

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 742**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2009 E 09742466 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 2283034**

54 Título: **Genes y procedimientos para aumentar la resistencia a enfermedades en plantas**

30 Prioridad:

**08.05.2008 US 51459 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.12.2013**

73 Titular/es:

**ALELLYX APPLIED GENOMICS (100.0%)  
Rua James Clerk Maxwell 320 Techno Park (Rod.  
Anhanguera Km 104)  
13069-380 Campinas Sao Paulo, BR**

72 Inventor/es:

**SILVA, ANA CLAUDIA RASERA y  
MONGE, GUSTAVO ADOLFO ASTUA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 434 742 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

Genes y procedimientos para aumentar la resistencia a enfermedades en plantas

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la biología molecular y de la regulación del sistema de defensa natural de las plantas mediante la introducción de genes extraños/naturales en las células vegetales, preferiblemente en sus genomas. De forma más específica, el procedimiento se refiere a aumentar la resistencia a enfermedades de los cítricos mediante la sobreexpresión de los genes implicados en el sistema de defensa innato de las plantas.

### Introducción

10 En la naturaleza, plantas y animales están en permanente contacto con un conjunto muy diverso de microorganismos, aunque raras veces esta asociación da como resultado enfermedades. Esto es debido principalmente a la existencia de sistemas de defensa que, en el caso de las plantas, carecen de la respuesta inmune adaptativa común en el reino animal.

15 La capacidad de una planta de reconocer un patógeno y de activar una defensa eficaz está controlada a menudo por la interacción (directa o indirecta) entre los productos de un gen de resistencia de la planta y un gen de avirulencia del patógeno. Dangl y Jones, 2001, Nature 411, 826-33. Como consecuencia de esta interacción gen a gen, el tejido recientemente infectado puede presentar flujos de iones, la producción de especies reactivas de oxígeno, ácido salicílico (SA), óxido nítrico, y un aumento en la expresión de los genes asociados a la defensa, incluyendo aquellos que codifican las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Durrant y Dong, 2004, Annu. Rev. Phytopathol. 2004. 42: 185-209. Además, las células que rodean el(los) sitio(s) de entrada del patógeno experimentan normalmente la muerte celular de tipo apoptótico, formando por tanto las características lesiones necróticas de la respuesta hipersensible (HR). Heath, 2000, Plant Molecular Biology 44: 321-34.

25 Hasta la flecha, se han clonado algunos genes de resistencia de plantas (genes R) y, basándose en la estructura de las proteínas que codifican, los genes se han dividido en diversos grupos (Hammond-Kosack y Jones, 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 48, 575-607). La mayoría de los genes R codifican proteínas NB-LRR citoplásmicas, que contienen un sitio de unión a nucleótido (NB) y repeticiones ricas en leucina (LRR). Este grupo consiste en genes que codifican proteínas CC-NB-LRR, que contiene un dominio de superhélice y genes que codifican proteínas que tienen un dominio similar a los receptores Toll y de la interleucina (IL) de mamíferos, las denominadas proteínas TIR-NB-LRR (Hammond-Kosack y Jones, 1997, más arriba).

30 El uso de dichos genes de resistencia específica en programas de reproducción para una resistencia duradera es problemático debido a que los patógenos evitan fácilmente el reconocimiento mediante mutaciones en sus factores de avirulencia, evitando de este modo la inducción de la defensa activa (Westerink y col., 2004, Mol. Microbiol. 54, 533-545). La similitud entre las proteínas de resistencia (proteínas R) sugiere la existencia de rutas de resistencia comunes (Shirasu y Schulze-Lefert, 2000, Plant Mol. Biol. 44, 371-385). Por tanto, la identificación de los genes adicionales requeridos para la resistencia no proporciona solo información sobre cómo funcionan dichas rutas de señalización sino que puede permitir también utilizarla para identificar los genes que juegan un papel más general en la resistencia.

35 A pesar de la creciente información acerca de las rutas de resistencia a enfermedades, sigue existiendo necesidad de identificar los genes y las proteínas que se pueden utilizar para crear plantas con un amplio rango duradero de resistencia a enfermedades. Es un objetivo de la invención proporcionar dichos ácidos nucleicos, proteínas y procedimientos para crear plantas, especialmente plantas que pertenecen a la familia Rutaceae, con resistencia a enfermedades aumentada.

### Resumen de la invención

45 En un aspecto, la invención proporciona una construcción que comprende (i) la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1 y (ii) un promotor que funciona en plantas, en la que la secuencia de nucleótidos está unida de forma operable al promotor de tal manera que el último expresa la secuencia polipeptídica que se muestra en la SEC ID N°: 14. En una realización, el promotor se selecciona entre un promotor CA/IV de 35S, el promotor de la poliubiquitina, un promotor específico de tejido, y un promotor preferido de tejido. En otro aspecto, la invención proporciona una célula vegetal que comprende la construcción.

50 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para aumentar la resistencia a la enfermedad del chancro de los cítricos en una planta o célula, que comprende sobreexpresar la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1.

55 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para aumentar la resistencia a la enfermedad del chancro de los cítricos en una planta o célula, que comprende (a) transformar una planta o célula con una construcción que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1, unida de manera operable con un promotor activo en células vegetales, (b) regenerar una planta a partir de dicha planta o célula

transformada y (c) seleccionar una planta o célula que tiene una resistencia aumentada a la enfermedad del chancro de los cítricos con respecto a una planta control. En una realización, el promotor se une de manera operable a un potenciador. En otra realización, el promotor es un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido. En una realización adicional, el promotor específico de tejido es un promotor específico de xilema, un promotor específico de floema, o un promotor específico de xilema/floema. En otra realización, la planta es un miembro de la familia Rutaceae. En una realización adicional, la planta se selecciona entre los géneros *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Murraya*, *Microcitrus*, *Limonia*, y *Eremocitrus*.

En otro aspecto, la invención proporciona una planta transgénica que tiene incorporado en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de resistencia a enfermedades que se muestra en la SEC ID N°: 14. En una realización, el polipéptido está codificado por una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1. En una realización adicional, la progenie, el fruto, o la semilla de la planta comprende dicha secuencia de nucleótidos. Materia que ya no constituye aspectos de la invención se mantiene en los siguientes párrafos de la memoria descriptiva como técnica antecedente de utilidad para la comprensión de la invención.

### **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1. Perfiles de expresión en silicio de una muestra seleccionada de genes identificados en bibliotecas de ADNc construidas a partir de tejido de hoja de cítrico previamente estimulada con *Xanthomonas axonopodis* pv citri (A-12h, A-24h e A-48h) y *Xanthomonas axonopodis* pv aurantifolii (C-12h, C-24h y C-48h).

Figura 2. Expresión diferencial de genes *deg* seleccionados en cítricos estimulados con *Xanthomonas axonopodis* pv citri (A-12, A-24 e A-48) y *Xanthomonas axonopodis* pv aurantifolii (C-12h, C-24h y C-48h).

Figura 3. Representación esquemática de los vectores pr35S(2x)-CaMV::ahas::35SpolyA pr35S-CaMV::deg::NOSpolyA.

Figura 4. Diagrama a escala que ilustra el desarrollo de lesiones de chancro de los cítricos en hojas de naranja dulce artificialmente inoculadas con una suspensión bacteriana de *Xanthomonas axonopodis* pv citri.

Figura 5. Gravedad de la enfermedad en eventos seleccionados pr35S-CaMV::deg::NOSpolyA y variedad de control en Pineapple (C).

Figura 6. Tasa de crecimiento diferencial de la bacteria del chancro de los cítricos en cítricos que contienen las construcciones pr35S-CaMV::deg:: NOSpolyA y la variedad de control Pineapple (C).

Figura 7. Niveles de expresión del transgén en eventos seleccionados que contienen las construcciones pr35S-CaMV::deg::NOSpolyA y la variedad de control Pineapple (C).

### **Breve descripción del listado de secuencias**

SEC ID N°: 1 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud con una proteína rica en glicina que pertenece a la familia de la seferina de péptidos antimicrobianos.

SEC ID N°: 2 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud con una enzima de la familia de las peroxidasa.

SEC ID N°: 3 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud con un péptido antimicrobiano de la familia de la esnaquina.

SEC ID N°: 4 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud con una enzima con actividad fosfatasa.

SEC ID N°: 5 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud con una enzima con actividad ligasa E3.

SEC ID N°: 6 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud con una enzima con actividad ligasa E3.

SEC ID N°: 7 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud con una enzima con actividad asparagina sintasa.

SEC ID N°: 8 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido que puede estar implicado en el sistema natural de defensa de las plantas.

SEC ID N°: 9 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud con un factor de transcripción de la familia de proteínas de unión a elementos sensibles a etileno.

SEC ID N°: 10 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido que puede estar implicado en el sistema natural de defensa de las plantas.

SEC ID Nº: 11 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud con una proteína teórica de función todavía desconocida; sin embargo, tiene dominios similares a los descubiertos en el factor de transcripción de la familia FRIGIDA.

5 SEC ID Nº: 12 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido que puede estar implicado en el sistema natural de defensa de las plantas.

SEC ID Nº: 13 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud con una enzima con actividad transferasa.

SEC ID Nº: 14 secuencia prevista de la proteína según la SEC ID Nº: 1.

SEC ID Nº: 15 secuencia prevista de la proteína según la SEC ID Nº: 2.

10 SEC ID Nº: 16 secuencia prevista de la proteína según la SEC ID Nº: 3.

SEC ID Nº: 17 secuencia prevista de la proteína según la SEC ID Nº: 4.

SEC ID Nº: 18 secuencia prevista de la proteína según la SEC ID Nº: 5.

SEC ID Nº: 19 secuencia prevista de la proteína según la SEC ID Nº: 6.

SEC ID Nº: 20 secuencia prevista de la proteína según la SEC ID Nº: 7.

15 SEC ID Nº: 21 secuencia prevista de la proteína según la SEC ID Nº: 8.

SEC ID Nº: 22 secuencia prevista de la proteína según la SEC ID Nº: 9.

SEC ID Nº: 23 secuencia prevista de la proteína según la SEC ID Nº: 10.

SEC ID Nº: 24 secuencia prevista de la proteína según la SEC ID Nº: 11.

SEC ID Nº: 25 secuencia prevista de la proteína según la SEC ID Nº: 12.

20 SEC ID Nº: 26 secuencia prevista de la proteína según la SEC ID Nº: 13.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos para regular el sistema de defensa natural de las plantas mediante la introducción de genes extraños/naturales en las células vegetales, preferiblemente es sus genomas. De forma más específica, los procedimientos se refieren a un aumento en la resistencia a enfermedades de la planta mediante la sobreexpresión de los genes implicados en el sistema de defensa innato de las plantas.

Los presentes inventores han utilizado bibliotecas de etiquetas de secuencias expresadas (EST) en combinación con la estimulación de cítricos con patógenos bacterianos avirulentos y virulentos, para identificar los genes implicados en la reacción hipersensible dependiente de efector (HR) y la resistencia a enfermedades. Se han encontrado un total de 2868 posibles genes que se expresan de forma diferencial en cítricos estimulados con un patógeno avirulento, en comparación con aquellos inoculados con una cepa bacteriana virulenta. Entre aquellos, se seleccionaron 29 genes para ensayar su potencial individual para conferir resistencia a cítricos frente a los patógenos bacterianos más comunes de los cítricos.

Los inventores han encontrado que la sobreexpresión de 13 de estos genes confirió un aumento de la resistencia a los cítricos frente a *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, el agente causal de la enfermedad del chancro de los cítricos. Estos 13 genes, tal como se ha señalado en las SEC ID Nºs: 1-13, están relacionados en que cada uno codifica una proteína implicada en la defensa de la planta.

Todos los términos técnicos utilizados en el presente documento son términos utilizados comúnmente en bioquímica, biología molécula y agricultura y pueden ser entendidos por la persona normalmente experta en la técnica a la cual esta invención pertenece. Aquellos términos técnicos se pueden encontrar en: MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook y Russel, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, ed. Ausubel y col., Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, Nueva York, 1988 (con actualizaciones periódicas); SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY: A COMPENDIUM OF METHODS FROM CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 5ª ed., vol. 1-2, ed. Ausubel y col., John Wiley & Sons, Inc., 2002; GENOME ANALYSIS: A LABORATORY MANUAL, vol. 1-2, ed. Green y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1997. La metodología que implica técnicas de biología vegetal se describe en el presente documento y se describe en detalle en tratados tales como METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY: A LABORATORY COURSE MANUAL, ed. Maliga y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1995. Diversas técnicas que utilizan la PCR se describen, por ejemplo, en Innis y col., PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, Academic Press, San Diego, 1990 y en Dieffenbach y Dveksler, PCR PRIMER: A LABORATORY

MANUAL, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2003. Las parejas de cebadores de la PCR se pueden derivar de secuencias conocidas mediante técnicas conocidas tales como las que utilizan programas informáticos previstos para este objetivo, por ejemplo., Primer, Versión 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA. Los procedimientos para la síntesis química de ácidos nucleicos se discuten, por ejemplo, en Beaucage y Caruthers, Tetra. Letts. 22: 1859-1862 (1981), y Matteucci y Caruthers, J. Am. Chem. Soc. 103: 3185 (1981).

Se realizaron digestiones con enzimas de restricción, fosforilaciones, ligamientos y transformaciones como describen Sambrook y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press. Todos los reactivos y materiales utilizados para el cultivo y mantenimiento de las células bacterianas se obtuvieron de Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), DIFCO Laboratories (Detroit, MI), Invitrogen (Gaithersburg, MD), o Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), salvo que se especifique de otra manera.

Los términos “que codifica” y “codificar” se refieren al proceso por el cual un gen, a través de los mecanismos de transcripción y traducción, proporciona información a una célula a partir de una serie de aminoácidos que se pueden ensamblar en una secuencia de aminoácidos específica para producir una enzima activa. Debido a la degeneración del código genético, determinados cambios de bases en la secuencia de ADN no cambian la secuencia de aminoácidos de una proteína. Se entiende por tanto que se contempla que las modificaciones en una secuencia de nucleótidos que codifican cualquiera de las proteínas de esta invención, no afecta sustancialmente sus propiedades funcionales

En esta descripción, “expresión” denota la producción del producto de proteína codificado por un gen. “Sobreexpresión” se refiere a la producción a la producción de un producto génico en un organismo transgénico que excede los niveles de producción en organismos normales o no transformados.

#### **Secuencias expresadas de forma diferencial**

Los genes expresados de forma diferencial referidos en esta invención se han identificado en diversas especies de cítricos ejemplificados por plantas de naranjas dulces. En el contexto de la presente invención, “deg” se refiere a genes expresados de forma diferencial cuya sobreexpresión confiere resistencia a las plantas frente a las enfermedades de las mismas. Las secuencias deg a modo de ejemplo se muestran en “Breve descripción de las secuencias”.

Los genes expresados de forma diferencial procedentes de *Citrus sinensis* se denominarán de ahora en adelante deg 1 (SEC ID N°: 1), deg 2 (SEC ID N°: 2), deg 3 (SEC ID N°: 3), deg 4 (SEC ID N°: 4), deg 5 (SEC ID N°: 5), deg 6 (SEC ID N°: 6), deg 7 (SEC ID N°: 7), deg 8 (SEC ID N°: 8), deg 9 (SEC ID N°: 9), deg 10 (SEC ID N°: 10), deg 11 (SEC ID N°: 11), deg 12 (SEC ID N°: 12), y deg 13 (SEC ID N°: 13).

Los términos “identidad de la secuencia” y “similitud de secuencias” se pueden determinar mediante la alineación de dos secuencias de péptidos o dos secuencias de nucleótidos utilizando algoritmos de alineación globales o locales. Las secuencias se pueden denominar como “sustancialmente idénticas” o “esencialmente similares” cuando comparten al menos un 70 % de identidad de la secuencia sobre su longitud completa, respectivamente. Las alineaciones y puntuaciones de secuencias para el porcentaje de identidad de la secuencia se pueden determinar utilizando programas informáticas, tales como el GCG Wisconsin Package, Versión 10.3, disponible de Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, Calif. 92121-3752 EE. UU., o EmbossWin versión 2.10.0 (que utiliza el programa “needle”). De forma alternativa, el porcentaje de similitud o identidad se puede determinar investigando en las bases de datos, utilizando algoritmos tales como FASTA; BLAST, etc.

Tal como se ha señalado anteriormente, se dan a conocer moléculas de ácidos nucleicos que comprenden las secuencias de nucleótidos de la SEC ID N°: 1-13, que codifica proteínas funcionales, en las que las proteínas tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en la SEC ID N°: 14-26. Se entiende que las proteínas que abarcan sustituciones, adiciones, y deleciones de aminoácidos no alteran la función de ninguna de las proteínas.

Debido a que muchas proteínas están codificadas por familias de genes, se espera que otros géneros de cítricos podrían tener funciones similares a las de las proteínas codificadas por la SEC ID N°: 1-13. Estos genes se pueden identificar y acotar funcionalmente para la comparación de la secuencia. Un operario experto en la técnica puede identificar una secuencia de proteínas relacionadas funcionalmente con la ayuda de procedimientos convencionales tales como el cribado de bibliotecas de ADNc o librerías genómicas con sondas de hibridación adecuadas. El técnico experto sabe que las secuencias homólogas se pueden aislar con la ayuda de oligonucleótidos (degenerados) y procedimientos basados en la PCR.

De acuerdo con esto, se pueden identificar las secuencias mediante los procedimientos descritos más arriba, y por tanto acotarse funcionalmente como perteneciendo a cualquiera de las familias DEG incluidas en esta invención (de acuerdo con la utilización común, la letra cursiva denota un gen y la letra mayúscula denota un producto codificado) Por tanto, la frase “secuencia de ADN de deg” se refiere aquí a cualquier molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse en condiciones restrictivas con cualquiera de las secuencias que se muestran en la SEC ID N°: 1-13, y codificar un polipéptido equivalente con las proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran como la SEC ID N°: 14-26. El término incluye también las secuencias que se

hibridan en cruzado con la SEC ID N°: 1-13, que tienen preferiblemente al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con los genes que se muestran en la SEC ID N°: 1-13. Las secuencias de nucleótidos de la invención pueden codificar proteínas que son homólogas con los productos génicos previstos dados a conocer en el presente documento como SEC ID N°: 14-26. La invención incluye también una secuencia de proteína que es preferiblemente al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a cualquiera de la SEC ID N°: 14-26.

“Condiciones restrictivas” tal como se usa en el presente documento, se refiere a parámetros con los cuales la técnica es familiar, tales como la hibridación en 3,5 x SSC, 1 x disolución de Denhardt, tampón fosfato de sodio 25 mM (pH 7,0), SDS al 0,5 %, y EDTA 2 mM durante 18 horas a 65° C, seguido por 4 lavados del filtro a 65° C durante 20 minutos, en 2 x SSC, SDS al 0,1 %, y un lavado final durante hasta 20 minutos en 0,5 x SSC, SDS al 0,1 %, o 3 x SSC y SDS al 0,1 % para una restricción mayor, y 0,1 x SSC, SDS al 0,1 % para una restricción incluso mayor. Se pueden sustituir otras condiciones, siempre que el grado de restricción sea igual al proporcionado en el presente documento, utilizando un lavado final de 0,5 x SSC.

De acuerdo con esto la presente invención comprende cualquier ácido nucleico, gen, polinucleótido, molécula de ADN, ARN, ARNm procedente de especies de cítricos, o producidas de manera sintética, que aumenta la resistencia a enfermedades. El ADN o el ARN puede ser bicatenario o monocatenario. El ADN monocatenario puede ser una hebra de codificación, conocida también como la hebra de sentido directo, o puede ser la hebra no codificante, denominada también la hebra de sentido contrario.

Tal como se usa en el presente documento, “los genes *deg* que se muestran en la SEC ID N°: 1-13” se entiende que significa que los genes *deg* incluyen las secuencias que se muestran en la SEC ID N°: 1-13, así como las moléculas de ácido nucleico comprendidas por variantes de la SEC ID N°: 1-13, con una o más bases eliminadas, sustituidas, insertadas, o añadidas, cuya variante codifica un polipéptido con la misma actividad. De acuerdo con esto, las secuencias que tienen “secuencias de bases con una o más bases eliminadas, sustituidas, insertadas, o añadidas” retienen la actividad fisiológica incluso cuando la secuencia de aminoácidos codificada tiene uno o más aminoácidos sustituidos, eliminados, insertados, o añadidos. Debido a la degeneración del código genético, se pueden utilizar diferentes codones de nucleótidos para codificar un aminoácido concreto. Una célula hospedadora presenta a menudo un modelo de utilización de codón preferido (Campbell y col., 1990). Las secuencias de ácido nucleico se construyen preferiblemente para utilizar el modelo de utilización del codón de una célula hospedadora concreta. Esta expresión de la secuencia del ácido nucleico mejora generalmente en una célula hospedadora transformada. Las secuencias de ácidos nucleicos dadas a conocer en el presente documento utilizan preferiblemente la utilización óptima del codón para las células hospedadoras bacterianas, fúngicas y vegetales. Adicionalmente, pueden existir múltiples formas de las proteínas de esta invención, que pueden deberse a la modificación posterior a la traducción de un producto génico o a múltiples formas de los genes *deg*. Las secuencias de nucleótidos que tienen dichas modificaciones están incluidas en el alcance de la presente invención

Por ejemplo, se pueden eliminar la cola de poli A o el extremo 5' o 3' de las regiones no traducidas, y se pueden eliminar las bases en la extensión en la que se eliminan los aminoácidos. Se pueden sustituir también las bases, siempre que no den como resultado cambios de marco. Se pueden “añadir” también bases en la extensión en la que se añaden aminoácidos. Es esencial, sin embargo, que cualquiera de dichas modificaciones no dé como resultado la pérdida de actividad de la proteína. Se puede obtener en este contexto un ADN modificado modificando las secuencias de bases del ADN de la invención de tal manera que los aminoácidos en los sitios específicos se sustituyan, eliminen, inserten, o añadan mediante mutagénesis específica del emplazamiento, por ejemplo. Zoller & Smith, *Nucleic Acid Res.* 10: 6487-500 (1982).

Una secuencia del gen *deg* se puede sintetizar desde el principio a partir de las bases adecuadas, por ejemplo, utilizando cualquier secuencia de proteína adecuada dada a conocer en el presente documento como una guía para crear una molécula de ADN que, aunque diferente de la secuencia de ADN natural, de como resultado la producción de proteínas con las mismas o similares secuencias de aminoácidos.

Por molécula(s) de ácido nucleico “aislada” se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN, ARN, que se ha eliminado de su entorno natural. Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinante contenidas en la construcción de ADN se consideran aisladas para los fines de la presente invención. Los ejemplos adicionales de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ARN recombinante mantenidas en las células hospedadoras heterólogas o moléculas de ADN que se purifican, parcial o sustancialmente, en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN in vitro de las moléculas de ADN de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico aisladas, de acuerdo con la presente invención incluyen, además dichas moléculas producidas de forma sintética.

“Ácido nucleico exógeno” se refiere a un ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha introducido en una célula (o en el antecesor de la célula) a través del esfuerzo de los seres humanos. Dicho ácido nucleico exógeno puede ser una copia de una secuencia que se encuentra de forma natural en la célula en la que se introdujo, o sus fragmentos.

Por el contrario, “ácido nucleico endógeno” se refiere a un ácido nucleico, gen, polinucleótido, molécula de ADN, ARN, ARNm, o ADNc que está presente en el genoma de una planta u organismo que se ha diseñado mediante ingeniería genética. Una secuencia endógena es “natural” para, es decir, indígena para, la planta u organismo que

se va a diseñar mediante ingeniería genética.

“Ácido nucleico heterólogo” se refiere a un ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha introducido en una célula (o en el antecesor de la célula). Dicho ácido nucleico heterólogo puede comprender segmentos que son una copia de una secuencia que se encuentra de forma natural en la célula en la que se ha introducido, o sus fragmentos.

5 A no ser que se indique otra cosa, todas las secuencias de nucleótidos determinadas mediante secuenciación de una molécula de ADN en el presente documento se han determinado utilizando un secuenciador de ADN automatizado, tal como el Modelo 3730 de Applied Biosystems, Inc. Por tanto, tal como se conoce en la técnica para cualquier secuencia de ADN determinada mediante esta solución automatizada, cualquier secuencia de nucleótidos determinada en el presente documento puede contener algunos errores. Las secuencias de nucleótidos determinadas de forma automática son normalmente al menos aproximadamente un 95 % idénticas, más normalmente al menos aproximadamente un 96 % a al menos aproximadamente un 99,9 % idénticas a la secuencia de nucleótidos real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real puede determinarse de forma más precisa mediante otras soluciones que incluyen procedimientos de secuenciación manuales bien conocidos en la técnica. Como se conoce también en la técnica una única inserción o delección en una secuencia de nucleótidos determinada en comparación con la secuencia real producirá un cambio de marco en la traducción de la secuencia de nucleótidos de tal manera que la secuencia de aminoácidos prevista codificada por una secuencia de nucleótidos determinada puede ser completamente diferente de la secuencia de aminoácidos codificada realmente por la molécula de ADN secuenciada, comenzando en el punto de dicha inserción o delección.

20 Una “variante” es una secuencia de nucleótidos o aminoácidos que se desvía del patrón, o de la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de un gen o proteína concreta proporcionado. Los términos “isoforma”, “isotipo”, y “análogo” se refieren también a formas “variantes” de una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos. Una secuencia de aminoácidos que está alterada por la adición, eliminación, o sustitución de uno o más aminoácidos, o un cambio en la secuencia de nucleótidos, se puede considerar como una secuencia “variante”. La variante puede tener cambios “conservativos”, en los que un aminoácido sustituido tiene similar estructura o propiedades químicas, por ejemplo, sustitución de leucina con isoleucina. Una variante puede tener cambios “no conservativos”, por ejemplo, sustitución de una glicina con un triptófano. Variaciones análogas menores pueden incluir también delecciones o inserciones de aminoácidos, o ambas: Se pueden encontrar directrices para determinar qué restos de aminoácidos se pueden sustituir, insertar, o eliminar utilizando programas informáticos bien conocidos en la técnica tales como el software Vector NTI Suite (InforMax, MD) “variante” puede referirse también a una “transposición genética” tal como la descrita en las patentes asignadas a Maxygen. Por ejemplo, una variante de la presente invención puede incluir variantes de las secuencias y polinucleótidos deseados que están modificados de acuerdo con los procedimientos y la lógica dada a conocer en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 6.132.970.

#### **Procedimientos para sobreexpresar genes *deg***

35 En un aspecto de la invención, la resistencia a las enfermedades de las plantas se aumenta mediante la sobreexpresión de un gen *deg*. Son bien conocidos en la técnica varios procedimientos para sobreexpresar un gen concreto y se pueden utilizar en la presente invención.

40 La presente invención contempla la sobreexpresión de una secuencia que codifica DEG. Los polinucleótidos de sentido directo utilizados para llevar a cabo la presente invención tienen longitud suficiente para expresar una proteína funcional en una célula vegetal. Dichos polinucleótidos pueden ser esencialmente un ácido nucleico genómico completo o complementario que codifica cualquiera de las proteínas DEG incluidas en la presente invención.

45 La idoneidad de las dianas candidato también se puede evaluar analizando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, usando ensayos de protección de la ribonucleasa tal como es conocido en la técnica. Se puede producir ADN que codifica moléculas de ARN enzimáticas de acuerdo con técnicas conocidas. Por ejemplo, véase Cech y col., Patente de los Estados Unidos con n° 4.987.071; Keene y col., Patente de los Estados Unidos con n° 5.559.021; Donson y col., Patente de los Estados Unidos con n° 5.589.367; Torrence y col., Patente de los Estados Unidos con n° 5.583.032; Joyce, Patente de los Estados Unidos con n° 5.580.967; Gold y col., Patente de los Estados Unidos con n° 5.595.877; Wagner y col., Patente de los Estados Unidos con n° 5.591.601; y la Patente de los Estados Unidos con n° 5.622.854.

50 Por ejemplo, la expresión de un gen *deg* se puede aumentar mediante procedimientos de ingeniería genética que son bien conocidos en la técnica. La expresión se puede aumentar uniéndose de forma operable la secuencia de un promotor fuerte a cualquier secuencia que codifica DEG incluida en la presente invención. La expresión se puede incrementar adicionalmente añadiendo una secuencia de un potenciador a un promotor fuerte unido de forma operable a cualquier secuencia que codifica DEG incluida en la presente invención.

55 “Potenciador” o “elemento potenciador” se refiere a un elemento regulador de la transcripción con acción en cis, es decir, un elemento cis, que confiere un aspecto del modelo de expresión global, pero que habitualmente es insuficiente para impulsar la transcripción en solitario de una secuencia de polinucleótido unida de forma operable. A diferencia de los promotores, los elementos potenciadores no suelen incluir un sitio de inicio de la transcripción

(TSS) o secuencia TATA. Un promotor puede comprender de forma natural uno o más elementos potenciadores que afectan la transcripción de una secuencia de polinucleótido unida de forma operable. Un elemento potenciador aislado también se puede fusionar con un promotor para producir un promotor quimérico elemento cis que confiere un aspecto de la modulación global de la expresión génica. Un promotor o fragmento de promotor puede comprender uno o más elementos potenciadores que efectúan la transcripción de genes unidos de forma operable. Se cree que muchos elementos potenciadores del promotor se unen a proteínas que se unen al ADN y/o afectan la topología del ADN, produciendo conformaciones locales que selectivamente permiten o restringen el acceso de la ARN polimerasa al molde de ADN o que facilitan la apertura selectiva de la doble hélice en el sitio de inicio de la transcripción. Un elemento potenciador puede funcionar para unir factores de transcripción que regulan la transcripción. Algunos elementos potenciadores se unen a más de un factor de transcripción, y los factores pueden interactuar con diferentes afinidades con más de una región del potenciador. Los elementos potenciadores se pueden identificar mediante varias técnicas, incluyendo el análisis de delección, es decir, la eliminación de uno o más nucleótidos desde el extremo 5' o bien de forma interna con respecto a un promotor; el análisis de la proteínas que se unen al ADN mediante el uso de la huella dactilar de la ADNasa I, interferencia de metilación, ensayos de desplazamiento de motilidad durante la electroforesis, huella dactilar genómica in vivo mediante PCR mediada por ligadura, y otros ensayos convencionales; o mediante análisis de similitudes de secuencias de ADN usando moldes de elementos cis conocidos, o elementos potenciadores como secuencia diana o molde diana con procedimientos convencionales de comparación entre secuencias de ADN, tales como BLAST. La estructura fina de una región potenciadora puede estudiarse adicionalmente mediante mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos o mediante otros procedimientos convencionales. Los elementos potenciadores se pueden obtener por síntesis química o por aislamiento de los elementos reguladores que incluyen tales elementos, y se pueden sintetizar con nucleótidos flanqueantes adicionales que contienen sitios útiles para enzimas de restricción que facilitan la posterior manipulación. Así, el diseño, construcción y uso de elementos potenciadores de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento para modular la expresión de moléculas de polinucleótidos unidas de manera operativa que se pueden transcribir quedan abarcados por la presente invención. Se conocen en la técnica varios potenciadores, entre los que se incluyen los potenciadores CaMV de 35S.

### **Construcciones de ácido nucleico**

De acuerdo con un aspecto de la invención, una o más secuencias que aumentan la resistencia a las enfermedades se incorporan a una construcción de ácido nucleico que es adecuada para la transformación de células o plantas. La invención proporciona moléculas de ácido nucleico que aumentan la resistencia a las enfermedades en una planta transformada.

Las construcciones de ácido nucleico recombinante se pueden fabricar con técnicas normalizadas. Por ejemplo, se puede obtener una secuencia de nucleótidos para su transcripción mediante el tratamiento de un vector que contiene dicha secuencia con enzima de restricción para recortar el segmento adecuado. La secuencia de nucleótidos para su transcripción también se puede generar hibridando y uniendo oligonucleótidos sintéticos o mediante el uso de oligonucleótidos sintéticos en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para proporcionar sitios de restricción adecuados en cada extremo. A continuación, la secuencia de nucleótidos se clona dentro de un vector que contiene elementos de regulación adecuados, tal como una secuencia de promotor en dirección 5' y una secuencia de terminación en dirección 3'.

Un aspecto importante de la presente invención es el uso de construcciones de ácido nucleico en las que una secuencia que codifica DEG está unida de forma operable a una o más secuencias de regulación, que impulsan la expresión de la secuencia en determinados tipos de células, órganos o tejidos sin afectar negativamente al desarrollo o fisiología normales.

"Promotor" denota una región de ADN en dirección 5' desde el inicio de la transcripción que está implicada en el reconocimiento y la unión a la ARN polimerasa y a otras proteínas para iniciar la transcripción. Un "promotor constitutivo" es uno que es activo durante la totalidad de la vida de la planta y en la mayor parte de condiciones ambientales. Los promotores específicos de tejidos, preferidos por los tejidos, específicos del tipo de célula e inducibles constituyen la clase "promotores no constitutivos". "Unido de forma operable" se refiere a un vínculo funcional entre un promotor y una segunda secuencia, donde la secuencia del promotor inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. Por lo general, "unido de forma operable" significa que las secuencias de ácido nucleico que se están vinculando son contiguas.

Se ilustran promotores adecuados, aunque no limitados a promotores constitutivos tales como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) o el promotor de la poliubiquitina, así como promotores específicos de tejido, preferidos por el tejido, específicos de tipo celular e inducibles. Por ejemplo, en cítricos, varios patógenos importantes se localizan en el sistema vascular, que hace referencia a los vasos del xilema o del floema; puede ser ventajoso usar un promotor específico del xilema/floema para dirigir la expresión de un gen de defensa. En la técnica se conocen promotores específicos del xilema o del floema, por ejemplo los divulgados en la patente de EE.UU. N° 6.613.960 y las publicaciones de solicitud n° 2004/0253717 y 2007/0266457.

Los vectores de la invención también pueden contener secuencias de terminación, que se localizan cadena debajo de las moléculas de ácido nucleico de la invención, de modo que se termina la transcripción del ARNm y se añaden

secuencias de poliA. Ejemplos de dichos terminadores son el terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador del gen de la nopalina sintasa (Tnos). El vector de expresión también puede contener potenciadores, intrones, codones de iniciación, secuencias señal de corte y empalme y secuencias de dirección a orgánulos celulares tales como las mitocondrias y los cloroplastos.

- 5 Los vectores de expresión de la invención también pueden contener un marcador de selección por el cual se pueden identificar las células transformadas en cultivo. El marcador se puede asociar con la molécula de ácido nucleico heteróloga, es decir el gen unido operativamente a un promotor. Como se usa en el presente documento, el término "marcador" hace referencia a un gen que codifica un rasgo o un fenotipo que permite la selección, o la detección selectiva, de una planta o célula que contiene el marcador. En plantas, por ejemplo, el gen marcador codificará resistencia a antibióticos o a herbicidas. Esto permite la selección de células transformadas de entre las células que no están transformadas o transfectadas.

- 10 Ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen resistencia a adenosina desaminasa, dihidrofolato reductasa, higromicina B fosfotransferasa, timidina cinasa, xantina-guanina fosforibosiltransferasa, glifosato y glufosinato y resistencia a amino-glucósido-3'-O-fosfotransferasa (resistencia a kanamicina, neomicina y G418).  
15 Estos marcadores pueden incluir resistencia a G418, higromicina, bleomicina, kanamicina, espectinomicina y gentamicina. La construcción también puede contener el gen del marcador seleccionable *ahas* que confiere resistencia a herbicidas tales como imazetapir, imazapic, imazapir, imazamox, sulfometuron metilo, imazaquin, clorimuron etilo, metsulfuron metilo, rimsulfuron, tifensulfuron metilo, piritiobac sódico, tribenuron metilo y nicosulfuron [*sic*: "clase de las imidazolinonas"]. Sun-Mi y col., 2004, Biochemical Journal 383: 53-61. También se  
20 conocen otros marcadores de selección adecuados.

Se pueden usar marcadores visibles tales como la proteína verde fluorescente (GFP). También se han descrito procedimientos para identificar o seleccionar plantas transformadas basadas en el control de la división celular. Véanse los documentos WO 2000/052168 y WO 2001/059086.

- 25 También se pueden incluir secuencias de replicación de origen bacteriano o viral, para poder clonar el vector en un huésped bacteriano o fago. Preferentemente se usa un origen de replicación procariota del amplio abanico de huéspedes. Se puede incluir un marcador seleccionable para bacterias con el fin de permitir la selección de células bacterianas portadoras de la construcción deseada. Marcadores seleccionables procariotas adecuados también incluyen resistencia a antibióticos tales como kanamicina o tetraciclina.

- 30 En el vector también puede haber otras secuencias de ácido nucleico que codifican funciones adicionales, como se conoce en la técnica. Por ejemplo, cuando el huésped es *Agrobacterium*, se pueden incluir secuencias de T-ADN para facilitar la posterior transferencia e incorporación en cromosomas de plantas.

### **Plantas para ingeniería genética**

La presente invención comprende la manipulación genética de plantas, especialmente cítricos, para potenciar la resistencia a enfermedades.

- 35 En esta descripción, "planta" indica cualquier material vegetal que contiene celulosa que se pueda manipular genéticamente, incluidas, entre otras, células vegetales diferenciadas o indiferenciadas, protoplastos, plantas enteras, tejidos vegetales u órganos vegetales, o cualquier componente de una planta tales como hojas, tallos, raíces, yemas, tubérculos, frutos, rizomas o similares. Como se usa en el presente documento, "propágalo" incluye una estructura con la capacidad para dar lugar a una planta nueva, por ejemplo una semilla, una espora o una parte  
40 del cuerpo vegetativo capaz de crecer de forma independiente si se desprende de la parental.

Las plantas que se pueden someter a ingeniería de acuerdo con la invención incluyen, entre otras, árboles, tales como naranjas dulces, limones, mandarinas etc. Se entiende que "planta cítrica" significa una planta de los géneros *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Murraya*, *Microcitrus*, *Limonia*, y *Eremocitrus*, preferentemente la especie *Citrus sinensis*

- 45 En la presente descripción, "planta transgénica" hace referencia a una planta que tiene incorporada una secuencia de ADN, que incluye, entre otros, genes que normalmente no están presentes en el genoma de una planta huésped, secuencias de ADN que normalmente no se transcriben en ARN o se traducen en una proteína ("se expresan") o cualquier otro gen o secuencia de ADN que se desee introducir en la planta no transformada, tales como los genes que normalmente pueden estar presentes en la planta no transformada pero que se desea someter a ingeniería genética o tener la expresión alterada. La categoría "planta transgénica" incluye tanto un transformante primario  
50 como una planta que incluye un transformante en su linaje, por ejemplo mediante introgresión estándar u otro procedimiento de cultivo.

- "Modificado genéticamente" (MG) abarca cualquier metodología para introducir un ácido nucleico o una mutación específica en un organismo huésped. Por ejemplo, una planta cítrica está modificada genéticamente cuando se ha transformado con una secuencia polinucleotídica que aumenta la expresión de un gen, tal como cualquier gen *deg*, y, de este modo, aumenta la resistencia a la enfermedad.  
55

Por el contrario, una planta cítrica que no está transformada con una secuencia polinucleotídica es una planta control

y se denomina planta “no transformada”.

### **Procedimientos de ingeniería genética**

Una secuencia polinucleotídica, como una secuencia *deg*, se puede integrar de forma estable en un genoma de planta de varias formas conocidas en la técnica. Se pueden transformar células de plantas angiospermas o gimnospermas monocotiledóneas, dicotiledóneas. Véase, por ejemplo, Klein y col., *Biotechnology* 4: 583-590 (1993); Bechtold y col., *C. R. Acad. Sci. Paris* 316:1194-1199 (1993); Bent y col., *Mol. Gen. Genet.* 204:383-396 (1986); Paszowski y col., *EMBO J.* 3: 2717-2722 (1984); Sagi y col., *Plant Cell Rep.* 13: 26 15-286 (1994). Se pueden usar especies de *Agrobacterium* tales como *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, por ejemplo de acuerdo con Nagel y col., *Microbiol Lett* 67: 325 (1990). Adicionalmente, las plantas se pueden transformar mediante transformación de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* o *Mesorhizobium*. Broothaerts y col., *Nature* 433:629-633 (2005). Véase la publicación de la solicitud de EE.UU. 200702711627.

Procedimientos adicionales para modificar genéticamente una planta o célula incluyen, entre otros, electroporación, bombardeo con pistola de partículas (Klein y col., (1987) *Nature*. 327:70-73), precipitación en fosfato cálcico y fusión con polietilenglicol, transferencia a granos de polen en germinación, transformación directa (Lorz y col., *Mol. Genet.* 199: 179-182 (1985)), y otros procedimientos conocidos en la técnica. Si se usa un marcador de selección, tal como de resistencia a kanamicina, facilita determinar qué células se han transformado con éxito. Se pueden incluir genes marcadores dentro de pares de sitios de recombinación reconocidos por recombinasas específicas, tales como *cre* o **flp**, para facilitar la eliminación del marcador después de la selección. Véase la solicitud de EE.UU. publicada N° 2004/0143874.

En el contexto de la presente invención, las plantas transgénicas producidas mediante el procedimiento descrito en lo que antecede se pueden usar como fuente de un transgén en un programa de cultivo convencional. En general se usa polen de una planta transgénica para polinizar una planta no transgénica. Las semillas de la planta madre se pueden usar para producir una nueva planta transgénica diferente de la planta transgénica original producida mediante el procedimiento descrito en lo que antecede.

Se seleccionan plantas modificadas genéticamente que tienen una expresión mayor de los genes *deg*. Por ejemplo, una planta cítrica transgénica/células de la planta empleada en el procedimiento de acuerdo con la invención se distingue de las plantas cítricas silvestres/células de las plantas por el hecho de que comprenden al menos una copia de la molécula de ácido nucleico expuesta en la SEC ID N°: 1-13 integrada de forma estable en su genoma, además de copias de dicha molécula de origen natural en las plantas cítricas silvestres/células de las plantas. En este caso, las plantas cítricas/células de las plantas del procedimiento de acuerdo con la invención se pueden distinguir de las plantas cítricas silvestres/células de las plantas en concreto por el hecho de que esta copia adicional, o estas copias adicionales, se localiza/n en ubicaciones en el genoma en las que no está, o donde no están, en plantas cítricas silvestres/células de las plantas.

“Plantas cítricas silvestres” hace referencia a plantas control cuyo genoma no se ha modificado mediante la introducción de una construcción que comprende cualquier secuencia del gen *deg*, o fragmento de la misma.

### **Procedimientos para cuantificar un incremento de la resistencia a la enfermedad**

Las plantas modificadas genéticamente y las células de la invención se caracterizan por una mayor resistencia a la enfermedad. Esto se consigue mediante la sobreexpresión de los genes *deg*.

“Resistencia a la enfermedad” o “resistencia a la enfermedad incrementada/potenciada” hace referencia a una capacidad aumentada de los transformantes (frente a los transformantes silvestres o control) para aguantar el ataque de uno o más patógenos vegetales o, en otras palabras, hace referencia a una reducción significativa de los síntomas de la enfermedad en controles transformantes en comparación con los no transformantes (o vector vacío transformado). La resistencia a la enfermedad o la resistencia potenciada a la enfermedad se pueden determinar usando varios procedimientos. A menudo los síntomas de la enfermedad se puntúan visualmente (en bioensayos o en campo) evaluando los síntomas de la enfermedad en uno o más puntos de tiempo tras inoculación o contacto con un patógeno. Procedimientos alternativos incluyen procedimientos mediante los cuales se detecta el patógeno y se cuantifica opcionalmente. Una planta transgénica puede mostrar una resistencia potenciada a la enfermedad si la cantidad de patógeno detectada en/sobre el tejido es significativamente menor que la de los controles o si la diseminación del patógeno es significativamente menor que la de los controles. En última instancia, un incremento significativo del rendimiento promedio de transformantes (p. ej., al menos el 1 %, 2 %, 5 %, 10 % o más) en comparación con los controles, cuando se cultivan a una presión de la enfermedad equivalente (preferentemente en el campo) proporciona una medición indirecta de la resistencia potenciada a la enfermedad.

Por tanto, una pluralidad de plantas transformadas que expresan proteínas DEG (o una proteína DEG constitutivamente activa) muestran una resistencia potenciada a la enfermedad su muestran una reducción significativa de los síntomas de la enfermedad en comparación con los controles transformados con el vector vacío o con los no transformados. El análisis estadístico es necesario para determinar si existen diferencias significativas. Preferentemente, uno o más síntomas de enfermedad están, de media, al menos un 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, o incluso 100 % menor en los transformantes DEG que en las plantas control. Dado que el ensayo

de la enfermedad es diferente para cada combinación huésped-patógeno, no se puede proporcionar un protocolo específico, pero el experto en la técnica sabe cómo determinar si los transformantes muestran una enfermedad significativamente potenciada a uno o más patógenos. Los bioensayos como se conocen en la técnica para cada combinación planta - patógeno se pueden usar para comparar la resistencia de las plantas transgénicas a controles adecuados.

Descripciones detalladas de patógenos de plantas, los síntomas de la enfermedad causada por ellos y sus ciclos de vida se pueden encontrar para cada especie de planta. Por ejemplo, los patógenos de los cítricos se describen en COMPENDIUM OF CITRUS DISEASES, Editors L. W. Timmer, Stephen Michael Garnsey, and J. H. Graham (ISBN 0-89054-248-1, APS Press).

10 Patógenos de cítricos incluyen, por ejemplo, las siguientes especies de hongos y bacterias y virus (no limitantes). *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* (bacteria), *Pseudomonas syringae* (bacteria), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Bacterium), *Xylella fastidiosa* (bacteria), *Candidatus Liberibacter africanus* (bacteria), *Candidatus Liberibacter americanus* (bacteria), *Candidatus Liberibacter asiaticus* (bacteria), *Alternaria alternata* (hongo), *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata* (hongo), *Alternaria citri* (hongo), *Glomerella cingulata* (hongo), *Colletotrichum gloeosporioides* (hongo), *Thanatephorus cucumeris* (hongo), *Rhizoctonia solani* (hongo), *Aspergillus niger* (hongo), *Thielaviopsis basicola* (hongo), *Chalara elegans* (hongo), *Guignardia citricarpa* (hongo), *Phyllosticta citricarpa* (hongo), *Penicillium italicum* (hongo), *Botrytis cinerea* (hongo), *Botryotinia fuckeliana* (hongo), *Sphaeropsis tumefaciens* (hongo), *Phytophthora citricola*, *P. citrophthora*, *P. hibernalis*, *P. nicotianae*, *P. parasitica*, *P. palmivora*, *P. syringae*, *Macrophomina phaseolina* (hongo), *Pythium* sp., *P. aphanidermatum*, *P. debaryanum*, *P. rostratum*, *P. ultimum*, *P. vexans*, *Rhizoctonia solani* (hongo), *Lasioidiplodia theobromae* (hongo), *Botryodiplodia theobromae* (hongo), *Diplodia natalensis* (fungous), *Botryosphaeria rhodina* (hongo), *Botryosphaeria ribis* (hongo), *Nectria haematococca* (hongo), *Schizothyrium pomi* (hongo), *Fusarium oxysporum* (hongo), *Botrytis cinerea* (hongo), *Mycosphaerella citri* (hongo), *Penicillium digitatum* (hongo), *Ganoderma applanatum* (hongo), *G. brownii* (hongo), *G. lucidum* (hongo), *Mycosphaerella horii* (hongo), *M. lageniformis* (hongo), *Phoma tracheiphila* (hongo), *Alternaria limicola* (hongo), *Diaporthe citri* (hongo), *Phomopsis citri* (hongo), *Mucor paronychia* (hongo), *M. racemosus* (hongo), *Armillaria mellea* (hongo), *Phaeoramularia angolensis* (hongo), *Phymatotrichopsis omnivora* (hongo), *Phomopsis citri* (hongo), *Erythricium salmonicolor* (hongo), *Gliocladium roseum* (hongo), *Pleospora herbarum* (hongo), *Oxyporus latemarginatus* (hongo), *Poria latemarginata* (hongo), *Colletotrichum acutatum* (hongo), *Oidium tingitaninum* (hongo), *Acrosporium tingitaninum* (hongo), *Rhizopus stolonifer* (hongo), *Lasioidiplodia theobromae* (hongo), *Hendersonula toruloidea* (hongo), *Elsinoe fawcettii* (hongo), *Sclerotinia sclerotiorum* (hongo), *Septoria citri* (hongo), *Gloeodes pomigena* (hongo), *Geotrichum citri-aurantii* (hongo), *Galactomyces citri-aurantii* (hongo), *G. candidum* (hongo), *Galactomyces geotrichum* (hongo), *Elsinoe australis* (hongo), *Corticium stevensii* (hongo), *Pellicularia koleroga* (hongo), *Trichoderma viride* (hongo), *Rhizidhysterium rufulum* (hongo), *Ustilina deusta* (hongo), *Penicillium ulaiense* (hongo), *Rosellinia necatrix* (hongo), *R. subiculata* (hongo), virus del mosaico de los cítricos, virus relacionado con el enanismo del mandarino Satsuma, virus de la hoja rugosa de los cítricos, virus del mosaico amarillo de los cítricos, virus de la hoja crujiente, virus de la variegación de cítricos (CVV), virus del enanismo del mandarino Satsuma (SDV), virus de la hoja andrajosa de los cítricos, virus de la tristeza de los cítricos (CTV), virus de la muerte súbita de los cítricos (CSDV), viroide de la caquexia de los cítricos, viroide de la mancha amarilla de los cítricos, virus de la mancha anular amarilla de los cítricos, viroide de la exocorteza de los cítricos (CEVd), virus de la lepra de los cítricos (CiLV). Debido a la defensa inespecífica de la planta, cabría esperar que los genes fueran eficaces contra otros patógenos bacterianos.

También es una realización generar plantas transgénicas que expresen varias proteínas DEG, preferentemente bajo el control de diferentes promotores, tales como diferentes promotores específicos de tejido.

45 El fenotipo de la resistencia a la enfermedad se puede ajustar de forma fina expresando una cantidad adecuada de proteínas DEG en un tiempo y localización adecuados. Dicho ajuste fino se puede realizar determinando el promotor más adecuado para una combinación huésped-patógeno concreta y también seleccionando "eventos" transgénicos que muestren el nivel de expresión deseado. Un nivel demasiado bajo de proteínas DEG o una inducción demasiado lenta de la producción de proteínas DEG tras el ataque de un patógeno puede ser insuficiente para potenciar los niveles de resistencia a la enfermedad. Por otro lado, un nivel o expresión de proteínas demasiado alto en momentos o ubicaciones desprovistos del ataque de patógenos puede tener como resultado fenotipos agrónomicamente indeseados, tales como lesiones en las hojas o los frutos en ausencia de patógenos, y producen penalizaciones. No obstante, el experto puede generar fácilmente plantas que tienen una resistencia potenciada a la enfermedad pero que al mismo tiempo son aceptables agrónomicamente. Alelos *deg* óptimos se pueden aislar o identificar como se ha descrito, por ejemplo alelos que proporcionan niveles de resistencia altos y solo un débil fenotipo HR.

60 Los transformantes que expresan los niveles deseados de proteínas DEG se seleccionan, por ejemplo, analizando el número de copias (análisis de transferencia de tipo Southern), los niveles de transcritos de ARNm (p. ej., RT-PCR usando pares de cebadores *deg* específicos o cebadores flanqueantes) o analizando la presencia y el nivel de proteínas DEG en varios tejidos (p. ej., SDS-PAGE, ensayos ELISA etc.). Por motivos reguladores, preferentemente los transformantes de una sola copia se seleccionan preferentemente y las secuencias que flanquean el sitio de inserción del gen quimérico se analiza, preferentemente se secuencia, para caracterizar el "evento". Los eventos transgénicos que expresan DEG de forma elevada o moderada se seleccionan para analizar adicionalmente hasta

que se obtiene un evento de élite de alto rendimiento con un transgén *deg* estable.

Los transformantes que expresan uno o más genes *deg* de acuerdo con la invención también pueden comprender otros transgenes tales como otros genes que confieren resistencia a la enfermedad o que confieren tolerancia a otras agresiones bióticas y/o abióticas. Para obtener estas plantas con transgenes "apilados", otros transgenes también se pueden introducir en los transformantes DEG o los transformantes DEG se pueden transformar después con uno o más de otros genes o, como alternativa, se pueden usar varios genes quiméricos para transformar una línea o variedad vegetal. Por ejemplo, varios genes quiméricos pueden estar presentes en un único vector o pueden estar presentes en diferentes vectores que se han co-transformado. Eventos únicos que contienen uno o más genes *deg* se pueden cultivar con otros eventos que contienen uno o más de otros genes *deg* para obtener un evento apilado con varios genes *deg*.

En una realización, los siguientes genes se combinan con uno o más genes *deg* de acuerdo con la invención: genes conocidos de resistencia a la enfermedad, especialmente genes que confieren una resistencia potenciada a patógenos necrotóxicos, genes de resistencia a virus, genes de resistencia a insectos, genes de resistencia a estrés abiótico (p. ej., tolerancia a la sequedad, tolerancia a la sal, tolerancia al calor o al frío etc.), genes de resistencia a herbicidas y similares. Por tanto, los transformantes apilados pueden tener una tolerancia al estrés biótico y/o abiótico todavía más amplia, resistencia a patógenos, resistencia a insectos, resistencia a nematodos, salinidad, estrés por frío, estrés por calor, estrés por agua, etc., Asimismo, los enfoques de silenciación de *deg* se pueden combinar con enfoques de expresión de *deg* en una única planta, Por ejemplo, la sobreexpresión de *deg* en rizomas o vástagos puede conferir o potenciar la resistencia del rizoma o el vástago a los patógenos del suelo, los patógenos vasculares o los patógenos de las hojas.

También es posible la introducción o introgresión de genes *deg* en una línea de cultivo de planta que ya tiene un cierto nivel de resistencia a enfermedad. Para la durabilidad de la resistencia a una enfermedad en el campo, puede ser deseable apilar varios mecanismos de resistencia a enfermedad en una planta, preferentemente de modo que las fuentes de resistencia tengan diferentes mecanismos moleculares subyacentes.

El presente documento abarca plantas enteras, semillas, células, tejidos y progenie (tal como híbridos F1, semillas/plantas F2 etc.) de cualquiera de las plantas transformadas descritas en lo que antecede y se pueden identificar mediante la presencia del transgén en el ADN, por ejemplo mediante análisis de PCR usando el ADN genómico total como molde y usando los pares de cebadores para PCR específicos de *deg*. Asimismo se pueden desarrollar procedimientos diagnósticos de PCR "específicos de evento", en los que los cebadores para PCR se basan en el ADN de la planta que flanquea al gen quimérico insertado, véase la patente de EE.UU. Nº 6,563,026. De un modo similar, se pueden desarrollar huellas de AFLP o huellas de RFLP específicas de evento que identifiquen la planta transgénica o cualquier planta, semilla, tejido o célula derivada de las mismas.

Se entiende que las plantas transgénicas de acuerdo con la invención preferentemente no muestran fenotipos no deseados, tales como reducción del rendimiento, mayor susceptibilidad a enfermedades (especialmente a necrotrofos) o cambios de la arquitectura no deseados (enanismo, deformaciones) etc. y que, si dichos fenotipos se ven en los transformantes primarios, estos se pueden eliminar mediante procedimientos de cultivo y selección normales (cruzamiento/retrocruzamiento/autopolinización etc.). Cualquiera de las plantas transgénicas descritas en el presente documento puede ser homocigota o hemicigota para el transgén.

A continuación se presentan ejemplos específicos de procedimientos para obtener genes *deg*, así como procedimientos para introducir el gen Diana en un cítrico para producir transformantes de la planta. Ejemplos relacionados con genes *deg* que ya no están cubiertos por las reivindicaciones se presentan con fines ilustrativos

### Ejemplo 1

#### Identificación de los genes *deg* de cítricos

En plantas de naranjo dulce se inoculó mediante infiltración una suspensión bacteriana de  $10^8$  UFC/ml de *Xanthomonas axonopodis* pv citri, agente causal del chancro de los cítricos. En un experimento paralelo, se inoculó en hojas de la misma variedad una suspensión bacteriana de  $10^8$  UFC/ml de *Xanthomonas axonopodis* pv aurantifolii conocida por provocar un HR en plantas de naranjo dulce. Se construyó un total de cuatro bibliotecas de ADNc de tejido de la hoja a las 0, 12, 24 y 48 horas de la exposición a dichas cepas bacterianas. Se produjo un total de 3.000 secuencias para cada biblioteca y los grupos se montaron usando el software CAP3 (Huang, X. and Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res., 9, 868-877). La supuesta identidad de cada secuencia grupo se determinó mediante comparación con bases de datos públicas usando el algoritmo BLAST (Altschul y col., 1997, Nucleic Acid Res. 25:3389-3402).

La expresión diferencial se determinó calculando la abundancia relativa de EST de un grupo concreto en cada una de las bibliotecas construidas (Steckel y Falciani, 2000, Genome Research 10:2055-2061). La probabilidad de que esta expresión diferencial no se deba a un evento aleatorio se confirmó mediante pruebas estadísticas (Steckel y Falciani, 2000, Genome Research 10:2055-2061).

La comparación de los perfiles de expresión de un gran número de genes identificados en este estudio indicó que, en condiciones de resistencia a enfermedad (HR) varios genes exhibían niveles de expresión significativamente más altos en comparación con el tejido enfermo (Figura 1). Entre ellos se escogió un total de 13 genes (SEC ID N° 1-13) como posibles candidatos para conferir resistencia a la enfermedad en plantas cítricas (Figura 2).

## 5 Ejemplo 2

### Construcción del vector

El ORF (marco de lectura abierto) de cada gen candidato (SEC ID N° 1-13) se amplificó mediante PCR usando cebadores específicos para el extremo 5' y el extremo 3' de cada gen. La secuencia de cada cebador se modificó de modo que incluyera las secuencias específicas requeridas por el sistema de clonación GATEWAY™ (Invitrogen). Los productos de la amplificación se clonaron primero en el vector pENTR/TEV/D-TOPO® (Invitrogen) mediante recombinación y su secuencia se confirmó mediante repetición de la secuenciación de todo el inserto. Después de confirmar la secuencia, los genes candidatos se transfirieron al plásmido pAH35GW mediante recombinación, lo que tuvo como resultado la construcción genérica pr35S(2x)-CaMV::ahas::35SpolyA | pr35S-CaMV::deg::NOSpolyA (Figura 3). La secuencia de las construcciones resultantes se confirmó mediante repetición de la secuenciación de toda la región de TADN. Los vectores completamente validados se usaron para transformar los cítricos.

## Ejemplo 3

### Transformación de cítricos

Semillas de plantas de naranja dulce cv. Pineapple se germinaron en ausencia de luz durante 30 días. Los epicotiledones de la plántula etiolada se cortaron e infectaron con *Agrobacterium tumefaciens* portador de cada uno de los genes candidatos (SEC ID N° 1-13) en una construcción. Aproximadamente 40 días después de la transformación, las plantas regeneradas se individualizaron y se injertaron por arriba en plántulas de rizoma. Las plantas injertadas permanecieron en condiciones de laboratorio durante aproximadamente 2 meses, tras lo cual se transfirieron a condiciones de invernadero. Antes de iniciar el periodo de aclimatación, se volvió a injertar las plantas sobre plantas de rizomas bien desarrolladas cultivadas en condiciones de invernadero. Se dejó que la aclimatación y el desarrollo del vástago durara 70 días, periodo tras el cual se transfirieron a bloques de plantas madre.

## Ejemplo 4

### Resistencia potenciada a la enfermedad en plantas cítricas portadoras de las construcciones pr35S-CaMV::deg::NOSpolyA

Para evaluar el efecto del incremento de la expresión de genes *deg* en plantas de cítricos transgénicas se desprendió un total de 5 hojas de cada uno de los 25 eventos transgénicos independientes para cada una de las construcciones transformadas en plantas de cítricos y 3 plantas silvestres no transgénicas de la variedad de naranja dulce "Pineapple". En resumen, cada hoja se perforó 6 veces usando una aguja y cada agujero se puso inmediatamente en contacto con 5 ml de una suspensión bacteriana de  $10^6$  UFC/ml. Las hojas inoculadas se incubaron en cámaras de humedad individuales y se evaluaron a diario durante 15 días. Las lesiones de chancro se puntuaron usando una escala de diagrama de propiedad exclusiva (Figura 4). El análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de Dunnett para la comparación media de todas las determinaciones se realizaron con el paquete de software R versión 2.6.2.

Durante el curso de los experimentos, varios eventos pr35S-CaMV::deg::NOSpolyA exhibieron un menor desarrollo de chancro en comparación con las hojas control. Tras 15 días de incubación, los resultados indicaron que algunos de los eventos transgénicos exhibían una reducción significativa de la gravedad de los síntomas de chancro en comparación con las plantas control (Figura 5). En conjunto, la sobreexpresión de los genes *deg* parece causar varios grados de cambios en el sistema de defensa de la planta que conducen a un incremento de la resistencia a la enfermedad.

## Ejemplo 5

### Tasa de crecimiento diferencial de la bacteria del chancro de los cítricos en plantas cítricas portadoras de las construcciones pr35S-CaMV::deg::NospolyA

Con el fin de determinar el efecto directo de la expresión de genes *deg* en plantas de cítricos transgénicas sobre el crecimiento de poblaciones bacterianas se desprendió un total de 3 hojas de los mejores eventos transgénicos identificados mediante el ensayo in Vitro descrito en lo que antecede y de 3 plantas silvestres no transgénicas de la variedad de naranja dulce "Pineapple". En resumen, cada hoja se perforó 6 veces usando una aguja y cada agujero se puso inmediatamente en contacto con 5 ml de una suspensión bacteriana de 105 UFC/ml. Las hojas inoculadas se incubaron en cámaras de humedad individuales y se evaluaron a 0 y 5 días tras la inoculación. Para cada evaluación se cortaron 3 discos de hojas de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> directamente de 3 sitios de inoculación. Cada disco individual se molió en nitrógeno líquido y se usó para la extracción de ADN total usando el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). El ADN de cada extracción individual se usó para enumerar las bacterias

usando PCRC (Cubero & Graham, 2005, *Phytopathology* 95: 1333-1340). La tasa de crecimiento bacteriano se calculó comparando las poblaciones bacterianas a los 0 y 5 días de la inoculación. El análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de Dunnett para la comparación media de todas las determinaciones se realizaron con el paquete de software R versión 2.6.2.

- 5 Los resultados indicaron una reducción significativa de la tasa de crecimiento de la bacteria del chancro de los cítricos cuando los genes *deg* se sobreexpresaron en tejido cítrico (Figura 6). Estos resultados también confirmaron las observaciones realizadas para los mismos eventos sobre la reducción significativa de la gravedad de la enfermedad (Figuras 5 y 6).

**Ejemplo 6**

10 **Niveles de expresión de transgenes en determinados eventos portadores de las construcciones pr35S-CaMV::deg::NOSpolyA**

Con el fin de examinar la correlación entre el nivel de expresión de los transgenes y la respuesta de diferentes eventos al patógeno del chancro de los cítricos se seleccionó un grupo de eventos transgénicos para cuantificar los niveles de transcritos usando RT-PCRC. En resumen, se extrajo el ARN total de hojas de cítrico joven usando el SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc de la primera hebra se generó mediante transcripción inversa de 1 µg de ARN total por muestra con el cebador Oligo-dT usando el sistema ImProm-II™ Reverse Transcriptase System (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un volumen de reacción final de 20 µl. Para la RT-PCR se añadieron 5 µl del ADNc a 12,5 µl de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para alcanzar un volumen de reacción final de 25 µl. La RT-PCR se realizó usando un sistema ABI PRISM® 7000 System (Applied Biosystems). El protocolo de la PCR consistió en: Inicio en 1 ciclo a 50 °C durante 2 minutos y 1 ciclo a 95 °C durante 10 minutos, seguido de amplificación durante 45 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y a 60 °C durante 1 minuto. Los datos de CT se recogieron mediante ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). En cada muestra de hoja se analizó cada gen un mínimo de dos veces distintas.

- 25 Los resultados indicaron una variación significativa del nivel de expresión de los transgenes entre los eventos seleccionados. No obstante, se observó una correlación significativa entre el nivel de expresión de un transgén dado (Figura 7) y la capacidad del correspondiente evento para limitar la tasa de crecimiento de la bacteria (Figura 6) que, en consecuencia, reducía a gravedad de las lesiones de chancro (Figura 5).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110>  
<120> Procedimiento para aumentar la resistencia a enfermedades en las plantas  
  
<140>  
<141>  
  
<210> 1  
35 <211> 378  
<212> ADN  
<213> *Citrus sinensis*  
  
<400> 1

```

atggggtcca aattgttccct tcttttaggc cttttaatgg ccattgctct tcttatctct 60
tccgaggtag cagccagaga cctggccgag acttccattg atcacaacga aaaggtgat 120
aaggccacag agacacatga aattgaggac ggtcgcggcg gatacggcgg cgggtggtggg 180
ggctatggcg gtggtggggg ctatggcggt ggtggggggc atggcggggg ccatggtggt 240
ggccatggcg gtggccatgg cggtgggccac tgcccctacg gttgctgtgg acgtggttat 300
tatggaagag gctgcaggtg ctgcacttac gctggtgagg ctgttgatac tgagcctgaa 360
accgagcctc aaaactga 378
    
```

- 40 <210> 14  
<211> 125

ES 2 434 742 T3

<212> PRT  
<213> *Citrus sinensis*

<400> 14

Met Gly Ser Lys Leu Phe Leu Leu Leu Gly Leu Leu Met Ala Ile Ala  
5 10 15  
Leu Leu Ile Ser Ser Glu Val Ala Ala Arg Asp Leu Ala Glu Thr Ser  
20 25 30  
Ile Asp His Asn Glu Lys Ala Asp Lys Ala Thr Glu Thr His Glu Ile  
35 40 45  
Glu Asp Gly Arg Gly Gly Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Gly  
50 55 60  
Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Gly Gly Gly His Gly Gly Gly His Gly Gly  
65 70 75 80  
Gly His Gly Gly Gly His Gly Gly Gly His Cys Pro Tyr Gly Cys Cys  
85 90 95  
  
Gly Arg Gly Tyr Tyr Gly Arg Gly Cys Arg Cys Cys Thr Tyr Ala Gly  
100 105 110  
Glu Ala Val Asp Thr Glu Pro Glu Thr Glu Pro Gln Asn \*  
115 120 125

5

<210> 2  
<211> 1008  
<212> ADN  
<213> *Citrus sinensis*

10 <400> 2



Ile Lys Glu Gln Val Lys Leu Leu Tyr Lys Arg His Lys Asn Thr Ala  
 50 55 60  
 Phe Ser Trp Leu Arg Asn Ile Phe His Asp Cys Ala Val Gln Ser Cys  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ser Leu Leu Leu Asp Ser Thr Arg Lys Thr Leu Ser Glu Lys  
 85 90 95  
 Glu Met Asp Arg Ser Phe Gly Met Arg Asn Phe Arg Tyr Ile Glu Asn  
 100 105 110  
 Ile Lys Glu Ala Val Glu Arg Glu Cys Pro Gly Val Val Ser Cys Ala  
 115 120 125  
 Asp Ile Leu Val Leu Ser Gly Arg Asp Gly Val Val Ala Leu Gly Gly  
 130 135 140  
 Pro Tyr Ile Pro Leu Lys Thr Gly Arg Arg Asp Gly Arg Lys Ser Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Glu Ile Leu Glu Gln Tyr Leu Pro Asp His Asn Asp Ser Met Ser  
 165 170 175  
 Val Val Leu Glu Arg Phe Ala Ala Ile Gly Ile Asp Ala Pro Gly Leu  
 180 185 190  
 Val Ala Leu Leu Gly Ser His Ser Val Gly Arg Thr His Cys Val Lys  
 195 200 205  
 Leu Val His Arg Leu Tyr Pro Glu Val Asp Pro Ala Leu Asn Pro Asp  
 210 215 220  
 His Val Pro His Met Leu His Lys Cys Pro Asp Ala Ile Pro Asp Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Ala Val Gln Tyr Val Arg Asn Asp Arg Gly Thr Pro Met Val Leu  
 245 250 255  
 Asp Asn Asn Tyr Tyr Arg Asn Ile Leu Asp Ser Lys Gly Leu Met Met  
 260 265 270  
 Val Asp His Gln Leu Ala Thr Asp Lys Arg Thr Arg Pro Tyr Val Lys  
 275 280 285  
 Lys Met Ala Lys Ser Gln Asp Tyr Phe Phe Lys Glu Phe Ser Arg Ala  
 290 295 300  
 Ile Thr Ile Leu Ser Glu Asn Asn Pro Leu Thr Gly Thr Lys Gly Glu  
 305 310 315 320  
 Ile Arg Lys Val Cys Asn Leu Ala Asn Lys Leu His Asp Lys Ser \*  
 321 326 331 335

<210> 3  
 <211> 267  
 <212> ADN  
 <213> *Citrus sinensis*

ES 2 434 742 T3

<400> 3

atgaagctgg ccttagttac gttccttctc gtttcgcttg tcctcacctc cactttcttt 60  
 gaggtctcaa tggctgggtc agatttctgc gactcaaagt gtgcggtgag gtgctcaaaa 120  
 gcaggaaggg aagacaggtg cctgaagtac tgtggaattt gctgtgacaa gtgccattgt 180  
 gttccatctg ggacttacgg gcacaaggac gagtgcctt gctacagga cctcaagaac 240  
 tccaagggca aacctaagtg tccttaa 267

5 <210> 16  
 <211> 88  
 <212> PRT  
 <213> *Citrus sinensis*

<400> 16

Met Lys Leu Ala Leu Val Thr Phe Leu Leu Val Ser Leu Val Leu Thr  
 5 10 15  
 Ser Thr Phe Phe Glu Val Ser Met Ala Gly Ser Asp Phe Cys Asp Ser  
 20 25 30  
 Lys Cys Ala Val Arg Cys Ser Lys Ala Gly Arg Glu Asp Arg Cys Leu  
 35 40 45  
 Lys Tyr Cys Gly Ile Cys Cys Asp Lys Cys His Cys Val Pro Ser Gly  
 50 55 60  
 Thr Tyr Gly His Lys Asp Glu Cys Pro Cys Tyr Arg Asp Leu Lys Asn  
 65 70 75 80  
 Ser Lys Gly Lys Pro Lys Cys Pro \*

10

<210> 4  
 <211> 1080  
 <212> ADN  
 <213> *Citrus sinensis*

15

<400> 4

ES 2 434 742 T3

atggactcag categtcage aacagctgct gctgcaattt ttaatgagag agagtcaatg 60  
 gtggatccat ttttggtga ggctctccag aatcctcgtc atcgtctcac cattctcgt 120  
 atggaacttg atattcagag gtttttgcaa aatcctgatc agcagcattt cgagttccaa 180  
 ctttttcccta cttcttatct ccgactggct gcacaccgtg tttctcaaca ttatgggcta 240  
 gtaactatgg ttcaggaaaa tggcatagaa gggctgggta acaggatttt ggtgaggaaa 300  
 acagcagaaa gcaaatatcc tgctgtccgt ttatctgaga ttcttgctaa gcagtcggaa 360  
 gaaagtgata agcttgaaaa gattaaaatt gccatcaggc gtaggcccaa tgetggatgt 420  
 gttaatggag caaatgaaac tgggacgaaa cgaagtcctg ttagaagtgt ggaagagagg 480  
 aaggaggagt atgatcgagc acgtgcccgc atctttagtg gtcctagcag tcctaactca 540  
 gaggatagc ttactcaggt ctctacagat atgaaaaata ttggctttaa ccgagatgag 600  
 agggaaattg tcaggaactc cttactgat gcagaaaaga ttattagtat cagagacggt 660  
  
 gctggtttgt ctcgagttgc cttttcaga gacagggaga aggatcgtac tgatccagat 720  
 tatgatcgga gttatgaaag gtatgtcagg agccttccaa ctaatcaagg ctttagcttg 780  
 ccacctttta atatgcagaa agttcaactt ccatttatgc agtacgatac tggttttccc 840  
 caattcagtc agateccaag gactcaagct tccctcagtt tcaggectcc gtcaagccca 900  
 gttatgagcc cttattgtgc agtgggaccg aatcagacat ctgtggaagc tgcataatg 960  
 caatggccaa gtgctgcaat gatgtatgct cattcgtatg agcagtttag acaagctgct 1020  
 ttccaggttc cattctgtca gcaacctctg agctttgatt actctcaaaa cactcatag 1080

<210> 5  
 <211> 1014  
 <212> ADN  
 <213> *Citrus sinensis*  
 <400> 5

5

ES 2 434 742 T3

atgggcaatt cggagaaaga ttcgacgtcg aagtcaatta acgagacggg gaacgggtcc 60  
 caccagttca cggtaaaagg ttactccctg gcgaaggaa tgggccctgg caagtgctta 120  
 tcgagcgacg tttttaccgt gggcggttac gattgggcca tttactttta ccccgacggc 180  
 aagaacccgg aagatggggc tttgtatggt tcggtgttta ttgcttggc gagtgaagga 240  
 acggacgtga gggcgctggt tgagttaact ttggttgacc aaagtgggaa aggaaagcat 300  
 aaagttcata gtcattttga tcgagcgta gagagtggcc cgtacacctt gaagtatcgt 360  
 ggaagcatgt ggggctataa gcgcttcttt aaaagaacat ctctggagac ttctgattat 420  
 attaaggatg attgtcttct catcaactgc actgttggag ttgttagaaa ccgccttgag 480  
 ggacaaaaac agtattccat accagtgcc ccgtcagaca tgggccaggg tcttaaggat 540  
 ttgctagagt ctgaaattgg atgtgacata gtttttgagg ttggtgatga aacatttaa 600  
 gctcataaac tgataactgc tgctcgctct cctgttttca gagcccaatt ctatgggctt 660  
 gttggagatc gtaacttggg taaagtagtt gtgaaggatg ttgaaccctc aatcttcaag 720  
 gcaatgctcc tgtttatata caccgataaa tttcctgatg tatatgaaat tactggcaca 780  
 acatcaatgt gcacaacaac caacatggta cagcatctac tggctgcagc tgatctttat 840  
 aatgtagatc gattgaaatt gttgtgtgaa tcaaaattat gtgaagaact aaatgctgag 900  
 acagtggcca caacactcgc actggcagaa caacatcagt gtccccagct taaggctatc 960  
 tgcttgaagt ttgctgcaac tccggcgaat ttgggagggtg cgtgttgttc gtag 1014

<210> 17

<211> 337

<212> PRT

5 <213> *Citrus sinensis*

<400> 17

Met Gly Asn Ser Glu Lys Asp Ser Thr Ser Lys Ser Ile Asn Glu Thr  
5 10 15

Val Asn Gly Ser His Gln Phe Thr Val Lys Gly Tyr Ser Leu Ala Lys  
20 25 30

Gly Met Gly Pro Gly Lys Cys Leu Ser Ser Asp Val Phe Thr Val Gly  
35 40 45

Gly Tyr Asp Trp Ala Ile Tyr Phe Tyr Pro Asp Gly Lys Asn Pro Glu  
50 55 60

Asp Gly Ala Leu Tyr Val Ser Val Phe Ile Ala Leu Ala Ser Glu Gly  
65 70 75 80

Thr Asp Val Arg Ala Leu Phe Glu Leu Thr Leu Val Asp Gln Ser Gly  
85 90 95

Lys Gly Lys His Lys Val His Ser His Phe Asp Arg Ala Leu Glu Ser  
100 105 110

Gly Pro Tyr Thr Leu Lys Tyr Arg Gly Ser Met Trp Gly Tyr Lys Arg  
115 120 125

Phe Phe Lys Arg Thr Ser Leu Glu Thr Ser Asp Tyr Ile Lys Asp Asp  
130 135 140

Cys Leu Leu Ile Asn Cys Thr Val Gly Val Val Arg Asn Arg Leu Glu  
145 150 155 160

Gly Pro Lys Gln Tyr Ser Ile Pro Val Pro Pro Ser Asp Met Gly Gln  
165 170 175

Gly Leu Lys Asp Leu Leu Glu Ser Glu Ile Gly Cys Asp Ile Val Phe  
180 185 190

Glu Val Gly Asp Glu Thr Phe Lys Ala His Lys Leu Ile Leu Ala Ala  
195 200 205

Arg Ser Pro Val Phe Arg Ala Gln Phe Tyr Gly Leu Val Gly Asp Arg  
210 215 220

Asn Leu Asp Lys Val Val Val Lys Asp Val Glu Pro Ser Ile Phe Lys  
225 230 235 240

Ala Met Leu Leu Phe Ile Tyr Thr Asp Lys Phe Pro Asp Val Tyr Glu  
245 250 255

Ile Thr Gly Thr Thr Ser Met Cys Thr Thr Thr Asn Met Val Gln His  
260 265 270

Leu Leu Ala Ala Ala Asp Leu Tyr Asn Val Asp Arg Leu Lys Leu Leu  
275 280 285

Cys Glu Ser Lys Leu Cys Glu Glu Leu Asn Ala Glu Thr Val Ala Thr  
290 295 300

Thr Leu Ala Leu Ala Glu Gln His Gln Cys Pro Gln Leu Lys Ala Ile  
305 310 315 320

Cys Leu Lys Phe Ala Ala Thr Pro Ala Asn Leu Gly Gly Ala Cys Cys  
325 330 335

Ser \*



Val Gln Ala Glu Lys Glu Ser Asp Gly Gly Lys Lys Pro Gly Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Pro Ser Tyr Arg Leu Ser Val Phe Asp Arg Val Gly Ala Val Trp Asp  
 85 90 95  
 Arg Ile Asp Pro Val Pro Gly Tyr Pro Asn Gly Leu Pro Leu Phe Cys  
 100 105 110  
 Gln Leu Ala Gly Cys Lys Gly Lys Leu Val Val Met Gly Gly Trp Asp  
 115 120 125  
 Pro Asp Ser Tyr Asn Pro Val Thr Asp Val Phe Val Tyr Asp Phe Gly  
 130 135 140  
 Met Arg Arg Trp Arg Lys Gly Lys Asp Leu Pro Ala Lys Met Ser Phe  
 145 150 155 160  
 Phe Gly Cys Gly Ser Ala Glu Gly Arg Val Tyr Val Ala Gly Gly His  
 165 170 175  
 Asp Gln Asn Lys Asn Ala Leu Arg Thr Gly Trp Val Tyr Asp Leu Arg  
 180 185 190  
 Arg Asp Glu Trp Ser Glu Leu Thr Gln Leu Ser Gln Glu Arg Asp Glu  
 195 200 205  
 Cys Glu Gly Val Val Ile Gly Asp Glu Phe Trp Val Ile Ser Gly Tyr  
 210 215 220  
 Asn Thr Glu Asn Gln Gly Ala Phe Asp Gly Ser Ala Asp Ala Tyr Gly  
 225 230 235 240  
 Phe Gly Ser Gly Gln Trp Lys Arg Val Glu Gly Ile Trp Glu Ala Gly  
 245 250 255  
 Arg Cys Pro Arg Ser Asn Val Gly Val Gly Lys Asp Gly Arg Ile Phe  
 260 265 270  
 Ser Trp Ser Glu Leu Asp Ser Val Val Arg Ala Gly Leu Cys Gly Val  
 275 280 285  
 Ala Leu Gly Asp Arg Val Leu Val Thr Gly Ser Glu Tyr Gln Gly Ala  
 290 295 300  
 Pro Ser Gly Phe Tyr Leu Ala Glu Ile Gly Glu Gly Gln Lys Val Lys  
 305 310 315 320  
 Leu Glu Lys Ile Asn Val Pro Asp Glu Phe Ser Gly Phe Val Gln Ser  
 325 330 335  
 Gly Cys Cys Val Glu Ile \*  
 340

<210> 7

<211> 690

<212> AND

5 <213> *Citrus sinensis*

<400> 7

ES 2 434 742 T3

atggtgggag tgttcagcag cgcgategtt tcacctccag aggagctggt ggcgggccgga 60  
agccggactc cgtcgccgaa gaccacatcg acggcactgg tcgaccgttt cctccaggcc 120  
aactcgtctg ctgtgtccgt acaggtcggg gacaacgtca ccctcgcgta cactcatcag 180

aacgagtctc ctttacggca aagatcattt gctgtgaaag atgagatctt ctgcttgttt 240  
gagggagcac ttgataaactt ggaagcctg aggcagcaat atggactagc taagtcggca 300  
aatgaagtga tcttggtgat tgaggcatac aaggctctgc gtgatcgggc cccttaccba 360  
ccgaaccatg tcgttggcca ccttagtggg tactttgcct tcattgteta cgacaagtcc 420  
acctccacct tgtttgtggc ttctgaccaa tttggttaagg ttcctcttta ttggggaatc 480  
actgctgatg gacatggtgc ctttgctgat gatgctgact tgctcaaagg tgcttgccgc 540  
aagtcacttg cttctttccc tcaaggttgt ttcttctcaa cagcagttgg aggactgaga 600  
agctttgaga atccaaagaa caagatcact gcagttcctg ctgcggaaga agagatctgg 660  
ggtgetacat ttaaggtaat gtcactttga 690

- 5 <210> 19  
<211> 230  
<212> PRT  
<213> *Citrus sinensis*  
<400> 19





ES 2 434 742 T3

Met Thr Ile Leu Ile Asp Gln Pro His Phe Gly Val Glu Val Gln Glu  
5 10 15

Lys Lys Val Pro Ile Asp Glu Lys Glu Leu Ser Leu Asp Gly Gly Phe  
20 25 30

Leu Val Pro Gln Thr Asn Ser Phe Gly His Thr Phe Arg Asp Tyr Asp  
35 40 45

Ala Glu Gly Glu Arg Gln Glu Gly Val Glu Asn Phe Tyr Arg Ile Asn  
50 55 60

His Ile Asn Gln Thr Tyr Asp Phe Val Lys Lys Met Arg Glu Glu Tyr  
65 70 75 80

Gly Lys Leu Asn Arg Val Glu Met Ser Ile Trp Glu Cys Cys Glu Leu  
85 90 95

Leu Asn Asp Val Val Asp Glu Ser Asp Pro Asp Leu Asp Glu Pro Gln  
100 105 110

Ile Glu His Leu Leu Gln Thr Ala Glu Ala Ile Arg Lys Asp Tyr Pro  
115 120 125

Asp Glu Asp Trp Leu His Leu Thr Gly Leu Ile His Asp Leu Gly Lys  
130 135 140

Val Leu Asn Leu Pro Ser Phe Gly Gly Leu Pro Gln Trp Ala Val Val  
145 150 155 160

Gly Asp Thr Phe Pro Val Gly Cys Ala Phe Asp Glu Ser Ile Val His  
165 170 175

His Lys Tyr Phe Lys Glu Asn Pro Asp Tyr Ser Asn Pro Ala Phe Asn  
180 185 190

Thr Glu Tyr Gly Val Tyr Ser Glu Gly Cys Gly Leu Asp Asn Val Met  
195 200 205

Met Ser Trp Gly His Asp Asp Tyr Met Tyr Leu Val Ala Asn Glu Asn  
210 215 220

Lys Thr Thr Leu Pro Ser Ala Ala Leu Leu Ile Ile Arg Tyr His Ser  
225 230 235 240

Phe His Ala Leu His Lys Ser Glu Ala Tyr Lys Asn Leu Met Asn Glu  
245 250 255

Glu Asp Val Glu Asn Leu Lys Trp Leu Gln Ile Phe Ser Lys Tyr Asp  
260 265 270

Leu Tyr Ser Lys Ser Lys Val Arg Ile Asp Val Glu Lys Val Lys Pro  
275 280 285

Tyr Tyr Leu Ser Leu Ile Glu Lys Tyr Phe Leu Ala Lys Leu Lys Trp  
290 295 300 304

\*

<210> 9  
<211> 762  
<212> ADN  
<213> *Citrus sinensis*

5

<400> 9



ES 2 434 742 T3

Lys Ala Ala Arg Val Glu Gly Lys Glu Lys Lys Thr Gln Arg Val Arg  
 65 70 75 80  
 Lys Asn Val Tyr Arg Gly Ile Arg Gln Arg Pro Trp Gly Lys Trp Ala  
 85 90 95  
 Ala Glu Ile Arg Asp Pro Tyr Lys Gly Val Arg Val Trp Leu Gly Thr  
 100 105 110  
 Phe Asn Thr Ala Glu Glu Ala Ala Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Ala Lys  
 115 120 125  
 Arg Ile Arg Gly Asp Lys Ala Lys Leu Asn Phe Ala Gln Pro Pro Pro  
 130 135 140  
 Pro Ile Ala Pro Pro Pro Ala Lys Lys Arg Cys Met Pro Ser Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Gln Pro Arg Phe Glu Thr Ile Gly Thr Pro Pro Ala Pro Ala  
 165 170 175  
 Pro Ser Pro Trp Val Gly Phe Gly Tyr Gln Asn Glu Phe Tyr Gln Pro  
 180 185 190  
 Arg Ala Val Asp Asp Glu Phe Glu Leu Ser Gln Gln Ile Ser Ser Leu  
 195 200 205  
 Glu Ser Phe Leu Gly Leu Glu Pro Leu Met Ser Gln Pro Ser Gly Asn  
 210 215 220  
 Gly Ala Gly Gly Tyr Asp Ser Val Asp Phe Trp Met Leu Asp Asp Val  
 225 230 235 240  
 Ala Ala Thr Gln Gln Leu Asn Ser Asn Gln Phe Leu Cys \*  
 245 250

<210> 12

<211> 253

<212> ADN

5 <213> *Citrus sinensis*

<400> 12

ES 2 434 742 T3

atgcaactct caacaaactt cacagcttca ccatttcgat cccaaaacca tctcttcaac 60  
 aatctcagtc ccacttcttt tctccacaaa tcactgttcc tttcaagacc caccaaaacc 120  
 ctccaaaatc tgetcttttc aaaccccaaa tcatcacaaa aaaagttact tagaacttca 180  
 acaattaatg cctctttgct tgaagctcca ctcttgtggg ctggtagact ttgcgtttac 240  
 tatgccctct tgaaagctgg cttagctgga tctcaagcta atcctctcgt ctctgatttg 300  
 gaaagtggg gtgtcactgg tagtgaaggt gctgatttgg gggtctctaa atgggttagaa 360  
 aacataaaag ggaagccaga caaggaagcg gctgacaaaa ggaaattggg gagcaaatgg 420  
 catcctacaa caaaggggaac actgagacgg aattacaggg tgccctccaa atctgaaggg 480  
 cgcagacttc ttaaagccat tgcgtcgttg ctgtctgatg atgatcactt cacggatgcc 540  
 acttcccaca agggttgtca aattaggagg gagaatgttc acgggtgaatc tgtctgctgc 600  
 aataacgtta gggctctctt tgatgagctt ccaactcctc acttggttgt ggaaatcaca 660  
  
 ccttttccag cggacctct aaccgaaaag gattacgtca aggctgagaa actagagagg 720  
 gtactgaggt cgggcecttc tatttga 747

- <210> 23
- <211> 248
- 5 <212> PRT
- <213> *Citrus sinensis*
- <400> 23



ES 2 434 742 T3

atggaagaaa accaatcagt tgctacactc atggactcta caacatccaa gattcaacaa 60  
 cttcagaaag catttgctga acttgaaagt cacagggcca taacccttaa tttgagatgg 120  
 aaggaacttg aagaacactt ccatgggctt gagaagtcct taaagcgaag gtttcatgaa 180  
 ctggaagacc aagaaaagga gtttgaaact aaaacaagga aagcccgtga aatcttgag 240  
 aagcgggagg ctgctgtttt ggccaaggaa caaactactc tggagaagct ccagaagaag 300  
 agagatgctg ctgtctttgc catttcaact gctctagaga aacagaggaa ggtatcatct 360  
 gcagagcctg ccattgttag caatgttgat gaaagcaggg caccacctgt tgaggacaaa 420  
 ctgectgatt caatgtctct tgaaaataac ttagaaagca gcaaaaaatc gtctgagagt 480  
 gaaaacatgg agctgaaggc ttatcccaaa ttatttaaac tatgtgaaga gatgaactca 540  
 gaaggcttgc acaaatttat atcagacaat cgtaagaacc ttgctgtcct aaaggaagaa 600  
 attcctcttg cgctgaaggc tgctgcagac ccagcctgtt tggatttga ttctctagaa 660  
 ggttttacc acatggaagt gtcaaatgtg gatggaaaga aagattcaag cttattgggt 720  
 ctccgcagaa cctgtattat gttgatggaa tgccttagca tttgttagc aaatctcaat 780  
 ctgaatactc ttactgctgt tatctcacia ggtgtaaagg agcaggcaaa ggcaattgcc 840  
 gaagagtgga aaccaaagtt ggatacctt gatgtggatg atagcaatgg gaactccttg 900  
 gaggetcatg ctttctaca acttctggca acgttttcta ttgettctga ctttaatgag 960  
 gaagaattat caaggctaat accaatggtc tctcgtcgtc gccaaacacc tgatttatgt 1020  
 cgctcccttg ggttgcaga aaaaatgcca ggtgtcattg aagttctggg gaatagtgga 1080  
 aggcaaattg atgcagtaa cctagctttt gcatttgagc ttactgagca gttctctcct 1140  
 gtgcctttac tgaagtccta cttgaaggag gcgaaaaagg cttcttccac tgtcaaggct 1200  
 ggaaacatgt ctccctctgc cgagaatgag gtcaatgatc gagagctgag tgcctgaaa 1260  
 gctgtgatca aatgcattga agagcataac cttgaggagc agtatcccat agatcctctc 1320  
 caaaagcgaa ttctccagct agagaaggcc aaggccgaaa agaaaagggc aactgaagtt 1380  
 gccaaagccg aaccaaagag accccgtgcc aatggtgctg gatcgggccc tcgagtcact 1440  
 aatgttgcgg ctgacaaggc attctatcct agagttgccc ataggtatcc ccaatatgtg 1500  
 tatgacagac cctatgttta caccggacct gctgacaacc acggcccctc tcttctgggt 1560  
 tctgctactt acagcttctc tccaatcat ggcaactact ttggaaatgg ctaccagtac 1620  
 caagctgtcc aagcccctta tcttactaa 1650

<210> 24

<211> 549

<212> PRT

<213> *Citrus sinensis* c

<400> 24

Met Glu Glu Asn Gln Ser Val Ala Thr Leu Met Asp Ser Thr Thr Ser  
5 10 15

Lys Ile Gln Gln Leu Gln Lys Ala Phe Ala Glu Leu Glu Ser His Arg  
20 25 30

Ala Ile Thr Leu Asn Leu Arg Trp Lys Glu Leu Glu Glu His Phe His  
35 40 45

Gly Leu Glu Lys Ser Leu Lys Arg Arg Phe His Glu Leu Glu Asp Gln  
50 55 60

Glu Lys Glu Phe Glu Thr Lys Thr Arg Lys Ala Arg Glu Ile Leu Gln  
65 70 75 80

Lys Arg Glu Ala Ala Val Leu Ala Lys Glu Gln Thr Thr Leu Glu Lys  
85 90 95

Leu Gln Lys Lys Arg Asp Ala Ala Val Phe Ala Ile Ser Thr Ala Leu  
100 105 110

Glu Lys Gln Arg Lys Val Ser Ser Ala Glu Pro Ala Ile Val Ser Asn  
115 120 125

Val Asp Glu Ser Arg Ala Pro Pro Val Glu Asp Lys Leu Pro Asp Ser  
130 135 140

Met Ser Leu Glu Asn Asn Leu Glu Ser Ser Lys Lys Ser Ser Glu Ser  
145 150 155 160

Glu Asn Met Glu Leu Lys Ala Tyr Pro Gln Leu Phe Lys Leu Cys Glu  
165 170 175

Glu Met Asn Ser Glu Gly Leu His Lys Phe Ile Ser Asp Asn Arg Lys  
180 185 190

Asn Leu Ala Val Leu Lys Glu Glu Ile Pro Leu Ala Leu Lys Ala Ala  
195 200 205

Ala Asp Pro Ala Cys Leu Val Leu Asp Ser Leu Glu Gly Phe Tyr His  
210 215 220

Met Glu Val Ser Asn Val Asp Gly Lys Lys Asp Ser Ser Leu Leu Gly  
225 230 235 240

Leu Arg Arg Thr Cys Ile Met Leu Met Glu Cys Leu Ser Ile Leu Leu  
245 250 255

Ala Asn Leu Asn Leu Asn Thr Leu Thr Ala Val Ile Ser Gln Gly Val  
260 265 270

Lys Glu Gln Ala Lys Ala Ile Ala Glu Glu Trp Lys Pro Lys Leu Asp  
275 280 285

Thr Leu Asp Val Asp Asp Ser Asn Gly Asn Ser Leu Glu Ala His Ala  
290 295 300

Phe Leu Gln Leu Leu Ala Thr Phe Ser Ile Ala Ser Asp Phe Asn Glu  
305 310 315 320

Glu Glu Leu Ser Arg Leu Ile Pro Met Val Ser Arg Arg Arg Gln Thr  
325 330 335

Pro Asp Leu Cys Arg Ser Leu Gly Leu Ser Glu Lys Met Pro Gly Val  
340 345 350

ES 2 434 742 T3

Ile Glu Val Leu Val Asn Ser Gly Arg Gln Ile Asp Ala Val Asn Leu  
 355 360 365

Ala Phe Ala Phe Glu Leu Thr Glu Gln Phe Ser Pro Val Pro Leu Leu  
 370 375 380

Lys Ser Tyr Leu Lys Glu Ala Lys Lys Ala Ser Ser Thr Val Lys Ala  
 385 390 395 400

Gly Asn Met Ser Pro Ser Ala Glu Asn Glu Val Asn Asp Arg Glu Leu  
 405 410 415

Ser Ala Leu Lys Ala Val Ile Lys Cys Ile Glu Glu His Asn Leu Glu  
 420 425 430

Glu Gln Tyr Pro Ile Asp Pro Leu Gln Lys Arg Ile Leu Gln Leu Glu  
 435 440 445

Lys Ala Lys Ala Glu Lys Lys Arg Ala Thr Glu Val Ala Lys Pro Gln  
 450 455 460

Pro Lys Arg Pro Arg Ala Asn Gly Ala Gly Tyr Gly Pro Arg Val Thr  
 465 470 475 480

Asn Val Ala Ala Asp Lys Ala Phe Tyr Pro Arg Val Ala Asp Arg Tyr  
 485 490 495

Pro Gln Tyr Val Tyr Asp Arg Pro Tyr Val Tyr Thr Gly Pro Ala Asp  
 500 505 510

Asn His Gly Pro Ser Leu Leu Gly Ser Ala Thr Tyr Ser Phe Ser Pro  
 515 520 525

Asn His Gly Asn Tyr Phe Gly Asn Gly Tyr Gln Tyr Gln Ala Val Gln  
 530 535 540

Ala Pro Tyr Leu His \*

545 549

<210> 12  
 <211> 375  
 <212> ADN  
 <213> *Citrus sinensis*

5

<400> 12

atgacttgta tcattaactc cactcaatct ttagtcttgg caactgccat ggtcgtctcc 60

agcactgtcc tctttcttgc tttctccaag caaaaaaatg attctaaaga accccaagag 120

gaaaccctac gttcttgctt gtattcagag gagaagaaga aggggaggaa gaagaagagg 180

gtgcaatttg cggagaatgt gaaggacaca gctgggaacg gagaggagta caggaaagag 240

tacaacaaga aatttgcaaa acaatttgat agaacttgca gaaatgatca aattcaaggg 300

atgcccgcta atagggttgc tttgtaccat ggaattctta gagacagagt ccacagaatg 360

gaatactcat attga 375

<210> 25  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> *Citrus sinensis*

10

<400> 25







**REIVINDICACIONES**

1. Una construcción que comprende (i) la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1 y (ii) un promotor que funciona en plantas, en las que la secuencia de nucleótidos está unida operativamente al promotor de modo que este último expresa una secuencia polipeptídica expuesta en la SEC ID N°: 14.
- 5 2. La construcción de la reivindicación 1, en la que el promotor se selecciona de un promotor 35S del CaMv, un promotor de la poliubiquitina, un promotor específico de tejido y un promotor preferido de tejido.
3. Una célula vegetal que comprende la construcción de la reivindicación 1.
4. Un procedimiento para aumentar la resistencia a la enfermedad del chancro de los cítricos en una planta o célula, que comprende sobreexpresar la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N° 1.
- 10 5. Un procedimiento para aumentar la resistencia a la enfermedad del chancro de los cítricos en una planta o célula, que comprende
  - (a) transformar una planta o célula con una construcción que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1, unida operativamente a un promotor activo en células vegetales.
  - (b) regenerar una planta a partir de dicha célula o planta transformada;
  - 15 (c) seleccionar una planta o célula que tiene una resistencia incrementada a la enfermedad del chancro de los cítricos respecto a una planta control.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el promotor es un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el promotor específico de tejido es un promotor específico del xilema, un promotor específico del floema o un promotor específico del xilema/floema.
- 20 8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el promotor está unido operativamente a un potenciador.
9. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la planta es un miembro de la familia Rutaceae.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicha planta se selecciona de los géneros *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Murraya*, *Microcitrus*, *Limonia* y *Eremocitrus*.
- 25 11. Una planta transgénica o una progenie, fruto o semilla de la misma, teniendo dicha planta, progenie, fruto o semilla incorporada en su genoma
  - (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de resistencia a la enfermedad expuesto en la SEC ID N°: 14, y
  - (ii) un promotor que funciona en plantas y que está operativamente unido a la secuencia de nucleótidos, en el
  - 30 que dicha planta sobreexpresa el polipéptido de resistencia a la enfermedad.
12. La planta transgénica de la reivindicación 11, en la que la secuencia de nucleótidos es la expuesta en la SEC ID N° 1.
13. La planta transgénica de la reivindicación 11, que tiene además incorporada en su genoma (iii) una secuencia potenciadora que se condensa con el promotor.
- 35 14. La planta transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que el promotor se selecciona de un promotor 35S del CaMv, un promotor de la poliubiquitina, un promotor específico de tejido y un promotor preferido de tejido.

Figura 1.



Figura 2

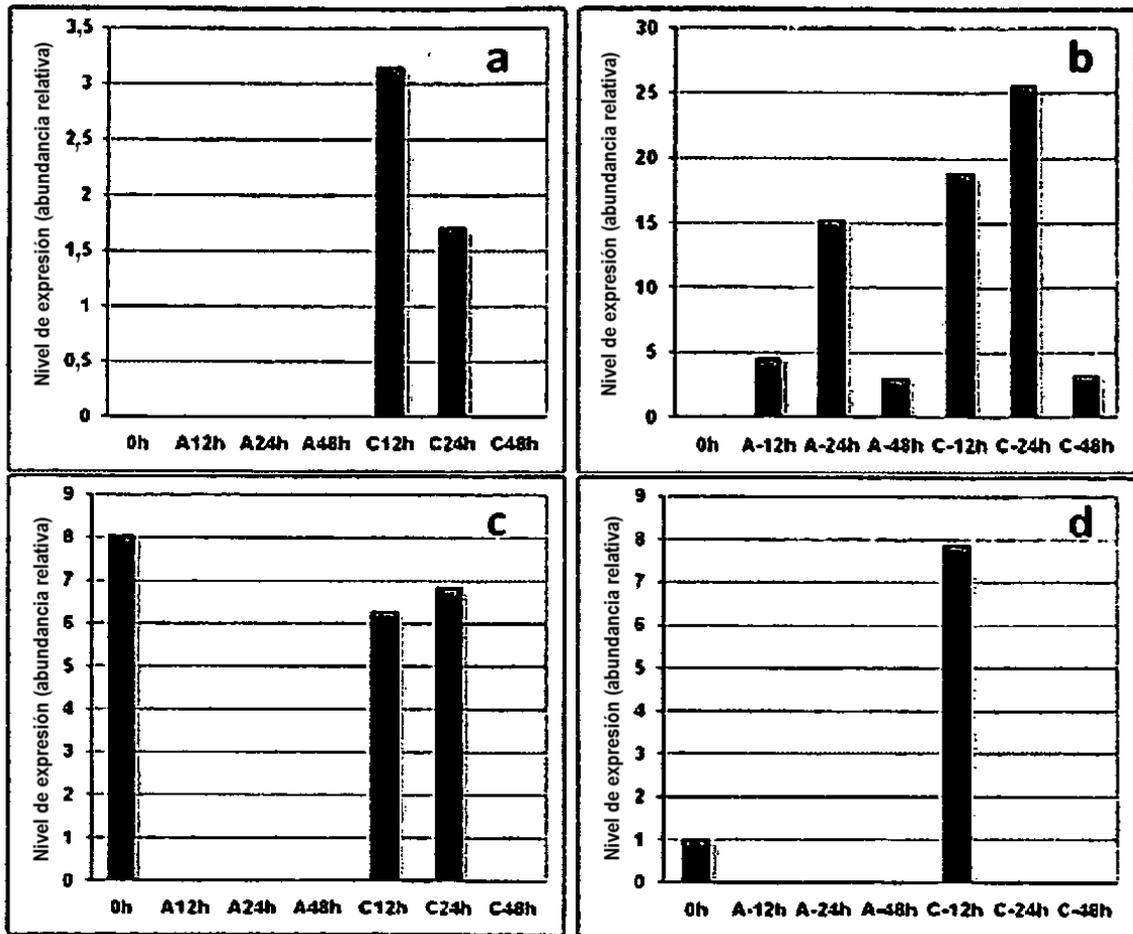


Figura 3.

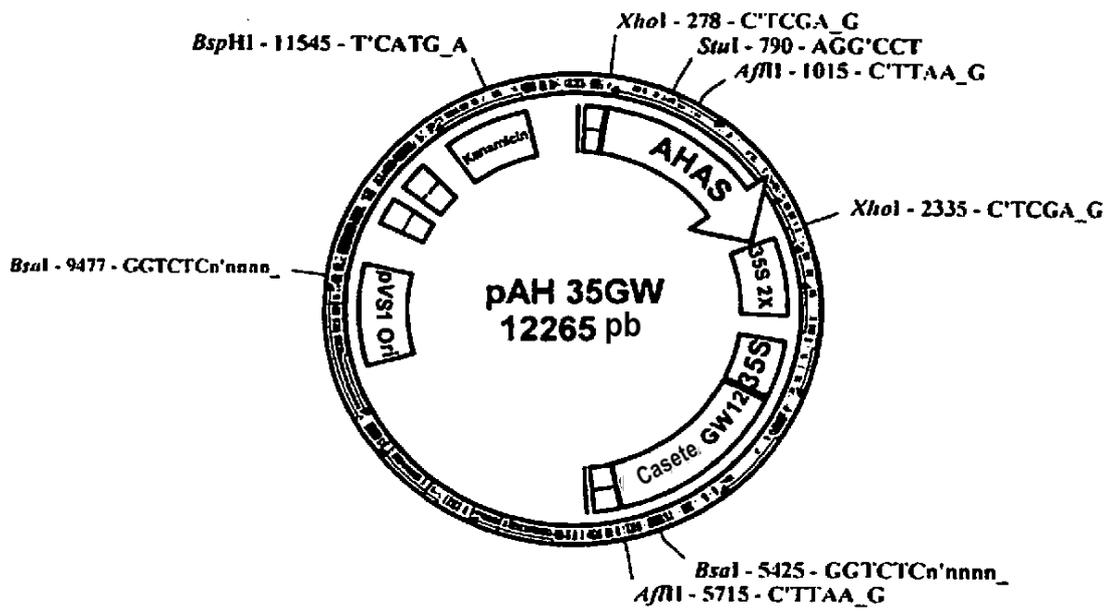


Figura 4.

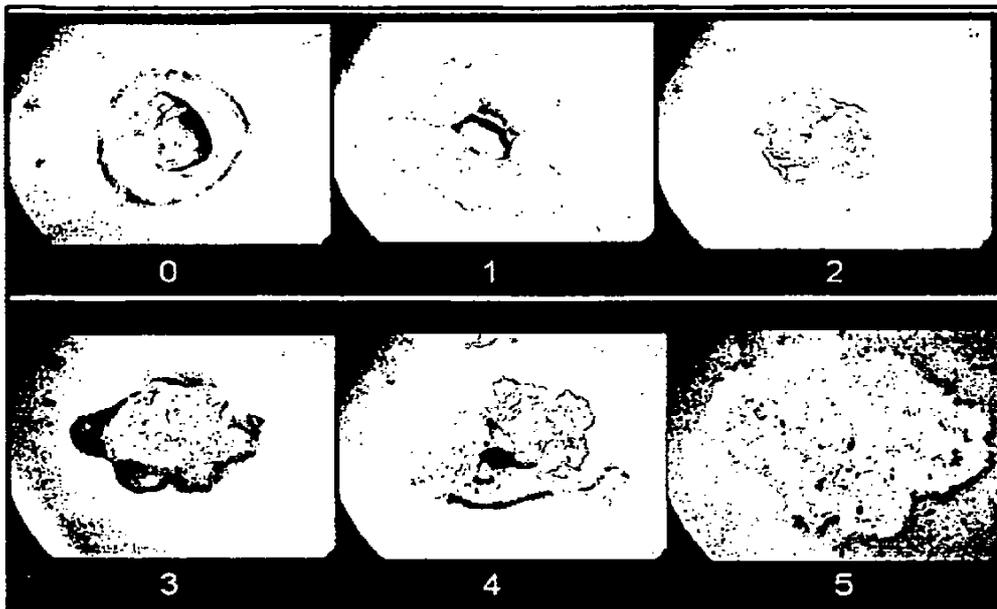


Figura 5.

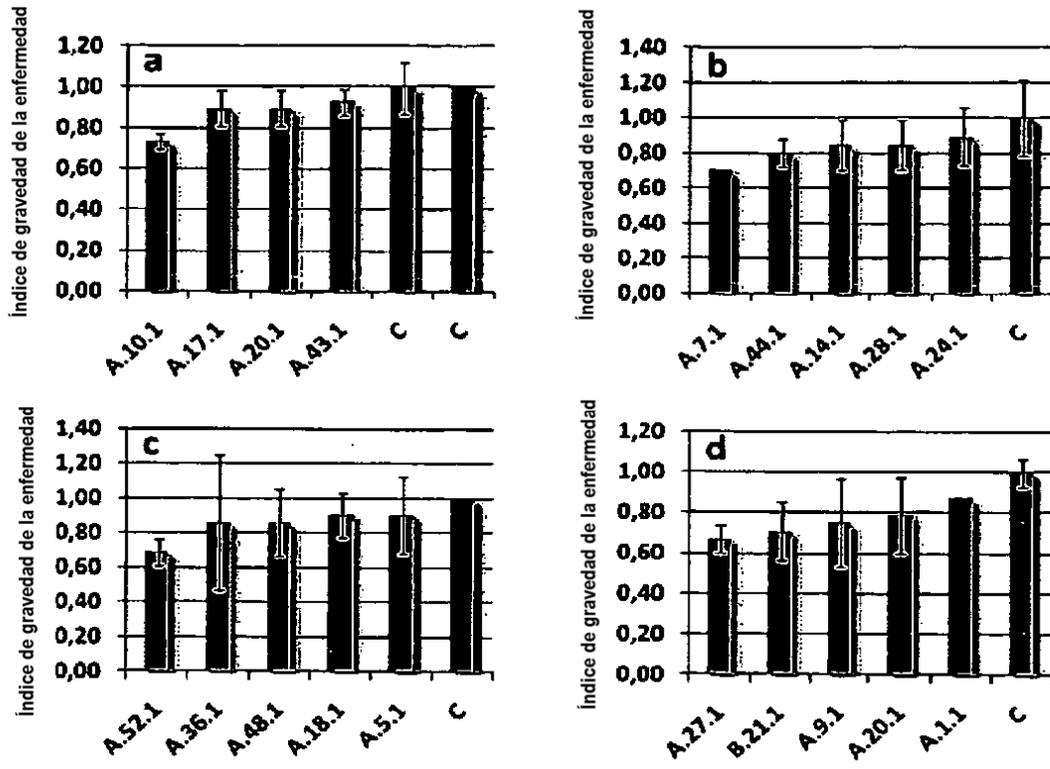
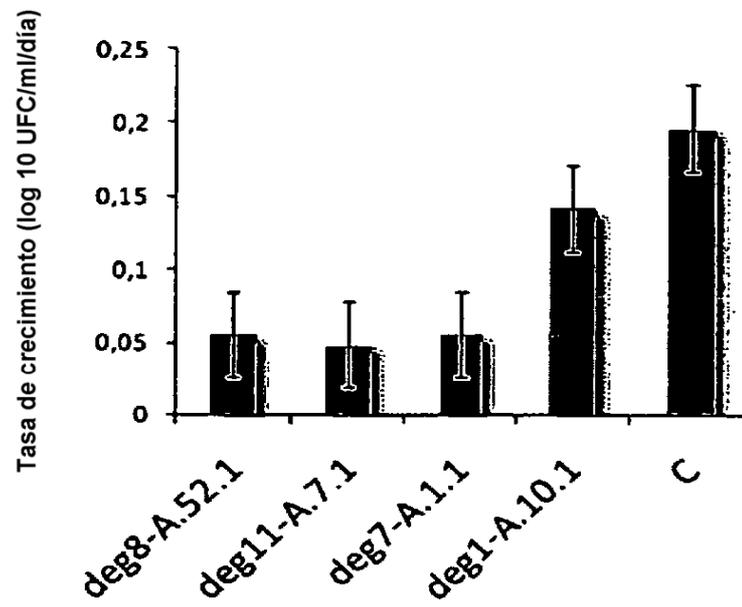


Figura 6.



**Figure 7.**

