

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 480**

51 Int. Cl.:

A01N 65/28 (2009.01)
A01N 27/00 (2006.01)
A01P 17/00 (2006.01)
A01N 65/00 (2009.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01N 45/02 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN REVISADA DE PATENTE EUROPEA

T4

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2010 PCT/BR2010/000353**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11050432**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2010 E 10825870 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2493318**

54 Título: **Composiciones repelentes y enfoques genéticos para controlar el Huanglongbing**

30 Prioridad:

28.10.2009 US 255705 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción revisada de la patente:
05.10.2017

73 Titular/es:

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA - FUNDECITRUS (50.0%)
Av. Dr. Adhemar Pereira de Barros 201 Vila Melhado
14807-040 Araraquara - SP, BR y
INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS (50.0%)

72 Inventor/es:

ALQUEZAR GARCÍA, BERTA;
RODRÍGUEZ BAIXAULI, ANA;
PERIS RODRIGO, JOSEP;
PEÑA GARCÍA, LEANDRO;
ENRIQUE, ANDRÉIA;
PEDREIRA DE MIRANDA, MARCELO;
YAMAMOTO, PEDRO TAKAO;
SPÓSITO, MARCEL BELLATO;
WULFF, NELSON ARNO;
TEIXEIRA, DIVA DO CARMO;
AYRES, ANTONIO JULIANO;
DE NORONHA, NEWTON CAVALCANTI, JR.;
BENTO, JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES y
POSTALI PARRA, JOSÉ ROBERTO

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 608 480 T4

DESCRIPCIÓN

Composiciones repelentes y enfoques genéticos para controlar el Huanglongbing.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a composiciones repelentes que comprenden sesquiterpenos para controlar el Huanglongbing (HLB) en plantas de cítricos. Asimismo, se dan a conocer procedimientos para controlar el HLB mediante la modificación genética de plantas de cítricos.

10

Antecedentes de la invención

El Huanglongbing (HLB), también conocido como degeneración de las venas del floema de los cítricos (DVFC), enfermedad de verdecimiento de los cítricos, enfermedad del brote amarillo (traducido del chino "huang-lunpin"), "likubin" en Taiwan (traducido del chino como enfermedad del marchitamiento inmediato), enfermedad del moteado amarillo foliar en las Filipinas y mortalidad de los cítricos en la India, es probablemente la peor enfermedad de las plantas de cítricos causada por un patógeno vectorizado. El agente causal es una bacteria mótil, *Candidatus liberibacter* spp., que es transmitida por el psílido asiático de los cítricos (*Stemorrhyncha: Psyllidae*), también conocido como *Diaphorina citri* o, en África, como *Trioza erytrae*, el psílido africano de los cítricos.

20

La distribución del HLB es principalmente del Asia tropical y subtropical. Se ha detectado en todas las regiones productoras de cítricos de Asia. La enfermedad ha afectado a cultivos en China, Taiwan, India, Sri Lanka, Malasia, Indonesia, Myanmar, las Filipinas, Pakistán, Tailandia, las islas Ryukyu, Nepal, Réunion, islas Mauricio y Afganistán.

Algunas áreas fuera de Asia, tales como Arabia Saudita, Brasil y Florida en los Estados Unidos también han informado de la presencia de la enfermedad.

25

Aunque las composiciones insecticidas y repelentes actuales pueden resultar útiles para controlar el HLB, se ha cuestionado la seguridad de estas composiciones, ya que muchas de ellas resultan excesivamente tóxicas para otros organismos en el ecosistema. Además, muchas de estas composiciones presentan una vida extraordinariamente larga y persisten en el medio ambiente en el que se aplican prácticamente de manera indefinida. Además, muchas especies de insectos han desarrollado resistencia a muchas de las composiciones insecticidas y repelentes conocidas. De esta manera, existe una necesidad de una composición repelente eficaz de vida corta y relativamente no tóxica, tal como una composición repelente biológica.

30

Se conoce desde hace mucho tiempo en Vietnam que la guayaba cultivada en proximidad o asociada con cítricos presenta un efecto protector o repelente del psílido asiático de los cítricos. Las guayabas son plantas de la familia del mirto (*Myrtaceae*), género *Psidium*, que contiene aproximadamente 100 especies de arbustos y árboles pequeños tropicales. La especie más frecuente y la denominada con frecuencia simplemente como "la guayaba" es la guayaba manzana (*Psidium guajava*).

40

El efecto protector del cultivo asociado de guayaba y cítricos probablemente se debe a los compuestos volátiles producidos por las hojas de la guayaba debido a que el efecto protector se encuentra presente durante todo el año. Aunque se han identificado cincuenta y siete componentes, incluyendo 27 terpenos (o sesquiterpenos) conjuntamente con 14 alcoholes y 4 ésteres en aceite esencial de hoja de guayaba mediante análisis GC-MS del aceite obtenido por hidrodestilación de hojas de guayaba, no se conoce cuál es el mecanismo exacto que subyace al efecto protector de la guayaba. Una publicación reciente (Rouseff et al., Sulfur Volatiles in Guava (*Psidium guajava* L.) Leaves: Possible Defense Mechanism, J. Agric. Food Chem. 56:8905-10, 2008) sugiere que algunos compuestos volátiles sulfurosos, tales como el disulfuro de dimetilo, son responsables del efecto repelente de la guayaba y no los compuestos volátiles principales, tales como el β -cariofileno, ya que éste último también se encuentra presente en los cítricos. Sin embargo, los compuestos volátiles sulfurosos contenidos en las hojas de la guayaba se emiten a niveles minúsculos y sólo durante un periodo de aproximadamente 30 minutos después de lesionar la hoja, indicando que estos compuestos están apenas relacionados o nada relacionados con lo observado en el cultivo asociado de cítricos-guayaba en Vietnam. Por otra parte, el β -cariofileno se encuentra presente en hojas de cítricos no dañadas a concentraciones generalmente inferiores al 0,2% del total de compuestos volátiles, mientras que representa habitualmente más de 50% de los compuestos volátiles totales emitidos por las hojas de guayaba.

50

55

Sigue existiendo una necesidad de control del HLB en las plantas de cítricos y la presente invención proporciona una nueva solución a este problema.

60

Sumario de la invención

Se ha encontrado que algunos sesquiterpenos tales como el β -cariofileno y el α -copaeno producidos por las hojas de la guayaba repelen los insectos psílicos *Diaphorina citri* y/o *Trioza erytrae*. De esta manera, la invención satisface una necesidad de la industria para controlar el HLB en las plantas de cítricos mediante la provisión de una composición repelente biológica que comprende sesquiterpenos. También se proporcionan procedimientos para

65

controlar el HLB mediante modificación genética de las plantas de cítricos para que sobreexpresen los genes codificantes de sesquiterpeno sintasas.

De esta manera, la invención se refiere en general a un procedimiento para controlar el HLB en las plantas de cítricos, que comprende expresar por lo menos un gen codificante de un polipéptido que presenta actividad de sesquiterpeno sintasa en las plantas de cítricos para producir sesquiterpenos adicionales con el fin de repeler los insectos psílidos *Diaphorina citri* y/o *Trypza erytrae*, de manera que se controle el HLB, en el que el sesquiterpeno acumulado en exceso es el β -cariofileno, el α -copaeno o las combinaciones de los mismos. En dicho procedimiento, el gen o genes presentan actividad de β -cariofileno sintasa y/o de α -copaeno sintasa.

En determinadas formas de realización, la expresión de por lo menos un gen está controlada por sus propias regiones promotoras y terminadoras. En otras formas de realización preferidas, la expresión de por lo menos un gen está controlada por una región reguladora heteróloga que proporciona una expresión constitutiva, específica de tejido o fuertemente inducible. Más preferentemente, la región reguladora heteróloga proporciona una fuerte expresión específica de tejido en el citosol, cloroplastos o mitocondrias.

En formas de realización adicionales, el presente procedimiento comprende además la expresión de un gen codificante de farnesil pirofosfatasa sintasa para incrementar la acumulación del sesquiterpeno producido por el polipéptido que presenta actividad de sesquiterpeno sintasa.

La invención se refiere además un procedimiento para controlar la enfermedad Huanglongbing (HLB) de las plantas de cítricos, que comprende aplicar por lo menos un sesquiterpeno purificado, que repele los insectos psílidos *Diaphorina citri* y/o *Trypza erytrae*, de manera que se controla la enfermedad HLB de las plantas de cítricos, en el que por lo menos un sesquiterpeno se selecciona de entre el grupo que consiste de β -cariofileno y α -copaeno, o combinaciones de los mismos. En dicho procedimiento, el sesquiterpeno o sesquiterpenos purificados se purifican a partir de un organismo seleccionado de entre el grupo que consiste de plantas, bacterias y levaduras. En una forma de realización preferida, el sesquiterpeno o sesquiterpenos purificados se purifican a partir de la planta de la guayaba, preferentemente de los extractos de hojas de la planta de la guayaba.

En algunas formas de realización preferidas, el sesquiterpeno o sesquiterpenos se aplican a las plantas de los cítricos mediante sistemas de liberación lenta, tales como los ya utilizados por entomólogos para administrar feromonas.

Breve descripción de las figuras

las figuras 1A y 1B representan las secuencias de nucleótidos de SEC ID nº 1 y nº 3, y las secuencias de proteína de SEC ID nº 2 y nº 4.

la figura 2 representa los terpenos volátiles emitidos (cromatograma superior) y extraídos (cromatograma inferior) de las hojas de la guayaba.

la figura 3 muestra una separación representativa mediante cromatografía de gases de los compuestos volátiles emitidos a partir de hojas de los diferentes genotipos de cítricos.

la figura 4 muestra la separación representativa mediante cromatografía de gases de los compuestos volátiles emitidas a partir de hojas de la guayaba en diferentes estadios de desarrollo: A, brote; B, plántula; C, madura; D, senescente.

la figura 5A muestra un cromatograma de iones totales representativo de productos sesquiterpeno de SEC ID nº 2. Los ensayos se llevaron a cabo con extractos crudos de proteína de la expresión in vitro con farnesil difosfato como sustrato. El pico 2 corresponde a un estándar interno. La figura 5B representa la comparación entre el patrón de fragmentación de TIC del pico 1 corregido para el fondo y los espectros del β -cariofileno obtenidos de bibliotecas.

la figura 6 muestra el porcentaje representativo y número de selecciones de *Diaphorina citri* respecto a los compuestos volátiles de cítricos \pm olor de guayaba (A) y de compuestos volátiles de guayaba frente a aire limpio (B) en olfatómetros de dos y cuatro brazos, respectivamente.

la figura 7 representa alineaciones de las secuencias de aminoácidos de la beta-cariofileno sintasa QHS1 de *Artemisia annua* (nº de acceso AAL79181), de la beta-cariofileno sintasa de *Mikania micrantha* (nº de acceso ACN67535), de la beta-cariofileno sintasa de *Cucumis sativus* (nº de acceso AAU05952), de la beta-cariofileno/alfa-humuleno sintasa de *Arabidopsis thaliana* (nº de acceso AAO85539), de la (E)-beta-cariofileno sintasa de *Zea mays* (nº de acceso ABY79206) y de la (E)-beta-cariofileno/beta-elemento sintasa de *Oryza sativa* (nº de acceso ABJ16553). Se destaca en negro y en gris los residuos idénticos y similares, respectivamente, en dichas secuencias.

5 las figuras 8A y 8B representan alineaciones de las secuencias de aminoácidos de la beta-cariofileno sintasa QHS1 de *Artemisia annua* (nº de acceso AAL79181), de la beta-cariofileno sintasa de *Mikania micrantha* (nº de acceso ACN67535), de la beta-cariofileno sintasa de *Cucumis sativus* (nº de acceso AAU05952) y de la beta-cariofileno/alfa-humuleno sintasa de *Arabidopsis thaliana* (nº de acceso AAO85539) (A) y alineaciones de las secuencias de aminoácidos de la (E)-beta-cariofileno sintasa de *Zea mays* (nº de acceso ABY79206) y de la (E)-beta-cariofileno/beta-elemento sintasa de *Oryza sativa* (nº de acceso ABO16553) (B). Destacados en negro y en gris se encuentran los residuos idénticos y similares, respectivamente, en dichas secuencias.

10 la figura 9 representa alineaciones de las secuencias de aminoácidos de la beta-cariofileno sintasa QHS1 de *Artemisia annua* (nº de acceso AAL79181), de la beta-cariofileno sintasa de *Mikania micrantha* (nº de acceso ACN67535), de la beta-cariofileno sintasa de *Cucumis sativus* (nº de acceso AAU05952), de la (E)-beta-farneseno sintasa de *Citrus junos* (nº de acceso AAK54279), de la terpeno sintasa de *Citrus junos* (nº de acceso AAG01339), de la terpeno sintasa putativa de *Citrus x paradisi* (nº de acceso AAM00426) y de la beta-cariofileno/alfa-humuleno sintasa de *Arabidopsis thaliana* (nº de acceso AAO85539). Se destacan en negro y en gris los residuos idénticos y similares, respectivamente, en dichas secuencias. Los cebadores diseñados para amplificar los genes de la beta-cariofileno sintasa se encuentran subrayados.

20 la figura 10 representa la secuencia de ADN parcial correspondiente a la sesquiterpeno sintasa de cítrico (SEC ID nº 3) y cebadores diseños para la amplificación rápida de los extremos 5' y 3' de la misma mediante metodología RACE.

25 la figura 11 representa alineaciones de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la farnesil pirofosfato sintasa 1 (FPPS1) de *Arabidopsis thaliana* (nº de acceso X75789). Se subrayan las secuencias utilizadas para diseñar cebadores para la amplificación de un ADNc de longitud completa codificante de un gen de FPP sintasa funcional.

Descripción detallada de la invención

30 La invención se refiere a procedimientos para controlar el HLB basados en la observación de que los sesquiterpenos producidos por las hojas de guayaba repelen los vectores de HLB, los insectos psílidos *Diaphorina citri* y/o *Trypoxys erytraea*.

35 Un terpeno es un hidrocarburo insaturado basado en una unidad isopreno (C₅H₈), que puede ser acíclico o cíclico. Un sesquiterpeno es un terpeno basado en una estructura C₁₅.

40 La guayaba, al igual que otras plantas aromáticas o plantas de aceites esenciales, acumula grandes cantidades de sesquiterpenos en sus hojas. Típicamente los sesquiterpenos tales como el β-cariofileno y el α-copaeno representan del 50% al 60% de la cantidad total de compuestos volátiles emitidos por las hojas de la guayaba. En las plantas de la guayaba, los sesquiterpenos con frecuencia se sintetizan y se acumulan en estructuras anatómicas especializadas, glándulas tricomas o cavidades secretorias, localizadas sobre las hojas y la superficie de los tallos. Los sesquiterpenos acumulados en las plantas pueden extraerse mediante diferentes medios, tales como la destilación al vapor que produce el denominado aceite esencial, que contiene los sesquiterpenos concentrados.

45 En determinadas formas de realización de la invención, como procedimiento para controlar el HLB, se aplica por lo menos un sesquiterpeno extraído de las plantas de la guayaba, preferentemente β-cariofileno, en las plantas de cítricos mediante pulverización o sistemas de liberación lenta. Los sistemas de liberación lenta ya han sido utilizados por los entomólogos para liberar feromonas. En dichos sistemas, se aplica β-cariofileno puro en una resina de PVC que conserva y libera el compuesto químico. Esta resina se aplica directamente en los árboles de cítricos en los huertos. Presenta la propiedad de liberar el compuesto durante un periodo de 3 a 4 meses.

50 El precio y disponibilidad de los extractos naturales de plantas dependen de su abundancia, rendimiento de aceite y origen geográfico de las plantas. Debido a la complejidad de su estructura, la producción de las moléculas individuales de sesquiterpeno mediante síntesis química con frecuencia está limitada por el coste del procedimiento y puede no ser en todos los casos química o económicamente viable. Por lo tanto, resultaría de gran interés una vía bioquímica para la producción de moléculas de sesquiterpeno. La construcción de una vía bioquímica para la producción de moléculas de sesquiterpeno requiere una clara comprensión de la biosíntesis de los sesquiterpenos y del aislamiento de los genes codificantes de enzimas que participan en etapas biosintéticas específicas.

60 La biosíntesis de los sesquiterpenos en las plantas ha sido estudiada extensivamente. El precursor de cinco carbonos común a todos los terpenos es el isopentenil pirofosfato (IPP). La mayoría de los enzimas que catalizan las etapas que conducen al IPP han sido clonados y caracterizados. En las plantas coexisten dos rutas diferentes para la biosíntesis de IPP. La ruta del mevalonato se localiza en el citosol y retículo endoplasmático y la ruta no mevalonato (o ruta del desoxixilulosa 5-fosfato (DXP)) se localiza en los plastidios. En la etapa siguiente, se condensa repetitivamente el IPP con prenil transferasas para formar los precursores prenil pirofosfato terpeno acíclicos para los sesquiterpenos, el farnesil-pirofosfato (FPP). Estos precursores sirven de sustrato para las sesquiterpeno sintasas, que catalizan complejas ciclizaciones en múltiples etapas. De esta manera, la primera etapa

realizada en la biosíntesis del β -cariofileno es la ciclización del precursor universal de sesquiterpeno FPP por una sesquiterpeno sintasa. Se ha clonado un grupo de genes codificantes de β -cariofileno sintasas a partir de plantas. Estas sintasas habitualmente participan en la producción de diferentes sesquiterpenos. Por ejemplo, una única proteína codificada por un gen de β -cariofileno sintasa de *Arabidopsis* es capaz de convertir FPP en los productos sesquiterpeno (-)- α -copaeno, α -humuleno y (-)-(E)- β -cariofileno (Chen et al., Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers, *Plant Cell* 15:481-494, 2003; Tholl et al., Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers, *The Plant J.* 42:757-771, 2005). Una β -cariofileno sintasa del maíz produce δ -elemeno, α -humuleno y (-)-(E)- β -cariofileno (Kollner et al., A maize (E)- β -caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties, *The Plant Cell* 20:482-494, 2008). Las β -cariofileno sintasas también han sido aisladas a partir de *Artemisia annua* (Cai et al., A cDNA clone for β -caryophyllene synthase from *Artemisia annua*, *Phytochem.* 61:523-529, 2002), pepino (Mercke et al., Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants, *Plant Phys.* 135:2012-2024), y arroz (Cheng et al., The rice (E)- β -caryophyllene synthase (OsTPS3) accounts for the major inducible volatile sesquiterpenes, *Phytochem.* 68:1632-1641, 2007) y oregano (Degenhardt et al., Restoring a maize root signal that attracts insect-killing nematodes to control a major pest, *PNAS* 106:13213-218, 2009).

Los genes quiméricos codificantes de sesquiterpeno sintasas han sido utilizados para transformar genéticamente plantas con el objetivo de atraer/repeler polinizadores (Kessler et al., Field experiments with transformed plants reveal the sense of floral scents, *Science* 321:1200-1202, 2008), de atraer insectos que eliminan plagas (Kappers et al., Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*, *Science* 309:2070-2072, 2005); Schnee et al., The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores, *PNAS* 103:1129-1134, 2006) y nemátodos (Degenhardt et al., Restoring a maize root signal that attracts insect-killing nematodes to control a major pest, *PNAS* 106:13213-218, 2009) y directamente a la eliminación de plagas de insectos (Wu et al., Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants, *Nature Biotechnology* 24:1441-1447, 2006), indicando que las estrategias transgénicas dirigidas a incrementar la acumulación de dichos sesquiterpenos, incluyendo el β -cariofileno, podrían ser una alternativa ecológicamente segura, que sola o en combinación con un menor uso de pesticidas, podría evitar los daños causados por enfermedades devastadoras transmitidas por plagas.

Una forma de realización de la presente invención se refiere al aislamiento de ácidos nucleicos codificantes de sesquiterpeno sintasas de plantas de cítricos, plantas relacionadas con cítricos pertenecientes a la familia de las rutáceas, la guayaba, las plantas relacionadas con la guayaba de la familia de las mirtáceas, o cualquier otro organismo vivo. Tal como se describe en la presente memoria, una sesquiterpeno sintasa es cualquier enzima que cataliza la síntesis de un sesquiterpeno. Puede determinarse si un polipéptido codificado por un ácido nucleico de la invención presenta actividad de sesquiterpeno sintasa mediante el ensayo de caracterización enzimática indicado en los ejemplos en la presente memoria.

En una forma de realización del ácido nucleico de la invención, el ácido nucleico se selecciona de entre (a) un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido sustancialmente indicada en SEC ID nº 1, o (b) un ácido nucleico codificante del polipéptido sustancialmente indicado en SEC ID nº 2, en el que el polipéptido codificado por dicho ácido nucleico presenta actividad de sesquiterpeno sintasa.

En otra forma de realización del ácido nucleico de la invención, el ácido nucleico se selecciona de entre: (a) un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos sustancialmente indicada en SEC ID nº 3, o (b) un ácido nucleico codificante del polipéptido sustancialmente indicado en SEC ID nº 4, en el que el polipéptido codificado por dicho ácido nucleico presenta actividad de sesquiterpeno sintasa.

Preferentemente, el ácido nucleico y/o polipéptido de la invención se aísla a partir de plantas de cítricos. En una forma de realización, el ácido nucleico se aísla a partir de plantas de la guayaba.

Preferentemente, el ácido nucleico según la invención comprende la SEC ID nº 1.

En una forma de realización particular, la invención se refiere a determinadas secuencias de nucleótidos aisladas, incluyendo aquellas que están sustancialmente libres de material endógeno contaminante. Las expresiones "ácido nucleico" o "molécula de ácidos nucleicos" se refieren a un polímero desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma de cadena sencilla o de doble cadena, y a menos que se encuentre limitado de otra manera, comprendería análogos conocidos de nucleótidos naturales que pueden funcionar de una manera similar a los nucleótidos naturales. Una "secuencia de nucleótidos" también se refiere a una molécula polinucleótida o una molécula oligonucleótida en forma de un fragmento separado o como componente de un ácido nucleico de mayor tamaño. Algunas de las moléculas de ácidos nucleicos de la invención se derivan de ADN o ARN aislado por lo menos una vez en forma sustancialmente pura y en una cantidad o concentración que permite la identificación, manipulación y recuperación de su secuencia de nucleótidos componente mediante procedimientos bioquímicos estándares. Se dan a conocer ejemplos de dichos procedimientos, incluyendo protocolos de PCR que pueden utilizarse en la presente memoria, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989;

Current Protocols in Molecular Biology, editado por F.A. Ausubel et al., John Wiley and Sons, Inc., 1987, e Innis M. et al., editores, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, 1990.

5 Tal como se indica en la presente memoria, entre las moléculas de ácidos nucleicos de la invención se incluye ADN en forma tanto de cadena sencilla como de doble cadena, así como el ARN complementario del mismo. El ADN incluye, por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ADN sintetizado químicamente, ADN amplificado por PCR, y combinaciones de los mismos. El ADN genómico, incluyendo las regiones traducidas, no traducidas y de control, pueden aislarse mediante técnicas convencionales, por ejemplo utilizando cualquiera de los ADNc de la invención, o fragmentos adecuados de los mismos, como sonda, para identificar un segmento de ADN genómico que
10 seguidamente puede clonarse utilizando procedimientos técnicos comúnmente conocidos. En general, entre las moléculas de ácidos nucleicos comprendidas dentro del alcance de la invención se incluyen secuencias que se hibridan con secuencias de la invención a temperaturas de 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C o 30°C inferiores a la temperatura de fusión del dúplex de secuencias de ADN de la invención, incluyendo cualquier intervalo de condiciones incluido dentro de dichos intervalos.

15 En otra forma de realización, los ácidos nucleicos de la invención comprenden una secuencia sustancialmente tal como se indica en SEC ID nº 1 o SEC ID nº 3. En una forma de realización, los ácidos nucleicos son por lo menos 70%, por lo menos 85%, por lo menos 90% o por lo menos 95% idénticos a las secuencias de nucleótidos SEC ID nº 1 o SEC ID nº 3, y cada ácido nucleico codifica una proteína que presenta actividad de sesquiterpeno sintasa, tal como se demuestra en, por ejemplo, el ensayo enzimático indicado en los ejemplos, con una estabilidad y eficacia incrementadas en comparación con la del polipéptido codificado por SEC ID nº 1 o SEC ID nº 3. En una forma de realización, el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 1. En otra forma de realización, el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 3.

25 En otra forma de realización adicional, el ácido nucleico comprende un tramo contiguo de por lo menos 50, 100, 250, 500 o 750 nucleótidos contiguos de SEC ID nº 1 o SEC ID nº 3. Dichos fragmentos contiguos de dichos nucleótidos también pueden contener por lo menos una mutación con la condición de que la secuencia mutante conserve la funcionalidad de la secuencia original y la capacidad de hibridarse con dichos nucleótidos bajo condiciones de baja o alta astringencia, tal como, por ejemplo, condiciones de astringencia moderada o alta. Dicho fragmento puede derivarse, por ejemplo, de los nucleótidos (nt) 200 a nt 1.700, de nt 800 a nt 1.700, de nt. 1.000 a nt. 1.700, de nt. 200 a nt. 1.000, de nt 200 a nt 800, de nt 400 a nt 1.600, o de nt 400 a nt 1.000 de la SEC ID nº 1 o de la SEC ID nº 3.

35 Tal como se ha indicado anteriormente, los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos de la invención se encuentran comprendidos en la invención. Los ácidos nucleicos aislados de la invención pueden seleccionarse de entre un ácido nucleico codificante del polipéptido indicado sustancialmente en SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4. En una forma de realización, los polipéptidos son por lo menos 70%, por lo menos 85%, por lo menos 90% o por lo menos 95% idénticos a SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4, y los polipéptidos presentan actividad de sesquiterpeno sintasa, tal como se demuestra, por ejemplo, en el ensayo enzimático indicado posteriormente.

40 Debido a la degeneración del código genético, en el que más de un codón puede codificar el mismo aminoácido, múltiples secuencias de ADN pueden codificar el mismo polipéptido. Dichas secuencias de ADN variantes pueden resultar de la deriva genética o de la manipulación artificial (por ejemplo la que se produce durante la amplificación por PCR o como producto de la mutagénesis deliberada de una secuencia nativa). De esta manera, la presente invención comprende cualquier ácido nucleico derivado de la SEC ID nº 1 o SEC ID nº 3 capaz de codificar un polipéptido sustancialmente indicado en la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

45 La mutagénesis deliberada de una secuencia nativa puede llevarse a cabo utilizando numerosas técnicas bien conocidas. Por ejemplo, pueden utilizarse los procedimientos de mutagénesis específica de sitio dirigida por oligonucleótido, en particular en el caso de que se desee mutar un gen de manera que nucleótidos o codones de restricción predeterminados resulten alterados mediante sustitución, delección o inserción. Se dan a conocer procedimientos ejemplares de realización de dichas alteraciones en Walder et al. (Gene 42:133, 1986), Bauer et al., (Gene 37:73, 1985), Craik (BioTechniques, Jan. 12-19, 1985), Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981), Kunkel (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985), Kunkel et al. (Methods in Enzymol. 154:367, 1987), y patentes US nº 4.518.584 y nº 4.737.462.

50 En una forma de realización, la invención proporciona polipéptidos aislados. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptidos" se refiere a un género de polipéptido o fragmentos peptídicos que comprende las secuencias de aminoácidos identificadas en la presente memoria, así como fragmentos de menor tamaño.
60 Alternativamente, puede definirse un polipéptido en términos de su grado de relación antigénica con cualquier péptido codificado por las secuencias de ácidos nucleicos de la invención. De esta manera, en una forma de realización, un polipéptido dentro del alcance de la invención se define como una secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo lineal o tridimensional compartido por cualquier péptido codificado por las secuencias de ácidos nucleicos de la invención. Alternativamente, un polipéptido dentro del alcance de la invención resulta reconocido por un anticuerpo que reconoce específicamente cualquier péptido codificado por las secuencias de ácidos nucleicos de la invención. Se define que los anticuerpos que se unen específicamente en el caso de que se
65

unan a polipéptidos de la invención con una K_a superior o igual a aproximadamente $10^7 M^{-1}$, tal como superior o igual a $10^8 M^{-1}$.

5 Una "variante" de polipéptido tal como se indica en la presente memoria se refiere a un polipéptido sustancialmente homólogo a un polipéptido nativo, pero que presenta una secuencia de aminoácidos diferente de la codificada por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención debido a una o más deleciones, inserciones o sustituciones.

10 Las variantes pueden comprender secuencias sustituidas de forma conservativa, es decir se sustituye un residuo aminoácido dado por un residuo que presenta características físicoquímicas similares. Entre los ejemplos de sustituciones conservativas se incluyen la sustitución de un residuo alifático por otro, tal como Ile, Val, Leu o Ala por otro, o sustituciones de un residuo polar por otro, tal como entre Lys y Arg, Glu y Asp, o Gln y Asn. Ver Zubay, Biochemistry, Addison-Wesley Pub. Co., 1983. Los efectos de dichas sustituciones pueden calcularse utilizando matrices de puntuaciones de sustituciones, tales como PAM-120, PAM-200 y PAM-250, tal como se comenta en
15 Altschul (J. Mol. Biol. 219:555-65, 1991). Otras sustituciones conservativas similares, por ejemplo sustituciones de regiones enteras que presentan características de hidrofobicidad similares, son bien conocidas.

20 Las variantes de péptidos naturales también se encuentran comprendidas en la invención. Son ejemplos de dichas variantes, proteínas que resultan de sucesos de procesamiento alternativo del ARNm o del corte proteolítico de los polipéptidos indicados en la presente memoria. Entre las variaciones atribuibles a la proteólisis se incluyen, por ejemplo, diferencias en los extremos N-terminal o C-terminal con la expresión en diferentes tipos de célula huésped debido a la eliminación proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de los polipéptidos codificados por las secuencias de la invención.

25 Las variantes de las sesquiterpeno sintasas de la invención pueden utilizarse para conseguir la actividad enzimática incrementada o reducida, regioquímica o estereoquímica modificada, o alteraciones de la utilización de sustratos o de la distribución de producto que se desea. Además, pueden prepararse variantes que presenten por lo menos una propiedad modificada, por ejemplo una afinidad incrementada para el sustrato, una especificidad mejorada para la producción de uno o más compuestos deseados, una distribución de producto diferente, una actividad enzimática diferente, un incremento de la velocidad de la reacción enzimática, una actividad o estabilidad más elevada en un medio específico (pH, temperatura, solvente, etc.) o un nivel de expresión mejorado en un sistema de expresión deseado. Puede prepararse una variante o mutante dirigido a sitio mediante cualquier procedimiento conocido de la técnica. Tal como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona polipéptidos aislados y purificados recombinantes y no recombinantes, tales como de la guayaba o de plantas de cítricos. Pueden obtenerse variantes y derivados de polipéptidos nativos mediante el aislamiento de variantes naturales, o la secuencia de nucleótidos de
30 variantes, de otras o las mismas líneas o especies de planta, o mediante la programación artificial de mutaciones de secuencias de nucleótidos codificantes de polipéptidos nativos de guayaba o de cítrico. Pueden llevarse a cabo alteraciones de la secuencia de aminoácidos nativa mediante cualquiera de entre varios procedimientos convencionales.

40 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una variante funcional de sesquiterpeno sintasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de (a) seleccionar cualquiera de los ácidos nucleicos de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 1 o nº 3, (b) alterar la secuencia de ácidos nucleicos para obtener una población de ácidos nucleicos mutantes, y (c) transformar las células huésped con el ácido nucleico mutante para expresar polipéptidos, y (d) cribar los polipéptidos para un polipéptido funcional que presenta por lo menos una propiedad modificada. La propiedad modificada puede ser cualquier propiedad deseada, por ejemplo las propiedades indicadas anteriormente. La alteración del ácido nucleico seleccionada puede llevarse a cabo mediante mutagénesis aleatoria, mutagénesis específica de sitio o reorganización del ADN, por ejemplo, La alteración puede ser por lo menos una mutación puntual, deleción o inserción. Por ejemplo, los polipéptidos que presentan una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico obtenido mediante técnicas de reorganización que implican por lo menos cualquiera de las SEC ID nº 1 o nº 3, también se encuentran comprendidas en la presente invención. Las etapas del procedimiento según la presente forma de realización de la invención, tales como el cribado de los polipéptidos para un polipéptido funcional, son conocidas por el experto en la materia, quien adaptará rutinariamente los protocolos conocidos a la propiedad modificada específica que se desea.
45

50 Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones en loci particulares mediante la síntesis de oligonucleótidos que contienen una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permiten la ligación a fragmentos de la secuencia nativa. Tras la ligación, la secuencia reconstruida resultante codifica un análogo que presenta la inserción, sustitución o deleción de aminoácido deseada. Alternativamente, pueden utilizarse procedimientos de mutagénesis específica de sitio dirigida por oligonucleótido con el fin de proporcionar un gen alterado en el que pueden alterarse codones predeterminados mediante sustitución, deleción o inserción. La presente invención comprende además ácidos nucleicos obtenidos a partir de la alteración de un ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo con el fin de obtener un polipéptido variante.
55

60 Existen varios procedimientos conocidos de la técnica para la creación de plantas transgénicas. Entre ellas se incluyen, aunque sin limitación, la electroporación de protoplastos vegetales, la transformación mediada por
65

liposomas, la transformación mediada por *Agrobacterium*, la transformación mediada por polietilenglicol, la microinyección de células vegetales y la transformación utilizando virus. En una forma de realización, se utiliza la transferencia génica directa mediante bombardeo de partículas. En otra forma de realización se utiliza la transformación mediada por *Agrobacterium*.

5 La transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el procedimiento más común utilizado para transformar plantas de cítricos. Utiliza una cepa *A. tumefaciens* atenuada que porta el gen o genes de interés en su genoma como vector para transformar células o tejidos de cítricos mediante el cocultivo durante unos cuantos días.

10 La transformación genética es utilizada de manera natural por las especies de *Agrobacterium* como sistema para insertar fragmentos de su propio ADN en las células vegetales infectadas. La expresión de los genes transferidos por las bacterias a las células vegetales lleva a la inducción de tumores de agallas de corona en plantas habitualmente en los sitios de lesiones. En *A. tumefaciens*, el ADN transferido se denomina ADN-T y reside en un megaplásmido denominado plásmido Ti (por sus siglas en inglés, inductor de tumor).

15 Los plásmidos Ti desarmados pueden manipularse mediante eliminación de los genes de ADN-T que participan en la formación de tumor. A continuación, pueden insertarse genes heterólogos con las regiones reguladoras apropiadas en una nueva región de ADN-T quimérica que una vez incorporada en las células de *Agrobacterium* que portan un plásmido Ti desarmado pueden utilizarse para integrar y expresar los genes foráneos en las células vegetales. A partir de las células vegetales transformadas resulta posible regenerar plantas transgénicas completas mediante la utilización de sistemas de cultivo de tejido estándares.

20 La transferencia génica directa mediante bombardeo de partículas proporciona otro ejemplo de transformación de tejido vegetal. En esta técnica, se dispara una partícula, o microproyectil, recubierto con ADN, a través de las barreras físicas de la célula. Puede utilizarse el bombardeo de partículas para introducir ADN en cualquier tejido diana que resulte penetrable por partículas recubiertas con ADN, aunque para la transformación estable es imperativo utilizar células regenerables. Típicamente las partículas están realizadas en oro o tungsteno. Las partículas se recubren con ADN utilizando procedimientos de precipitación con CaCl_2 o etanol que son técnicas comúnmente conocidas.

25 Se disparan partículas recubiertas con ADN con una pistola de partículas. Puede obtenerse una pistola de partículas adecuada de Bio-Rad Laboratories (Hercules, Calif.). Se controla la penetración de las partículas modificando parámetros tales como la intensidad del estallido explosivo, el tamaño de las partículas o la distancia que deben salvar las partículas para alcanzar el tejido diana.

30 El ADN utilizado para el recubrimiento de las partículas puede comprender un casete de expresión adecuado para controlar la expresión del gen de interés que comprenderá un promotor operablemente ligado al gen de interés.

35 Los procedimientos para llevar a cabo la transferencia génica directa mediante bombardeo de partículas se dan a conocer en la patente US nº 5.990.387 de Tomes et al. En una forma de realización, el ADN transfectedo se integra en un cromosoma de un organismo no humano de manera que resulta un sistema recombinante estable. Puede utilizarse cualquier procedimiento técnico conocido de integración cromosómica en la práctica de la invención, incluyendo, aunque sin limitación, el intercambio de casetes mediado por recombinasa (ICMR), la inserción cromosómica específica de sitio vírico, adenovirus y la inyección pronuclear.

40 Además de en el ejemplo operativo, o cuando se indique de otro modo, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, etc. utilizados en la memoria y reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". De acuerdo con lo expuesto anteriormente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos indicados en la memoria y reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que busca obtener la presente invención. Como mínimo absoluto, y no como intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance según las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse a la luz del número de dígitos significativos y enfoques ordinarios de aproximación.

45 Con independencia de que los intervalos y parámetros numéricos que indican el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos indicados en los ejemplos específicos se informan con la máxima precisión posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente determinados errores que resultan necesariamente de la desviación estándar observada en sus mediciones de ensayo respectivas. Los ejemplos siguientes pretenden ilustrar la invención sin limitar el alcance de la misma. Los porcentajes se expresan en peso.

50 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el significado entendido comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Aunque también pueden utilizarse cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a los indicados en la presente memoria en la práctica de la presente memoria, se indican procedimientos y materiales ejemplares con fines ilustrativos. Todas las publicaciones mencionadas en la presente solicitud se incorporan como

referencia para dar a conocer y describir los procedimientos y/o materiales en relación a los que se citan las publicaciones.

Además, las publicaciones expuestas en la presente memoria se proporcionan únicamente para la exposición de las mismas antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente memoria debe interpretarse como admisión de que la presente invención no posee el derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, las cuales podrían requerir confirmación independiente.

10 Ejemplos

Los ejemplos siguientes están destinados a ilustrar las formas de realización preferentes de la invención sin limitar el alcance de la misma como consecuencia.

15 Material

Las plantas de cítricos utilizadas en los presentes ejemplos se obtuvieron del Banco de Germoplasma de Cítricos (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia, España). Las semillas de guayaba se obtuvieron de productores locales de Vietnam y Brasil y se cultivaron en un invernadero en el IVIA. Otras fuentes disponibles de plantas maduras de guayaba son la Universitat Politècnica y el Jardí Botànic de Valencia (España).

Ejemplo 1

Análisis del contenido y emisión de compuestos volátiles en hojas de plantas de cítricos y de guayaba

Se estudió el contenido y emisión de compuestos volátiles en hojas de diferentes genotipos (*Psidium guajava*, *Citrus sinensis*, *Citrus aurantifolia* y *Citrus clementina*). Los análisis se llevaron a cabo utilizando hojas en diferentes etapas de desarrollo recogidas en diferentes horas del día y en diferentes estaciones. Se analizó cada muestra por lo menos cuatro veces (dos réplicas biológicas más dos réplicas técnicas).

Para determinar el contenido de compuestos volátiles, el tejido foliar recogido se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta la extracción. Se pesó el material congelado molido (200 mg) en tubos de Pyrex con tapón de rosca y se añadieron inmediatamente 3 ml de pentano frío. Las muestras se homogeneizaron sobre hielo durante 30 s con un homogeneizador Yellowline (modelo DI 25). La suspensión se agitó con vórtex durante 15 s y se añadieron 3 ml de agua Milli-Q, se agitaron con vórtex adicionalmente durante 30 s y se centrifugaron a 1.800 g durante 10 min. a 4°C . Se recuperó la fase orgánica con una pipeta Pasteur y la fase acuosa se reextrajo dos veces más con 3 ml de pentano. Una alícuota de 2 μl de las fases orgánicas agrupadas se inyectó directamente en el CG-EM para el análisis de los compuestos volátiles (ver posteriormente).

Debido a que el análisis del espacio de cabeza proporciona una representación más realista del perfil de compuestos volátiles emitidos por las plantas y detectados por los insectos que responden a los compuestos volátiles de plantas, se llevó a cabo un muestreo estático del espacio de cabeza con un dispositivo de microextracción en fase sólida (SPME). Las muestras de hojas se encerraron en tubos de Pyrex de tapón de rosca de 50 ml que portaban un septo en la parte superior y que contenían 1 ml de agua Milli-Q para evitar el estrés hídrico de las hojas. Se expuso la fibra de SPME (100 μm de poli(dimetil)siloxano, Supelco, Bellefonte, PA) a una temperatura controlada de 22°C , durante 1 a 4 horas. Inmediatamente después se transfirió la fibra a un inyector de CG (220°C) y se prolongó la desorción térmica durante 4 min.

Los resultados demostraron que los compuestos principales identificados en el contenido de compuestos volátiles también eran los compuestos volátiles principales emitidos por las hojas (para un ejemplo representativo, ver la fig. 2). Tal como se indica en la literatura, más del 80% de los compuestos volátiles totales contenidos y emitidos por las hojas de cítricos son monoterpenos, siendo el linaol el más abundante en todos los genotipos y fechas de muestreo analizados (fig. 3). En estas muestras, no se detectó o se detectó a niveles muy bajos β -cariofileno, y no en todas las réplicas. En las hojas de guayaba, los sesquiterpenos eran los compuestos volátiles predominantes y, en todas las muestras analizadas, el β -cariofileno constituía por lo menos 50% del total de compuestos (fig. 4).

Ejemplo 2

Análisis de CG-EM

Se utilizó un aparato Thermo Trace GC Ultra acoplado con un espectrómetro de masas Thermo DSQ con modo de ionización electrónica (IE) a 70 eV. La fuente de iones y la línea de transferencia se encontraban a 200°C y a 260°C , respectivamente. Los compuestos volátiles se separaron en una columna HP-INNOWax (Agilent J&C Columns) (30 m x 0,25 mm d.i. x película de 0,25 μm). Las temperaturas de la columna se programaron a 40°C durante 5 min., se elevaron a 150°C a $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, después se elevaron a 250°C a $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y se mantuvieron durante 2 min. a 250°C . La temperatura del inyector era de 220°C . El gas portador era helio a un caudal de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ en el modo sin

fraccionamiento. Se registraron los espectros de masas con impacto de electrones en el intervalo de 30 a 400 amu a una velocidad de escaneo de 0,5 escaneos⁻¹. Los compuestos se identificaron mediante correspondencia de los espectros de masas adquiridos con los almacenados en bibliotecas de referencia (NIST, MAINLIB, REPLIBT) o con compuestos estándares auténticos, en caso de encontrarse disponibles.

5

Ejemplo 3

Respuesta de *D. citri* a compuestos volátiles de guayaba

10 Se diseñó una serie de experimentos con el objetivo de investigar el efecto de los compuestos volátiles de la hoja de guayaba sobre el comportamiento de *D. citri*. Se obtuvieron adultos de *D. citri* de sexo mixto a partir de cultivos cultivados en continuo a partir de plántulas de *C. limonia* mantenidos en Fundecitrus (Araraquara, Brasil) a 25 ± 1°C, 70 ± 10% de humedad relativa y un fotoperiodo de L14:D10.

15 Para los ensayos de comportamiento se utilizó un olfatómetro de tubo Y con un brazo de entrada de 12,5 cm de longitud y dos brazos de ensayo de 21,0 cm de longitud (diámetro interior: 0,6 cm). Se bombeó aire filtrado (0,4 l min⁻¹) a través de carbono (granulado de 4-8 mm, Applichem GmbH, Darmstadt, Alemania) a través de dos frascos de vidrio de 2 litros que contenían las fuentes de compuestos volátiles, que consistían de aire o plántulas de guayaba. Se sometieron a ensayo 40 psíldos en cada experimento y cada experimento se llevó a cabo por lo menos por triplicado. Se determinó la posición de los psíldos tras 10 min. y aquellos que se habían desplazado 10,0 cm después de la ramificación se registraron como 'respuesta'. Los resultados demostraron que los compuestos volátiles de la guayaba repelían o inmovilizan los psíldos o limitaban el atractivo de los cítricos (fig. 6A). Se llevaron a cabo estudios adicionales utilizando un olfatómetro de cuatro brazos. El aire lavado a través de carbono se humidificó mediante el paso por un cilindro de vidrio lleno de agua y se separó en cuatro flujos (0,4 l min⁻¹) cada uno de los cuales se dirigió a uno de los cuatro campos de olfatómetro. El aire que fluía al interior del campo de ensayo del olfatómetro se pasó a través de un cilindro de vidrio (1 l) que contenía las muestras o aire limpio. Se sometieron a ensayo 40 psíldos en cada experimento, y cada experimento se llevó a cabo por lo menos por triplicado. Los resultados de guayaba frente a aire limpio indican claramente que los compuestos volátiles de guayaba presentaban un efecto repelente (fig. 6B).

20

25 También se evaluó el efecto de β-cariofileno puro (pureza>98,5%, Sigma-Aldrich, Alemania) y de α-copaeno (pureza>90,0%, Sigma-Aldrich, Alemania) sobre *D. citri* utilizando un olfatómetro de cuatro brazos. En cada observación se colocó un psílido en la parte media del olfatómetro permeado por aire procedente de cada uno de sus brazos extendidos. En dos de los brazos se bombeó aire limpio mientras que en los brazos restantes se bombeó a través de viales de vidrio que contenían 10 µl de compuestos puros. Cada observación se prolongó durante cinco min. y se registró la primera y última elecciones de cada psílido individual. Se utilizaron por lo menos 29 psíldos para estudiar la respuesta de comportamiento a cada compuesto. En el ensayo preliminar con aire limpio no se observaron diferencias significativas entre brazos, indicando que todos ellos eran equivalentes y no introducían ningún sesgo durante los ensayos de opción. Los ensayos llevados a cabo con β-cariofileno y α-copaeno mostraron un nivel más alto de psíldos que entraban en el brazo sin olor, observando el efecto repelente de dichos compuestos (tabla 1).

30

Tabla 1

	β-cariofileno	Aire limpio	X ²	p	n
Primera elección	42,3%	57,7%	1,23	0,4054	29(26)
Elección final	32,0%	68,0%*	6,48	0,0237	29(25)
	α-copaeno	Aire limpio	X ²	p	n
Primera elección	42,0%	58,0%	0,76	0,4862	34(33)
Elección final	33,0%	67,0%**	7,33	0,0138	34(33)

35

45 Tabla 1: resultados representativos de ensayos olfatométricos de tubo Y. Porcentaje de individuos que seleccionó cada compuesto en ensayos de olfatómetro de cuatro brazos que examinaban las respuestas de los psíldos al tratamiento con fuentes de olor frente a un control de aire limpio. n: tamaño total de la muestra (con el número de individuos que realizaron una selección entre paréntesis). Se compararon los datos utilizando pruebas de chi-cuadrado (*p<0,05; **p<0,01).

50

Estos resultados se reprodujeron al utilizar en ensayos olfatométricos dosis más bajas de los compuestos puros.

Ejemplo 4

55

Aislamiento de ARN total

Se recogieron hojas de plantas de cítricos y de guayaba, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se molieron utilizando un mortero. Se extrajo el ARN total utilizando el kit Qiagen RNeasy Mini. Tal como indica Keszei et al. (Phytochem. 71:844-852, 2010) se modificó el tampón de extracción mediante la adición de PVP al 2% (Sigma-

60

Aldrich) y 120 mg/ml de isoascorbato sódico (hasta la saturación) (Sigma-Aldrich) para inhibir la conjugación oxidativa de los fenólicos al ARN. Típicamente se obtuvo un promedio de 100 µg de ARN total a partir de 200 mg de tejido molido. Se estimó la concentración de ARN a partir de la DO a 260 nm. Se evaluó la integridad del ARN en un gel de agarosa mediante la verificación de la integridad de las bandas de ARN ribosómico.

Ejemplo 5

Transcripción reversa (TR) y amplificación por PCR

Se llevó a cabo la síntesis de ADNc con 1 µg de ARN total. Se llevó a cabo la TR en presencia de 500 ng de oligo-dT y 200 unidades de transcriptasa reversa SuperScript II (Gibco BRL, Alemania). Se incubaron las muestras durante 5 min. a 65°C, durante 50 min. a 42°C y durante 15 min. a 70°C. Para la amplificación por PCR, se diseñaron cebadores que contenían codones de inicio y de parada de SEC ID nº 1 y SEC ID nº 3 (tabla 2).

Tabla 2

	Cebador	Secuencia del cebador (5'→3')	Orientación
SEC ID nº 5	B27F	CACCATGTCGGCTCAAGTTC	S
SEC ID nº 6	B28R	TCAGATGGTAAACAGGGTCTC	AS
SEC ID nº 7	B27F	GCATGAGGGATGTTAAGAG	S
SEC ID nº 8	B28R	CTGTTTCTTTGAAGACTAGGC	AS

S: sentido, AS: antisentido.

Tabla 2: cebadores utilizados para amplificar los ADNc correspondientes a las secuencias SEC ID nº 5 (B25F) y SEC ID nº 6 (B26R), SEC ID nº 7 (B27F) y SEC ID nº 8 (B28R). Se han subrayado los codones de inicio y de parada.

Las condiciones del ciclador térmico fueron: 5 min. a 95°C; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 56°C y 150 s a 72°C, y finalmente 10 min. a 72°C. Se evaluaron los tamaños de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1%. Las bandas correspondientes al tamaño esperado se extrajeron del gel, se purificaron utilizando el kit de extracción de gel QIAquick™ (Qiagen) y se clonaron en pTZ57R/T (Fermentas GmbH). A continuación, los fragmentos de ADN insertados se sometieron a secuenciación de ADN y la secuencia se comparó con las de la base de datos de proteínas no redundantes GenBank (NCBI) utilizando el algoritmo BLASTX (Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. y Lipman D.J., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990).

Ejemplo 6

Construcción de plásmidos de expresión para el ensayo de actividad de la sesquiterpeno sintasa

Cada casete de expresión preparado comprendía una o más regiones de inicio de transcripción o de control transcripcional (por ejemplo un promotor), la región codificante de la proteína de interés y una región terminadora de la transcripción. Con el fin de evitar la posible toxicidad del compuesto sesquiterpeno al acumularse en un huésped microbiano, se seleccionó un promotor inducible. Para la expresión funcional de las sesquiterpeno sintasas, los ADNc se subclonaron en el vector pF3K WG (BYDV) Flexi® de Promega diseñado para la expresión in vitro de proteínas. Este vector porta el gen letal barnasa, que es sustituido por el fragmento de ADN de interés y actúa como selección positiva para la ligación con éxito de la inserción y un gen de resistencia a la canamicina para la selección de colonias bacterianas. Además, permite la clonación direccional de los productos de PCR en los sitios de restricción SgfI y PmeI. En este plásmido, se situó el ADNc cadena abajo del promotor SP6.

Se amplificaron las inserciones por PCR utilizando un oligonucleótido de PCR aminoterminal que incluía el codón de inicio y el sitio SgfI y un cebador de PCR carboxiterminal que incluía el codón de parada y el sitio PmeI (tabla 3). En el cebador directo, se añadieron seis codones de histidina en la pauta de lectura con el fin de crear una proteína etiquetada N-terminalmente. Los ADNc amplificados se purificaron y se ligaron en el plásmido pF3K WG (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Los constructos se verificaron mediante digestión y secuenciación del ADN.

Todas las amplificaciones de ADNc para la expresión se llevaron a cabo utilizando la ADN polimerasa Pfu (Promega) en un volumen final de 50 µl que contenía 5 µl de tampón 10X de ADN polimerasa Pfu, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada cebador directo e inverso, 2,9 unidades de ADN polimerasa Pfu y 5 µl de 1 µl de ADNc (preparado tal como se ha indicado anteriormente). Las condiciones de ciclación térmica fueron las siguientes: 2 min. a 95°C, 25 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 52°C y 4 min. a 72°C y 10 min. a 72°C. Los productos de PCR se purificaron en un gel de agarosa y se eluyeron utilizando el kit de extracción de gel QIAquick® (Qiagen).

Tabla 3

Cebador	Secuencia de cebador (5'→3')	Orientación
SQS5F	<i>CGCATCGCCATGCATCACCATCACCATCACGGATCCGCTCAAGTTCTAGC</i> (SEC ID nº 9)	S
SQS5R	<i>GTTTAAACTCAGATGGTAACAGGGTCTCT</i> (SEC ID nº 10)	AS

5 Tabla 3: cebadores utilizados para la clonación de SEC ID nº 1 en el vector pF3KW Flexi (Promega) correspondiente a las secuencias SEC ID nº 9 (SQS5F) y SEC ID nº 10 (SQS5R). S, sentido; AS, antisentido. Los sitios de restricción se señalan en cursiva. Los nucleótidos codificantes de HHHHHH se muestran en negrita. Los codones de inicio y de parada están subrayados.

10 Ejemplo 7

Expresión de sesquiterpeno sintasa y ensayos enzimáticos

15 En un experimento de expresión de proteínas estándar, los plásmidos de expresión que contienen el ADNc de la sesquiterpeno sintasa así como el plásmido vacío (control negativo) se transformaron en células *E. coli* XL1-Blue (Stratagene). Se utilizaron colonias individuales de *E. coli* transformadas para inocular 5 ml de medio LB. Se cultivaron cultivos líquidos de bacterias que alojaban el constructo de expresión o el plásmido vacío a 37°C hasta una DO₆₀₀ de 0,8. Se aisló el ADN de plásmido a partir de bacterias utilizando el kit miniprep QIA prep spin (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 2 µg de ADN plasmídico purificado para la transcripción/traducción in vitro en sistema de expresión sin células de extracto de germen de trigo de Promega (sistema de expresión de proteínas de germen de trigo de alto rendimiento TnT® SP6) en un volumen final de 50 µl. Tras la incubación a 25°C durante 2 horas se confirmó la producción de proteína analizando una alícuota de 1 µl mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) y transferencia western utilizando procedimientos estándares. Se sondearon membranas de nitrocelulosa con anticuerpo monoclonal anti His G HRP de Invitrogen.

25 Se llevaron a cabo los ensayos enzimáticos en tubos de vidrio de 15 ml sellado con teflón utilizando 49 µl de extracto de proteína en un volumen final de 1 ml de tampón de reacción (tampón de fosfato potásico 25 mM, pH 6,8; MgCl₂ 10 mM, MnSO₄ 1 mM y DTT 1 mM) complementado con FPP 100 µM (Sigma). Sobre el medio se aplicó 1 ml de pentano para atrapar los productos volátiles y los tubos se incubaron durante la noche a 30°C. Se recuperó la fase de pentano, que contenía el sesquiterpeno, y el medio se extrajo con un segundo volumen de pentano. Se analizaron 2 µl de las fracciones de pentano agrupadas, mediante cromatografía de gases tal como se ha indicado anteriormente. De esta manera, se atribuyó la actividad de cariofileno sintasa a la secuencia SEC ID nº 2 (fig. 5).

35 Ejemplo 8

Aislamiento de secuencias parciales correspondientes a las sesquiterpeno sintasas utilizando RT-PCR

40 Las secuencias de aminoácidos deducidas de las β-cariofileno sintasas vegetales se alinearon para identificar regiones conservadas y diseñar oligonucleótidos específicos de β-cariofileno sintasa vegetal (fig. 7). Se obtuvieron de la base de datos NCBI secuencias de aminoácidos de sesquiterpeno sintasas vegetales con actividad demostrada de β-cariofileno sintasa. El análisis de homología mostró una identidad de proteína baja (aproximadamente 21%) entre las β-cariofileno sintasas vegetales conocidas. Sin embargo, se encontró una homología más alta al separar las secuencias de proteína en dos grupos (fig. 8). El primer grupo (fig. 8A) contenía las secuencias de las β-cariofileno sintasas de plantas dicotiledóneas, tales como *Arabidopsis* (Chen et al., Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers, *Plant Cell* 15:481-494, 2003; Tholl et al., Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers, *The Plant J.* 42:757-771, 2005), el pepino (Mercke et al., Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants, *Plant Phys.* 135:2012-2024), *Mikania micrantha* (Wang et al., Cloning, expression and wounding induction of β-caryophyllene, *Allelopathy J.* 24:35-44, 2009) y *Artemisia annua* (Cai et al., A cDNA clone for β-caryophyllene synthase from *Artemisia annua*, *Phytochem.* 61:523-529, 2002). El segundo grupo (fig. 8B) contenía secuencias de β-cariofileno sintasas de plantas monocotiledóneas tales como el maíz (Kollner et al., A maize (E)-β-caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most american maize varieties, *The Plant Cell* 20:482-494, 2008) y el arroz (Cheng et al., The rice (E)-β-caryophyllene synthase (OsTPS3) accounts for the major inducible volatile sesquiterpenes, *Phytochem.* 68:1632-1641, 2007). Las β-cariofileno sintasas de las monocotiledóneas presentaban una identidad global de 47%, las β-cariofileno sintasas de *M. micrantha* y de *Artemisia annua* mostraban una homología de 58%, mientras que las de *Arabidopsis* y el pepino mostraban una identidad baja (aproximadamente de 17%) respecto al resto de secuencias de aminoácidos. Con el fin de conocer mejor las sesquiterpeno sintasas de cítricos, se alinearon las secuencias de aminoácidos de la base de datos de NCBI con β-cariofileno sintasas de plantas dicotiledóneas (fig. 9). Las secuencias utilizadas para el análisis eran la (E)-β-

farneseno sintasa de *Citrus junos* (AAK54279), la terpeno sintasa putativa de *Citrus junos* (AAG01339), la terpeno sintasa putativa de *Citrus paradisi* (AAM00426) y la valenceno sintasa de *Citrus sinensi* (AAQ04608). El motivo de unión a ión metálico (DDxxD) y el dominio RRx₃W, ambos característicos de las sesquiterpeno sintasas vegetales (tanto monocotiledóneas y dicotiledóneas) se identificaron en todas las secuencias peptídicas. Además, se identificaron otros aminoácidos conservados, localizados mayoritariamente en la región central de las secuencias. Basándose en dichas secuencias conservadas entre plantas, se diseñaron cebadores degenerados de las β-cariofileno sintasas y sesquiterpeno sintasas de cítricos (subrayados en la fig. 9) con el fin de aislar la β-cariofileno sintasa de las plantas de guayaba. Se proporciona una secuencia detallada de dichos cebadores en la tabla 4. Se encontró la homología de secuencia más alta en la parte central de las secuencias. Se seleccionaron tres regiones que contenían aminoácidos suficientemente conservados y se diseñaron oligonucleótidos degenerados específicos para dichas regiones (es decir, se dedujeron cuatro cebadores directos (CSF1A, CSF1B, CSF2 y CSF3) y tres cebadores inversos (CSR3, CSR2 y CSR1) (tabla 4). Se amplificaron, clonaron y secuenciaron secuencias parciales siguiendo procedimientos estándares. Basándose en estas secuencias, se diseñaron nuevos cebadores y se llevó a cabo la amplificación de los extremos 5' y 3' utilizando el kit 5'/3' RACE (Roche, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 4

	Cebador	Secuencia de cebador (5' → 3')	Orientación
SEC ID nº 11	CSF1A	TKGGKGTRKCKTATCAYTTTGA	S
SEC ID nº 12	CSF1B	GGAGTRKCMYATTTTGA	S
SEC ID nº 13	CSF2	GGATGTTAAGTTTGTAYGARGC	S
SEC ID nº 14	CSF3	GATGAYACWTWTGACGCKTAYGG	S
SEC ID nº 15	CSR3	CCRTAMGCGTCAWTWGTRTCATC	AS
SEC ID nº 16	CSR2	TCCTCATTCATATCTTTCCA	AS
SEC ID nº 17	CSR1	CTATCTCTTGCAAAGG	AS

S, sentido; AS, antisentido. K: G o T; R: A o G; M: C o A; W: T o A; Y: T o C.

Tabla 4: CSF1A, CSF1B, CSF2, CSF3 y CSR1, CSR2 y CSR3 son cebadores diseñados basándose en motivos conservados con el fin de amplificar secuencias parciales correspondientes a sesquiterpeno sintasas. FPPF y FPPR son cebadores diseñados para amplificar la FPP sintasa de *Arabidopsis thaliana*.

25 Ejemplo 9

Aislamiento de las secuencias de longitud completa correspondientes a los genes de sesquiterpeno sintasa. 3'- y 5'-RACE

Se llevó a cabo la síntesis de ADNc de primera cadena a partir de tejidos de hojas y amplificaciones por PCR, tal como se ha indicado anteriormente. Para la PCR se utilizaron combinaciones de cebadores sentido y antisentido detalladas en la tabla 3. Los productos de PCR se ligaron en pTZ57R/T (Fermentas GmbH) y se secuenciaron. La información de secuencia permitió una rápida amplificación de los extremos del ADNc mediante la estrategia de RACE-PCR utilizando el kit 5'/3' RACE (Roche, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Por ejemplo, CSF1B y CSR1 amplificaron una banda de 621 pb con elevada homología respecto a los genes de sesquiterpeno sintasa de la base de datos del NCBI. Basándose en esta secuencia, se diseñaron nuevos cebadores específicos para la amplificación de extremo 5' (B62R y B63R) y para la amplificación de extremo 3' (B61F) (fig. 10). Para la amplificación de extremo 5', se sintetizó ADNc de primera cadena utilizando el cebador específico CSR1 (tabla 4). Se añadió una cola A homopolimérica al extremo 3' del ADNc purificado y después se amplificó por PCR utilizando el cebador específico de gen B62R y un cebador de anclaje oligo-dT específico. Se amplificó una banda de aproximadamente 800 pb, se purificó en gel con el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen) y se amplificó adicionalmente mediante una segunda PCR utilizando el cebador anidado específico de gen B63R y el cebador de anclaje de PCR. El producto de amplificación (700 pb) se purificó a partir del gel de agarosa, se ligó en pTZ57R/T (Fermentas GmbH) y se secuenció. Para la amplificación de extremo 3', se sintetizó el ADNc utilizando un cebador de anclaje oligo-dT y se llevó a cabo la amplificación por PCR con cebador de anclaje de PCR y el cebador específico de gen B61F. Se purificó el producto de amplificación (900 pb) a partir del gel de agarosa, se ligó en pTZ57R/T (Fermentas GmbH) y se secuenció.

Las secuencias obtenidas en primer lugar se compararon con la base de datos de proteínas no redundantes GenBank (NCBI) utilizando el algoritmo BLASTX (Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. y Lipman D.J., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990) y después se compararon con la secuencia de ADN inicial para garantizar que se obtenía un solapamiento significativo de la secuencia de ADN.

Ejemplo 10

Clonación de FPPS y péptidos de tránsito

Con el objetivo de incrementar adicionalmente el contenido y emisión de sesquiterpenos en plantas de cítricos transgénicas, se introdujo un casete de gen de FPP sintasa en plásmidos binarios para la transformación de las plantas (ver posteriormente). Una estrategia similar fue adoptada por Wu et al. (Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nature Biotech.* 24:1441-1447, 2006), quienes utilizaron la coexpresión transgénica de FPP sintasa y amorfadieno sintasa en plastidios para la síntesis exitosa a nivel elevado de amorfadieno en plantas de tabaco transgénico (*Nicotiana tabacum*). Hasta hoy no se ha aislado ninguna FPP sintasa a partir de cítricos, aunque una secuencia de nucleótidos de la base de datos CFGP (Citrus Functional Genomic Project), la aCL9351contig1, presenta una identidad elevada (78%; homología de 87%) respecto a una FPP sintasa de *Arabidopsis* (nº de acc. X75789). Con el fin de seleccionar un gen de FPP sintasa, se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos pública del NCBI. La proteína FPP sintasa se encuentra altamente conservada en las plantas dicotiledóneas. Por ejemplo, las proteínas FPP sintasas de dichas especies no relacionadas, tales como *Arabidopsis* (nº de acc. Q09152), *Malus domestica* (nº de acc. AAM08927), *Vitis vinifera* (nº de acc. AAX76910), *Gossypium hirsutum* (nº de acc. CAA72793) y *Hevea brasiliensis* (nº de acc. AAM98379) muestran una identidad global de 79% (homología de 89%). La identidad de las proteínas FPP sintasa de las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas también es elevada. Por ejemplo, la FPPS de *Zea mays* (nº de acc. AC634051) es idéntica al 71% (similar al 85%) a la de *Arabidopsis*. Finalmente, el elevado grado de similitud entre las FPPS de plantas y las FPPS de otros reinos, por ejemplo la FPPS de *Saccharomyces cerevisiae* (nº de acc. EDN63217) es 66% homóloga respecto a la de *Arabidopsis*, sugiere que esta proteína se encuentra muy conservada durante la evolución. De esta manera, se creía que cualquier FPPS de una planta dicotiledónea resultaba adecuada para incrementar la producción de FPP en las plantas de cítricos. Debido a que las de *Arabidopsis* han sido bien caracterizadas y su actividad ha sido demostrada (Cunillera et al., *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl diphosphate synthase genes, *J. Biol. Chem.* 221:7774-780, 1996), se diseñaron cebadores basados en la secuencia de AtFPS1 (nº de acc. X75789) con el fin de amplificar un ADNc de longitud completa codificante de una FPP sintasa funcional (fig. 11). Se extrajo el ARN total de hojas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) utilizando el minikit RNeasy de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante y se sintetizó el ADNc tal como se ha indicado anteriormente. Se llevó a cabo la amplificación del ADNc utilizando la ADN polimerasa *Pfu* (Promega) y la misma mezcla de reacción indicada anteriormente. Las condiciones de ciclación térmica eran: 2 min. a 95°C; 30 ciclos de 30 s y 95°C, 30 s a 50°C y 1,5 min. a 72°C y 10 min. a 72°C. El producto de PCR se purificó a partir del gel de agarosa con el kit de extracción del QIAquick® (Qiagen) ligado en pTZ57R/T (Fermentas GmbH) y se confirmó su identidad mediante secuenciación.

Aparte de lo anterior, el desplazamiento de la biosíntesis de sesquiterpenos del citosol a plastidios o mitocondrias puede mejorar los resultados de la manipulación metabólica. En primer lugar, lo anterior puede evitar posibles efectos perjudiciales de la acumulación de sesquiterpenos en el citosol y, en segundo lugar, evitando la competición por el FPP citosólico entre la sesquiterpeno sintasa introducida y las proteínas endógenas que emplean FPP se lograría una cantidad adecuada de sustrato para la ruta manipulada sin comprometer el crecimiento de la planta. Esta estrategia ha sido utilizada con éxito anteriormente, por Wu et al. (Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants, *Nature Biotech.* 24:1441-1447, 2006), quienes han llevado a cabo la coexpresión transgénica de FPP sintasa y de amorfadieno sintasa en plásticos para la síntesis exitosa de nivel elevado de amorfadieno en plantas de tabaco transgénicas (*Nicotiana tabacum*). El cambio de la localización subcelular de la sesquiterpeno sintasa introducida a la mitocondria también ha sido utilizada anteriormente por Kappers et al. (Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*, *Science* 309:2070-2072, 2005), quienes han informado de que el FPP se encuentra fácilmente disponible en este orgánulo para la biosíntesis de sesquiterpenos.

El péptido de tránsito (PT) de la subunidad pequeña de Rubisco (SSU) de *Pisum sativum* (nº de acc. X00806) se sintetizó como tres fragmentos oligonucleótidos solapantes y posteriormente se amplió mediante PCR introduciendo los sitios de restricción NdeI y ClaI en los extremos 5' y 3', respectivamente, de los mismos. El producto de PCR se ligó en pTZ57R/T (Fermentas GmbH), generando el plásmido pTZ-TPssu, y se secuenció. Se sintetizó la secuencia CoxIV (de *Saccharomyces cerevisiae*, nº de acc. X01048) como dos fragmentos oligonucleótidos complementarios y posteriormente se amplió mediante PCR introduciendo los sitios de restricción NdeI y ClaI en los extremos 5' y 3', respectivamente, de los mismos. El producto de PCR se ligó en pTZ57R/T (Fermentas GmbH), generando el plásmido pTZ-mTP, y se secuenció.

Ejemplo 11

Construcción de vector de expresión

Para generar los vectores de expresión, se utilizaron los plásmidos pMOG 180 (Mogen International, resistencia a la ampicilina) y el vector binario pROK (resistencia a la canamicina, Invitrogen), portadores ambos de las secuencias

de promotor constitutivo CaMV 35S y de terminador nopalina sintasa (NOS). El ADN-t de pROK también portaba el gen de la neomicina fosfotransferasa II (NPTII) bajo el control de las secuencias de promotor y terminador NOS.

5 Las sesquiterpeno sintasas clonadas y FPPS1 se amplificaron mediante PCR a partir de pTZ57R/T (Fermentas GmbH) añadiendo sitios de restricción convenientes para la ligación de los péptidos de tránsito (NdeI, ClaI) y en el vector pMOG (BamHI), se ligaron nuevamente en pTZ57R/T (Fermentas GmbH) y se secuenciaron, generando los plásmidos pTZ-CsCS+rest, pTZ-PgCS+rest, pTZ-CsCoS+rest, pTZ-PgCoS+rest y pTZ-FPPS+rest. Todos estos plásmidos y los que portan los péptidos de tránsito (pTZ-TPssu y pTZ-mtTP, ver el ejemplo, anteriormente) se sobredigirió 10 veces con los enzimas de restricción NdeI y ClaI de Takara (Shuzo, Co., Ltd.). Los fragmentos digeridos de tamaño adecuados se extrajeron del gel de agarosa y se purificaron utilizando el kit de extracción de gel QIAquick® (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la desfosforilación de los plásmidos con fosfatasa antártica (New England Biolabs), se llevó a cabo la ligación de los fragmentos correspondientes a ambos péptidos de tránsito con ligasa de T4 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se comprobó la correcta orientación y mantenimiento de los ORF de las inserciones mediante secuenciación y digestión. Los plásmidos resultantes que alojaban TPssu para la importación a plástidos se denominaron pTZ-TPssu-CsCS, pTZ-TPssu-PgCS, pTZ-TPssu-CsCoS, pTZ-TPssu-PgCoS y pTZ-TPssu-FPPS, mientras que aquellos con señal de importación mitocondrial se denominaron pTZ-mtTP-CsCS, pTZ-mtTP-PgCS, pTZ-mtTP-CsCoS, pTZ-mtTP-PgCoS y pTZ-mtTP-FPPS. Los plásmidos con FPPS, que incluían o no incluían péptido de tránsito, se sobredigirieron 10 veces con BamHI y se ligaron entre el promotor CaMV 35S y el terminador nopalina sintasa ((NOS) del vector pMOG 180. Los plásmidos resultantes se denominaron pMOG-FPPS, pMMOG-TPssu-FPPS y pMOG-mtTP-FPPS. La correcta orientación y mantenimiento de los ORF de las inserciones se comprobaron mediante secuenciación y digestión. Los casetes de dichos tres plásmidos se amplificaron mediante PCR con cebadores específicos para el promotor CaMV 35S y el terminador NOS que contenían los sitios de restricción AseI para fines de subclonación. Los productos de PCR se sobredigirieron con AseI y se ligaron en el vector pROK, generando los vectores pROK-FPPS, pROK-TPssu-FPPS y pROK-mtTP-FPPS. Los ORF de los genes de sesquiterpeno sintasa se amplificaron a partir de pTZ-CsCS, pTZ-TPssu-CsCS, pTZ-mtTPCsCS, pTZ- CsCoS, pTZ-TPssu- CsCoS, pTZ-mtTP- CsCoS, pTZ-PgCS, pTZ-TPssu-PgCS, pTZ-mtTP-PgCS, pTZ-PgCoS, pTZ-TPssu-PgCoS y pTZ-mtTP-PgCoS con cebadores específicos para el plásmido pTZ57R/T que contenía el sitio de restricción XbaI.

30 Los productos amplificados se purificaron en gel, se sobredigirieron con XbaI (New England Biolabs) y se ligaron en los vectores de expresión pROK, pROK-FPPS, pROK-TPssu-FPPS y pROK-mtTP-FPPS. Se comprobó la correcta orientación y mantenimiento de los ORF de las inserciones mediante secuenciación y digestión. Los plásmidos resultantes que expresaban los péptidos sesquiterpeno sintasa dirigidos al citosol se denominaron pROK-CsCs, pROK-CsCoS, pROK-PgCS y pROK-PgCoS. Los plásmidos resultantes que expresaban FPPS más un péptido sesquiterpeno sintasa, ambos dirigidos al citosol, se denominaron pROK-FPPS-CsCs, pROK-FPPS-CsCoS, pRQK-FPPS-PgCS y pROK-FPPS-PgCoS. Los plásmidos que expresaban péptidos sesquiterpeno sintasa dirigidos a cloroplastos se denominaron pROK-TPssu-CsCs, pROK-TPssu-CsCoS, pROK-TPssu-PgCS, pROK-TPssu-PgCoS, mientras que los que expresaban péptidos sesquiterpeno sintasa dirigidos a la mitocondria se denominaron pROK-mtTP-CsCs, pROK-mtTP-CsCoS, pROK-mtTP-PgCS y pROK-mtTP-PgCoS. Los plásmidos resultantes que expresaban FPPS más un péptido sesquiterpeno sintasa, ambos dirigidos al cloroplasto, se denominaron pROK-TPssu-FPPS-TPssu-CsCs, pROK-TPssu-FPPS-TPssu-CsCoS, pROK-TPssu-FPPS-TPssu-PgCS, pROK-TPssu-FPPS-TPssu-PgCoS. Los plásmidos resultantes que expresaban FPPS más un péptido sesquiterpeno sintasa, ambos dirigidos a la mitocondria, se denominaron pROK-mtTP-FPPS-mtTP-CsCs, pROK-mtTP-FPPS- mtTP-CsCoS, pROK-mtTP-FPPS-mtTP-PgCS y pROK-mtTP--FPPS-mtTP-PgCoS.

45 Cada constructo se incorporó mediante electroporación en células competentes para *A. tumefaciens*. Se utilizó NPTII como gen de marcador seleccionable, ya que su expresión proporciona a las células vegetales resistencia a los antibióticos aminoglucósidos, tales como canamicina, neomicina, geneticina y otros.

50 **Ejemplo 12**

Transformación de las plantas de cítricos con un gen de sesquiterpeno sintasa de la guayaba o de cítrico

55 Se transformaron naranjos dulces (*Citrus sinensis* L. Osb.) variedades Valencia y Pera con un gen de β -cariofileno sintasa o un gen de α -copaeno sintasa de naranjo dulce o de *Psidium guajava*, bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S y el terminador nopalina sintasa (NOS).

60 Se utilizó la cepa EHA 105 de *A. tumefaciens* en el presente ejemplo para la transformación de explantes de cítricos maduros. Las bacterias se cultivaron durante la noche en un agitador orbital a 28°C y 200 rpm en medio de cultivo (LB) que contenía los antibióticos apropiados para cultivar los sistemas binarios. Se sedimentaron las células bacterianas a 3.500 rpm durante 10 min., se resuspendieron y se diluyeron hasta 4×10^7 o 4×10^8 células/ml en medio de inoculación líquido, que consistía de solución salina MS, hidrocloreuro de tiamina 0,2 mg/l, hidrocloreuro de piridoxina 1 mg/l, ácido nicotínico 1 mg/l y sacarosa al 3% (p/v), pH 5,7.

65 Para la transformación de tejidos maduros de naranjo dulce, se recogieron brotes de árboles mantenidos en un invernadero y se injertaron en plántulas de un portainjertos vigoroso bajo condiciones de invernadero (18°C a 27°C)

y se utilizaron brotes recién alargados como material de partida. Se deshojaron trozos de tallo (20 cm de longitud) y las espinas se desinfectaron durante 10 min en una solución de hipoclorito sódico al 2% (v/v) y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Los segmentos de tallo internodales (de 1 cm de longitud aproximadamente) se cortaron transversalmente y se incubaron durante 15 min. en placas de 10 cm de diámetro que contenían 15 ml de la suspensión bacteriana en medio de inoculación mediante agitación suave. Los explantes infectados se secaron sobre papel de filtro estéril y se depositaron horizontalmente sobre placas con el medio de cocultivo durante un periodo de cocultivo de 3 días. El medio de inoculación consistía de 4,3 g/l de sales MS, 10 ml/l de solución madre de vitaminas y 30 g/l de sacarosa, pH 5,7, 10. El medio de cocultivo consistía de medio de inoculación más 2,4-D 2 mg/l, IAA 2 mg/l, 2,i-P 1 mg/l y agar 8 g/l, pH 5,7.

Tras el cocultivo, los explantes se secaron sobre papel de filtro estéril y se transfirieron a medio de regeneración de brotes (MRB), que consistía de sales MS, hidrocloreuro de tiamina 0,2 mg/l, hidrocloreuro de piridoxina 1 mg/l, ácido nicotínico 1 mg/l, sacarosa al 3% (p/v), agar al 1% (p/v), pH 5,7, más canamicina 100 mg/l para la selección de los brotes transgénicos y 250 mg/l de vancomicina y 500 mg/l de cefotaxima para el control del crecimiento bacteriano. Dicho medio se complementó con 3 mg/l de BAP. Los cultivos se mantuvieron en la oscuridad durante 4 semanas a 26°C y después se transfirieron a un fotoperiodo de 16 h, iluminación de 45 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 26°C.

Se extrajeron de los explantes los brotes regenerados a partir de explantes cultivados en el medio de selección que contenía canamicina y se cortaron en dos trozos. La parte basal se sometió a ensayo de PCR y, en el caso de que la reacción fuese positiva para el gen de interés, se injertó la parte apical in vitro en una plántula cultivada in vitro decapitada no transgénica. Aproximadamente 3 a 4 semanas después del injerto de púa terminal, las plántulas se injertaron nuevamente en un portainjertos de plántula vigoroso en un invernadero a una temperatura de entre 18°C y 27°C.

Los procedimientos para transformar tejidos maduros de cítrico se dan a conocer en la patente US nº 6.103.955 de Peña et al. La transformación resultó en plantas que producían cantidades elevadas de β -cariofileno o α -copaeno, constitutivamente. Se seleccionaron tres líneas transformadas independientemente, basándose en dicha característica. Los bioensayos de comportamiento en olfatómetros revelaron que las plantas de cítricos transgénicos no atraían sino que repelían los psílidos de cítricos.

Ejemplo 13

Producción de β -cariofileno y α -copaeno y la utilización de los mismos para repeler *Diaphorina citri* en el campo mediante un sistema de administración lenta

El β -cariofileno es un compuesto extendido en el reino vegetal, es decir se encuentra presente en muchas oleorresinas de la mayoría de coníferas de la familia de las pináceas. Sin embargo, dicho sesquiterpeno se produce típicamente con una abundancia baja en el organismo huésped. El aceite del árbol del clavo *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum*) contiene β -cariofileno en una cantidad considerable y sirve como fuente de preparación para el aislamiento de dicho compuesto. El α -copaeno se encuentra como componente menor en los aceites esenciales de las hojas de diversas especies vegetales, tales como la guayaba, mientras que es abundante en raíces y semillas de copaiba (*Copaifera officinalis* (Jacq) L.) y de angélica (*Angelica archangelica* L.) (Jacobson et al., Optical isomers of α -copaene derived from several plant sources, J. Agric. Food Chem. 35(5):798-800, 1987).

Actualmente, a pesar de la utilización de técnicas modernas, el aislamiento de dichos sesquiterpenos a partir de fuentes vegetales adolece de bajos rendimientos y un consumo elevado de recursos naturales (es decir, Quispe-Condori et al., Obtaining β -caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by supercritical fluid extraction, J. of Supercritical Fluids 46:27-32, 2008; Jacobson et al., Optical isomers of α -copaene derived from several plant sources, J. Agric. Food Chem. 35(5):798-800, 1987). Además, la concentración de β -cariofileno y de α -copaeno en las plantas depende de factores difíciles de controlar, tales como las condiciones climáticas y las enfermedades vegetales. Por otra parte, aunque se consiguió la síntesis del β -cariofileno hace décadas (Corey et al., Total synthesis of d,1-caryophyllene and d,l-iscaryophyllene, J. Am. Chem. Soc. 86:485-492, 1964), todavía resulta difícil de escalar a la producción industrial.

De esta manera, la presente invención proporciona además procedimientos de biosíntesis y manipulación metabólica del β -cariofileno y el α -copaeno con el objetivo de desarrollar procedimientos de buena relación coste-eficacia para la producción estable a gran escala y de calidad consistente.

Una estrategia alternativa atractiva es manipular rutas metabólicas para la producción de β -cariofileno en un huésped diverso. Incluso en una célula, que no puede sintetizar sesquiterpenos, contiene farnesil pirofosfato en el caso de que sintetice esteroides o terpenos. Debido a que toda célula contiene por lo menos esteroides o terpenos, en teoría prácticamente todos los huéspedes son capaces de sintetizar sesquiterpenos utilizando las secuencias de ADN de la presente invención en la medida en que se encuentra disponible un sistema de huésped-vector adecuado. Se conocen sistemas de huésped-vector, por ejemplo, para plantas tales como *Nicotiana tabacum*, *Petunia hybrida* y similares, microorganismos tales como bacterias, por ejemplo *Escherichia coli*, *Zymomonas*

mobilis y similares, levaduras, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* y similares, y hongos (por ejemplo especies de ascomicetos y basidiomicetos).

5 La manipulación de la producción del β -cariofileno en un huésped heterólogo puede requerir la disponibilidad de su precursor (FPP) en cantidad suficiente para evitar la competencia por el pool de FPP por enzimas exógenos y endógenos que utilizan FPP que podría resultar en efectos perjudiciales. Con este fin, resultarían eficientes varios enfoques: (i) el cambio de la compartimentación celular del enzima de citosol a mitocondrias o plastidios utilizando señales de tránsito peptídicas conocidas (es decir, Kappers et al., Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*, Science 309:2070-2072, 2005), (ii) coexpresar los genes de la β -cariofileno sintasa y la FPP sintasa (es decir, Wu et al., Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants, Nature Biotechnology 24:1441-1447, 2006), (iii) manipular el huésped con una ruta MVA/MEP heteróloga (es decir, Yu et al., Molecular cloning and functional characterization of α -humulene synthase, a possible key enzyme of zerumbone biosynthesis in shampoo giner (*Zingiber zerumbet* Smith), Planta 227:1291-1299, 2008), (iv) incrementar la expresión de HMGR, una etapa putativa limitadora de la velocidad en la ruta de MVA, (v) optimizar el flujo por la ruta MEP, es decir, la regulación positiva de DXR en plantas de menta transgénicas resultó en un incremento de 50% del rendimiento de aceite esencial (Mahmoud y Croteau, Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:8915-8920, 2001). También podrían utilizarse combinaciones de dichos enfoques, es decir, la coexpresión de los genes de la β -cariofileno sintasa y de la FPP sintasa, desviando simultáneamente el compartimiento subcelular de ambas enzimas. Además, la optimización del gen de la β -cariofileno sintasa para reflejar el sesgo en el uso de codones del huésped podría incrementar la producción de β -cariofileno en algunos organismos.

25 Con el fin de expresar las secuencias de ADN de la presente invención en un huésped, resulta necesario insertar los genes en un vector para introducirlos en el huésped. Pueden utilizarse cualquiera de entre diversos vectores conocidos, tales como pBIN19, pC2200, pROK o similares para las células vegetales (*Nicotiana tabacura* y *Petunia hybrida*), pC19, pET101 o similares para *E. coli*, y *YEpl3* o similares para levaduras.

30 Además, resulta necesario transcribir las secuencias de ADN de la presente invención en el ARNm en el huésped. Con este fin puede utilizarse en la presente invención una diversidad de promotores, tales como CaMV35S, NOS, TR1', TR2' (para plantas); lac, Tc', CAT, trp (para *E. coli*); Tc', CAT (para *Zymomonas mobilis*); ADH1, GAL7, PGK, TRP1 (para levaduras) y similares. En el caso de los huéspedes procarióticos, resulta necesario introducir un sitio de unión ribosómica (secuencia SD en *E. coli*) varios nucleótidos cadena arriba del codón de inicio (ATG).

35 La transformación del huésped con el vector obtenido de esta manera puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento apropiado, que se utiliza convencionalmente en los campos de la manipulación genética o de la biología celular. Pueden utilizarse como referencias publicaciones o revisiones apropiadas, por ejemplo para la transformación de microorganismos, T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

40 Las condiciones de cultivo de los transformantes son esencialmente las mismas que las utilizadas comúnmente para el huésped no transformado. Podría mejorarse el rendimiento de los cultivos microbianos en el caso de que se eliminase el β -cariofileno de los biorreactores, es decir, utilizando resinas de intercambio iónico o pervaporación de cultivos microbianos o destilación de hojas.

45 Se aplica β -cariofileno puro a una resina de PV que conserva y libera el compuesto químico. Esta resina se aplica directamente en árboles de cítricos en los huertos. Presenta la propiedad de liberar el compuesto durante un periodo de 3 a 4 meses. Los dispensadores de PVC-resina para los estudios de tasa de liberación se preparan mezclando 40% en peso de copolímero en emulsión de cloruro de vinilo/acetato de vinilo (Vinnol E5/65C, Wacker Chemicals Ltd., Reino Unido) con una mezcla 1:1 de los plastificadores Cereclor (S45, ICI Ltd., Reino Unido) y di-(2-etilhexil)-ftalato (DEHP, Sigma Aldrich Ltd., Reino Unido). En los compuestos químicos de interés se incluye un antioxidante y el filtro de UV negro Waxoline (WB, ICI Ltd., Reino Unido), los cuales son añadidos al prepolímero según se requiera, típicamente 1% en peso de cada uno. Se mezcla el prepolímero y se desgasifica en un evaporador rotatorio durante 1 h bajo vacío; se vierte en un molde compuesto de dos placas de vidrio con espaciadores adecuados (0,1 cm) y se cura mediante calentamiento a 150°C durante 15 min. Las láminas de PVC resultantes se sacan de los moldes y se cortan en cuadrados de 1 cm.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para el controlar el Huanglongbing (HLB) en plantas de cítricos que comprende expresar por lo menos un gen aislado que codifica un polipéptido que presenta actividad de β -cariofileno sintasa y/o de α -copaeno sintasa en plantas de cítricos para producir β -cariofileno, α -copaeno adicionales o combinaciones de los mismos con el fin de repeler los insectos psílidos *Diaphorina citri* y/o *Tryoza erytrae* para controlar el HLB.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que al menos uno de los citados genes aislados presenta una o más mutaciones en comparación con su forma natural, en el que el polipéptido codificado por al menos uno de los citados genes aislados conserva la actividad de β -cariofileno sintasa y/o de α -copaeno sintasa.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la expresión de al menos uno de los citados genes aislados está conducida por las regiones promotoras y de terminación constitutivas.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la expresión de al menos uno de los citados genes aislados está conducida por una región reguladora heteróloga que proporciona una expresión constitutiva fuerte, específica de tejido o inducible.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la región reguladora heteróloga proporciona una expresión fuerte en el citosol, los cloroplastos o las mitocondrias.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además expresar un gen que codifica una farnesil pirofosfato sintasa para aumentar la acumulación del β -cariofileno, α -copaeno o combinaciones de los mismos producidos por el polipéptido que presenta actividad de β -cariofileno sintasa y/o α -copaeno sintasa.
- 35 7. Procedimiento para controlar la enfermedad Huanglongbing (HLB) de las plantas de cítricos que comprende aplicar β -cariofileno, α -copaeno purificados, o combinaciones de los mismos, que repele los insectos psílidos *Diaphorina citri* y/o *Tryoza erytrae*, a plantas de cítricos para controlar la enfermedad HLB de las plantas de cítricos.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el β -cariofileno, el α -copaeno purificados, o combinaciones de los mismos se purifican a partir de un organismo seleccionado de entre el grupo que consiste en plantas, bacterias y levaduras, o sus contrapartes modificadas genéticamente que pueden sobreproducir β -cariofileno, α -copaeno o combinaciones de los mismos.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el β -cariofileno, el α -copaeno purificados, o combinaciones de los mismos se purifican a partir de la planta de la guayaba.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el β -cariofileno, el α -copaeno purificados, o combinaciones de los mismos se purifican a partir de extractos de hojas, frutos o tallos de la planta de la guayaba.
11. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el β -cariofileno, α -copaeno purificados, o combinaciones de los mismos se aplican a las plantas de cítricos mediante sistemas de liberación lenta.

SEC ID n° 1

1 ATGTCCGCTC AAGTTCTAGC AACGGTTTCC AGTTCAACAG AAAAACTGT TCGTCCCATT
61 GCTGGTTTCC ATCCTAACTT ATGGGGAGAC TATTTCTGA CCCTCGCTTC TGATGCAAG
121 ACAAATGATA CTACGCACCA AGAGGAATAC GAAGCGCTGA AGCAAGAAGT CAGAAGCATG
181 ATAACGGCTA CGGCAGATAC ACCTGCCCAG AAGTTGCAAT TGGTTGATGC AGTCCAACGA
241 TTGGGTGTGG CCTATCACTT CGAACAGGAG ATAGAAGATG CAATGGAAAA GATTTATCAC
301 GATGACTTTG ATAATAACGA TGATGTCGAT CTCTACACTG TTTCTCTTCG TTTTCGACTG
361 CTTAGGCAGC AAGGATTTAA GGTTCGGTGT GATGTGTTTCG CGAAGTTCAA AGATGATGAA
421 GGTAAATTC AAGGCATCATT GGTGCAGGAT GTTCATGGCA TTCTAAGTTT GTATGAGGCA
481 GGACACTTGG CCATTCGCGG AGAAGGGATA TTAGATGAAG CCATTGCTTT CACTAGAACT
541 CACCTTCAGT CAATGGTATC TCAGGATGTA TGCCCTAATA ATCTTGCTGA ACAAATTAAT
601 CATACTCTCG ACTGTCCTCT CCGCAGAGCC CTTCCAAGAG TGGAGACAAG ATTTTCTTG
661 TCTGTCTATC CAAGAGATGA TAAACACGAT AAAACTTTGT TAAAGTTTTC AAAGTTAGAC
721 TTTAACCATG TGCAAAGAAT ACATCAGAAG GAATTAAGTG CCATCACACG GTGGTGGAAA
781 GATTTAGACT TCACTACAAA GCATCCTTAT GCAAGAGACA GAATCGTAGA GTTGATTTT
841 TGGATTGTAG GGACGTATTT TGAACCAAAG TACACTTTAG CGAGAAAAAT AATGACCAA
901 ACAATTTACA CGGCATCTAT CATAGATGAC ACTTTCGACG CTTATGGTTT CTTGAAAGAG
961 CTCAAACTCT TAGCAGAAGC AGTCCAGAGG TGGGACATTG GAGCCATGGA TATACTTCCA
1021 GAATACATGA AAGTGCTTTA TAAGGCCCTT TTAGATACTT TCAATGAAAT TGAGCAAGAC
1081 TTGGCCAAGG AAGGAAGATC GTCCTGCTTA CCTTATGGCA AAGAAAAGAT GCAAGAGCTT
1141 GTTCAAATGT ACTTTGTTCA AGCCAAGTGG TTCAGTGAAG GTTATGTTCC GACATGGGAC
1201 GAATATATC CGGTTGGACT TGTAAGTTGC GGCTACTTCA TGCTTGCGAC AAATTCCTTC
1261 CTTGGCATGT GTGATGTTGC AAACAAGGAA GCTTTTGAAT GGATATCCAA GGACCCTAAG
1321 ATTTCAACAG CGTCATCAGT TATCTGCAGA CTTAGGAATG ACATTGTTTC CCACCAGTTT
1381 GAACAGAAGA GAGGACATAT TGCCTCAGGA GTTGAATGCT ACATTAAGCA GTATGGTGT
1441 TCAGCAGAAG AGGTAGTTAC AGTTTTTACT GAAGAAGTTG AGAATGCATG GAAAGATATG
1501 AATGAGGAAT TCCTGAAACC AACTGCTTTT CCTGTGGCTT TGATTGAGAG ACCTTTCAAT
1561 ATCGCACGTG TGATTGAATT TCTAAACAAG AAGGGTGATT GGTACACTCA TTCTCATGCG
1621 ATTAAGACC AGATTGCCGC AGTGCTCAGA GACCCTGTTA CCATCTGA

SEC ID n° 2

1 MSAQVLATVS SSTEKTVRPI AGFHPNLWGD YFLTLLASDCK TNDTTHQEEY EALKQEVRS
61 ITATADTPAQ KLQLVDAVQR LGVAYHFEQE IEDAMEKIYH DDFDNDDVD LYTVSLRFR
121 LRQQGFKVPC DVFAKFKDDE GKFKASLVQD VHGILSLYEA GHLAIRGEGI LDEAIAFTR
181 HLQSMVSQDV CPNNLAEQIN HTLDCPLRRA LPRVETRFFL SVYPRDDKHD KTLKFSKLD
241 FNHVQRIHQK ELSAITRWWK DLDFTTKLPY ARDRIVELYF WIVGTYFEPK YTLARKIMTK
301 TIYTASIID TFDAYGFFEE LKLLAEAVQR WDIGAMDILP EYMKVLYKAL LDTFNEIEQD
361 LAKEGRSSCL PYGKEKMQEL VQMYFVQAKW FSEGYPVPTW EYYPVGLVSC GYFMLATNSF
421 LGMCDVANKE AFEWISKDPK ISTASSVICR LRNDIVSHQF EQKRGHISG VECYIKQYGV
481 SAEVVTVFT EEVENAWKDM NEEFLKPTAF PVALIERPFN IARVIEFLNK KGDWYTHSHA
541 IKDQIAAVLR DPVTI

Fig. 1A

SEC ID n° 3

1 ATGAGGGATG TTAAGAGTGT TCTTTCTTCA AAAGAAAGCA CGAAAGCCGA TGTGAACCGT
61 CGATCCTCGA ATTATCATCC TAGCATTGG GGTGATCATT TCATTAATGT GTCATCAAAT
121 GAAAAGTACA CCAATACGGA AGTCGAAAAG CGGTTTGAAA CATTAAAAGC AGAAATTGAA
181 AAGTTGCTGG TGAGCAATAA TACAGCATGG AAAACACTTG AAGAAATTGT GGCTATTGTT
241 AATCAACTTC AACGCCTTGG TGTGGCCTAT CATTTTGAAA ATGAGATCAA AGAGGCCTTA
301 CAAACAATCT ATGATAGCCA TGTTAACGGC AATTTGTGATG TTAATTACGA TCATAATAAC
361 GATCTCTACA TAGTTGCTCT TCGATTTCCG CTTCTAAGGC AGCATGGTTA CAAGGTGTCA
421 GCAGATATAT TTAATAAAT CAGAGATGAA AAAGGTGAAT TCAAGGCCAT GTTAACAAAT
481 GACGCGAAAG GCTTGCTATG TTTGTATGAG GCGTCATATC TGAGAGTACA AGGGGAGAAT
541 ATATTGGAAG AAGCATGTGA ATTTTCTAGG AAGCACTTAA AATCTTTATT GTCCCATTTA
601 AGCATCCTC TAGCTGACCA AGTTGAGCAC TCCCTGGAGA TACCTTTGCA CAGAGGGATG
661 CCAAGATTGG AGGCAAGGCA GTATATTTCC ATCTATGAAG CAGACAATTC AACACGAAAT
721 GAGCTAATAT TAGAACTTGC AAAGCTAGAT TTTAATCTTT TGCAGGCGTT ACACCGGATA
781 GAGCTAAGTG AGATCTCAAG GTGGTGGAAA GATATTGATT TTGCAACAAA GCTACCTTTT
841 GCAAGAGATA GAGTGGTGGG GGGCTATTTT TGGATTTTGG GAGTATATTT TGAGCCAAAA
901 TTTTATTGG CTAGAAAAAT TCTAACCAA GTGATATCAA TGGCTTCAAT TATTGATGAC
961 ATTTATGATG CTTATGGTAC AATAGAAGAA CTTGAGCTTT TTGCCACAGC AATTGAGAGG
1021 TGGGATCTCA GTGCCATAGA TCTGCTTCTT GAGTACATGA AGTTGTGCTA TTGCGCTCTC
1081 CTGGATGCTT ACAGCGAATT TGAGAAAGAT TTGGCCAGCA AAGGAATATT GTACGGCCTA
1141 CCTTTTGCTA AAGAATCGAT GAAGATTTTG GTGAGAAGTT ACATCATCGA AGCTAGATGG
1201 TGTGACCAAC AATATGTACC GACAATGGAG GAATACATGC GCGTTGCACT ACTTTCATGT
1261 GGCTACTTAC TGTTATCAAC ATCTTCATTT CTGGGAATGG AAGATATTGT AACAAAAGAA
1321 GCCTTTGAAT GGGTATCCGG CAACCCTAAA ATCGTTCAGG CTTCTCAAT AATTGTCAGA
1381 CTCATGGATG ACATTGTCTC TCATAAGTTT GAGCAACAGA GAGGACATGT GGCCTCAGCT
1441 GTTGAATGCT ACATGAAGCA GCATGGAGTT TCTGAGGAAG AGGCAGTTAA AGTGTTCGG
1501 GAGAAAGTTG GGAATGCGTG GAAAGATATA AATGAGGAGC TCATGAGACC ACCTGTGTT
1561 CCTATGCCTT TGCTCGAACG GGTTCCTAAT CTGCTCGTT TAATGGATGT GCTGTACCAA
1621 AATAATGATT CCTATACAAA TCCTCACTTG ATGAAAGATC ATGTAGCCGC ATTGCTTAAG
1681 GATCCTGTTT TCTTTGAAGA CTAG

SEC ID n° 4

1 MRDVKSVLSS KESTKADVNR RSSNYHPSIW GDHFINVSSN EKYTNTEVEK RFETLKAEIE
61 KLLVSNNTAW KTLLEIVAIV NQLQRLGVAY HFENEIKEAL QTIYDSHVNG NCDVNYDHNN
121 DLYIVALRFR LLRQHGYKVS ADIFKKFRDE KGEFKAMLTN DAKGLLCLYE ASYLRVQGEN
181 ILEEACEFSR KHLKSLLSHL STPLADQVEH SLEIPLHRGM PRLEARQYIS IYEADNSTRN
241 ELILELAKLD FNLLQALHRI ELSEISRWWK DIDFATKLPF ARDRVVEGYF WILGVYFEPK
301 FLLARKILTK VISMASIIDD IYDAYGTIEE LELFATAIER WDLSAIDLLP EYMKLCYCAL
361 LDAYSEFEKD LASKGILYGL PFAKESMKIL VRSYIIEARW CDQQYVPTME EYMRVALLSC
421 GYLLLSTSSF LGMEDIVTKE AFEWVSGNPK IVQASSICR LMDDIVSHKF EQQRGHVASA
481 VECYMKQHGV SEEEAVKVFR EKVGNAWKDI NEELMRPPVV PMPLLERVLN LARLMDVLYQ
541 NNDSYTNPHL MKDHVAALLK DPVFFED

Fig. 1B

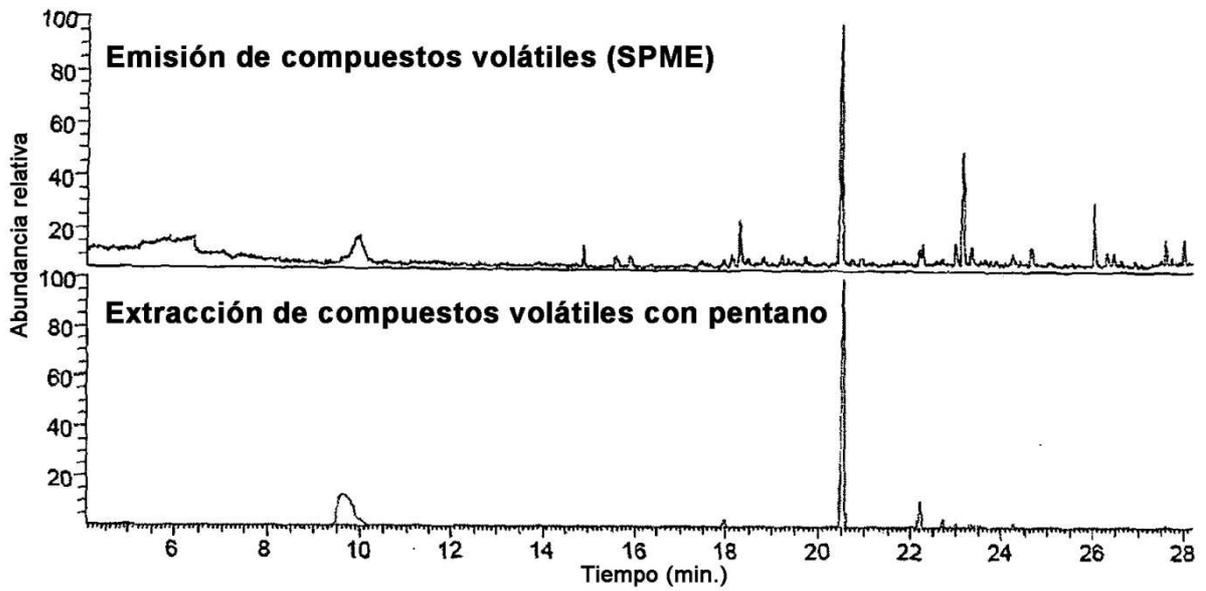


Fig. 2

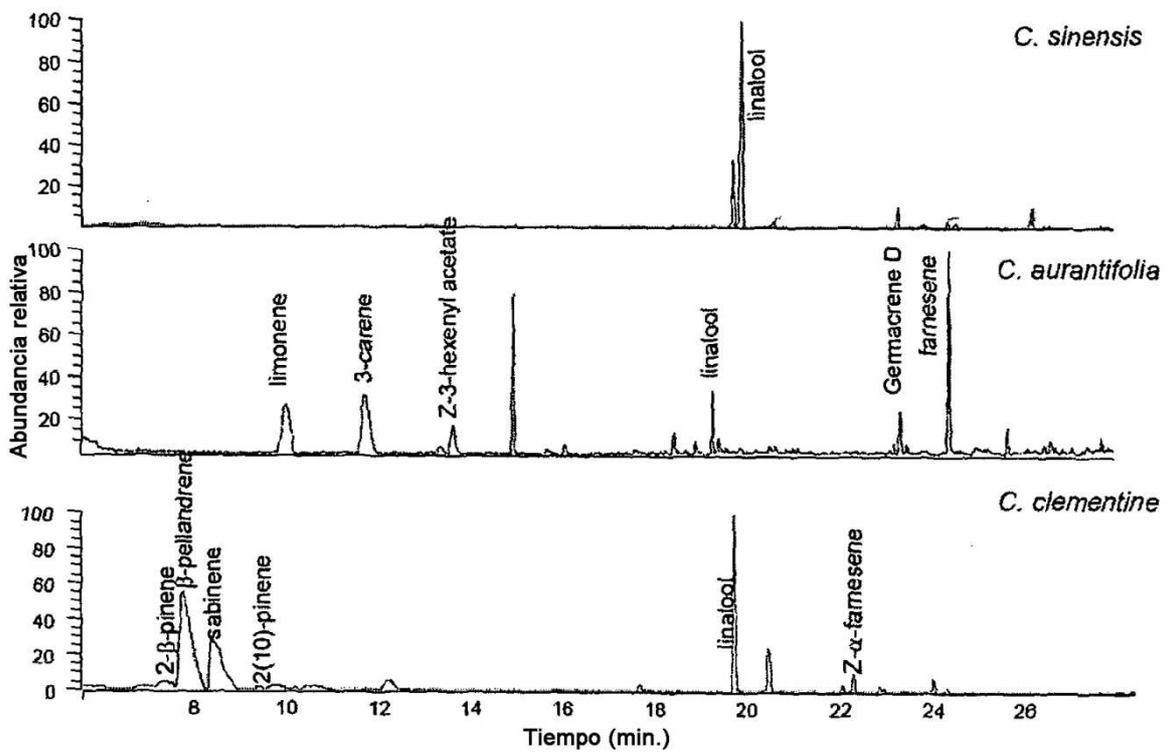


Fig. 3

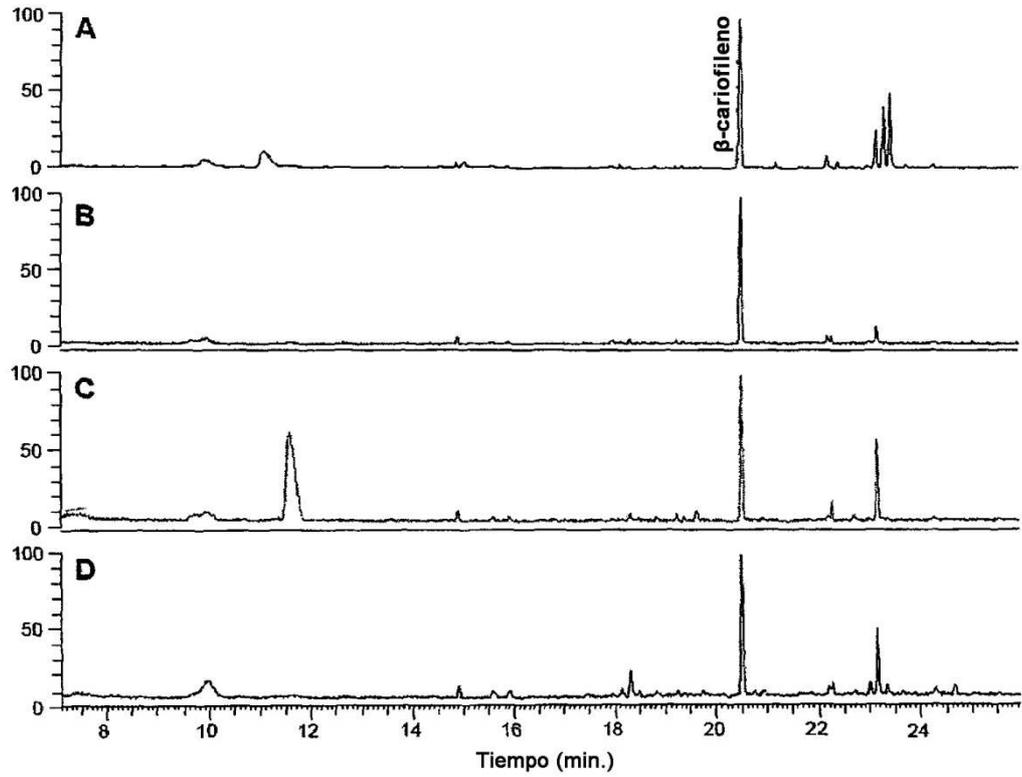


Fig. 4

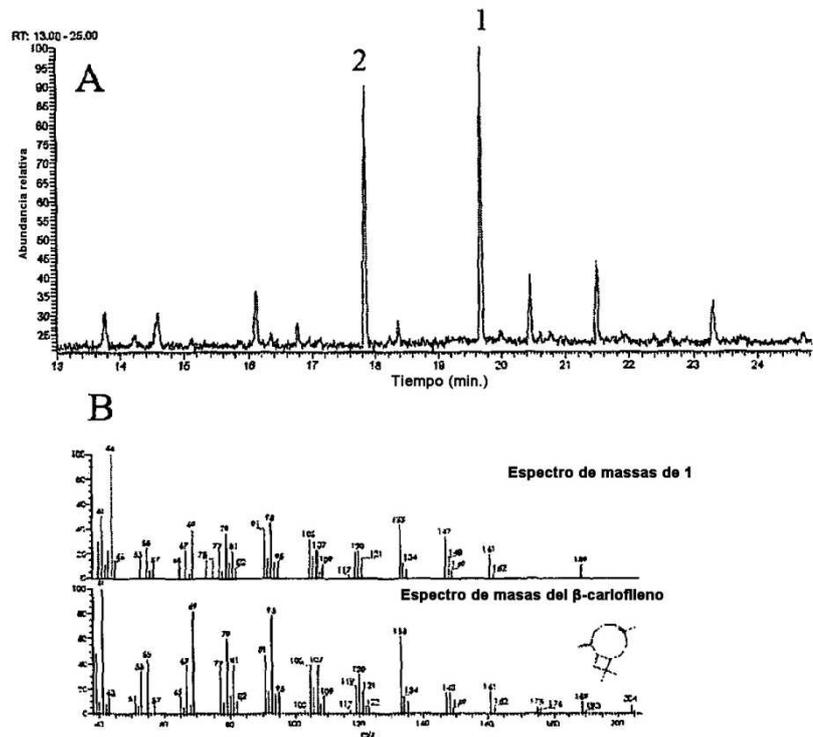


Fig. 5

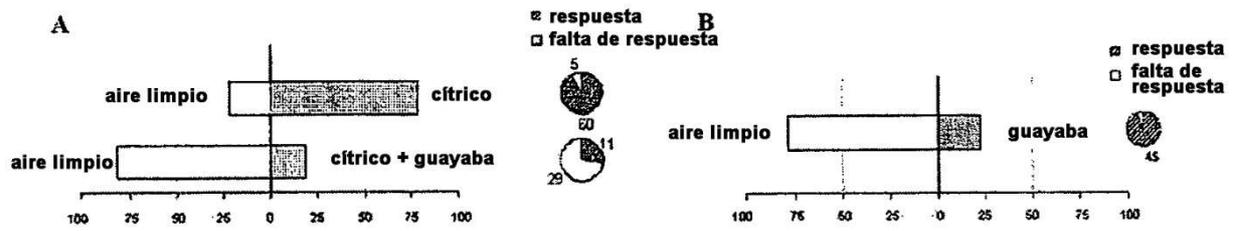


Fig. 6

AAL79181	.SKLLIDMSVKEEKVIRIIVHFPPSVWADQFLIFDDKQAEQANVEQVVAEREDVRKILVSSLDVOTEPHTNLKILIDA.....	77
ACN67535	FOLSIHLSMGCKQESFRPFPRSTSPSVWGLMFLNYEKK.ABQCQVELITVDELEKQVREAITGALCNPKHVNLLKILIDA.....	77
AAU05952KVMSSHFPASIMKINDIYDTRKISLANFHTTIWKCHFTSPTFDALKVDGCMKRIEKEKEIRMMVIVASV	70
AA085539MGSEVNEPLADFPANIWEDPETSFSKSLTGTETPKKHST...LKEAVKRAFMS	52
ABY79206MAADEARSVSRHSEELMHGKHSTLIGDFLHHVPCRQOYLIMKDNVEIMKEEV.KKMLLDVG	64
ABJ16553	...MATSVPVLLLPVETICTMIVSFPVEGCDLHCKPHFDHHPNVWGLVYELTFSPTPSMLLNMRKAHVS.EEQ.VRRMILEC	79
AAL79181IQRIGIAYHFFEEBEQAOHDDIYVCDWKGKSPSLW.....	132
ACN67535IQRIGIPVYFEEETINAOHLKAYVCEWVCGSPSIW.....	133
AAU05952	QNPLVK..LNLVDSIQRIGVSYHEEEDIDQFLHFMVSNVMSILLFSSNDSQDD.....	147
AA085539	KANPIE..NIKFIYALCRIGVSCHEKDIVBOLDKSFDCLEFPQVROBGC.....	128
ABY79206	SSDLSH..KLDCTDIERLGLDYHYTKEDDEMCNVFEARQDL.....	133
ABJ16553	SSGNLHVKLELVETIERLCIDYHYEKEHENLRRVHEEEDIDNYH.....	153
AAL79181	YKKEGGSRESLITNVEGLDELYEITYLIVQESGVDDAVVETIQEIKADLVHINPTLSTYTOEAKKQELHKLTRLEALRY	217
ACN67535	YKEKHGDFKESHINDEEMVLEYETSLEVRVWDEAFEBLNHEANIAKEPRCSNATLSTHIOVALETPLHKIPRLDALRY	218
AAU05952	FMENNGQKESVVEDEKSISSSRPSSHGHGHALISELEFHTTIKAYIHLYSNINPNFASEVSNALKGEI..FKCVPPVKAR	230
AA085539	KLENCKFKGHLMTAYGMLSLYEACWGTHTGTHIDALAFPSRSHLEEISSSSPH.....LARIKNAIKHPYHKGISRIETK	207
ABY79206	RDEKGEIVTDARCLLEMYE...PAHYVNSHEELDNTLILIKRLOQOIVDDEPTLQEEVRY.....	209
ABJ16553	RLEEGNFTEDNNGTRSMLSLYNPAHLEHSEELIDDAIVVETINYLQSVKHLQSPMADEVCS.....	233
AAL79181	IPVYEQASHNESLLKAKLGFNLSQSHRKELSVSRWVKGLDVPNNIPYARDIMVVECYFWALGVYFEPKYSQARIFLAKVISL	302
ACN67535	IREYEQASHNESLLKAKLGFNLSQSHRSELSQSVKWKVDVVOQNIYARDIMVVECYFWALGVYSEPKYSLGRVFLAKVIOL	303
AAU05952	EMVEIQOQPSHNETLITFSKLDENILQKHLQKEIAEICRWKDLAVSTNFPFARDRIVECYFWILSYIF..EPYFKGRKILTK	313
AA085539	QVLSYVEEESCDP..TILLEFAKHEENLLOIHRREIACVIRRHHEMEKSKVITYTRHRITAYLWSLGYFEPQYSQARVITIM	290
ABY79206	QELSTIVEKSTTRINMLRE..ESKHEENLITVYCELDKDLILWKEFOAQANTTIYARDRMVEMHFWMGVFFEPQYSYRKMILT	292
ABJ16553	HYLSVVDKLPTRNETIPE..FAKLEFGHLSYICELNILLWKELOQDHLSF.ADRDMVEMHFWMGLVLFEPQYSYGRIMLT	315
AAL79181	AVLDDIYDAYGTYEELKIFTEAIQRWSITCTDMLFEYLKLL..YQVLDIYIEMEEIMGREGKAHLIYAKESMKFFIRSYMME	385
ACN67535	ATAIDDTFAYGTYEELQFTRAVERSITCTLELFEYMKLL..YQVLLDLYGEMETIMEKEOLTPLFNCSKRFMIETVKAYMVE	386
AAU05952	VEMAMTSMDDIYDAYGTFEELQFLTLNKRWDSMNVNLLPOY..MKVHYTTLLIFEEEDKGIVNDGYSYRSCFGKRAMKROAES	396
AA085539	AIHLIFALEIMYDAYGIMELELFTIDAMDEWLPVVEDEIPIPDSMKFIYNVTVFEDYKDEELEKEGGRSGCGFHLKKSLOKTANG	375
ABY79206	QDFMIVSVLDDLYDSHCITTEGNAFTAARORNEEGVQECPTYLRTLYTNIRATIKAEEDLNFCNNKHAKLVKGLIIDMAMCYN	377
ABJ16553	KELFVFSIFEDIDYDNYSTLEESKLFTEADERNCEFAARELPGYMKFFYKVLITMKSDETDLKLGQNKHVDYVKNLLIDATRIFY	400
AAL79181	AKWANGYVPTAEEMSVAFVSSGY...MLATTFCVGMCDIVTDEAFTWALTKPPIKASCAIARIMDDIHSCKEEKRIRHVA	466
ACN67535	AKWVYEGHIPTKDEHTSIAFATGG...PLINSSCYLGMCDIITINDSINWVISEPPLKATNMIGRLINDIVSSKGEORVHFQ	467
AAU05952	YFKEAFLNKAQPKYGEYMEVALA...SGYELLSTISFVCMG..IATKEVFEWLFDCPOILKASTTISRMLDVSYSFKEKE	476
AA085539	YMQEAKLKKIYIATFDEYKENAIL...SGYGLIAMTFVVMHIVAKLDAFEMLNHPKIRVASEIISRPDTESSVFEFKR	456
ABY79206	RET..EVRDKKAVP..ATVDEHLKISARS..GMHLVSCGFISM..EVATSEALEASTYKIVRAVCIARLANLMSYKFEASN	457
ABJ16553	NEV..KVRSEGADQVAATVEHLKISVPS..CMHVPVYAFVAMGNVITDDAINWGMAYPKIITSSCVGRLLNEIASHEREQGS	483
AAL79181	SSVESYMKCYDVTIEHVL.KVFNKKIEDAWKDIITRESVTRKDIIMPLMRVINLAQVMELVLYKHKDGETNVGE..ELKDHLKSTLV	549
ACN67535	SISQCYKCYDVSEEHAI.NLVREEIEDVWKINKDSITAKVREPLILVVVNYARTLYLYKQNDNEFEVEE..DIKEDKSTLIV	550
AAU05952	REHIVSAVFCYMSNHGRS.EDETCAELLKQVLEDAVCTNECQHFNVMVMPPLTCLNLTTRVMALLYSHEDGY..INSGRTKLEI	559
AA085539	EHVATGLDCVMQFGVSK.ERAVEVMGNIVSDAWKDLAQLMRHFVFPF..PLIMVNLALSIVLIVFVRYODA.YTNPKILKSHI	537
ABY79206	NIMV.SIVCTCAKIVGITTIVEQAIKEIRELEAAMDITHEGLROB..QPKALREAVNLARIMEFLYKADAGYIDRSKLGHLD	539
ABJ16553	SSSSSIVTEAMREHGGITKEEAYAKLRELVEESVMDLAGEQIRPAAQPPPLEAVNATRVLIVYKDDQDAYTHPSSLQDTE	568
AAL79181	HPIF.....	554
ACN67535	HPMS.....	555
AAU05952	CSLLDPLHL	569
AA085539	VSLLETIPI	547
ABY79206	SLYVHLID..	547
ABJ16553	HSIYDLSV..	576

Fig. 7


```

1   ACTGCTCGCG ATGCATCTAG ATTGGAGTGT CCTATCATTT TGAAAATGAG ATCAAAGAGG
61  CCTTACAAAC AATCTATGAT AGCCATGTTA ACGGCAATTG TGATGTTAAT TACGATCATA
121 ATAACGATCT CTACATAGTT GCTCTTCGAT TTCGGCTTCT AAGGCAGCAT GGTTACAAGG
181 TGTCAGCAGA TATATTTAAA AAATTCAGAG ATGAAAAAGG TGAATTCAAG GCCATGTTAA
241 CAAATGACGC GAAAGGCTTG CTATGTTTGT ATGAGGCGTC ATATCTGAGA GTACAAGGGG
301 AGAATATATT GGAAGAAGCA TGTGAATTTT CTAGGAAGCA CTTAAAATCT TTATTGTCCC
361 ATTTAAGCAC TCCTCTAGCT GACCAAGTTG AGCACTCCCT GGAGATACCT TTGCACAGAG
362   ← B63R (SP3)
421 GGATGCCAAG ATTGGAGGCA AGGCAGTATA TTTCCATCTA TGAAGCAGAC AATTCAACAC
422   ← B62R (SP2)
481 GAAATGAGCT AATATTAGAA CTCGCAAAGC TAGATTTTAA TCTTTTGAG GCGTTACACC
541 GGATAGAGCT AAGTGAGATC TCAAGGTGGT GGAAAGATAT TGATTTTGCA ACAAAGCTAC
      B61F →
601 CTTTTGCAAG AGATAGAATC
      ← B48R (SP1)

```

Fig. 10

1 AGTAATTTAGCTGAGAAGTCTTGGTGGGAGTCTCTATCGTCGTCGTATCCAAAGCTCTTC
 1 V I * L R S L G G S L Y R R R I Q S S S
 61 AATGGAGACCGATCTCAAGTCAACCTTTCTCAACGTTTATTCTGTTCTCAAGTCTGACCT
 21 M E T D L K S T F L N V Y S V L K S D L
 121 TCTTCATGACCCTTCCTTCGAATTCACCAATGAATCTCGTCTCTGGGTTGATCGGATGCT
 41 L H D P S F E F T N E S R L W V D R M L
 181 GGACTACAATGTACGTGGAGGGAAACTCAATCGGGTCTCTCTGTTGTTGACAGTTTCAA
 61 D Y N V R G G K L N R G L S V V D S F K
 241 ACTTTTGAAGCAAGGCAATGATTTGACTGAGCAAGAGGTCTTCCTCTCTTGTGCTCTCGG
 81 L L K Q G N D L T E Q E V F L S C A L G
 301 TTGGTGCATTGAATGGCTCCAAGCTTATTTCTTGTGCTTGATGACATTATGGATAACTC
 101 W C I E W L Q A Y F L V L D D I M D N S
 361 TGTCACCCGCCGTTGGTCAACCTTGCTGGTTTCAAGTTCCTCAGGTTGGTATGGTTGCCAT
 121 V T R R G Q P C W F R V P Q V G M V A I
 421 CAATGATGGGATTCTACTTCGCAATCACATCCACAGGATTCTCAAAAAGCATTTCCTGTA
 141 N D G I L L R N H I H R I L K K H F R D
 481 TAAGCCTTACTATGTTGACCTTGTTGATTTGTTAATGAGGTTGAGTTGCAAACAGCTTG
 161 K P Y Y V D L V D L F N E V E L Q T A C
 541 TGGCCAGATGATAGATTTGATCACCACCTTTGAAGGCGAAAAGGATTTGTCCAAGTACTC
 181 G Q M I D L I T T F E G E K D L S K Y S
 601 ATTTGCAATCCACCGTCGTATTGTCCAGCACAAAACGGCTTATTACTCATTTTATCTCCC
 201 L S I H R R I V Q H K T A Y Y S F Y L P
 661 TGTTGCTTGTGCGTTGCTTATGGCGGGCGAAAATTTGGAAAACCATATTGACGTGAAAA
 221 V A C A L L M A G E N L E N H I D V K N
 721 TGTTCTTGTGACATGGGAATCTACTTCCAAGTGCAGGATGATTATCTGGATTGTTTTGC
 241 V L V D M G I Y F Q V Q D D Y L D C F A
 781 TGATCCCGAGACGCTTGGCAAGATAGGAACAGATATAGAAGATTTCAAATGCTCTTGGTT
 261 D P E T L G K I G T D I E D F K C S W L
 841 GGTGGTTAAGGCATTAGAACGCTGCAGCGAAGAACAACCTAAGATATTATATGAGAACTA
 281 V V K A L E R C S E E Q T K I L Y E N Y
 901 TGGTAAAACCGACCCATCGAACGTTGCTAAAGTGAAGGATCTCTACAAAGAGCTGGATCT
 301 G K T D P S N V A K V K D L Y K E L D L
 961 TGAGGGAGTGTTCATGGAGTATGAGAGCAAAAAGCTACGAGAAGCTGACTGGAGCGATTGA
 321 E G V F M E Y E S K S Y E K L T G A I E
 1021 GGGACACCAAAGTAAAGCAATCCAAGCAGTGCTAAAATCCTTCTTGGCTAAGATCTACAA
 341 G H Q S K A I Q A V L K S F L A K I Y K
 1081 GAGGCAGAAGTAGTAGAGACAGACAAACATAAGTCTCAGCCCTCAAAAATTTCTGTTAT
 361 R Q K * * R Q T N I S L S P Q K F P V M
 1141 GTCTTTGATTCTTGGTTGGTGATTTGTGTAATTCTGTAAAGTCTCTGATTTTCAGGGGG
 381 S L I L G W * F V * F C * V L * F S G G
 1201 AATAATAAACCTGCCTCACTCTGT
 401 I I N L P H S

Fig. 11