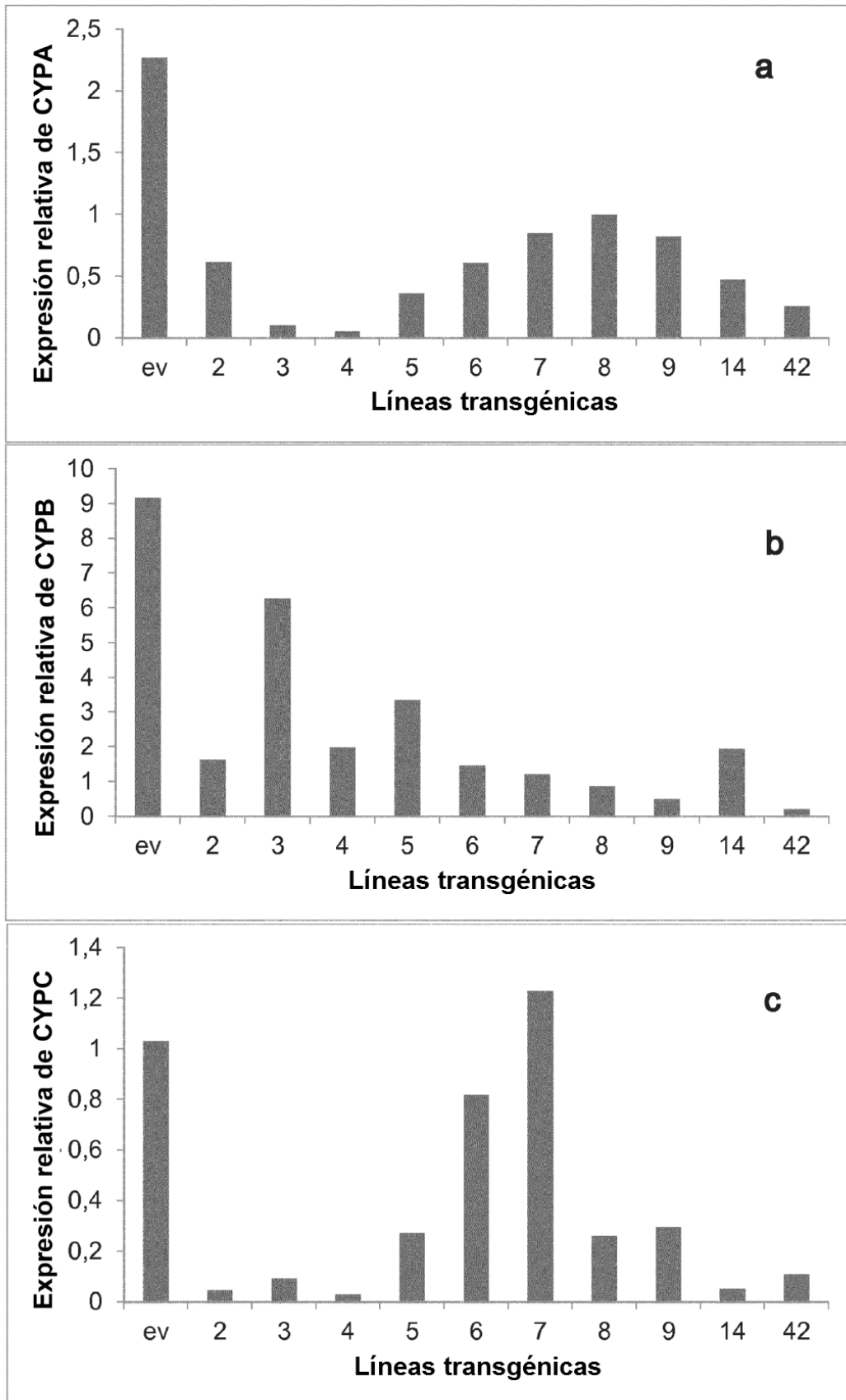


Figura 10



**Figura 11**



**Figura 12**

