

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 325**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/415** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2009 E 13179392 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2682403**

54 Título: **Genes y procedimientos para incrementar 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:  
**27.09.2016**

73 Titular/es:

**MONSANTO DO BRASIL LTDA (100.0%)  
Avenida das Nações Unidas No. 12901, North  
Tower, 7th floor  
São Paulo, BR**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 584 325 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 incrementar la resistencia a enfermedades en plantas

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la biología molecular y a la regulación del sistema de defensa natural de las plantas mediante la introducción de genes extraños / nativos en células vegetales, preferiblemente en sus genomas. Más específicamente, el procedimiento se refiere al aumento de la resistencia a enfermedades en plantas de cítricos mediante la sobreexpresión de genes implicados en el sistema de defensa innato de la planta. La invención también se refiere a tales genes.

### Introducción

10 En la naturaleza, las plantas y los animales están en contacto permanente con una gama muy diversa de microorganismos, aunque rara vez lo hace esta asociación da lugar a una enfermedad. Esto se debe principalmente a la existencia de sistemas de defensa que, en el caso de las plantas, carecen de la respuesta inmunitaria adaptativa frecuente en el reino animal.

15 La capacidad de una planta para reconocer un patógeno y activar una defensa eficaz a menudo se controla 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 de un gen y otro gen, el tejido recién infectado puede presentar flujos de iones, la producción de especies reactivas de oxígeno, ácido salicílico (AS), óxido nítrico y aumento de la expresión de genes de defensa asociados, incluidas las proteínas relacionadas con la patogenia (RP). Durrant y Dong, 2004, Annu. Rev. Phytopathol. 2004. 42:185-209. Además, las  
20 células que rodean el o los sitios de entrada de patógenos por lo general sufren muerte celular de tipo apoptótico, formando de esta manera las lesiones necróticas características de la respuesta hipersensible (RH). Heath, 2000, Plant Molecular Biology 44: 321-34.

Hasta la fecha, se han clonado varios genes de resistencia de las plantas (genes R) y se han fundamentado en la estructura de las proteínas que codifican, los genes se dividen en varios 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  
25 citoplasmáticas, que contienen un sitio de unión de para nucleótido (NB) y repeticiones ricas en leucina (LRR). Este grupo consiste en genes que codifican proteínas de CC-NB-LRR, que contienen un dominio de hélice superenrollada y genes que codifican proteínas que tienen un dominio similar a los receptores Toll y de interleucina (IL), las denominadas proteínas TIR-NB-LRR (Hammond-Kosack y Jones, 1997, citado anteriormente).

30 El uso de dichos genes de resistencia específicos en programas de mejoramiento para resistencia duradera es problemático, ya que los patógenos eluden fácilmente el reconocimiento mediante mutaciones en sus factores de virulencia, de modo que evitan la inducción de la defensa activa (Westerink y col., 2004, Mol. Microbiol. 54, 533-545). La similitud entre proteínas de resistencia (proteínas R) sugiere la existencia de mecanismos de resistencia comunes (Shirasu y Schulze-Lefert, 2000, Plant Mol. Biol. 44, 371-385). Por lo tanto, la identificación de genes  
35 adicionales requeridos para la resistencia no solo proporciona información sobre cómo funcionan dichas vías de señalización sino que también podría permitirnos identificar los genes que desempeñan un papel más general en la resistencia.

A pesar de la creciente información sobre las vías de resistencia a enfermedades, todavía hay una necesidad de  
40 identificar genes y proteínas que se puedan utilizar para crear plantas con una resistencia duradera y amplia a enfermedades. Es un objeto de la invención proporcionar dichos ácidos nucleicos, proteínas y procedimientos para la creación de plantas, especialmente plantas pertenecientes a la familia *Rutaceae*, con una resistencia a enfermedades mejorada.

### Sumario de la invención

45 En un aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:15.

En otro aspecto, la invención proporciona una construcción que comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO:2, unida operativamente a un promotor activo en células vegetales. En una realización, una secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un promotor que funciona en las plantas y dicho promotor expresa una secuencia de polipéptidos expuesta en la SEQ ID NO: 15. En una realización adicional, el promotor se  
50 selecciona de un promotor CaMV 35S, el promotor de la poliubiquitina, un promotor específico de tejido y un promotor de tejido preferente. En otra realización, una célula vegetal comprende la construcción.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para aumentar la resistencia a la enfermedad del chancro de los cítricos en una planta o célula, que comprende la sobreexpresión de la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. En una realización, una planta, célula de planta, semilla o fruto se produce mediante el  
55 procedimiento.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para aumentar la resistencia al 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 SEQ ID NO: 2, unida operativamente a 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 tenga una resistencia aumentada al chancro cítrico en relación con una planta control. En una realización, el promotor está unido operativamente a un promotor. 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 del xilema, un promotor específico del floema o un promotor un promotor específico del xilema/floema. En otra realización, la planta es un miembro de la familia Rutaceae. En una realización adicional, la planta se selecciona de los géneros *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Murraya*, *Microcitrus*, *Limonia* y *Eremocitrus*. En otra realización, mediante el procedimiento se produce una planta, una célula de planta, semilla o fruto.

En otro aspecto, la invención proporciona una planta transgénica que tiene incorporado en su genoma una secuencia de nucleótidos exógena que codifica un polipéptido de resistencia a las enfermedades expuesto en la SEQ ID NO: 15. En una realización, el polipéptido está codificado por una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. En una realización adicional, la descendencia, fruto o semilla de la planta comprenden dicha secuencia de nucleótidos exógena expuesta en la SEQ ID NO: 2.

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

Figura 1. En los perfiles de expresión *in silico* de una muestra seleccionada de los genes identificados en las bibliotecas de ADNc construidos a partir de tejido de hojas de cítricos expuesto previamente a *Xanthomonas axonopodis* pv citri (A-12 h, 24 h-A y A-48 h) y *Xanthomonas axonopodis* aurantifolii pv (C-12 h, 24 h-C y C-48 h).

Figura 2. Expresión diferencial de genes *ged* seleccionados en plantas de cítricos expuestas a *Xanthomonas axonopodis* pv citri (A-12, A-24 y A-48) y a *Xanthomonas axonopodis* pv aurantifolii (C-12 h, 24 h-C y C-48 h).

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

Figura 4. Escala de diagramas que ilustra el desarrollo de lesiones del chancro de los cítricos en hojas de naranja dulce a las que se ha inoculado artificialmente una suspensión bacteriana de *Xanthomonas axonopodis* pv citri.

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

Figura 6. Tasa de crecimiento diferencial de las bacteria del chancro de los cítricos en plantas de cítricos portadoras de las construcciones CaMV::deg::NOSpolyA y la variedad de Pinapple de control (C).

Figura 7. Niveles de expresión del transgén en acontecimientos seleccionados portadores de las construcciones pr35S-CaMV::deg::NOSpolyA y la variedad de piña de control (C).

### **Breve descripción de las secuencias en el listado de secuencias**

SEQ ID NO: 1 Secuencia del ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud a una proteína rica en glicina perteneciente a la familia de las seferinas de péptidos antimicrobianos.

SEQ ID NO: 2 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud a una enzima de la familia de peroxidasas.

SEQ ID NO: 3 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud a un péptido antimicrobiano de la familia Snakin.

SEQ ID NO: 4 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud a una enzima con actividad fosfatasa.

SEQ ID NO: 5 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud a una enzima con actividad ligasa E3.

SEQ ID NO: 6 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud a una enzima con actividad ligasa E3.

SEQ ID NO: 7 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud a una enzima con actividad de asparagina sintasa.

SEQ ID NO: 8 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido que puede estar involucrado en el sistema de defensa natural de las plantas.

SEQ ID NO: 9 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud a un factor de transcripción de la familia de proteínas de unión al elemento respondedor al etileno.

SEQ ID NO: 10 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido que puede estar involucrado en el sistema de defensa natural de las plantas.

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

SEQ ID NO: 12 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido que puede estar involucrado en el sistema de defensa natural de las plantas.

10 SEQ ID NO: 13 Secuencia de ADN de *Citrus senensis* que codifica un polipéptido con similitud a una enzima con actividad transferasa.

SEQ ID NO: 14 secuencia de proteína predicha para la SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 15 secuencia de proteína predicha para la SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 16 secuencia de proteína predicha para la SEQ ID NO: 3.

15 SEQ ID NO: 17 secuencia de proteína predicha para la SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 18 secuencia de proteína predicha para la SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 19 secuencia de proteína predicha para la SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 20 secuencia de proteína predicha para la SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 21 secuencia de proteína predicha para la SEQ ID NO: 8.

20 SEQ ID NO: 22 secuencia de proteína predicha para la SEQ ID NO: 9.

SEQ ID NO: 23 secuencia de proteína predicha para la SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 24 secuencia de proteína predicha para la SEQ ID NO: 11.

SEQ ID NO: 25 secuencia de proteína predicha para la SEQ ID NO: 12.

SEQ ID NO: 26 secuencia de proteína predicha para la SEQ ID NO: 13.

25 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos de regulación del sistema de defensa natural de las plantas mediante la introducción de genes extraños / nativos en células vegetales, preferiblemente en sus genomas. Más específicamente, los procedimientos se refieren al aumento de la resistencia a enfermedades en plantas mediante la sobreexpresión de genes implicados en el sistema de defensa innato de la planta.

30 Los presentes inventores usaron bibliotecas de marcadores de secuencia expresados (MSE) en combinación con plantas de cítricos de exposición a patógenos bacterianos no virulentos y virulentos, para identificar genes implicados en la reacción de hipersensibilidad (RH) dependiente de efectores y la resistencia a enfermedades. Se encontró un total de 2.868 genes putativos que se expresaban de forma diferencial en plantas de cítricos expuestas a un patógeno no virulento, en comparación con otras a las que se ha inoculado una cepa bacteriana virulenta. Entre ellos, se seleccionaron 29 genes para analizar su potencial individual para conferir resistencia a las plantas de cítricos contra los patógenos bacterianos más frecuentes de los cítricos.

35 Los inventores encontraron que la sobreexpresión de 13 de estos genes confería a las plantas de cítricos una mayor resistencia contra *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, el agente causal del chancro de los cítricos. Estos 13 genes, como se indica en las SEQ ID NO: 1-13, están relacionados porque cada uno codifica una proteína implicada en la defensa de la planta.

40 Todos los términos técnicos utilizados en el presente documento son términos que se utilizan habitualmente en bioquímica, biología molecular y la agricultura, y un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención puede entenderlos. Esos 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, New 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 con detalle en tratados 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. Varias técnicas que utilizan PCR se describen en, por ejemplo, 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. Los pares de cebadores para PCR se pueden obtener de secuencias conocidas mediante técnicas conocidas, tal como mediante el uso de programas informáticos destinados a tal efecto, por ejemplo, Primer, Versión 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA. Los procedimientos para la síntesis química de ácidos nucleicos se tratan en, por ejemplo, Beaucage y Caruthers, Tetra. Letts. 22:1859-1862 (1981), y Matteucci y Caruthers, J. Am. Chem. Soc. 103:3185 (1981).

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

Los términos "que codifica" y "codificación" 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 la cual se puede unir una serie de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos específica para producir una enzima activa. Debido a la degeneración del código genético, ciertos cambios de bases en la secuencia de ADN no cambian la secuencia de aminoácidos de una proteína. Por tanto, se entiende que se contemplan las modificaciones en una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las proteínas de la presente invención que no afectan sustancialmente sus propiedades funcionales.

En esta descripción, "expresión" se refiere a la producción del producto proteico codificado por un gen. "Sobreexpresión" se refiere a la producción de un producto génico en organismos transgénicos que supera los niveles de producción en organismos normales o no transformados.

#### **Secuencias expresados de forma diferencial**

Los genes expresados de forma diferencial a los que se hace referencia en la presente invención se han identificado en varias especies de cítricos y se ilustran mediante plantas de naranja dulce. En el contexto de la presente invención, "ged" se refiere a un gen expresado de forma diferencial cuya sobreexpresión confiere resistencia a las plantas contra enfermedades de las plantas. Las secuencias de *ged* se exponen en "Breve descripción de las secuencias".

Los genes expresados de forma diferencial de *Citrus sinensis* a partir de ahora se denominarán *ged 1* (SEQ ID NO: 1), *ged 2* (SEQ ID NO: 2), *ged 3* (SEQ ID NO: 3), *ged 4* (SEQ ID NO: 4), *ged 5* (SEQ ID NO: 5), *ged 6* (SEQ ID NO: 6), *ged 7* (SEQ ID NO: 7), *ged 8* (SEQ ID NO: 8), *ged 9* (SEQ ID NO: 9), *ged 10* (SEQ ID NO: 10), *ged 11* (SEQ ID NO: 11), *ged 12* (SEQ ID NO: 12) y *ged 13* (SEQ ID NO: 13).

Las expresiones "identidad de secuencia" y "similitud de secuencia" se pueden determinar mediante alineación de dos secuencias peptídicas o nucleotídicas utilizando algoritmos de alineación global o local. Por tanto, las secuencias pueden denominarse "sustancialmente idénticas" o "esencialmente similares" cuando comparten al menos un 70 % de identidad de secuencia en toda su longitud, respectivamente. Las alineaciones de secuencias y las puntuaciones del porcentaje de identidad de secuencia pueden determinarse usando programas informáticos, tales como el paquete GCG Wisconsin, versión 10.3, disponible en Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, Calif. 92121-3752 USA, o EmbossWin versión 2.10.0 (usando el programa "needle"). Alternativamente el porcentaje de similitud o de identidad se puede determinar mediante la búsqueda en bases de datos, utilizando el algoritmo FASTA, BLAST, etc.

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, que codifican proteínas funcionales, en las que las proteínas tienen secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 15. Se entiende que las proteínas de la invención abarcan sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos que no alteran la función de cualquiera de las proteínas.

Debido a que muchas proteínas están codificadas por familias de genes, se espera que otros genes de cítricos podrían tener funciones similares a las de las proteínas codificadas por la SEQ ID NO: 2. Estos genes pueden identificarse y anotarse funcionalmente mediante comparación de secuencias. Un trabajador experto en la técnica puede identificar una secuencia de proteínas relacionada funcionalmente con la ayuda de procedimientos convencionales, tal como cribado de bibliotecas de ADNc o de bibliotecas genómicas con sondas de hibridación adecuadas. El experto en la materia sabe que las secuencias parálogas también se pueden aislar con la ayuda de oligonucleótidos (degenerados) y procedimientos basados en PCR.

En consecuencia, las secuencias pueden identificarse mediante los procedimientos descritos *anteriormente* y, por lo tanto, anotados funcionalmente como pertenecientes a una de las familias de GED incluidas en la presente invención. (De conformidad con el uso habitual, la cursiva indica un gen y las mayúsculas un producto codificado.) Por lo tanto, en el presente documento, la frase "*secuencia de ADN ged*" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar en condiciones rigurosas con cualquiera de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, y que codifica un polipéptido equivalente a las proteínas que tienen secuencias de aminoácidos expuestas como SEQ ID NO: 15. El término también incluye secuencias que hibridan de forma cruzada con la SEQ ID NO: 2, que tienen, preferiblemente, al menos aproximadamente una identidad del 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con los genes que se muestran en la SEQ ID NO: 2. Las secuencias de nucleótidos de la invención pueden codificar proteínas que son homólogas a los productos génicos predichos divulgados en el presente documento como SEQ ID NO: 15. La divulgación también incluye una secuencia de proteínas que es, preferiblemente, al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 15.

Como se usa en el presente documento "condiciones rigurosas" se refiere a parámetros con los que la técnica está familiarizada, tales como la hibridación en 3,5 x SSC, 1 x solución de Denhardt, tampón de fosfato de sodio 25 mM (pH 7,0), 0,5 % de SDS, y EDTA 2mM durante 18 horas a 65 °C, seguido de 4 lavados del filtro a 65 °C durante 20 minutos, en 2 x SSC, 0,1 % de SDS, y un lavado final de hasta 20 minutos en 0,5 x SSC, 0,1 % de SDS, o 0,3 x SSC y 0,1 % de SDS para una rigurosidad mayor y 0,1 x SSC, 0,1 % de SDS para una rigurosidad todavía mayor. Otras condiciones pueden sustituirse, siempre que el grado de rigurosidad sea igual al proporcionado en el presente documento, usando un lavado final de 0,5 x SSC.

En consecuencia, la presente invención comprende cualquier molécula de ácido nucleico, gen, polinucleótido, ADN, ARN, ARNm, o ADNc de una especie de planta de cítricos, o producido sintéticamente, que aumenta la resistencia a las enfermedades. El ADN o ARN pueden ser de doble cadena o de cadena sencilla. El ADN de cadena sencilla puede ser la cadena de codificación, también conocida como la cadena sentido, o puede ser la cadena no codificadora, también denominada la cadena antisentido.

Tal como se usa en el presente documento, se entiende que "*genes ged tal como* se exponen en la SEQ ID NO: 2" significa que los genes *ged* incluyen genes incluyen las secuencias expuestas en la SEQ ID NO: 2, así como moléculas de ácido nucleico que comprenden variantes de la SEQ ID NO: 2, con una o más bases delecionadas, sustituidas, insertadas, o añadidas, de modo que la variante codifica un polipéptido con la misma actividad. Por consiguiente, las secuencias que tienen "secuencias de bases con una o más bases delecionadas, sustituidas, insertadas o añadidas" retienen la actividad fisiológica, incluso cuando la secuencia de aminoácidos codificada tiene uno o más aminoácidos sustituidos, delecionados, insertados o añadidos. Debido a la degeneración del código genético, se pueden usar diferentes codones de nucleótidos que codifiquen un aminoácido particular. Una célula huésped a menudo muestra un patrón preferido de uso de codones (Campbell y col., 1990). Las secuencias de ácidos nucleicos se construyen, preferiblemente, para utilizar el patrón de uso de codones de la célula huésped concreta. Generalmente, esto mejora la expresión de la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped transformada. Las secuencias de ácido nucleico divulgadas en el presente documento usan, preferentemente, el uso óptimo de codones para células huésped bacterianas, fúngicas y vegetales. Adicionalmente, pueden existir múltiples formas de las proteínas de la presente invención, que puede deberse a la modificación postraduccional de un producto génico, o de múltiples formas de los genes *ged*. Las secuencias de nucleótidos que tienen dichas modificaciones y codifican proteínas similares se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

Por ejemplo, la cola de poliA o las regiones no traduccionales en los extremos 5' o 3', se pueden eliminar y las bases se pueden eliminar en la medida en que se eliminan aminoácidos. Las bases también pueden sustituirse siempre que no se produzca ningún desplazamiento del marco. También pueden "añadirse" bases en la medida que se añaden aminoácidos. Sin embargo, es esencial que cualquiera de estas modificaciones no den lugar a la pérdida de la actividad de la proteína. En este contexto se puede obtener un ADN modificado mediante la modificación de las secuencias de bases de ADN de la invención, de modo que los aminoácidos en sitios específicos estén sustituidos, delecionados, insertados o añadidos mediante mutagénesis específica de sitio, por ejemplo. Zoller y Smith, Nucleic Acid Res. 10: 6487-500(1982).

Una secuencia génica de *ged* puede sintetizarse *ab initio* a partir de las bases adecuadas, por ejemplo, mediante el uso de cualquier secuencia de proteína adecuada divulgada en el presente documento como guía para crear una molécula de ADN que, aunque diferente de la secuencia de ADN nativa, da lugar a la producción de proteínas con las mismas secuencias de aminoácidos o unas similares.

Molécula o moléculas "aisladas" de ácido nucleico significa una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha retirado de su entorno nativo. Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinante contenidas en una construcción de ADN se consideran aisladas para los fines de la presente invención. Otros ejemplos de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinante mantenidas en células huésped heterólogas o moléculas de ADN que están purificadas, parcial o sustancialmente, en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de RNA *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 tales moléculas producidas sintéticamente.

"Ácido nucleico exógeno" se refiere a un ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha introducido en una célula (o en el ancestro de la célula) mediante los esfuerzos de 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 fragmentos de la misma.

5 Por el contrario, "ácido nucleico endógeno" se refiere a una molécula de ácido nucleico, gen, polinucleótido, ADN, ARN, ARNm o de ADNc que está presente en el genoma de una planta u organismo que se va a modificarse genéticamente. Una secuencia endógena es "nativa" para, es decir, autóctona de, la planta u organismo que se va a modificar genéticamente.

10 "Ácido nucleico heterólogo" se refiere a un ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha introducido en una célula (o en el ancestro 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 introdujo, o fragmentos de la misma.

15 A menos que se indique lo contrario, todas las secuencias de nucleótidos determinadas mediante secuenciación de una molécula de ADN en el presente documento se determinaron usando un secuenciador de ADN automatizado, tal como el Modelo 3730 de Applied Biosystems, Inc. Por lo tanto, como se conoce en la técnica para cualquier secuencia de ADN determinada mediante este enfoque automatizado, cualquier secuencia de nucleótidos determinada en el presente documento puede contener algunos errores. Las secuencias de nucleótidos determinadas mediante automatización son, típicamente, al menos aproximadamente un 95 % idénticas, más típicamente al menos aproximadamente de un 96 % a al menos aproximadamente en 99,9 % idénticas a la secuencia de nucleótidos real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real puede determinarse más precisamente mediante otros enfoques, incluyendo procedimientos de secuenciación manual de ADN bien conocidos en la técnica. Como también se conoce en la técnica, una sola inserción o delección en una secuencia de nucleótidos determinada en comparación con la secuencia real causará un desplazamiento del marco en la traducción de la secuencia de nucleótidos de forma que la secuencia de aminoácidos predicha codificada por una secuencia de nucleótidos determinada puede ser completamente diferente de la secuencia de aminoácidos realmente codificada por la molécula de ADN secuenciada, comenzando en el punto de dicha inserción o delección.

25 Una "variante" es una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos que se desvía de la convencional, o dada, la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de un gen o proteína concreto. Los términos "isoforma", "isotipo" y "análogo/a" también se refieren a "formas variantes" de una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos. Una secuencia de aminoácidos que se altera mediante la adición, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos, o un cambio en la secuencia de nucleótidos se puede considerar una secuencia "variante". La variante puede tener cambios "conservadores", en los que un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, la sustitución de leucina por isoleucina. Una variante puede tener cambios "no conservadores", por ejemplo, la sustitución de una glicina por un triptófano. Las variaciones menores análogas también pueden incluir delecciones o inserciones, o ambas cosas., de aminoácidos. La guía para determinar qué restos de aminoácidos pueden estar sustituidos, insertados o delecionados se pueden encontrar usando programas informáticos bien conocidos en la técnica, tal como el software Vector NTI Suite (InforMax, MD). "Variante" también puede hacer referencia a un "gen barajado", tales como los descritos en las patentes asignadas a Maxygen. Por ejemplo, una variante de la presente invención puede incluir variantes de secuencias y polinucleótidos deseados que se modifican según los procedimientos y fundamentos divulgados en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.132.970.

#### **Procedimientos para sobreexpresar genes *ged***

40 En un aspecto de la invención, la resistencia a enfermedades de las plantas se incrementa mediante la sobreexpresión de un gen *ged*. En la técnica se conocen diversos procedimientos para la sobreexpresión de un gen en particular y se pueden usar en la presente invención.

45 La presente invención contempla la sobreexpresión de una secuencia de codificación de *ged*. Los polinucleótidos sentido empleados para llevar a cabo la presente invención tienen una longitud suficiente para expresar una proteína funcional en una célula vegetal. Dichos polinucleótidos pueden ser esencialmente un ácido nucleico completo genómico o complementario que codifica cualquier proteína GED incluida en la presente invención.

50 La idoneidad de los objetivos candidatos también puede evaluarse analizando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios mediante ensayos de protección de ribonucleasa como se conocen en la técnica. El ADN que codifica moléculas de ARN enzimático se pueden producir de acuerdo con técnicas conocidas. Por ejemplo, véase Cech y col., patente de Estados Unidos n.º 4.987.071; Keene y col., patente de Estados Unidos n.º 5.559.021; Donson y col., patente de Estados Unidos n.º 5.589.367; Torrence y col., patente de Estados Unidos n.º 5.583.032; Joyce, patente de Estados Unidos n.º 5.580.967; Gold y col., patente de Estados Unidos n.º 5.595.877; Wagner y col., patente de Estados Unidos n.º 5.591.601; y patente de Estados Unidos n.º 5.622.854.

55 Por ejemplo, la expresión del gen *ged* puede aumentarse a través de procedimientos de ingeniería genética que son bien conocidos en la técnica. La expresión puede aumentarse mediante la unión operativa de una secuencia promotora fuerte a cualquier secuencia de codificación de GED incluida en la presente invención. La expresión puede incrementarse aún más mediante la adición de una secuencia potenciadora a un promotor fuerte unido de forma operativa cualquier secuencia de codificación de DEG incluida en la presente invención.

"Potenciador" o "elemento potenciador" se refiere a un elemento regulador de la transcripción que actúa en cis, también denominado elemento cis, que confiere un aspecto del patrón general de expresión, pero generalmente es insuficiente por sí solo para impulsar la transcripción, de una secuencia de polinucleótidos unida operativamente. A diferencia de los promotores, los elementos potenciadores no suelen incluir un sitio de inicio de la transcripción (TSS) o una caja TATA. Un promotor puede comprender de forma natural uno o más elementos potenciadores que afectan a la transcripción de una secuencia de polinucleótidos unida operativamente. Un elemento potenciador aislado también puede fusionarse a un promotor para producir un elemento en cis del promotor quimérico que confiere un aspecto de la modulación global de la expresión génica. Un promotor o fragmento del promotor puede comprender uno o más elementos potenciadores que afectan a la transcripción de genes unidos operativamente. Se cree que muchos elementos potenciadores del promotor se unen las proteínas de unión al ADN y / o afectan a la topología del ADN, de modo que se producen conformaciones locales que permiten o restringen de forma selectiva el acceso de la ARN polimerasa al molde de ADN o que facilitan la apertura selectiva de la doble hélice en el sitio de iniciación de la transcripción. Un elemento potenciador puede funcionar uniendo los factores de transcripción que regulan la transcripción. Algunos elementos potenciadores se unen a más de un factor de transcripción y los factores de transcripción pueden interaccionar con afinidades diferentes con más de un dominio potenciador. Los elementos potenciadores pueden identificarse con una serie de técnicas, incluidos el análisis de delección, es decir, la eliminación de uno o más nucleótidos del extremo 5' o internos de un promotor; el análisis de las proteínas de unión al ADN usando la impronta de DNase I, interferencia de la metilación, ensayos de desplazamiento de movilidad en electroforesis, impronta genómica in vivo genómico mediante PCR mediada por ligación, y otros ensayos convencionales; o mediante análisis de similitud de secuencias de ADN utilizando motivos del elemento cis conocidos o elementos potenciadores como secuencia diana o motivo diana con los procedimientos de comparación de secuencias de ADN convencionales, tales como BLAST. La estructura fina de un dominio potenciador se puede estudiar adicionalmente mediante mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos o mediante otros procedimientos convencionales. Se pueden obtener elementos potenciadores mediante síntesis química o mediante aislamiento de elementos reguladores que incluyen tales elementos, y se pueden sintetizar con nucleótidos flanqueantes adicionales que contengan sitios de enzimas de restricción útiles para facilitar la manipulación de la subsecuencia. Por tanto, el diseño, la construcción y el uso de elementos potenciadores de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento para modular la expresión de moléculas de polinucleótidos transcribibles unidas operativamente están incluidos en la presente invención. En la técnica se conocen diversos potenciadores, incluyendo los potenciadores 35S de CaMV.

### **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 en una construcción de ácido nucleico que es adecuada para transformación en la planta o celular. La invención proporciona moléculas de ácido nucleico que aumentan la resistencia a las enfermedades en una planta transformada.

Las construcciones de ácidos nucleicos recombinantes se pueden preparar usando técnicas estándar. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos para la transcripción se puede obtener mediante el tratamiento de un vector que contiene dicha secuencia con enzimas de restricción para cortar el segmento adecuado. La secuencia de nucleótidos para la transcripción también puede generarse mediante hibridación y ligación de oligonucleótidos sintéticos o mediante el uso de oligonucleótidos sintéticos en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para dar sitios de restricción adecuados en cada extremo. A continuación, la secuencia de nucleótidos se clona en un vector que contiene elementos reguladores adecuados, tales como secuencias del promotor aguas arriba y del terminador aguas abajo.

Un aspecto importante de la presente invención es el uso de construcciones de ácido nucleico en las que una secuencia de codificación de GED está unida operativamente a una o más secuencias reguladoras que dirigen la expresión de la secuencia en ciertos tipos de células, órganos o tejidos sin afectar indebidamente el desarrollo normal o la fisiología.

"Promotor" indica una región de ADN aguas arriba del inicio de la transcripción que está implicada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un "promotor constitutivo" es uno que es activo durante toda la vida de la planta y en la mayoría de las condiciones ambientales. Los promotores específicos de tejido, preferidos de los tejidos, específicos del tipo de célula e inducibles constituyen la clase de los "promotores no constitutivos." "Unido operativamente" se refiere a un enlace funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en el que la secuencia promotor inicia y participa en la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ácido nucleico que se están uniendo son contiguas.

Los promotores adecuados se ilustran mediante, pero no se limitan 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 de tejidos, específico del tipo de célula inducibles. Por ejemplo, en los cítricos, diversos patógenos importantes se encuentran en el sistema vascular, que se refiere 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. Los promotores específicos del xilema o del floema son conocidos en la técnica, por ejemplo, los



divulgados en la patente de Estados Unidos n.º 6.613.960 y las publicaciones de solicitud de Estados Unidos n.º 2004/0253717 y 2007/0266457.

5 Los vectores de la invención también pueden contener secuencias de terminación, que se colocan aguas abajo de las moléculas de ácido nucleico de la invención, de modo que la transcripción del ARNm se termina y se añaden secuencias de poliA. Ejemplos de tales 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 de señal de corte y empalme y secuencias de direccionamiento a orgánulos celulares, tales como las mitocondrias y los cloroplastos.

10 Los vectores de expresión de la invención también pueden contener un marcador de selección mediante el cual las células transformadas se pueden identificar en el cultivo. El marcador puede asociarse con la molécula de ácido nucleico heterólogo, es decir, el gen unido operativamente a un promotor. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "marcador" se refiere a un gen que codifica un rasgo o un fenotipo que permite la selección o el cribado de una planta o célula que contiene el marcador. En las 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.

15 Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen resistencia a adenosina desaminasa, dihidrofolato reductasa, higromicina-B-fosfotransferasa, timidina quinasa, xantina-guanina fosforribosiltransferasa, glifosato y glufosinato, y amino-glicósido 3'-O-fosfotransferasa (resistencia a kanamicina, neomicina y G418). Estos marcadores pueden incluir la resistencia a G418, higromicina, bleomicina, kanamicina, espectinomina, y gentamicina. La construcción también puede contener el gen marcador seleccionable *ahas*, que confiere resistencia a herbicidas tales como imazetapir, imazapic, imazapir, imazamox, sulfometurón metil, imazaquin, clorimurón etilo, metsulfurón metilo, rimsulfurón, tifensulfurón metilo, piritiobac sodio, tribenurón metilo y nicosulfurón [sic: "clase de imidazolinonas"]. Sun-Mi y col., 2004, *Biochemical Journal* 383: 53-61. También se conocen otros marcadores de selección adecuados.

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

30 También se pueden incluir secuencias de replicación, de origen bacteriano o viral, para permitir que el vector se clone en un huésped bacteriano o fago. Preferiblemente, se utiliza una amplia gama de huéspedes de origen de replicación procariótico. Se puede incluir un marcador seleccionable para las bacterias para permitir la selección de células bacterianas portadoras de la construcción deseada. Los marcadores seleccionables procarióticos adecuados también incluyen resistencia a antibióticos, tales como la kanamicina o la tetraciclina.

35 Otras secuencias de ácido nucleico que codifican funciones adicionales también pueden estar presentes en el vector, como se conoce en la técnica. Por ejemplo, cuando *Agrobacterium* es el huésped, se pueden incluir secuencias de ADN-T para facilitar la posterior transferencia y la incorporación en los cromosomas de la planta.

### **Plantas para ingeniería genética**

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

40 En esta descripción, "planta" se refiere a cualquier material vegetal que contiene celulosa que puede manipularse genéticamente, incluyendo, pero no limitado a, células vegetales diferenciadas o no diferenciadas, protoplastos, plantas completas, tejidos vegetales u órganos de plantas, o cualquier componente de una planta, tal como una hoja, tallo, raíz, yema, tubérculo, fruto, rizoma o similares. Como se usa en el presente documento, "propágulo" incluye una estructura con la capacidad para dar lugar a una nueva planta, por ejemplo, una semilla, una espora, o una parte del cuerpo vegetativo capaz de un crecimiento independiente si se desprende de los padres.

45 Las plantas que pueden modificarse de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, árboles, tales como naranjas dulces, limones, mandarinas, etc. Se entiende que "planta de cítricos" significa una planta de los géneros *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Murraya*, *Microcitrus*, *Limonia* y *Eremocitrus*, preferentemente la especie *Citrus sinensis*.

50 En la presente descripción, "planta transgénica" se refiere a una planta que ha incorporado una secuencia de ADN, incluyendo, pero sin limitación a, genes que normalmente no están presentes en un genoma de la planta huésped, secuencias de ADN normalmente no transcritas a ARN o traducidas a una proteína ("expresadas"), o cualquier otro gene o secuencia de ADN que se desee introducir en la planta no transformada, tales como genes que normalmente puedan estar presentes en la planta no transformada, pero uno que se desee modificar genéticamente o que tenga alterada la expresión. La categoría "planta transgénica" incluye tanto un transformante primario como una planta que incluye un transformante en su linaje, por ejemplo, a modo de introgresión norma u otro procedimiento de reproducción.

55

"Modificado genéticamente" (MG) abarca cualquier metodología para introducir un ácido nucleico o mutación específica en un organismo huésped. Por ejemplo, una planta de cítricos se manipula genéticamente cuando se transforma con una secuencia de polinucleótidos que incrementa la expresión de un gen, tal como cualquier gen *ged* y, por lo tanto, aumenta la resistencia a las enfermedades. Por el contrario, una planta de cítricos que no se transforma con una secuencia de polinucleótidos es una planta control y se denomina planta "no transformada".

#### **Procedimientos de ingeniería genética**

Una secuencia de polinucleótidos, tal como una secuencia *ged* puede estar integrada de manera estable en el genoma de una planta de diversas formas conocidas en la técnica. Se pueden transformar células de plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas, angiospermas o plantas gimnospermas. 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, conforme a Nagel y col., *Microbiol Lett* 67: 325 (1990). Además, las plantas pueden transformarse mediante transformación en *Rhizobium*, *Sinorhizobium* o *Mesorhizobium*. Broothaerts y col., *Nature* 433:629-633 (2005). Véase la publicación de la solicitud de Estados Unidos 200702711627.

Los procedimientos adicionales para modificación por ingeniería genética de una planta o célula incluyen, pero no se limitan a, electroporación, bombardeo con pistola de partículas (Klein y col., (1987) *Nature*. 327:70-73), precipitación con fosfato de calcio y fusión de 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 emplea un marcador de selección, tal como resistencia a la kanamicina, se facilita la determinación de qué células se han transformado con éxito. Los genes marcadores pueden incluirse 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 publicada de Estados Unidos n.º 2004/0143874.

En el contexto de la presente invención, las plantas transgénicas producidas mediante el procedimiento descrito anteriormente puede usarse como fuente de un transgén en un programa de reproducción convencional. En general, el polen de una planta transgénica se utiliza 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 anteriormente.

Se seleccionan plantas modificadas genéticamente que tienen una expresión aumentada de los genes *ged*. Por ejemplo, una planta/células vegetales de cítricos transgénicas en el procedimiento de acuerdo con la invención se distinguen de las plantas de cítricos / células vegetales de tipo salvaje mediante el hecho de que comprenden al menos una copia de la molécula de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO:2 integrada de forma estable en su genoma, además de copias de una molécula tal que se produce de forma natural en las plantas/células vegetales de cítricos de tipo silvestre. En este caso, las plantas/ células vegetales de cítricos del procedimiento de acuerdo con la invención se pueden distinguir de las plantas/células vegetales de cítricos de tipo silvestre, en particular, por el hecho de que esta copia adicional o estas copias adicionales, está o están situadas en puntos en el genoma en el que no se produce, o en el que no se producen, en plantas/ células vegetales de cítricos de tipo silvestre.

"Planta de cítricos de tipo silvestre" se refiere a las plantas control cuyo genoma no se ha modificado mediante la introducción de una construcción que comprende cualquier secuencia del gen *ged*, o fragmento del mismo.

#### **Procedimientos para la cuantificación del incremento de resistencia a las enfermedades**

Las plantas y células modificadas por ingeniería genética de la invención se caracterizan por una resistencia a enfermedades mejorada. Esto se logra mediante la sobreexpresión de *genes ged*.

"Resistencia a enfermedades" o "resistencia a enfermedades aumentada/mejorada" se refiere a una mayor capacidad de los transformantes (en comparación con los transformantes control o de tipo silvestre) para resistir el ataque de uno o más patógenos de plantas, o, en otras palabras, se refiere a una reducción significativa de los síntomas de la enfermedad en transformantes en comparación con los controles no transformados (o transformados con vectores vacíos). La resistencia a enfermedades o resistencia a enfermedades mejorada se pueden determinar usando diversos procedimientos. A menudo, los síntomas de la enfermedad se puntúan visualmente (mediante bioensayos o en el campo) a través de la evaluación de los síntomas de la enfermedad en uno o más puntos de tiempo después de la inoculación o el contacto con un patógeno. Los procedimientos alternativos incluyen procedimientos en los que se detecta el patógeno y, opcionalmente, se cuantifica. Por tanto, una planta transgénica puede mostrar de este modo una mayor resistencia a las enfermedades si la cantidad de patógeno detectada en / sobre el tejido es significativamente menor en comparación con los controles, o si la propagación de patógenos es significativamente más lenta que en los controles. En última instancia, un aumento significativo del rendimiento promedio de transformantes (por ejemplo, al menos 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 medida indirecta de una resistencia a enfermedades mejorada.

Por lo tanto, una pluralidad de plantas transformadas que expresan proteínas DEG (o una proteína DEG constitutivamente activa) muestran una resistencia a las enfermedades mejorada si muestran una reducción significativa de los síntomas de la enfermedad, en comparación con los controles no transformados o transformados con el vector vacío. Se requiere un análisis estadístico para determinar si existen diferencias significativas. Preferiblemente, uno o más síntomas de la enfermedad son, de media, al menos, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, o incluso 100 % menor en los transformantes de DEG que en las plantas control. Como el ensayo de la enfermedad es diferente para cada combinación huésped-patógeno, no se puede proporcionar ningún protocolo específico, pero el experto en la técnica sabe cómo determinar si los transformantes muestran una resistencia a las enfermedades significativamente mejorada a uno o más patógenos. Los bioensayos, tal como se conoce en la técnica, para cada combinación de planta-patógeno se pueden utilizar para comparar la resistencia de las plantas transgénicas con la de los controles adecuados.

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

Los patógenos de cítricos incluyen, por ejemplo, las siguientes especies bacterianas, fúngicas y virus (no limitantes): *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* (bacteria), *Pseudomonas syringae* (bacteria), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (bacteria), *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), *Lasiodiplodia theobromae* (hongo), *Botryodiplodia theobromae* (hongo), *Diplodia natalensis* (hongo), *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), *Erythriscium 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), *Lasiodiplodia theobromae* (hongo), *Hendersonula toruloidea* (hongo), *Elsinoë 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), *Elsinoë 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 de Satsuma, virus de la hoja rugosa de los cítricos, virus del mosaico amarillo de los cítricos, virus de la hoja arrugada, virus de la variegación de los cítricos (CVV), virus del enanismo Satsuma (SDV), virus de la tristeza foliar 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, viroide 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 no específica de las plantas, se podría esperar que los genes son eficaces contra otros patógenos bacterianos.

También es una realización generar plantas transgénicas que expresan diversas proteínas DEG, preferiblemente bajo el control de diferentes promotores, tales como diferentes promotores específicos de tejido.

El fenotipo de resistencia a la enfermedad puede ajustarse de forma fina mediante la expresión de una cantidad adecuada de proteínas DEG en un momento y lugar adecuados. Tal ajuste adecuado se puede realizar determinando el promotor más adecuado para una combinación particular huésped-patógeno y también mediante la selección de "acontecimientos" transgénicos que muestran 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 patógenos puede ser insuficiente para mejorar los niveles de resistencia a enfermedades. Por otro lado, un nivel demasiado alto de proteínas o la expresión en momentos y lugares desprovistos de ataque de patógenos pueden dar lugar a fenotipos agrónomicamente indeseables, tales como lesiones en las hojas o los frutos en ausencia de patógenos y penalizaciones de rendimiento. Sin embargo, el experto en la técnica puede generar fácilmente plantas que tengan resistencia a enfermedades mejorada, pero que al mismo tiempo sean agrónomicamente aceptables. Los alelos de *ged* óptimos pueden aislarse o identificarse como se ha descrito, por ejemplo, alelos que proporcionen niveles altos de resistencia, y solo un débil fenotipo de RH.

Los transformantes que expresan niveles deseados de proteínas DEG se seleccionan por ejemplo, mediante el análisis del número de copias (transferencia Southern), los niveles de transcripción de ARNm (por ejemplo, RT-PCR utilizando pares de cebadores específicos para *ged* o cebadores flanqueantes) o mediante el análisis de la presencia y el nivel de proteínas DEG en diversos tejidos (por ejemplo, SDS-PAGE; ensayos de ELISA, etc). Por razones de regulación, preferentemente se seleccionan los transformantes de una sola copia y se analizan las secuencias que flanquean el sitio de inserción del gen quimérico, preferiblemente secuenciado para caracterizar el "acontecimiento." Los acontecimientos transgénicos que expresan DEG a niveles altos o moderados se seleccionan para su análisis adicional hasta que se obtiene un acontecimiento de élite de alto rendimiento con un transgén *ged* estable.

Los transformantes que expresan uno o más genes *deg* de acuerdo con la invención también puede comprender otros transgenes, tales como otros genes que confieren resistencia a enfermedades o que confieren tolerancia a otras tensiones bióticas y / o abióticas. Para obtener plantas con transgenes "apilados", otros transgenes se pueden introducir en los transformantes DEG, o los transformantes DEG pueden transformarse posteriormente con uno o más de otros genes, o, como alternativa, se pueden usar varios genes quiméricos para transformar una línea o variedad de planta. Por ejemplo, varios genes quiméricos pueden estar presentes en un único vector, o pueden estar presentes en diferentes vectores que se cotransforman. Los acontecimientos individuales que contienen uno o más genes *deg* pueden criarse con otros acontecimientos que contienen una o más de otros genes *ged* para obtener un acontecimiento apilado con varios genes *ged*.

En una realización, los siguientes genes se combinan con uno o más genes *deg* de acuerdo con la invención: genes de resistencia a enfermedades conocidos, especialmente genes que confieren una mayor resistencia a patógenos necrotrofos, genes de resistencia a virus, genes de resistencia a insectos, genes de resistencia a estrés abiótico (por ejemplo, tolerancia a la sequía, 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 más amplia al estrés biótico y / o abiótico, resistencia a patógenos, resistencia a insectos, resistencia a los nematodos, salinidad, estrés por frío, estrés por calor, estrés hídrico, etc. Asimismo, los abordajes de silenciamiento de *ged* se pueden combinar con abordajes de expresión de *ged* en una sola planta. Por ejemplo, la sobreexpresión de *deg* en rizomas o vástagos puede conferir o mejorar la resistencia del rizoma o el vástago a los patógenos del suelo, patógenos vasculares o patógenos foliares.

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

En el presente documento se abarcan plantas enteras, semillas, células, tejidos y descendencia (tales como híbridos F1, semillas F2 / plantas, etc.) de cualquiera de las plantas transformadas descritas anteriormente y se pueden identificar por la presencia del transgén en el ADN, por ejemplo mediante análisis de PCR utilizando ADN genómico total como molde y pares de cebadores de PCR específicos de *ged*. Asimismo, se pueden desarrollar procedimientos de PCR "específicos del acontecimiento", en los que los cebadores de PCR se basan en el ADN de la planta que flanquea el gen quimérico insertado, véase la patente de Estados Unidos n.º 6.563.026. Del mismo modo, se pueden desarrollar huellas de AFLP o huellas de RFLP específicas de acontecimientos que identifican la planta transgénica o cualquier planta, semilla, tejido o células derivadas de la misma.

Se entiende que las plantas transgénicas de acuerdo con la invención, preferiblemente, no muestran fenotipos no deseados, tales como reducción del rendimiento, susceptibilidad aumentada a las enfermedades (especialmente a necrotrofos) o cambios en la arquitectura no deseados (enanismo, deformaciones), etc., y que, si tales fenotipos se observan en los transformantes primarios, estos pueden eliminarse mediante procedimientos de cultivo y selección normales (cruce / retrocruzamiento / autofecundación, etc.). Cualquiera de las plantas transgénicas descritas en el presente documento pueden ser homocigotas o hemicigotas para el transgén.

A continuación se presentan ejemplos específicos de procedimientos para la obtención de genes *ged*, así como procedimientos para la introducción del gen diana en cítricos para producir transformantes de plantas. Los ejemplos no cubiertos por el alcance de las reivindicaciones son para fines ilustrativos.

### Ejemplo 1

#### Identificación genes *ged* de cítricos

En plantas de naranja dulce se inocularon, mediante infiltración, una suspensión bacteriana de  $10^8$  UFC / ml de *Xanthomonas axonopodis* pv citri, agente causal del chancro cítrico. En un experimento paralelo, en hojas de la misma variedad se inoculó una suspensión bacteriana de  $10^8$  UFC / ml de *Xanthomonas axonopodis* aurantifolii pv que se sabe que producen una RH en plantas de naranja dulce. Se construyó un total de cuatro bibliotecas de ADNc de tejido foliar 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 se ensamblaron grupos utilizando el software CAP3 (Huang, X. y Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res., 9, 868-877). La supuesta identidad de cada secuencia clúster se determinó por comparación con bases de datos públicas utilizando el algoritmo BLAST (Altschul

y col., 1997, Nucleic Acid Res. 25:3389-3402).

La expresión diferencial se determinó mediante el cálculo de la abundancia relativa de EST de un clúster 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 debió a un acontecimiento 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 enfermedades (RH), varios genes mostraron niveles de expresión significativamente más altos en comparación con el tejido enfermo (Figura 1). Entre ellos, se seleccionó un total de 13 genes (SEQ ID NO: 1-13) como posibles candidatos para conferir resistencia a enfermedades en plantas de cítricos (Figura 2).

## Ejemplo 2

### Construcción de vector

El ORF (marco de lectura abierto) de cada gen candidato (SEQ ID NO: 1-13) se amplificó mediante PCR usando cebadores específicos para los extremos 5' y 3' de cada gen. Cada secuencia de cebador se modificó para incluir las secuencias específicas requeridas por el sistema de clonación GATEWAY™ (Invitrogen). Los productos de amplificación se clonaron primero en el vector pENTR/TEV/D-TOPO® (Invitrogen) mediante recombinación y su secuencia se confirmó mediante resecuenciación de todo el inserto. Después de la confirmación de la secuencia, los genes candidatos se transfirieron al plásmido pAH35GW mediante recombinación, lo que da como resultado la construcción genética pr35S(2x)-CaMV::ahas::35SpolyA | pr35S-CaMV::deg::NOSpolyA (Figura 3). La secuencia de las construcciones resultantes se confirmó mediante resecuenciación de toda la región de TDNA. Los vectores completamente validados se utilizaron para la transformación de cítricos.

## Ejemplo 3

### Transformación de cítricos

Las semillas de plantas de naranja dulce cv. Pineapple se germinaron en ausencia de luz durante 30 días. Se cortaron epicótilos de plántulas etioladas y se infectaron con *Agrobacterium tumefaciens* portadores cada uno de los genes candidatos (SEQ ID NO: 1-13) en una construcción. Aproximadamente 40 días después de la transformación, las plantas regeneradas se individualizaron y se injertaron por la parte superior sobre plántulas de rizomas. Las plantas injertadas se mantuvieron en condiciones de laboratorio durante aproximadamente 2 meses, cuando se transfirieron a condiciones de invernadero. Antes de iniciar el periodo de aclimatación, las plantas se injertaron de nuevo sobre plantas de rizoma bien desarrollado cultivadas en condiciones de invernadero. Se permitió que aclimatación y el desarrollo del esqueje durara 70 días, tiempo tras el cual se transfirió a bloques de plantas madre.

## Ejemplo 4

### Resistencia a enfermedades mejorada en plantas de cítricos portadoras de las construcciones pr35S-CaMV::deg::NOSpolyA

Para evaluar el efecto de aumentar la expresión de los genes *ged* en plantas de cítricos transgénicas, un total de 5 hojas se separaron de cada uno de 25 acontecimientos transgénicos independientes para cada una de las construcciones transformadas en plantas de cítricos y 3 plantas de tipo silvestre 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 5µl de una suspensión bacteriana de 10<sup>6</sup> UFC / ml. Las hojas inoculadas se incubaron en cámaras de humedad individuales y se evaluaron diariamente durante 15 días. Las lesiones del chancro se puntuaron usando una escala esquemática de propiedad (Figura 4). Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de Dunnett para la comparación de todas las mediciones con el paquete de software R de versión 2.6.2.

Durante el curso de los experimentos, varios acontecimientos pr35S-CaMV::deg::NOSpolyA exhibieron un desarrollo reducido del chancro en comparación con las hojas control. Después de 15 días de incubación, los resultados indicaron que algunos de los acontecimientos transgénicos exhibieron una reducción significativa de la gravedad de los síntomas del chancro en comparación con las plantas control (Figura 5). Todos juntos, la sobreexpresión de genes *ged* parece causar, en diversos grados, cambios en el sistema de defensa de la planta que conducen a una mayor resistencia a las enfermedades.

## Ejemplo 5

### Tasa de crecimiento diferencial de la bacteria del chancro de los cítricos en plantas de cítricos portadoras de las construcciones CaMV::deg::NOSpolyA

Con el fin de determinar el efecto directo de la expresión de genes *ged* en plantas transgénicas de cítricos sobre el crecimiento de las poblaciones de bacterias patógenas, se separó un total de 3 hojas de los mejores

acontecimientos transgénicos identificados mediante el ensayo *in vitro* descrito antes y a partir de 3 plantas de tipo salvaje no transgénicas de la variedad "Pineapple" de naranja dulce. En resumen, cada hoja se perforó 6 veces usando una aguja y cada agujero se puso inmediatamente en contacto con 5µl de una suspensión bacteriana de 105 UFC / ml. Las hojas inoculadas se incubaron en cámaras de humedad individuales y se evaluaron 0 y 5 días después de la inoculación. Para cada evaluación, 3 discos de hojas de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> se cortaron directamente desde 3 puntos de inoculación. Cada discos individuales se molió en nitrógeno líquido y se usó para la extracción de ADN total utilizando el kit de purificación de ADN Wizard<sup>®</sup> Genomic (Promega). El ADN de cada extracción individual se usó para la enumeración de bacterias usando qPCR (Cubero & Graham, 2005, *Phytopathology* 95: 1333-1340). La tasa de crecimiento bacteriano se calculó mediante la comparación de poblaciones de bacterias 0 y 5 días después de la inoculación. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de Dunnett para la comparación de todas las mediciones con el paquete de software R de versión 2.6.2

Los resultados indicaron una reducción significativa de la tasa de crecimiento de la bacteria del chancro de los cítricos cuando los genes *ged* se sobreexpresaron en el tejido de los cítricos (Figura 6). Estos resultados también confirmaron las observaciones realizadas por los mismos acontecimientos con respecto a la reducción significativa de la gravedad de la enfermedad (Figuras 5 y 6).

### Ejemplo 6

#### Niveles de expresión de transgenes en acontecimientos seleccionados portadores de las construcciones pr35S-CaMV::deg::NOSpolyA

Con el fin de examinar la correlación entre el nivel de expresión de los transgenes y de la respuesta de los diferentes acontecimientos al patógeno del chancro de los cítricos, se seleccionó un grupo de acontecimientos transgénicos para la cuantificación de los niveles de transcripción mediante qRT-PCR. En resumen, el ARN total se extrajo de de hojas de cítricos jóvenes utilizando el sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega, Madison, WI) según 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<sup>™</sup> Reverse Transcriptase System (Promega) según las instrucciones del fabricante en un volumen de reacción final de 20 µl. Para RT-PCR, se añadieron 5 µl de ADNc a 12,5 µl de SYBR Green Mix Master (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante para lograr un volumen de reacción final de 25 µl. La RT-PCR se realizó utilizando un sistema ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 (Applied Biosystems). El protocolo de 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 el sistema de detección ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Cada muestra de hoja se analizó para cada gen un mínimo de dos veces por separado.

Los resultados indicaron una variación significativa en el nivel de expresión de los transgenes entre acontecimientos seleccionados. Sin embargo, se observó una correlación significativa entre el nivel de expresión de un transgén dado (Figura 7) y la capacidad del acontecimiento correspondiente para limitar la tasa de crecimiento de la bacteria (Figura 6), que, en consecuencia, redujo la gravedad de las lesiones de chancro (Figura 5).

La planta transgénica, como se ha definido anteriormente, en la que el polipéptido está codificado por una secuencia de nucleótidos expuesta en las SEQ ID NO: 1-13.

Una descendencia, fruto o semilla de la planta como se ha definido anteriormente, que comprende dicha secuencia de nucleótidos.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ALELLYX APPLIED GENOMICS

45 <120> GENES Y PROCEDIMIENTOS PARA INCREMENTAR LA RESISTENCIA A ENFERMEDADES EN PLANTAS

<130> 139040ep

50 <150> EP09742466.7  
<151> 08-05-2009

<150> PCT/IB2009/005842  
<151> 08-05-2009

55 <150> US61/051.459  
<151> 08-05-2008

<160> 27

ES 2 584 325 T3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 378

5 <212> ADN

<213> *Citrus sinensis*

<400> 1

atgggttcca aattgttctt tcttttaggc cttttaatgg ccattgctct tcttatctct	60
tccgaggtag cagccagaga cctggccgag acttccattg atcacaacga aaaggctgat	120
aaggccacag agacacatga aattgaggac ggtcgcggcg gatacggcgg cgggtggtggg	180
ggctatggcg gtggtggggg ctatggcggg ggtggggggc atggcggggg ccattggtggt	240
ggccatggcg gtggccatgg cgggtggccac tgcccctacg gttgctgtgg acgtggttat	300
tatggaagag gctgcaggtg ctgcacttac gctggtgagg ctggtgatac tgagcctgaa	360
accgagcctc aaaactga	378

10

<210> 2

<211> 1008

15 <212> ADN

<213> *Citrus sinensis*

<400> 2

atgggtacga aagctgtctt ctgtctttta gctttgcttt ccttctcagc tgtgtctctg	60
aggtctgctt tggcagaaaa tgaagaggac ccaggtcttg ttatgaattt ttacaaggat	120
acatgccctc aggccgagga cattatcaag gaacaagtta agcttctgta caagcggcac	180
aagaacactg cattttcttg gcttagaaac attttccatg actgtgctgt ccagtcttgt	240
gatgcttcac tgcttctgga ctcgacaaga aagacctgt ctgagaagga aatggacagg	300
agctttggta tgaggaactt caggtacatt gagaacatca aagaagctgt tgaaagagag	360
tgccctggtg ttgtttcctg tgctgatatt ctgtcctgt ccggtagaga tggcgttgtt	420
gcgcttgag gcccttacat tcctctcaag acaggaagaa gagatggtag aaaaagcaga	480
gcagagatac ttgagcagta tctcccagat cacaatgaca gcatgtctgt tgttcttgag	540
aggtttgag ccattggcat tgacgccctt ggacttgttg ctctgctagg atctcacagt	600
gttggcagaa ctattgtgt gaagctggtg caccgtctgt acccagaagt tgaccctgca	660
ctgaaccctg accacgttcc gcatatgctc cataagtgtc ctgatgcaat ccagacccc	720
aaggctgttc agtatgtgag gaatgacogt ggcacacca tgggtgctgga caacaactac	780
tataggaaca tattggacag caagggcttg atgatggttg atcatcagct agccaccgac	840
aagaggacaa gaccttatgt taagaagatg gccaaagatc aagactactt ctcaaggaa	900
ttttcaagag ccattactat cctttctgag aacaaccctc tcaccggtac aaagggtgag	960
atcagaaagg tttgcaatct tgccaacaag ctccacgaca agtctctag	1008

20

ES 2 584 325 T3

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

5

<400> 3

```

atgaagctgg ccttagttac gttccttctc gtttcgcttg tcttcacctc cactttcttt      60
gaggtctcaa tggctggttc agatttctgc gactcaaagt gtgcggtgag gtgctcaaaa      120
gcaggaaggg aagacaggtg cctgaagtac tgtggaatth gctgtgacaa gtgccattgt      180
gttccatctg ggacttacgg gcacaaggac gagtgcctth gctacagggg cctcaagaac      240
tccaagggca aacctaagtg tctttaa                                           267
    
```

10

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

15

<400> 4

```

atggactcag catcgtcagc aacagctgct gctgcaatth ttaatgagag agagtcaatg      60
gtggatccat ttttggttga ggctctccag aatcctcgtc atcgtctcac cattctgcgt      120
atggaacttg atattcagag gtttttgcaa aatcctgatc agcagcattt cgagttccaa      180
cattttccta cttcttatct ccgactggct gcacaccgtg tttctcaaca ttatgggcta      240
gtaactatgg ttcaggaaaa tggcatagaa gggctgggta acaggattht ggtgaggaaa      300
acagcagaaa gcaaatatcc tgctgtccgt ttatctgaga ttcttgctaa gcagtcggaa      360
gaaagtgata agcttgaaaa gattaaaatt gccatcaggc gtaggoccaa tgctggatgt      420
gttaatggag caaatgaaac tgggacgaaa cgaagtcttg ttagaagtgt ggaagagagg      480
aaggaggagt atgatcgagc acgtgcccgc atctttagtg gtcctagcag tcttaactca      540
gaggatacgc ttactcaggt ctctacagat atgaaaaata ttggctttaa ccgagatgag      600

agggaaattg tcaggaactc cttactgat gcagaaaaga ttattagtat cagagacggt      660
gctggtttgt ctogagttgc cattttcaga gacagggaga aggatcgtac tgatccagat      720
tatgatcgga gttatgaaag gtatgtcagg agccttccaa ctaatcaagg ctthtagcttg      780
ccacctttta atatgcagaa agttcaactt ccatttatgc agtacgatac tggttttccc      840
caattcagtc agatcccaag gactcaagct tccctcagtt tcaggcctcc gtcaagccca      900
gttatgagcc cttattgtgc agtgggaccg aatcagacat ctgtggaagc tgcatatatg      960
caatggccaa gtgctgcaat gatgtatgct cattcgtatg agcagtttag acaagctgct      1020
ttccaggttc cattctgtca gcaacctctg agctttgatt actctcaaaa cactcatag      1080
    
```

20

<210> 5  
 <211> 1014



ES 2 584 325 T3

<212> ADN  
 <213> *Citrus sinensis*

<400> 5

5

```

atgggcaatt cggagaaaga ttcgacgtcg aagtcaatta acgagacggg gaacgggtcc      60
caccagttca cggtaaaagg ttactocotg gcgaagggaa tgggcctgg caagtgctta      120
tcgagcgacg tttttaccgt gggcggttac gattgggcga tttactttta ccccgacggc      180
aagaaccogg aagatggggc tttgtatggt tcggtgttta ttgcgttggc gagtgaagga      240
acggacgtga gggcgctggt tgagttaact ttggttgacc aaagtgggaa aggaaagcat      300
aaagttcata gtcattttga tcgagcggtta gagagtggcc cgtacacctt gaagtatcgt      360
ggaagcatgt ggggctataa gcgcttcttt aaaagaacat ctctggagac ttctgattat      420
attaaggatg attgtcttct catcaactgc actggtggag ttgtagaaa cgccttgag      480
ggaccaaaac agtattocat accagtgcca ccgtcagaca tgggccaggg tcttaaggat      540
ttgotagagt ctgaaattgg atgtgacata gtttttgagg ttggtgatga aacatttaa      600
gctcataaac tgatacttgc tgctogctct 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 gtcccagct taaggctatc      960
tgcttgaagt ttgctgcaac tccggcgaat ttgggaggtg cgtgttggtc gtag      1014
    
```

<210> 6  
 <211> 1029  
 <212> ADN  
 <213> *Citrus sinensis*

10

<400> 6

ES 2 584 325 T3

```

atgaaaatgg aatcttccga gttaataccg agtctccctg aagagctcag cctcgagtgc      60
ttaaccggcc tcccttactc cacccatcgc ctgcctccg ctgtctgccg gcggtgggoc      120
caactccttc aaagccaaga cttttactac caaagaaaaa attctgggca caccacaaa      180
gttgcggtgct tagttcaagc tgaaaaagaa tcagacggtg gcaaaaaacc aggcgagtca      240
cogagttatc gactcagcgt gttcgaccgg gtcggtgccg tatgggacag gattgaccoc      300
gtaccocgggt atccaaatgg gttgccgctc tttgtcagt tggcggggtg caagggcaag      360
cttgtggtga tgggcgggtg ggaccocgat agttacaacc cggtcaccga cgttttcgtg      420
tacgatttcg ggatgocggag gtggocgaaa gggaaggatt tgccggocgaa gatgtocgtt      480
ttocgggtgtg gatctgcgga gggtcgggtc tatggtgcgg gcgggcacga tcagaataag      540
aacgcgctga ggacggggtg ggtctatgat ttgaggcggg acgagtgagag tgagttgact      600
cagttgagtc aagagcagaa cgaatgtgag ggggtggtga taggggatga gttttgggta      660
attagcgggt ataacaccga gaatcaaggg gctttcgatg gaagcgcoga cgcttacggg      720
ttocgatccg gtcaatggaa gcgggtggaa gggatttggg aggctggtcg gtgcccagaa      780
tccaacggtg ggggtggcaa agatgggagg atatttagtt ggtccgagct agactccgtt      840
gtacggggccg ggttatgcgg ggtagcgttg ggcgatcggg ttctgggtcac cgggtcggag      900
taccaaggag ctccaagtgg gttttatctg gcgaaattg ggaagggca aaagtgaaa      960
ttggagaaaa tcaatgtgcc cgatgaattt tctggggttg ttcaatctgg ttgctgcgtt     1020
gagatctaa                                     1029

```

<210> 7  
<211> 690  
<212> ADN  
<213> *Citrus sinensis*  
<400> 7

5

ES 2 584 325 T3

atggtgggag tgttcagcag cgcgatcgtt tcacctccag aggagctggt ggcggccgga 60  
 agccggactc cgtcgccgaa gaccacatcg acggcactgg tcgaccgttt cctccaggcc 120  
 aactcgtctg ctgtgtccgt acaggtcggg gacaacgtca cctcgcgta cactcatcag 180  
 aacgagtctc ctttacggca aagatcattt gctgtgaaag atgagatctt ctgcttgttt 240  
 gagggagcac ttgataactt gggaagcctg aggcagcaat atggactagc taagtccgca 300  
 aatgaagtga tcttggtgat tgaggcatac aaggctctgc gtgatcgggc cccttaccoca 360  
 ccgaaccatg tcgttggcca ccttagtggg tactttgcct tcattgtcta cgacaagtcc 420  
 acctccacct tgtttgtggc ttctgaccaa tttggtaagg ttctcttta ttggggaatc 480  
 actgctgatg gacatgttgc ctttgcctgat gatgctgact tgctcaaagg tgcttgccgc 540  
 aagtcacttg cttctttccc tcaaggttgt ttcttctcaa cagcagttgg aggactgaga 600  
 agctttgaga atccaaagaa caagatcact gcagttcctg ctgcggaaga agagatctgg 660  
 ggtgctacat ttaaggtaat gtcatttga 690

5 <210> 8  
 <211> 486  
 <212> ADN  
 <213> *Citrus sinensis*  
 <400> 8

atgaaccgct gcgccgttat gggattggga ggaggctgtg atgaagagag gaggatgggt 60  
 tcaatgattt gccctaagcc aaggagatta ggcctcataa atcctccgat taacgattcc 120  
 attagacatt tgaaaaggcc agctagtgag tttggagatt caaaagctgg gactgaactt 180  
 ctggatttaa ttctaccaa gggaggctac ggtacagaaa agactggcaa ccaagtggcg 240  
 tcgtcgccac cttatttctc cggatctcca coactcgaggg cttcaaatcc totaatacag 300  
 gatgoccaat toggcaatga gaagtcagcc ccgctcactg cagcacccgc atctccgtcc 360  
 tocgggatgg gaggcggcgg atgcgtgagg gtgaaattcg ggcacaagcc tgctgcggtg 420  
 agaattgaag ggtttgattg tctcagccga gatcgccgca attgcagcat ctctgctgtg 480  
 gcttaa 486

10  
 15 <210> 9  
 <211> 762  
 <212> ADN  
 <213> *Citrus sinensis*  
 <400> 9

ES 2 584 325 T3

atgtgtggcg gtgcacttat tgctgattat gatgaagtcg ggccggtcag ggcgagcgcg 60  
aaattgacct cagaggatct ctggctcagag ttgggttcca tttccgacct cttgggcttg 120  
gactacaatg gcaaatccca ccctaagcaa cctctcaaag tgaaaaatga gaaggctgaa 180  
gattcaagca ataaagctgc tcgtggtgag gggaaggaga agaagactca gcgagttcgc 240  
aagaacgtgt acagaggaat acggcagagg ccgtggggaa aatgggcagc tgaaattaga 300  
gacccttaca agggcgtccg cgtttggctc ggcactttca acacagccga agaagccgca 360  
agagcttatg atgaagccgc caagcgtatc cgcggogaca aggccaagct caacttcgct 420  
cagccgcccgc cgccaatagc tccaccccca gctaagaaac gctgcatgcc atcccctgag 480  
ttgactcagc cgagatttga aaccatcgga accccaccgg ctccggcgcc gtcccctggg 540  
gtgggggttg ggtatcagaa tgagttttat caaccaggg cagtagacga cgagtttgag 600  
ctgagccagc aaatttcgag cttggaatcg tttttgggat tggagccatt aatgagtcag 660  
ccgagtggaa acggtgctgg tgggtatgac tcgggtgact tttggatgct tgatgacgtg 720  
gcgccgactc agcagctgaa cagcaatcag ttcttgtgtt ag 762

<210> 10  
<211> 747  
<212> ADN  
<213> *Citrus sinensis*

5

<400> 10

atgcaactct caacaaactt cacagcttca ccatttcgat cccaaaacca tctcttcaac 60  
aatctcagtc ccacttcttt tctccacaaa tcaactgttc tttcaagacc caccaaaacc 120  
ctocaaaatc tgctcttttc aaaccccaaa tcatcacaaa aaaagttact tagaacttca 180  
acaattaatg cctctttgct tgaagctcca ctcttggtgg ctggtagact ttgcgtttac 240  
tatgcctctt tgaaagctgg cttagctgga tctcaageta atcctctcgt ctctgatttg 300  
gaaagtggtg gtgtcactgg tagtgaaggt gctgatttgg ggttctctaa atggttagaa 360  
aacataaaag ggaagccaga caaggaagcg gctgacaaaa ggaaattggt gagcaaatgg 420  
catcctacaa caaagggaac actgagacgg aattacaggg tgccctocaa atctgaaggg 480  
cgcagacttc ttaaagccat tgctcgttg ctgtctgatg atgatcactt cacggatgcc 540  
acttcccaca agggttgtca aattaggagg gagaatgttc acggtgaate tgtctgctgc 600  
aataacgtta gggctctctt tgatgagctt ccaactcctc acttggttgt ggaaatcaca 660  
ccttttccag ccggacctct aaccgaaaag gattacgtca aggctgagaa actagagagg 720  
gtactgaggt cgggcccttc tatttga 747

10

<210> 11  
<211> 1650  
<212> ADN  
<213> *Citrus sinensis*

15

ES 2 584 325 T3

<400> 11

```

atggaagaaa accaatcagt tgctacactc atggactcta caacatccaa gattcaacaa      60
cttcagaaaag catttgctga acttgaaagt cacagggcca taacccttaa tttgagatgg      120
aaggaacttg aagaacactt ccatgggctt gagaagtcc taaagcgaag gtttcatgaa      180
ctggaagacc aagaaaagga gtttgaaact aaaacaagga aagcccgta aatottgcag      240
aagcgggagg ctgctgtttt ggccaaggaa caaactactc tggagaagct ccagaagaag      300
agagatgctg ctgtctttgc catttcaact gctctagaga aacagaggaa ggtatcatct      360
gcagagcctg ccattgttag caatgttgat gaaagcaggg caccacctgt tgaggacaaa      420
ctgcctgatt caatgtctct tgaaaataac ttagaaagca gcaaaaaatc gtctgagagt      480
gaaaacatgg agctgaaggc ttatcccaa ttatttaac tatgtgaaga gatgaactca      540
gaaggcttgc acaaatttat atcagacaat cgtaagaacc ttgctgtcct aaaggaagaa      600
attcctcttg cgctgaaggc tgctgcagac ccagcctgtt tggatttga ttctctagaa      660
ggtttttacc acatggaagt gtcaaatgtg gatggaaaga aagattcaag cttattgggt      720

ctccgcagaa cctgtattat gttgatggaa tgccttagca tttgttagc aaatctcaat      780
ctgaatactc ttactgctgt tatctcacia ggtgtaaagg agcaggcaaa ggcaattgcc      840
gaagagtgga aaccaaagt ttgataccctt gatgtggatg atagcaatgg gaactccttg      900
gaggctcatg ctttctaca acttctggca acgttttcta ttgcttctga ctttaatgag      960
gaagaattat caaggcta atccaatggtc tctcgtcgtc gccaaacacc tgatttatgt      1020
cgctcccttg ggttgcaga aaaaatgcc ggtgtcattg aagtctggt gaatagtgga      1080
aggcaattg atgcagtaa cctagctttt gcatttgagc ttactgagca gttctctcct      1140
gtgcctttac tgaagtcta cttgaaggag gcaaaaagg cttcttccac tgtcaaggct      1200
ggaaacatgt ctccctctgc cgagaatgag gtcaatgatc gagagctgag tgccctgaaa      1260
gctgtgatca aatgcattga agagcataac cttgaggagc agtatcccat agatcctctc      1320
caaaagcgaa ttctccagct agagaaggcc aaggccgaaa agaaaagggc aactgaagtt      1380
gccaaagccg aaccaaagag accccgtgcc aatggtgctg gatacgggcc togagtcact      1440
aatggtgctg ctgacaaggc attctatcct agagttgccg ataggtatcc ccaatatgtg      1500
tatgacagac cctatgttta cacoggacct gctgacaacc acggccctc tcttctgggt      1560
totgctactt acagctctc tccaatcat ggcaactact ttggaaatgg ctaccagtac      1620
caagctgtcc aagccccta tcttcaacta      1650

```

5

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

10

<400> 12

ES 2 584 325 T3

```
atgacttgta tcattaactc cactcaatct ttagtcttgg caactgccat ggtcgtctcc      60
agcactgtcc tctttcttgc tttctccaag caaaaaaatg attctaaaga accccaagag      120
gaaaccctac gttcttgott 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
```

5

```
<210> 13
<211> 1302
<212> ADN
<213> Citrus sinensis

<400> 13
```

ES 2 584 325 T3

atggaaacaa ttcacgtaaa agagtcaaca ataatacggc ctgctcaaga aacccccaga 60  
cattgcctac ggttgagtga tttagacctg ctgattccgg aaattcacat cccctgtgtg 120  
tatttctacc ggcggccaaa ttatccttgc aatttcttag aagggtggtt actgaaggag 180  
gctttgagta aagttcttgt cccgttttac ccoctggccg gaagattggg taaagatgaa 240  
aatggcagaa ttgaaataaa atgtaacgga gagggagttt tatttattga agctgaaacg 300  
agttgtgtcg ctgatgattt tgggtgacttt gaatcaagct tcaagctcgt gcaacttgtt 360  
ccacaggttg atcgcacgaa agatgcatat tttcatccac ttattatggc acaggttaact 420  
cattttaagt atggaggagt ttctcttggc cttatgatgc atcatatgcc aatggacgga 480  
actacggcat atcacttcat caactcatgg gctgagatgg cgcgtggcat tcctattagc 540  
gttccaccaa tctttgatcg aactatacta gatgttggag tcccaacttc tccatcattt 600  
caccacatcg aatacgatcc cctccttcc atgaatactc ctactcaaaa tcctcaagcc 660  
atttccaatg caatcctgaa gttatcacct gatcaaatga acatccttaa agaaaaatct 720  
aagggagatc acggatccac tgtcaagtat actagatttg agattgtagc agcacatata 780  
tggcgctgcg catgtaaagc acgagggttg tctgtcgate aagctaccaa gtagagatt 840  
cccacatctg ggcgatttaa attgaatcct aaaattccac ttgggtattg tggcaatgta 900  
aacttcagcg ccacaccaat ggccttgtea ggtgatattc aatcggaatc gttaaattgt 960  
acaacagaga gaattcatga agcaattaa ttgagggatg acaagtatat gaagtcaggg 1020  
cttgcttacc taaagcaaca acctgattta acagatgtca ggcgagacgg taaaattagt 1080  
aattgtccaa acctgctgat aaccaaattg gcagacatgc ctatgtacga ggtagatctt 1140  
ggatggggtc ggcgggtgtt tacgacgcct ttgttcggca tggacgaaga ggttttcatt 1200  
ttaccgggtc caaccaatga tgggagctgg tttgtggttg tagacatgga aactaaccac 1260  
ttgcagcact tcaagaagta tttttatgat atctttccgt aa 1302

<210> 14  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> *Citrus sinensis*

<400> 14

5

ES 2 584 325 T3

Met Gly Ser Lys Leu Phe Leu Leu Leu Gly Leu Leu Met Ala Ile Ala  
 1 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 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

- <210> 15
- <211> 335
- <212> PRT
- <213> *Citrus sinensis*
- <400> 15

5



ES 2 584 325 T3

Met Gly Thr Lys Ala Val Phe Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Phe Ser  
 1 5 10 15

Ala Val Ser Leu Arg Ser Ala Leu Ala Glu Asn Glu Glu Asp Pro Gly  
 20 25 30

Leu Val Met Asn Phe Tyr Lys Asp Thr Cys Pro Gln Ala Glu Asp Ile  
 35 40 45

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

ES 2 584 325 T3

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  
 325 330 335

<210> 16  
 <211> 88  
 <212> PRT  
 <213> *Citrus sinensis*  
 <400> 16

5

Met Lys Leu Ala Leu Val Thr Phe Leu Leu Val Ser Leu Val Leu Thr  
 1 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

10

ES 2 584 325 T3

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  
85

- 5  
<210> 17  
<211> 337  
<212> PRT  
<213> *Citrus sinensis*  
  
<400> 17

ES 2 584 325 T3

Met Gly Asn Ser Glu Lys Asp Ser Thr Ser Lys Ser Ile Asn Glu Thr  
 1 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

ES 2 584 325 T3

				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

<210> 18  
 <211> 342  
 <212> PRT  
 <213> *Citrus sinensis*  
 <400> 18

5



ES 2 584 325 T3

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





ES 2 584 325 T3

Met Leu Gly Val Phe Ser Ser Ala Ile Val Ser Pro Pro Glu Glu Leu  
 1 5 10 15

Val Ala Ala Gly Ser Arg Thr Pro Ser Pro Lys Thr Thr Ser Thr Ala  
 20 25 30

Leu Val Asp Arg Phe Leu Gln Ala Asn Ser Ser Ala Val Ser Val Gln  
 35 40 45

Val Gly Asp Asn Val Thr Leu Ala Tyr Thr His Gln Asn Glu Ser Pro  
 50 55 60

Leu Arg Gln Arg Ser Phe Ala Val Lys Asp Glu Ile Phe Cys Leu Phe  
 65 70 75 80

Glu Gly Ala Leu Asp Asn Leu Gly Ser Leu Arg Gln Gln Tyr Gly Leu  
 85 90 95

Ala Lys Ser Ala Asn Glu Val Ile Leu Val Ile Glu Ala Tyr Lys Ala  
 100 105 110

Leu Arg Asp Arg Ala Pro Tyr Pro Pro Asn His Val Val Gly His Leu  
 115 120 125

Ser Gly Tyr Phe Ala Phe Ile Val Tyr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Leu  
 130 135 140

Phe Val Ala Ser Asp Gln Phe Gly Lys Val Pro Leu Tyr Trp Gly Ile  
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Gly His Val Ala Phe Ala Asp Asp Ala Asp Leu Leu Lys  
 165 170 175

Gly Ala Cys Gly Lys Ser Leu Ala Ser Phe Pro Gln Gly Cys Phe Phe  
 180 185 190

Ser Thr Ala Val Gly Gly Leu Arg Ser Phe Glu Asn Pro Lys Asn Lys  
 195 200 205

Ile Thr Ala Val Pro Ala Ala Glu Glu Glu Ile Trp Gly Ala Thr Phe  
 210 215 220

Lys Val Met Ser Ser  
 225

<210> 20  
 <211> 161  
 <212> PRT

ES 2 584 325 T3

<213> *Citrus sinensis*

<400> 20

Met Asn Arg Cys Ala Val Met Gly Leu Gly Gly Gly Cys Asp Glu Glu  
 1 5 10 15

Arg Arg Met Gly Ser Met Ile Cys Pro Lys Pro Arg Arg Leu Gly Leu  
 20 25 30

Ile Asn Pro Pro Ile Asn Asp Ser Ile Arg His Leu Lys Arg Pro Ala  
 35 40 45

Ser Glu Phe Gly Asp Ser Lys Ala Gly Thr Glu Leu Leu Asp Leu Ile  
 50 55 60

Leu Thr Lys Gly Gly Tyr Gly Thr Glu Lys Thr Gly Asn Gln Val Ala  
 65 70 75 80

Ser Ser Pro Pro Tyr Phe Ser Gly Ser Pro Pro Ser Arg Ala Ser Asn  
 85 90 95

Pro Leu Ile Gln Asp Ala Gln Phe Gly Asn Glu Lys Ser Ala Pro Leu  
 100 105 110

Thr Ala Ala Pro Pro Ser Pro Ser Ser Arg Met Gly Gly Gly Gly Cys  
 115 120 125

Val Arg Val Lys Phe Gly His Lys Pro Ala Ala Val Arg Ile Glu Gly  
 130 135 140

Phe Asp Cys Leu Ser Arg Asp Arg Arg Asn Cys Ser Ile Ser Ala Val  
 145 150 155 160

Ala

5

<210> 21

<211> 304

<212> PRT

10 <213> *Citrus sinensis*

<400> 21

ES 2 584 325 T3

Met Thr Ile Leu Ile Asp Gln Pro His Phe Gly Val Glu Val Gln Glu  
1 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

ES 2 584 325 T3

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

- <210> 22
- <211> 253
- <212> PRT
- <213> *Citrus sinensis*
- <400> 22

5

ES 2 584 325 T3

Met Cys Gly Gly Ala Leu Ile Ala Asp Tyr Asp Glu Val Arg Pro Val  
 1 5 10 15

Arg Arg Glu Arg Lys Leu Thr Ser Glu Asp Leu Trp Ser Glu Phe Gly  
 20 25 30

Ser Ile Ser Asp Leu Leu Gly Leu Asp Tyr Asn Gly Lys Ser His Pro  
 35 40 45

Lys Gln Pro Leu Lys Val Lys Asn Glu Lys Ala Glu Asp Ser Ser Asn  
 50 55 60

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



ES 2 584 325 T3

Met Gln Leu Ser Thr Asn Phe Thr Ala Ser Pro Phe Arg Ser Gln Asn  
 1 5 10 15

His Leu Phe Asn Asn Leu Ser Pro Thr Ser Phe Leu His Lys Ser Leu  
 20 25 30

Phe Leu Ser Arg Pro Thr Lys Thr Leu Gln Asn Leu Leu Phe Ser Asn  
 35 40 45

Pro Lys Ser Ser Gln Lys Lys Leu Leu Arg Thr Ser Thr Ile Asn Ala  
 50 55 60

Ser Leu Leu Glu Ala Pro Leu Leu Trp Ala Gly Arg Leu Cys Val Tyr  
 65 70 75 80

Tyr Ala Leu Leu Lys Ala Gly Leu Ala Gly Ser Gln Ala Asn Pro Leu  
 85 90 95

Val Ser Asp Leu Glu Ser Gly Gly Val Thr Gly Ser Glu Gly Ala Asp  
 100 105 110

Leu Gly Phe Ser Lys Trp Leu Glu Asn Ile Lys Gly Lys Pro Asp Lys  
 115 120 125

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

Lys Gly Thr Leu Arg Arg Asn Tyr Arg Val Pro Ser Lys Ser Glu Gly  
 145 150 155 160

Arg Arg Leu Leu Lys Ala Ile Ala Ser Leu Leu Ser Asp Asp Asp His  
 165 170 175

Phe Thr Asp Ala Thr Ser His Lys Gly Cys Gln Ile Arg Arg Glu Asn  
 180 185 190

Val His Gly Glu Ser Val Cys Cys Asn Asn Val Arg Ala Leu Phe Asp  
 195 200 205

Glu Leu Pro Thr Pro His Leu Val Val Glu Ile Thr Pro Phe Pro Ala  
 210 215 220

Gly Pro Leu Thr Glu Lys Asp Tyr Val Lys Ala Glu Lys Leu Glu Arg  
 225 230 235 240

Val Leu Arg Ser Gly Pro Ser Ile  
 245

ES 2 584 325 T3

<210> 24  
 <211> 549  
 <212> PRT  
 <213> *Citrus sinensis*

5

<400> 24

Met Glu Glu Asn Gln Ser Val Ala Thr Leu Met Asp Ser Thr Thr Ser  
 1 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



ES 2 584 325 T3

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 2 584 325 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

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

<400> 25

Met Thr Cys Ile Ile Asn Ser Thr Gln Ser Leu Val Leu Ala Thr Ala  
 1 5 10 15

5

10

ES 2 584 325 T3

Met Val Val Ser Ser Thr Val Leu Phe Leu Ala Phe Ser Lys Gln Lys  
 20 25 30

Asn Asp Ser Lys Glu Pro Gln Glu Glu Thr Leu Arg Ser Cys Leu Tyr  
 35 40 45

Ser Glu Glu Lys Lys Lys Gly Arg Lys Lys Lys Arg Val Gln Phe Ala  
 50 55 60

Glu Asn Val Lys Asp Thr Ala Gly Asn Gly Glu Glu Tyr Arg Lys Glu  
 65 70 75 80

Tyr Asn Lys Lys Phe Ala Lys Gln Phe Asp Arg Thr Cys Arg Asn Asp  
 85 90 95

Gln Ile Gln Gly Met Pro Ala Asn Arg Val Ala Leu Tyr His Gly Ile  
 100 105 110

Leu Arg Asp Arg Val His Arg Met Glu Tyr Ser Tyr  
 115 120

<210> 26  
 <211> 433  
 <212> PRT  
 <213> *Citrus sinensis*

5

<400> 26

Met Glu Thr Ile His Val Lys Glu Ser Thr Ile Ile Arg Pro Ala Gln  
 1 5 10 15

Glu Thr Pro Arg His Cys Leu Arg Leu Ser Asp Leu Asp Leu Leu Ile  
 20 25 30

Pro Glu Ile His Ile Pro Cys Val Tyr Phe Tyr Arg Arg Pro Asn Tyr  
 35 40 45

Pro Cys Asn Phe Leu Glu Gly Gly Leu Leu Lys Glu Ala Leu Ser Lys  
 50 55 60

Val Leu Val Pro Phe Tyr Pro Leu Ala Gly Arg Leu Gly Lys Asp Glu  
 65 70 75 80

Asn Gly Arg Ile Glu Ile Lys Cys Asn Gly Glu Gly Val Leu Phe Ile  
 85 90 95

Glu Ala Glu Thr Ser Cys Val Ala Asp Asp Phe Gly Asp Phe Glu Ser  
 100 105 110

10

ES 2 584 325 T3

Ser Phe Lys Leu Val Gln Leu Val Pro Gln Val Asp Arg Thr Lys Asp  
115 120 125

Ala Tyr Phe His Pro Leu Ile Met Ala Gln Val Thr His Phe Lys Tyr  
130 135 140

Gly Gly Val Ser Leu Gly Leu Met Met His His Met Pro Met Asp Gly  
145 150 155 160

Thr Thr Ala Tyr His Phe Ile Asn Ser Trp Ala Glu Met Ala Arg Gly  
165 170 175

Ile Pro Ile Ser Val Pro Pro Ile Phe Asp Arg Thr Ile Leu Asp Val  
180 185 190

Gly Val Pro Thr Ser Pro Ser Phe His His Ile Glu Tyr Asp Pro Pro  
195 200 205

Pro Ser Met Asn Thr Pro Thr Gln Asn Pro Gln Ala Ile Ser Asn Ala  
210 215 220

Ile Leu Lys Leu Ser Pro Asp Gln Met Asn Ile Leu Lys Glu Lys Ser  
225 230 235 240

Lys Gly Asp His Gly Ser Thr Val Lys Tyr Thr Arg Phe Glu Ile Val  
245 250 255

Ala Ala His Ile Trp Arg Cys Ala Cys Lys Ala Arg Gly Leu Ser Val  
260 265 270

Asp Gln Ala Thr Lys Leu Glu Ile Pro Thr Ser Gly Arg Phe Lys Leu  
275 280 285

Asn Pro Lys Ile Pro Leu Gly Tyr Cys Gly Asn Val Asn Phe Ser Ala  
290 295 300

Thr Pro Met Ala Leu Ser Gly Asp Ile Gln Ser Glu Ser Leu Asn Cys  
305 310 315 320

Thr Thr Glu Arg Ile His Glu Ala Ile Lys Leu Arg Asp Asp Lys Tyr  
325 330 335

Met Lys Ser Gly Leu Ala Tyr Leu Lys Gln Gln Pro Asp Leu Thr Asp  
340 345 350

Val Arg Arg Asp Gly Lys Ile Ser Asn Cys Pro Asn Leu Leu Ile Thr  
355 360 365

ES 2 584 325 T3

Lys Leu Ala Asp Met Pro Met Tyr Glu Val Asp Leu Gly Trp Gly Arg  
370 375 380

Pro Val Phe Thr Thr Pro Leu Phe Gly Met Asp Glu Glu Val Phe Ile  
385 390 395 400

Leu Pro Gly Pro Thr Asn Asp Gly Ser Trp Phe Val Val Val Asp Met  
405 410 415

Glu Thr Asn His Leu Gln His Phe Lys Lys Tyr Phe Tyr Asp Ile Phe  
420 425 430

**Pro**

5 <210> 27  
<211> 11  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (7)..(11)  
<223> a, c, t, g, desconocida u otros

20 <400> 27  
ggtctcnnnn n 11

**REIVINDICACIONES**

1. Una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:15.
2. Una construcción que comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO:2.
- 5 3. La construcción de la reivindicación 2, en la que dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un promotor que funciona en las plantas y dicho promotor expresa una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO:15.
4. La construcción de la reivindicación 3, en la que el promotor se selecciona del grupo que consiste en un promotor 35S de CaMV, el promotor de la poliubiquitina, el promotor específico de tejido y un promotor preferido del tejido.
- 10 5. Una célula vegetal que comprende la construcción de la reivindicación 2.
6. Un procedimiento para aumentar la resistencia al chancro de los cítricos en una planta o célula, que comprende sobreexpresar la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO:2, unida operativamente a un promotor activo en células vegetales.
7. Un procedimiento para aumentar la resistencia a al chancro de los cítricos en una planta o célula, que comprende
  - 15 (a) transformar una planta o célula con una construcción que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO:2, unida operativamente a un promotor activo en células vegetales;
  - (b) regenerar una planta a partir de dicha planta o célula transformada;
  - (c) seleccionar una planta o célula que tiene una resistencia aumentada al chancro de los cítricos con respecto a una planta control.
- 20 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el promotor es un promotor constitutivo o un promotor específico de tejidos.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el promotor específico de tejido es un promotor específico del xilema, un promotor específico del floema o un promotor un promotor específico del xilema/floema.
10. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el promotor está unido operativamente a un potenciador.
- 25 11. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la planta es un miembro de la familia Rutaceae, preferiblemente dicha planta se selecciona de los géneros de *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Murraya*, *Microcitrus*, *Limonia* y *Eremocitrus*.
12. Una planta, célula vegetal, semilla o fruto obtenible mediante el procedimiento de las reivindicaciones 6-7, en el que dicha planta, célula vegetal, semilla o fruto comprende una construcción que comprende la SEQ ID NO:2.
- 30 13. Una planta transgénica que tiene incorporado en su genoma una construcción que comprende un promotor activo en células vegetales, operativamente unido a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de resistencia a las enfermedades expuesto en la SEQ ID NO:15.
14. La planta transgénica de la reivindicación 13, en la que el polipéptido está codificado por una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO:2.
- 35 15. Descendencia, fruto o semilla de la planta de la reivindicación 14, que comprende una construcción que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO:2.

Figura 1



Figura 2

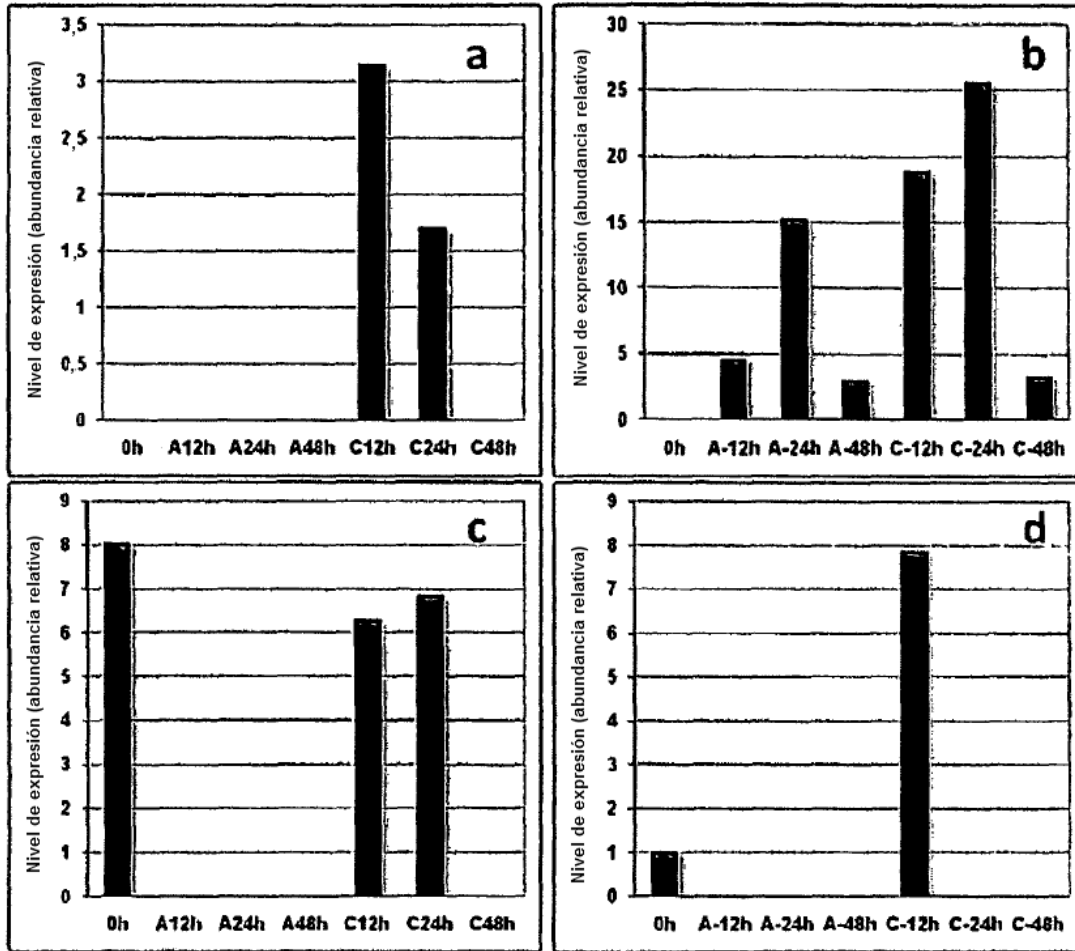




Figura 3

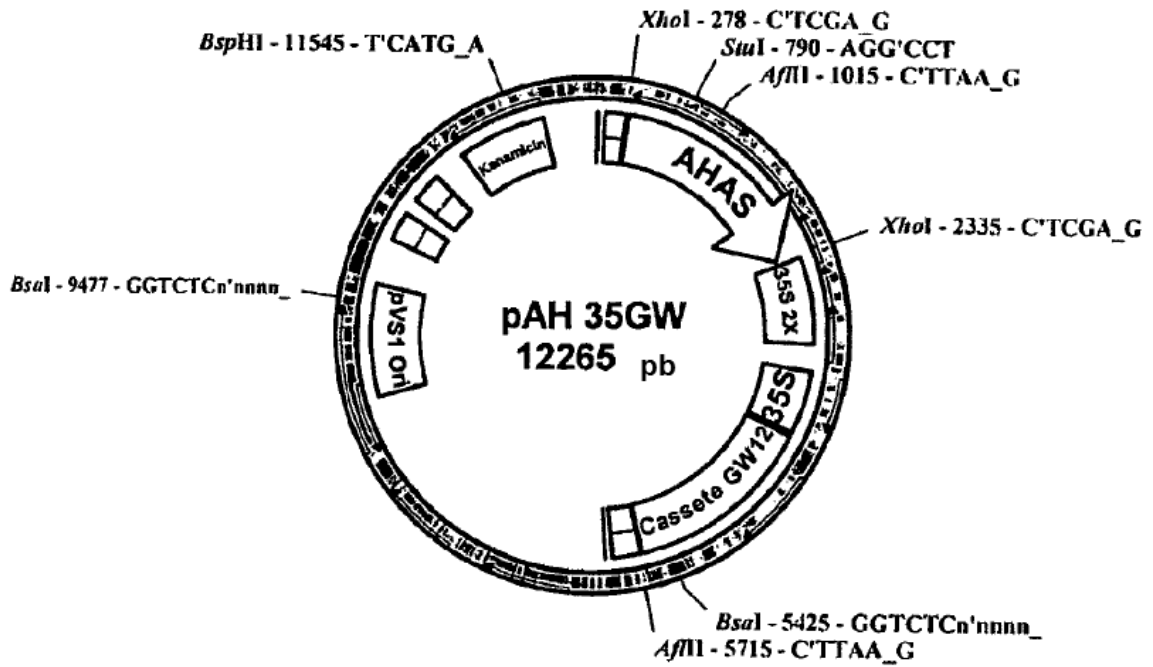


Figura 4

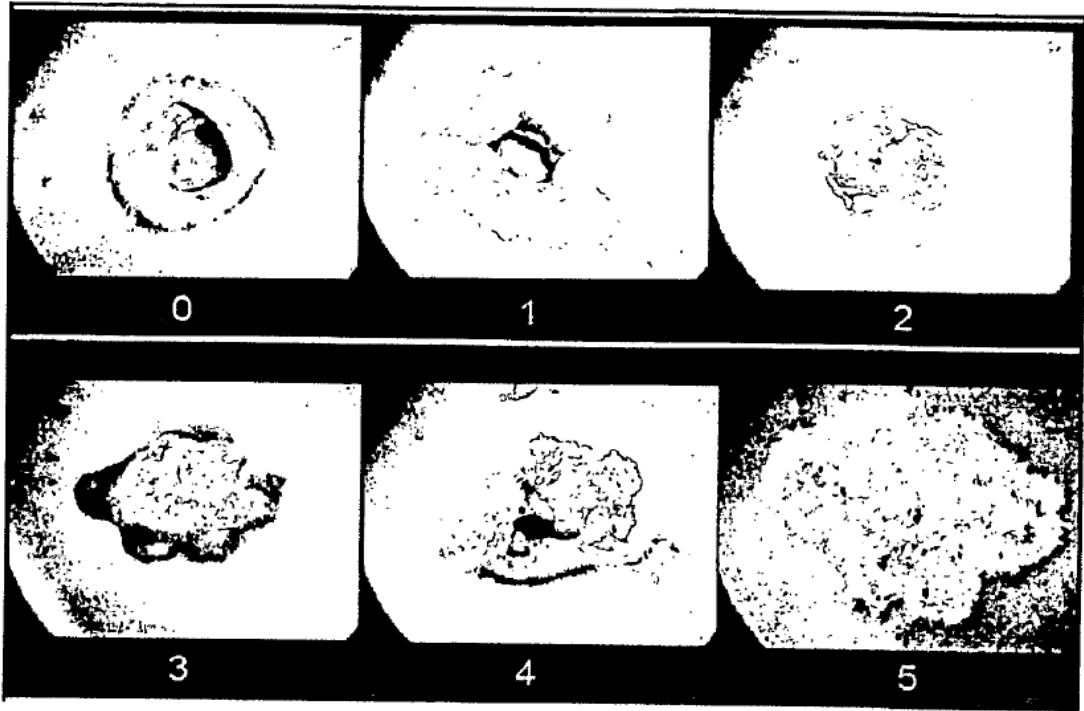


Figura 5

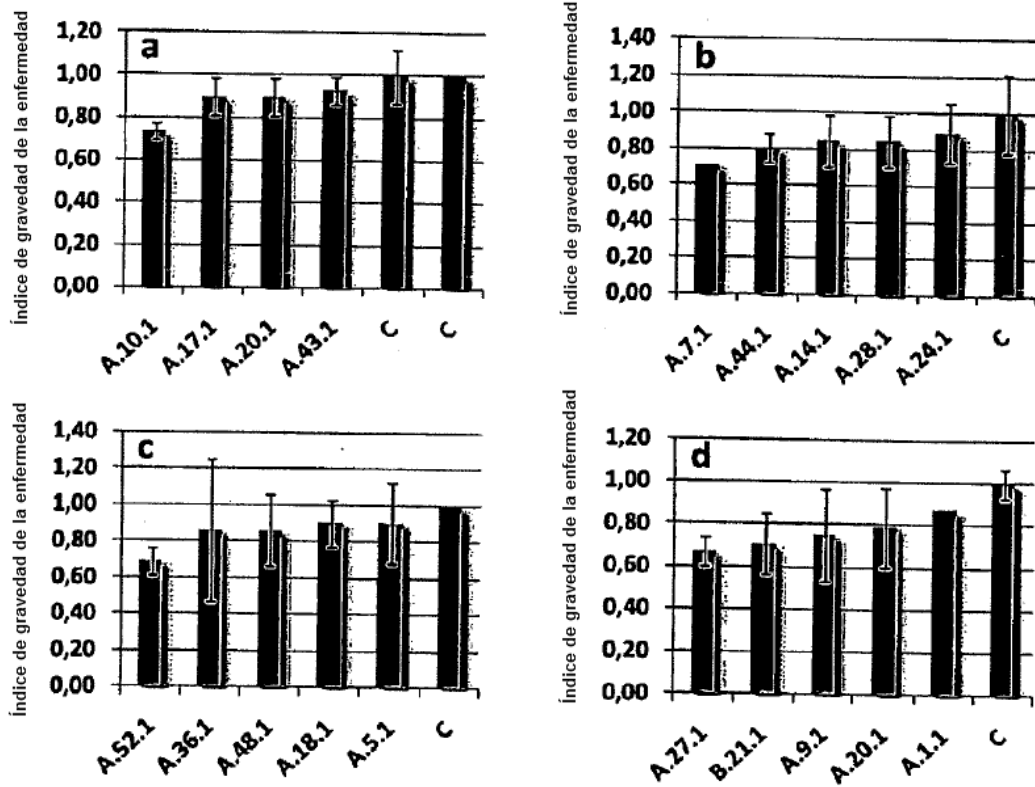


Figura 6

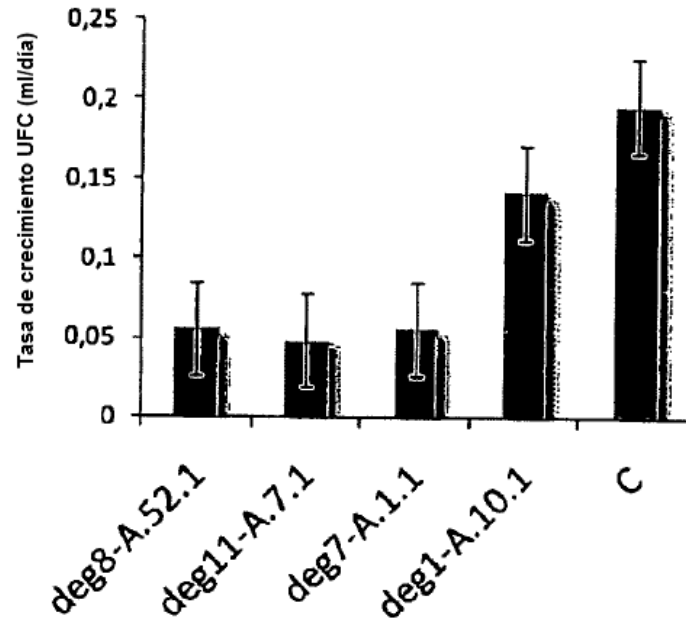


Figura 7

