

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 831 386**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2008.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2014 PCT/IB2014/060965**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14174474**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2014 E 14788964 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2020 EP 2988590**

54 Título: **Plantas resistentes a microorganismos patógenos que crecen en tejidos vasculares**

30 Prioridad:

24.04.2013 MX 2013004623

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

08.06.2021

73 Titular/es:

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (50.0%)
Av. Instituto Politécnico Nacional, no. 2508, Col. San Pedro Zacatenco
Ciudad de Mexico 07360, MX y
SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**XOCONOSTLE CÁZARES, BEATRIZ;
CHAVARIN PALACIO, CLAUDIO;
LÓPEZ BUENFIL, JOSÉ ABEL;
GUERRA LUPIÁN, MIGUEL ÁNGEL;
MORALES GALVÁN, OSCAR;
ZECUA NÁJERA, REBECA;
RUÍZ MEDRANO, ROBERTO;
GÓMEZ FELIPE, ANDREA y
TRUJILLO ARRIAGA, FRANCISCO JAVIER**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 831 386 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas resistentes a microorganismos patógenos que crecen en tejidos vasculares

5 **Sector de la invención.**

La presente invención se refiere al sector de aplicación de técnicas de biología molecular para generar plantas resistentes a microorganismos fitopatógenos que residen en el tejido vascular de plantas, a través de la expresión de proteínas con actividad antimicrobiana fusionadas traduccionalmente a proteínas con capacidad de movimiento supracelular y sistémico. En una de sus realizaciones, la presente invención se refiere a procedimientos para controlar a la bacteria causante del amarillamiento de los cítricos o Huanglongbing (HLB), mediante la expresión constitutiva y proteínas antimicrobianas vasculares específicas de tejido fusionadas a proteínas con capacidad de movimiento simplásmico a tejidos distantes a través del tejido vascular.

15 **Estado de la técnica anterior**

Huanglongbing ("dragón amarillo", en chino) es una enfermedad de los cítricos que ha cobrado gran importancia en México. Se le conoce también por las iniciales HLB y por el nombre en inglés "Greening" o "Ex-Greening". La enfermedad es muy destructiva, ya que causa pérdidas totales en la producción de cítricos. Los síntomas de la HLB incluyen, pero sin limitación a los mismos, un amarillamiento de las hojas, menor producción de frutos, y prácticamente la ausencia de semillas (figura 1). Además, y de manera coincidente con la vasta mayoría de enfermedades en plantas de interés agrícola, no existe un tratamiento eficaz para la HLB. Por tal razón un diagnóstico temprano es crucial y un tratamiento sería esencial para revertir la enfermedad. Nótese que esta enfermedad se ha expandido rápidamente a diferentes partes del mundo desde su detección en Asia oriental; actualmente se ha detectado en Florida y en México. También se considera como la principal amenaza para la producción de cítricos a nivel mundial (www.senasica.sagarpa.gob.mx).

La enfermedad HLB fue reportada inicialmente en China en 1929, la cual se ha diseminado rápidamente y fue detectada en Sudáfrica en 1947, también ha sido un problema importante en la producción de cítricos en Taiwán desde 1951. De este modo, se encuentra diseminada sobre todo en regiones productoras de cítricos tanto tropicales como subtropicales, que incluyen Florida, EE.UU. desde 1998. En el caso de México, se ha informado en varias regiones productoras del país a partir de 2009, desde Sinaloa hasta Campeche. Es probable que esta enfermedad ya se encuentre presente en otras regiones productoras de cítricos en México, haciendo de su control una prioridad.

En el caso de México existen 23 Estados productores de cítricos, en 13 de los cuales ya ha sido detectada la bacteria causante de la HLB y al insecto vector que la transmite. Este problema fitosanitario es crucial ya que los cítricos se cultivan en 549.000 hectáreas, con una producción de siete millones de toneladas anuales, valoradas en 10.206 billones de pesos mexicanos (SENASICA, 2011).

Entre los cítricos susceptibles a la infección por HLB, los síntomas más graves se dan en el limón mexicano, naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y pomelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*), mientras que los síntomas menos graves se manifiestan en las limas (*Citrus limon*) y tangerinas (*Citrus paradisi*), *Citrus limonia*, *Citrus limettioides* (McClean & Schwarz, citados en EPPO quarantine pest, 1990). Sin embargo, a nivel mundial la lista de plantas infectadas es mayor, donde se listan, a continuación, las especies susceptibles (Halbert y Manjunath, 2004): *Aeglopsis chevalieri* Swingle, *Atalantia missionis* Oliver, *Balsamocitrus dawei* Stapf., *Calodendrum capensis* Thunb, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don X *Citroncirus webberi* J. Ingram & H.E. Moore, *Citrus amblycarpa* Ochse, *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle, *Citrus aurantium* L., *Citrus depressa* Hayata, *Citrus grandis* (L.) Osbeck, *Citrus hassaku* Hort. ex Tanaka, *Citrus hystrix* DC., *Citrus ichangensis* Swingle, *Citrus jambhiri* Lushington, *Citrus junos* Sieb. ex Tanaka, *Citrus kabuchi* Hort. ex Tanaka, *Citrus limon* (L.) Burm., *Citrus x limonia* Osbeck, *Citrus x nobilis* Lour. "Ortanique", *Citrus maxima* (pomelo/shaddock), *Citrus x nobilis* Lour., *Citrus oto* Hort. ex Tanaka, *Citrus x paradisi* Macfad., *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka, *Citrus unshiu* (Mack.) Marc, *Clausena indica* Oliver, *Clausena lansium* (Lour.) Skeels, *Cuscuta australis* R. Br. (Convolvulaceae, Cuscutaceae), *Fortunella* spp., *Limonia acidissima* L., *Microcitrus australasica* (F.J. Muell.) Swingle, *Murraya koenigii* (L.), *Murraya paniculata* (L.) Jack, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr., *Toddalia lanceolata* Lam, y *Triphasia trifolia* (Burm. f.) P. Wilson.

De la misma manera, los posibles huéspedes incluyen *Citrus indica* Tanaka, *Citrus limetta* Risso, y *Citrus macroptera* Montrons (Gómez, 2008).

Se ha reconocido que la etiología de la enfermedad es bacteriana (Liberibacter); sin embargo, hay diferentes cepas asociadas (tabla 1). Se ha encontrado que la HLB es transmitida por insectos pertenecientes al grupo de los psílidos (Hemíptera), que incluye otros vectores importantes, tales como, por ejemplo, los vectores de la mosquita blanca y áfidos. De manera semejante a otras enfermedades transmitidas por vectores, una de las estrategias usadas para el control de esta enfermedad es precisamente el control de los vectores asociados a ella. Si bien no se conocen con precisión los mecanismos por los cuales los psílidos transmiten la bacteria causante de la enfermedad, es evidente que estos insectos son capaces de transmitirla de manera sumamente eficiente. Además, los psílidos transmiten

patógenos de manera semejante a los áfidos, por lo que cabe esperar que los detalles de la transmisión de la bacteria sean semejantes a otros patógenos restringidos al floema. También son capaces de transmitir virus, lo que hace aún más necesario el control de estos vectores.

5 Uno de los vectores de la bacteria *Candidatus Liberibacter spp* causante de la HLB es *Diaphorina citri Kuwayama* (Hemiptera: Psyllidae); este insecto tiene un período embrionario que varía de 9,7 días a 15°C a 3,5 días a 28°C; los huevos son colocados en el extremo de los brotes tiernos de la planta, sobre hojas tiernas desplegadas y entre las mismas, apareciendo frecuentemente un gran número en una misma ramita; la oviposición depende de la presencia de brotes tiernos, en los que la hembra pone hasta 800 huevos en toda su vida, las ninfas son sedentarias y se establecen sobre las ramitas tiernas y los peciolos, formando colonias con un número variable de individuos. Las ninfas excretan una sustancia blanca cerosa a través de los hilos que se depositan sobre las hojas, mientras que los adultos tienen poca capacidad para sostener vuelos muy largos, pero pueden ser transportados a grandes distancias por las corrientes de aire.

15 **Tabla 1. Bacterias asociadas a Huanglongbing (HLB)*.**

Agente	Huésped	Características	Distribución	Vector natural
Liberibacter asociado a HLB ^a				
Candidatus Liberibacter asiaticus	<i>Citrus spp.</i> ; transmitida a <i>Catharantus roseus</i> , tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) jitomate, (<i>Lycopersicon esculentum</i>) a través de plantas parásitas (<i>Cuscuta campestris</i>)	Gram negativa, no cultivable, restringida a tejido vascular, tolerante al calor	México, Asia, Arabia Saudita, Florida, Brasil	<i>Diaphorina citri</i> (psílido asiático de los cítricos)
Liberibacter de huéspedes no rutáceos ^b				
Candidatus Liberibacter psyllarous	Solanaceae	97% de similitud en la secuencia con <i>Candidatus Liberibacter</i> causante de "zebra chip" en patatas	Texas, Guatemala, México	<i>Bactericera Cockerell</i> (psílido de las patatas/tomates)
Fitoplasma asociado con HLB				
Fitoplasma c	Citrus, <i>Crotolaria juncea</i>	Restringido a tubo de cribado, sin pared celular, con 99% de homología en ADN al fitoplasma escoba de bruja del chícharo (16Sr IX)	Brasil	Desconocido
Fitoplasma d	Citrus		China	Desconocido

Referencias: * Strategic Planning for the Florida Citrus Industry: Addressing Citrus Greening; a Bové et al., 1974; Garnier y Bové, 1983; Jagoueix et al., 1994, 1997; Garnier et al., 2000, Duan et al., 2008; b Gudmestad y Secor, 2007; Hansen et al., 2008; Lin et al., 2009; c Teixeira et al., 2008; Wulffet et al., 2009; d Chen et al., 2009.

20 La duración del ciclo biológico del insecto (huevo-adulto) varía de 14,1, a 49,3 días a 28°C y 15°C, respectivamente, siendo las temperaturas de 25°C a 28°C las más adecuadas para su desarrollo, ya que el psílido no se desarrolla a temperaturas de 33°C y 10°C. El insecto presenta un pico poblacional al final de la primavera e inicios del verano (coincidente con el período de brotación de los cítricos). La presencia del psílido no implica que esté infectado con la bacteria, aunque en el caso de México, existen ambos elementos.

25 Se ha determinado que la HLB está causada por un grupo de bacterias que forman un clado coherente, denominadas de forma general *Candidatus Liberibacter*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus* y *Candidatus Liberibacter americanus*. México ha reportado que *Candidatus Liberibacter asiaticus* es la bacteria que es transmitida por el psílido *Diaphorina citri* y está presente en la familia Rutaceae; sin embargo, hay informes de la presencia de *Candidatus Liberibacter psyllarous*, cuyas plantas huéspedes son las Solanaceae. Brasil y China han informado de fitoplasma asociado con HLB, también restringido al sistema vascular de las plantas infectadas.

35 Hasta la fecha no ha sido posible cultivar estos grupos bacterianos, lo que ha impedido una mayor caracterización de estos patógenos. Si bien la relación taxonómica de *Candidatus Liberibacter spp.* con otros grupos no es completamente clara, las secuencias de ADN disponibles indican que se trata de una alfa-proteobacteria. La información disponible sugiere que está relacionada con rhizobacterias, tales como *Bradyrhizobium*, y más distante con *Agrobacterium*. Estos grupos bacterianos tienen una pared celular compuesta con peptidoglicano y, por lo tanto, podrían ser susceptibles a enzimas que la destruyen como la lisozima.

40 Las bacterias *Candidatus Liberibacter* (CaL) se restringen al floema de su huésped; existen una gran variedad de patógenos de plantas que también se acumulan en el floema, o bien están restringidos a este tejido, desde virus

(como por ejemplo, geminivirus y luteovirus) hasta bacterias (por ejemplo, fitoplasmas principalmente). El caso de los hongos ha sido poco estudiado, pero es posible que muchos endófitos colonicen el floema. El conocimiento de la función de este tejido es esencial para desarrollar estrategias para el control de estos patógenos.

5 Significativamente, las bacterias Gram negativas son susceptibles a la lisozima en condiciones de alta presión hidrostática (por ejemplo, un tampón con fosfato de potasio 10 mM (Marsschalk et al., 2001)), condición que se encuentra en el floema de la planta. Los síntomas de su infección en ocasiones son confundidos por deficiencias nutricionales, pero según avanza la infección la asimetría de las manchas cloróticas presentes en la enfermedad difiere de las manchas simétricas a ambos lados de las nervaduras centrales, las cuales son precisamente producidas por una deficiencia nutricional (figura 1).

10 En especial, la acumulación en el floema de estos patógenos parece causar la mayor parte de los síntomas observados. El análisis ultraestructural del tejido infectado ha demostrado que el libre flujo del floema está bloqueado por depósitos masivos de callosa (beta 1-3 glucanasa) en las placas cribosas. Los órganos de la planta que están interconectados a través de los haces vasculares bloqueados desarrollan clorosis; esto seguramente causa una menor tasa en el crecimiento de las plantas infectadas. La acumulación de callosa podría ser una respuesta descontrolada a la presencia de estas bacterias en el floema, lo que también sugiere un tratamiento en contra de la enfermedad (es decir, la inducción de la expresión de glucanasas en el floema, por ejemplo).

15 El movimiento de solutos en el floema se debe a una diferencia de presión entre los tejidos fuente y los tejidos consumidores, que están interconectados, ya que en éstos los solutos, sobre todo la sacarosa y otros azúcares, así como aminoácidos, son rápidamente consumidos, dando como resultado una entrada de agua en estas células por ósmosis, y la consecuente dilución de los solutos, además, existe una mayor acumulación de solutos por fijación de carbono en el tejido fuente. La interconexión entre ambos tejidos permite el movimiento de solutos entre estos tejidos. El floema es también un conducto a través del cual señales químicas son transportadas entre órganos distantes involucrados en su comunicación, en el que dicha comunicación es necesaria para coordinar el crecimiento y desarrollo de plantas vasculares, ambos como respuesta a un programa genético y de estímulos externos.

20 El transporte en el floema se encuentra alterado en plantas infectadas con *Candidatus Liberibacter*; particularmente el transporte simplásmico que ocurre a través de los canales citoplásmicos o plasmodesmos. La infección por *Candidatus Liberibacter* ocasiona una excesiva acumulación de almidón en las hojas, esto es reminiscente de mutantes en la función del transporte simplásmico a través del floema, tal como, por ejemplo, *sxd* en maíz (Provencher et al., 1999). El mutante *sxd* tiene un defecto en la movilización simplásmica de azúcares, lo cual hace que los azúcares se polimericen a almidón produciendo el síntoma de moteado difuso asimétrico, tal como el encontrado en cítricos enfermos con HLB.

25 Para comprender la enfermedad HLB, también es importante describir las funciones y estructuras de los tejidos conductores de plantas superiores cuya especialización les han conferido ventajas evolutivas, en los que este tejido se conforma del xilema (conductor unidireccional de agua y minerales) y del floema, que transloca fotoasimilados, minerales, proteínas y ácidos nucleicos y que consisten básicamente en dos tipos celulares, la célula acompañante (CA) y el elemento de cribado (EC) que puede ser un tubo cribado (TC), los cuales están interconectados entre sí por medio de plasmodesmos modificados. El tejido vascular en angiospermas se diferencia a partir de células de cambium, las cuales sufren una división longitudinal asimétrica (Esau, 1953) para posteriormente, cuando maduran, perder el núcleo y dar lugar al tubo de cribado. La figura 2 resume el tejido vascular de plantas superiores, así como la ontogenia de un tubo de cribado y su relación con la célula acompañante. En la figura 3 se puede observar la presencia de las bacterias en los tubos de cribado (TC) en los que se establecen y colonizan, mientras que en la figura 4 se presenta la estructura del plasmodesmo (PD) que es la conexión simplásmica entre el tubo de cribado y la célula acompañante, en la que la micrografía muestra su aspecto cuando está obstruido por material fibrilar y amorfo debido a la infección. La identificación bioquímica de estos depósitos de material fibrilar sugiere que se trata de beta 1-3 glucana (callosa) y una proteína "cicatrizante" denominada PP2, en los que ambas moléculas son sintetizadas y depositadas en los plasmodesmos como una reacción de hipersensibilidad.

30 Los plasmodesmos son canales que atraviesan la membrana y la pared celular; no son pasivos, son especializados y actúan como compuertas que facilitan y regulan la comunicación y el transporte de agua, nutrientes, metabolitos y macromoléculas entre las células vegetales; contienen una forma del retículo endoplásmico capturado, interconectando todas las células vegetales, con excepción de las células guarda. Los plasmodesmos parecen permitir el movimiento de moléculas de hasta 30 kD entre ambos tipos celulares; en contraste, los plasmodesmos que interconectan las células mesófilas tienen un límite de exclusión de aproximadamente 1 kD.

35 Los mecanismos de transporte de macromoléculas a través del plasmodesmo son complejos. El modelo descrito por Haywood et al., 2004, considera la presencia de moléculas estructurales y facilitadoras de la translocación, en las que una proteína de reconocimiento de la naturaleza sistémica de moléculas forma un complejo que es reconocido por una proteína anclada al inicio del plasmodesmo; debe existir una gran variedad de complejos para reconocer a las familias tan diversas en sus secuencias, y son capaces de atravesar esta barrera simplásmica; moléculas de tipo chaperón desdoblán proteínas e inician su translocación al tubo de cribado. El control del sistema es ejercido por el núcleo, que transcribe ARN codificantes de proteínas de naturaleza supracelular; las moléculas se pliegan después

de haber atravesado el plasmodesmo y son a su vez reconocidas por otras moléculas que supuestamente les indicarán su tejido diana. Se han descubierto un gran número de proteínas que tienen la capacidad de desplazarse a través de los plasmodesmos, aumentando su límite de exclusión, en las que algunas de estas proteínas tienen la capacidad de unir a ARN de manera inespecífica, mientras que en otros casos se ha demostrado su papel en la comunicación a larga distancia en el fenómeno de inducción floral; también se tienen antecedentes de la capacidad del ARN para atravesar un heteroinjerto y alcanzar tejidos distantes tales como meristemos florales y vegetativos, tal como informa para calabaza Ruíz Medrano y colaboradores (1999).

Debido a las restricciones espaciales del plasmodesmo, existe un límite de exclusión molecular, tal como ya se ha mencionado anteriormente, sin embargo, la presencia de proteínas de peso molecular superior de 1 hasta 250 kD así como de ARN sugiere que el transporte es altamente selectivo y regulado por mecanismos que todavía no se conocen claramente en la entrada del plasmodesmo. La naturaleza de las señales químicas involucradas es altamente desconocida, aunque en el floema se han encontrado diversas moléculas que podrían constituir dichas señales; entre ellas cabe mencionar a las fitohormonas y otras moléculas de bajo peso molecular, lípidos, proteínas y una gran diversidad de especies de ARN.

En la actualidad se desarrollan estrategias experimentales para el tratamiento de HLB, entre las que se incluyen la aplicación de pesticidas para el control del vector. Sin embargo, su toxicidad y actividad residual limita su aplicación, mientras que la utilización de antibióticos que logren ser distribuidos sistémicamente dentro del floema, tiene la limitación de que su aplicación necesariamente debe ser continua, lo que implica una inversión considerable para esta estrategia.

Para controlar la HLB se ha informado de la utilización de tetraciclina, la cual interfiere con la síntesis de proteínas en bacterias, o de penicilina, que inhibe la síntesis de peptidoglicano, componente estructural de la pared celular de bacterias. Aunque el resultado fue una marcada reducción de los síntomas, se descartó la utilización del bacteriostático tetraciclina por la fitotoxicidad que produjo, además, no se recomienda la utilización de antibióticos en plantas y animales para consumo humano.

Recientemente, se ha obtenido la secuencia del genoma de *Candidatus Liberibacter asiaticus* y de *Candidatus Liberibacter ZC*, una bacteria estrechamente relacionada, que causa la enfermedad en patatas conocida como Zebra chip; ambas presentan una elevada semejanza entre sí (Hartung et al., 2011; Lin et al., 2011). Sin embargo, la comparación de las secuencias disponibles de ambos patógenos sugiere reordenamientos divergentes en sus genomas, en los que la ganancia y pérdida de material genético ha contribuido a diferencias en sus respectivos genomas. De cualquier forma, la información disponible indica claramente que *Candidatus Liberibacter* forma un clado compacto con un "estilo de vida" adaptado al floema de las plantas, que incluye, por ejemplo, una capacidad limitada de síntesis de ciertos aminoácidos y ácidos nucleicos. La comparación con el genoma de una rizobacteria, *Sinorhizobium meliloti*, muestra que a pesar de que ambas bacterias están claramente relacionadas, *Candidatus Liberibacter* tiene un genoma más pequeño, con un contenido de A/T mucho más alto, y con una habilidad potencial de reparar ADN limitada deducida de la ausencia de dominios de exonucleasa en su ADN polimerasa y la presencia de un solo gen para ADN ligasa, contra 10 genes de *S. meliloti* (Hartung et al., 2011).

Estudios indican la susceptibilidad a antibióticos beta-lactámicos de *C. Liberibacter ZC*, lo que indica que su pared celular es semejante a la de otras bacterias que presentan péptidoglicano, y por tanto, susceptible a la enzima lisozima. Por otra parte, *C. Liberibacter asiaticus* presenta claramente una pared celular típica de bacterias Gram negativas, lo que también indica que el tratamiento con antibióticos beta lactámicos es posible, lo cual es una estrategia que está utilizándose de manera experimental en la Universidad de Florida y el USDA para el control de esta bacteria (Bové, 2006).

Otra estrategia que se ha considerado es la de inducir la expresión de genes involucrados en resistencia sistémica adquirida o la respuesta a patógenos. Sin embargo, desde el punto de vista comercial no es deseable, ya que las plantas de manera general reducen su productividad en situaciones de estrés. Estrategias paralelas han considerado el silenciamiento de genes clave en el insecto vector. ARN de interferencia (ARNi) para controlar psílidos sería expresado en la planta mediante la introducción del mismo al vector cuando se alimentara la planta, apagando genes esenciales en el insecto y, de este modo, causando la disminución de su población.

Se han propuesto diversas estrategias para el control de bacterias que viven en el dominio simplásmico y específicamente del agente causal de la HLB. Diversos laboratorios, principalmente en los Estados Unidos, han propuesto diferentes estrategias para controlar a la bacteria *Candidatus Liberibacter*. Por ejemplo, la transformación genética de cítricos se ha realizado exitosamente a través de técnicas mediadas por *Agrobacterium tumefaciens* y biolística. La tabla 2 describe la expresión de diferentes genes de interés agronómico, por ejemplo en especies de cítricos.

Tabla 2. Expresión de diferentes genes de interés agronómico en especies de cítricos*

Nombre común	Nombre científico	Gen introducido	Referencia
Citrange carrizo	<i>Citrus sinensis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>	Genes asociados al tizón de los cítricos	Kayim et al, 2004
		HAL2	Cervera, et al, 2000
		LEAFY APETALA1	Peña et al, 2001
Pomelo	<i>C. paradisi</i>	Genes de biosíntesis de carotenoides	Costa et al, 2002
		Proteína de la cápside de VTC	Moore, et al, 2000
		Genes de VTC	Febres, et al, 2003
Limón mexicano	<i>C. aurantifolia</i>	Proteína de la cápside de VTC	Domínguez et al., 2000
Mandarina pokan	<i>C. reticulata</i> Blanco	Gen quimérico de ribonucleasa	Li et al., 2002
Limón Rangpur	<i>C. limonia</i>	Gen bO (bacteriopsina)	Azevedo et al., 2006
Naranja agria	<i>C. aurantium</i>	Proteína de la cápside de VTC	Gutiérrez-E et al., 1997; Ghorbel et al., 2000
Naranja trifoliada	<i>P. trifoliata</i>	Poliproteína de la cápside pCP	Iwanami et al., 2004
		Citrus FT (CiFT) Factor de crecimiento epidérmico humano	Endo et al., 2005 Kobayashi et al., 1996
		rolC	Kaneyoshi y Kobayashi, 1999
Citrange Troyer	<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>	Versión truncada de VTC y gen Bar	Piestun et al., 2000
		Genes rolAB	Gentile et al., 2002, Cirvilleri et al., 2005
Naranja valenciana	<i>C. sinensis</i>	Gen de pectina metilesterasa	Guoert et al., 2005
Limón del oeste de la India	<i>Citrus aurantifolia</i>	Genes para la disminución de semillas	Koltunow et al., 2000

Hasta la fecha, la utilización de péptidos antimicrobianos, la inducción de la respuesta inmune innata y la utilización de ARN de interferencia contra psílidos se han empleado con resultados limitados.

5 Entre los ejemplos de péptidos antimicrobianos se encuentran el péptido meloide antimicrobial, Beta-defensina-1, Polifemusina-1, Taquipesina, Protegrina-1, Magainina, indolicidina (de origen animal); Cecropinas, Sarcotoxina IA, Pirrocoricina (originadas de Insectos) y Defensinas que son de origen vegetal, así como animal. La expresión de estas moléculas ha sido ya evaluada, pero los resultados no han producido los efectos deseados de control.

10 En la actualidad existen numerosos protocolos para la transformación genética de plantas con fines de control de enfermedades.

15 Por ejemplo, la Patente US6455759 se refiere a la producción de múltiples proteínas en una planta transgénica, e incluye la construcción de ADN que expresa dos proteínas de fusión unidas por un enlazador y que son escindidas por enzimas de la planta quedando ambas proteínas libres.

20 La Patente US7196057 se refiere a la producción de proteínas de fusión para proteger plantas de insectos patógenos, en la que una parte de estas proteínas es tóxica para el insecto y la otra parte de las mismas se transloca a toxina a través del intestino del insecto, mencionándose solo la posibilidad de obtener plantas transgénicas que expresen los vectores de estas proteínas de fusión sin mostrar pruebas de su desempeño.

25 La Patente WO2009/064255 se refiere a la utilización de una señal de anclaje que localiza una proteína de fusión al apoplasto de los elementos vasculares en una planta, lo cual puede ser útil para diseñar proteínas secretoras a la pared celular y/o el apoplasto de células de plantas y para producir proteínas secretoras en células de plantas como biorreactores.

30 La Patente WO99/28484 se refiere a un procedimiento para mejorar la resistencia o la tolerancia en una planta y sus descendientes a patógenos, que consiste en expresar una proteína de fusión que comprende un primer dominio con actividad anti-patógena, un enlazador y un segundo dominio también con actividad anti-patógena; describe también las construcciones de expresión, la expresión en *E. coli*, su introducción en *Agrobacterium sp* para mediar la transformación de plantas y su desempeño contra nemátodos patógenos.

A pesar de lo anterior, es esencial tener procedimientos y/o estrategias de control eficaces se dirijan a enfermedades

de plantas causadas por microorganismos que invaden el floema a través del simplasma, dado que hasta antes de la presente invención no existían procedimientos eficaces para su combate y/o control.

Descripción breve de la invención.

5 La presente invención da a conocer procedimientos eficaces para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos patógenos que invaden el floema de las plantas. Específicamente la presente invención da a conocer la modificación genética de explantes de cítricos transformados con *Agrobacterium tumefaciens* que contienen el gen CsPP16 de cítricos que tiene la SEQ. ID. No. 3, que es homólogo al gen CmPP16 probado en calabaza (Xoconostle-Cazares et al., 1999), tal como se define en las reivindicaciones. Este gen CsPP16 se fusionó traduccionalmente a través de un enlazador flexible que tiene la secuencia de SEQ. ID. No. 4 a péptidos antimicrobianos seleccionados del grupo que comprende alfa-defensina humana, lisozima humana, indolisina, magainina, cecropina, sarcotoxina, lisozima y mezclas de las mismas en las que el gen que codifica proteínas con actividad antimicrobiana, tiene la secuencia seleccionada entre el grupo que comprende SEQ. ID. No. 5, SEQ. ID. No. 8, SEQ. ID. No. 9, SEQ. ID. No. 10, SEQ. ID. No. 11, SEQ. ID. No. 12. Para este fin, se usó una bisagra que permite que las proteínas CsPP16 y los péptidos antimicrobianos se doblen independientemente. De acuerdo a la presente invención, las proteínas utilizadas en el control de bacterias patógenas en el floema son fusionadas al extremo amino con la bisagra y la proteína de movimiento supracelular CsPP16.

20 Todas las construcciones genéticas descritas en el presente documento contienen como promotor 1 al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor CaMV 35S y como secuencia terminadora a la secuencia NOS. Adicionalmente, otro grupo de construcciones contienen al promotor de expresión específica de floema 59880 de *Arabidopsis thaliana* (Ruiz-Medrano et al., 2011) dirigiendo la expresión de los péptidos antimicrobianos mencionados anteriormente, lo cual permite la expresión solamente en el tejido vascular, en el que se encuentra la bacteria fitopatógena. Todas las construcciones descritas en el presente documento contienen los bordes izquierdo y derecho del ADN-T de *Agrobacterium* en sus extremos, y carecen de marcadores de selección (figura 24). El primer procedimiento de transformación con las construcciones descritas anteriormente comprende, por ejemplo, la transformación genética de tallos y brotes de cítricos, los cuales se regeneran *in vitro* hasta obtener una plántula genéticamente modificada, la cual es injertada en un portainjertos o patrón, por ejemplo de naranja amarga de las variedades *Citrus macrophylla* o *Citrus volkameriana*. El patrón puede provenir de una plántula de un centímetro, por ejemplo, de la germinación de una semilla de naranja agria, o bien el patrón es una planta joven de cítricos, la cual se injerta lateralmente en un brote cuyo crecimiento se ha modificado genéticamente.

35 El segundo procedimiento de transformación con las construcciones descritas anteriormente, comprende promover la generación de pequeñas áreas transformadas genéticamente de plantas adultas, sean sanas o enfermas con la bacteria que produce la HLB. Este consiste en exponer el tejido vascular de tallos o ramas localizadas entre tejidos consumidores y productores (fotosintéticos). Esto se realiza por raspado hasta observar tejido verde fotosintético, en el que se coloca un algodón humedecido con la solución de *Agrobacterium* pretratada con acetosiringona y diluida en tampón con inductores de crecimiento vegetal (auxinas y citocininas). La planta o rama tratada se coloca en una bolsa para mantener la humedad elevada del parche con *Agrobacterium tumefaciens* hasta tres días, retirando el apósito después del tratamiento indicado. Las plantas son expuestas a los tratamientos de dos días hasta un mes, obteniéndose en todos los casos la expresión de los antimicrobianos en los tejidos vasculares y acumulados en los tejidos consumidores, que son los sitios de infección de la bacteria. Según la presente invención, después de la transformación de las plantas enfermas, el siguiente paso es monitorear la presencia de la bacteria causante de la HLB, la cual disminuye debido a los tratamientos de expresión de los antimicrobianos aplicados solos o en combinaciones. Las plantas enfermas que fueron tratadas mediante la presente invención recuperaron su fotosíntesis, indicando que los tejidos vasculares ya no estaban bloqueados y que las plantas fueron capaces de florecer y llevar a cabo un adecuado llenado de fruto. Por su parte, las plantas con tratamiento con Defensina florecieron, tal como se observa en la figura 21(A), produciendo dos limones de 101 y 84 gramos, los cuales fueron partidas en su eje transversal, mostrando que el mesocarpo es simétrico. Esta es la apariencia normal de frutos sanos, en contraste a los infectados, los cuales muestran secciones o mesocarpo asimétricos (figura 21(B)).

50 Los resultados obtenidos en la transformación de plantas enfermas de 1,20 m de altura mediante la presente invención y su evaluación hasta 210 días, muestran una disminución sustancial en los síntomas de la enfermedad de HLB así como la recuperación de las condiciones fisiológicas normales de la planta (crecimiento, producción de brotes, aumento de fotosíntesis, floración y llenado de frutos) (figura 17).

60 Además, la transformación genética de árboles jóvenes de 1,20 m con certificado de control sanitario, provenientes del vivero certificado Emiliano Zapata y expuestos a psílicos infectados en campo con la bacteria *Candidatus Liberibacter* en Tecomán Colima, México, bajo condiciones de bioseguridad (figura 22), obtuvieron nula o baja cantidad de bacterias, en contraste con los árboles control que fueron transformados con *Agrobacterium* con plásmidos sin genes codificantes para los antimicrobianos mencionados anteriormente. Los árboles descritos fueron expuestos a psílicos infectados con *Candidatus Liberibacter* y se evaluó la presencia de la bacterias después de 60 días. Esta evaluación consistió en recoger dos hojas fotosintéticas maduras y dos hojas jóvenes, denominadas brotes. Se aisló ADN total de la vena central y se estimó el número de bacterias mediante PCR en tiempo real del gen 16S de *Candidatus Liberibacter*, empleando sondas fluorescentes. Los valores obtenidos se normalizaron con el

gen endógeno de limón COX (figura 23). Los resultados obtenidos muestran que en los tratamientos con lisozima, defensina y una combinación de ambos (Lis y Def), la cantidad de bacterias se reduce o no es detectable, en contraste con las plantas control que no expresan antimicrobianos.

5 Además, el segundo procedimiento que comprende la transformación de explantes y su regeneración a través del cultivo de tejidos según la presente invención muestra que las plantas son capaces de regenerarse y son vigorosas. En estos experimentos, se obtuvieron plantas injertadas vigorosas expresando los antimicrobianos anteriormente mencionados, de los cuales se seleccionaron diez transformantes independientes para futuros ensayos de campo bajo condiciones de bioseguridad.

10

Descripción breve de las figuras.

Figura 1. Muestra los síntomas característicos de la HLB en árboles (superior izquierda) y en hojas (superior derecha), y los síntomas de la HLB en hojas y frutas (inferior). Se pueden observar frutos deformes con semillas abortadas y haces vasculares de color marrón (Tomado de Strategic Planning for the Florida Citrus Industry, Addressing Citrus, 2010).

15

Figura 2. Muestra el tejido vascular de plantas superiores, representando (izquierda) el corte transversal de un haz vascular, (A) ontogenia de un elemento de cribado; (B) división longitudinal de células de cambium y (C) crecimiento asimétrico; (D) fragmentación de núcleo y (E) su desaparición; (F) acumulación de cuerpos mucilaginosos y (G) perforación de placa cribosa en un tubo funcional (G). El elemento de cribado maduro (derecha) muestra los poros abiertos en la placa cribosa, bordeados de callosa, y la proteína P dispersa en el citoplasma periférico con RE y plástidos.

20

Figura 3. Muestra una micrografía electrónica que representa la presencia de *Candidatus liberibacter sp* restringida al floema vascular de un árbol cítrico (Tomado de Strategic Planning for the Florida Citrus Industry, Addressing Citrus, 2010). Se observa la célula acompañante (CA), el plasmodesmo (PD) y el tubo de cribado (TC).

25

Figura 4. Muestra la localización y estructura de un plasmodesmo. (Superior) El sitio de la pared en el que se encuentra cada poro o desmotúbulo que está atravesado por un plasmodesmo, en el que frecuentemente la pared es más gruesa; depósitos del retículo endoplásmico atravesados próximos a la pared y asociados al plasmodesmo en ambas células. (Inferior izquierda) Se observa también la representación de un tubo de cribado (morado) y una célula acompañante (rosa), e (inferior derecha) una micrografía de transmisión de un plasmodesmo ramificado presente entre la célula acompañante (CA) y tubo o elemento de cribado (EC). Nótese el retículo endoplásmico (ER) que atraviesa al plasmodesmo.

30

Figura 5. Muestra evidencia de la capacidad de movimiento de la proteína CmPP16 (Xoconostle-Cázares et al., 1999). Nótese que (a) la proteína se microinyectó en células del mesófilo de hojas de *Nicotiana benthamiana* y fue capaz de moverse de célula a célula; (d y g) cuando la proteína se complejó con ARN, ésta medió el movimiento de ARN a células vecinas. Como controles se muestra el ARN sentido de CmPP16 y ARN2 de RCNMV, los cuales no se translocan fuera de la célula por sí mismos. El movimiento de la proteína marcada con otra molécula fluorescente (TRITC) hacia otras células se muestra en (e) y (h).

35

Figura 6. Muestra que la CmPP16 se sintetiza en la célula acompañante y viaja al tubo de cribado para coincidir con la posición de *Candidatus Liberibacter*. (Izquierda) Muestra una imagen de microscopía confocal de una hibridación *in situ*, detectando al ARN que codifica la proteína CmPP16, situada en el haz vascular (verde); y (derecha) la inmunolocalización de la proteína en morado. Se utilizaron anticuerpos policlonales y se dirigieron contra la proteína CmPP16 y se revelaron con fosfatasa alcalina cromogénica, la cual produce el color morado (Xoconostle-Cázares et al., 1999).

40

Figura 7. Muestra la transformación de plantas maduras de cítricos, en especial la transformación de tallos con *A. tumefaciens*. Inicialmente (izquierda), se hace crecer el cultivo *in vitro* en condiciones aerobias en la bacteria que contiene el gen que codifica las proteínas antimicrobianas. Separadamente (centro), se retira la corteza de los árboles a transformar, con el fin de exponer el tejido vascular. El diagrama (derecha) muestra que (1) la célula reconoce señales de la planta, que son compuestos de bajo peso molecular, (2) estos compuestos son reconocidos por la bacteria a través de un sistema de dos componentes de Fosfo-relay, (3) se induce la síntesis del ADN-T presente en el plásmido binario, dando como resultado una cadena sencilla de ADN-T, el cual forma complejos con proteínas; (5) se encienden genes adicionales de virulencia, los cuales ayudan a movilizar (6) el ADN-T a la célula vegetal. En este proceso, se inserta de manera estable una copia de ADN-T en el genoma de las células vegetales.

45

Figura 8. Muestra el procedimiento de transformación de la presente invención por medio de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* de plantas maduras de limón mexicano. En el invernadero (superior izquierda) se retira la corteza del tallo a infectar (superior derecha), y el algodón se humedece con la solución que contiene *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes*. Posteriormente (centro izquierda), el algodón se coloca sobre el tallo, el cual (centro derecha) se envuelve en plástico flexible y se asegura con una cinta. Las plantas (inferior izquierda) se transfieren a bolsas de plástico para mantener una humedad relativa elevada, la cual favorece la transformación genética de las plantas. Después de la transformación (inferior derecha), las plantas se evalúan por su capacidad fotosintética, como indicativo de que sus haces vasculares son permeables.

50

Figura 9. Muestra el desarrollo de pequeñas áreas fotosintéticas protuberantes en forma de callos en las plantas inoculadas según la presente invención (izquierda). En el panel derecho se delinearon los tumores con una línea para poderse localizar visualmente.

55

Figura 10. Muestra la estimación de la fotosíntesis de las plantas tratadas según la presente invención. Se midió la fotosíntesis a 500 micromoles de intensidad luminosa. Los valores de la fotosíntesis corresponden a micromoles de

60

65

CO₂ fijados por cm⁻¹ x s⁻¹. El control corresponde a los valores promedio de cinco plantas infectadas inoculadas con agua. La barra GUS corresponde a plantas infectadas transformadas con el gen GUS (que codifica la beta-glucuronidasa). La barra DEF corresponde a la transformación con el gen que codifica la defensina fusionado con CsPP16, la barra LIS, lisozima-CsPP16 y LYD-CsPP16, la combinación de ambos antibacterianos. Como control positivo se emplearon plantas sanas de limón. Tal como se muestra, después del tratamiento, las plantas de limón infectadas y transformadas con antimicrobianos aumentan su capacidad fotosintética.

Figura 11. Muestra el número de brotes nuevos en las plantas tratadas según la presente invención. El gráfico indica el tamaño de los brotes nuevos en las plantas tratadas, en el que las plantas con brotes más grandes fueron aquellas que recibieron los tratamientos con antimicrobianos según la presente invención. Los tratamientos fueron: GUS (plantas que expresan una proteína informadora, sin capacidad antimicrobiana); DEF/LIS (plantas que expresan defensina humana fusionada con CsPP16 y lisozima fusionada con CsPP16; ambos genes se expresan a partir del promotor CaMV 35S y están flanqueados por los bordes izquierdo y derecho de ADN-T).

Figura 12. La tabla superior muestra el tamaño de los brotes nuevos en las plantas, posteriores al tratamiento indicado. El gráfico inferior indica la longitud promedio de los brotes nuevos. Las plantas con brotes más grandes fueron aquellas que recibieron los tratamientos con antimicrobianos según la presente invención. (Izquierda inferior) Muestra el aspecto de los brotes nuevos sin síntomas en plantas tratadas con antimicrobianos. Los tratamientos fueron: GUS (plantas que expresan una proteína informadora, sin capacidad antimicrobiana), DEF/LIS (plantas que expresan defensina humana fusionada con CsPP16 y Lisozima fusionada con CsPP16, ambos genes se expresan a partir del promotor CaMV 35S y están flanqueados por los bordes izquierdo y derecho de ADN-T).

Figura 13. Muestra el aspecto de las plantas tratadas después de 100 días de tratamiento.

Figura 14. Muestra la comparación de las áreas foliares de las plantas antes y después del tratamiento con los antimicrobianos, según la presente invención.

Figura 15. Muestra el desarrollo de pequeños tumores hiperproductores de antimicrobianos en los tallos de las plantas producidos por la transformación genética según la presente invención.

Figura 16. Muestra la cuantificación de la bacteria *Candidatus Liberibacter* a 60 días en plantas tratadas con antimicrobianos según la presente invención. Los datos son unidades arbitrarias calculadas por PCR en tiempo real.

Figura 17. Muestra (A) la detección de *Candidatus Liberibacter* en plantas adultas infectadas con HLB mediante PCR cuantitativa. Se midió la carga bacteriana por PCR en tiempo real, los datos se normalizaron con el gen endógeno COX de cítricos. Al valor más alto se le asignó el valor arbitrario de 1 (plantas no tratadas). El asterisco amarillo muestra el valor que se obtiene en plantas sanas. Los asteriscos rojos muestran las plantas que estando enfermas inicialmente, disminuyeron la carga bacteriana comparable a las plantas sanas. (B) Diagrama simplificado de la evaluación a los 210 días del tratamiento, en el que más de un tercio de las plantas están sanas, mientras que los dos tercios restantes han disminuido el 99% del contenido bacteriano.

Figura 18. Muestra el cultivo *in vitro* de semillas de limón mexicano. Se observa (izquierda) día 1, (centro) 3^a. semana incubado a temperatura ambiente en la oscuridad y (derecha) 5^a. semana incubado a temperatura ambiente en presencia de luz.

Figura 19. Muestra el proceso de regeneración de explantes transformados con *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens* según la presente invención. Se observan (superior izquierda) explantes en medio de co-cultivo, (superior derecha) explantes en medio de regeneración (SRM) durante 30 días en condiciones de oscuridad e (inferior) explantes en medio de regeneración (SRM) durante 60 días en condiciones de luz-oscuridad.

Figura 20. Muestra el desarrollo y regeneración de un injerto (izquierda) a 15 días (centro) y 60 días (derecha) después de la generación de injertos en diversos patrones.

Figura 21. Se muestran limones obtenidos de plantas enfermas con HLB y sometidas a tratamiento con el antimicrobiano defensina, según la presente invención. Se observa (A) el aspecto de limones que expresan defensina (nótese que su peso 101 y 84 g, se compara con el peso de un limón comercial de un peso promedio de 90 g); (B) un limón sano (izquierda), un limón infectado con segmentos irregulares y frutos más pequeños (centro) y un limón que expresa CsPP16-defensina (derecha), en la que la simetría del mesocarpo es comparable a la de frutos sanos.

Figura 22. Muestra el aspecto del ensayo de 120 plantas sanas transformadas con CsPP16-lisozima, CsPP16-defensina y una combinación de las mismas. Se realizó en microtúneles cubiertos con malla antiáfidos en Tecomán, Colima, México, zona endémica de HLB (superior). Los dos paneles de la izquierda contienen 160 plantas tratadas con el antimicrobiano y expuestas a psílido infectado con la bacteria *Candidatus Liberibacter*, CsPP16-defensina, CsPP16-indolisina, CsPP16-magainina, CsPP16-cecropina, CsPP16-sarcotoxina, CsPP16-lisozima y combinaciones de pares de las mismas. Muestra (inferior) el interior de un túnel.

Figura 23. Muestra la cuantificación de la bacteria *Candidatus Liberibacter* en árboles jóvenes de limón mexicano que expresan CsPP16-defensina, CsPP16-lisozima y ambas a los 60 días de haberse expuesto a psíidos infectados. Los tratamientos con antimicrobianos, según la presente invención (izquierda), muestran menor cantidad de bacterias y se compararon con el control negativo. En contraste, las plantas de control sin antimicrobianos (derecha) muestran en general mayor cantidad de bacterias. En defensina los inventores de la presente invención detectaron a bajos niveles la bacteria en una sola planta, mientras que en el tratamiento con lisozima los inventores de la presente invención detectaron dos plantas, también a niveles bajos. En la combinación, puede apreciarse la detección de *Candidatus Liberibacter* en dos plantas. Estas plantas correlacionan con niveles bajos de antimicrobianos.

Figura 24. Muestra las unidades de expresión de proteínas con actividad antimicrobiana según la presente invención, capaces de expresar dichas proteínas en el floema. Se puede observar (superior) la unidad de expresión que contiene el promotor AT5G59880 e (inferior) la unidad de expresión que contiene el promotor CaMV 35S.

Figura 25. Muestra la disminución de bacteria CLa asociada a la enfermedad HLB, que fue detectada por EMA-PCR en tiempo real.

Figura 26. Muestra el análisis toxicológico agudo realizado en ratones BALB/c con zumo de limón proveniente de frutos de plantas tratadas según la presente invención.

5 **Figura 27.** Muestra el aspecto de árboles de limón mexicano adultos bajo confinamiento a los 3 meses de tratamiento con antimicrobianos según la presente invención.

Figura 28. Muestra el aspecto de las plantas crecidas en los microtúneles después de 12 meses (limón mexicano) y 6 meses de tratamiento (limón persa, naranja, pomelo y mandarina).

Figura 29. Muestra el aspecto de las plantas crecidas bajo biocontención.

10 **Figura 30.** Muestra plantas de limón tratadas según la presente invención.

Figura 31. Muestra el contenido de bacterias (izquierda) a los 3 meses de tratamiento en brotes y hojas maduras de plantas infectadas tratadas según la presente invención y la fotosíntesis (derecha) inicial y final de plantas tratadas con defensina (tratamiento 1), lisozima (tratamiento 2) y una mezcla de defensina con lisozima (tratamiento 3).

15 **Figura 32.** Muestra el área foliar de plantas de (A) naranja, (B) pomelo, (C) limón persa y (D) mandarina, tratadas según la presente invención. Se puede observar el área foliar en plantas maduras (barra izquierda de cada grupo) y jóvenes (barra derecha de cada grupo).

Figura 33. Muestra los parámetros bromatológicos obtenidos para zumo de limón obtenido de frutos de los árboles tratados con defensina, lisozima y una mezcla de las mismas, además de limones de árboles control.

20 **Figura 34.** Muestra la inmunodetección de la defensina en tejido vascular de un limón modificado genéticamente. Se puede observar (X) xilema, (C) cambium y (F) floema (células acompañantes y tubos de cribado).

Figura 35. Se muestra un ensayo de PCR punto final de la detección de genes que codifican los antimicrobianos en plantas tratadas con *Agrobacterium tumefaciens* transformado con las construcciones mencionadas. Se observa un fragmento de 402 pb, el cual corresponde al gen que codifica la lisozima humana.

25 **Figura 36.** Muestra (A) el aspecto del polen de plantas tratadas con defensina (RR09) y plantas de control sin tratamiento; (B) el promedio del área de polen sin tratamiento (barra izquierda) y con tratamiento antimicrobiano (lisozima) (barra derecha).

Descripción detallada de la invención.

30 La presente invención se refiere a procedimientos eficaces para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos patógenos que invaden el floema de las plantas, particularmente a procedimientos para la generación de plantas transgénicas, entre las que se incluyen cítricos, resistentes a la infección bacteriana por el clado de *Candidatus Liberobacter* (*Ca.L.*) que ocasiona la enfermedad HLB; estas bacterias se ubican de manera restringida en el floema, por lo que los protocolos en los que se utilizan antibióticos no han sido exitosos.

35 Hasta la presente invención, la solución a esta enfermedad no se había abordado mediante procedimientos de ingeniería genética, con la finalidad de que las plantas generadas adquieran una construcción genética que se encuentra y expresa de manera estable.

40 Se considera que el procedimiento más eficaz para el manejo a largo plazo de enfermedades asociadas con Liberobacterias se basa en la adquisición de resistencia en las plantas huésped, por lo que la presente invención se basa en la adquisición de resistencia en las plantas utilizando ingeniería genética. Por lo tanto, la presente invención comprende un procedimiento de transformación genética, el cual es adecuado para especies de cítricos y está dirigido a transferir un mecanismo de defensa para eliminar o combatir la infección ocasionada por, como mínimo, un microorganismo patógeno que invade el floema de las plantas, por ejemplo, bacterias del grupo que comprende *Candidatus Liberobacter*, *Candidatus Liberobacter asiaticus*, *Candidatus Liberobacter africanus* y/o *Candidatus Liberobacter americanus*, y así controlar las enfermedades asociadas a estas infecciones, tales como por ejemplo HLB y Zebra chip (ZC). El éxito del procedimiento de la presente invención tiene como base utilizar un mecanismo utilizado por las plantas para la translocación de moléculas con actividad antimicrobiana a través del tejido vascular.

50 La presente invención se basa, por ejemplo, en el hecho de que la pared celular de *Candidatus Liberobacter spp.* está compuesta de peptidoglicanos, por lo que los inventores de la presente invención asumen que las bacterias son susceptibles a ser destruidas por enzimas como la lisozima. Así mismo la presente invención se refiere a una estrategia para controlar la infección utilizando la necesidad de *Candidatus Liberobacter spp.* para establecerse en el floema de la planta.

60 El procedimiento de la presente invención comprende lograr la expresión de un gen quimérico que codifica una proteína de fusión que posee una doble función: actuar como un transportador dentro del tejido vascular de la planta para realizar una actividad microbiana, por ejemplo, para destruir la pared celular de bacterias patógenas que invaden el floema de las plantas, por ejemplo *Candidatus Liberobacter spp.* Durante el desarrollo de la presente invención, los inventores de la presente invención realizaron un protocolo de transformación con el cual se logró obtener una eficacia de transformación razonable y una integración exitosa y estable del transgen quimérico propuesto en el presente documento, tal como confirmaron los datos experimentales mostrados a continuación, los cuales también muestran que la protección contra la infección HLB mediante el procedimiento de la presente invención, también fue exitosa debido a la transferencia, la expresión y la funcionalidad del gen transferido.

65

El equipo de investigación de los inventores de la presente invención ha caracterizado con detalle una proteína que une ARN independiente de su secuencia; se la ha denominado CmPP16, en la que esta proteína no solo se asocia a diferentes ARN *in vitro*, sino que es capaz de transportarlos de una célula a otra a través de plasmodesmos (Xoconostle-Cázares et al., 1999). La CmPP16 es, por tanto, funcionalmente similar a las proteínas de movimiento de virus de ARN aunque, como ya ha quedado implícito, su función en plantas sanas es desconocida. Este trabajo pionero demostró la presencia de un sistema endógeno de la planta sana para translocar proteínas y ácidos nucleicos, un sistema que es usado por los virus para moverse sistémicamente. Homólogos de la proteína CmPP16 se han encontrado en diferentes especies vegetales, aunque su conservación no es tan elevada. Las investigaciones de los inventores de la presente invención también indican que CmPP16 fusionada a proteínas de mayor tamaño no pierde su capacidad de transporte intercelular a través de plasmodesmos. Una evidencia de la capacidad de movimiento que tiene la proteína CmPP16 son los resultados mostrados en la figura 5, en los que las imágenes de microscopía confocal muestran que cuando la proteína CmPP16 se microinyecta en células mesofílicas de hojas de *Nicotiana benthamiana* es capaz de moverse de célula a célula; y cuando CmPP16 se complejó con ARN, también medió el movimiento del ARN a células vecinas. La figura 6 muestra la ubicación de CmPP16 en el floema.

Con respecto a patógenos que circulan por el floema y que raramente lo dejan durante el proceso infeccioso, una limitación en el tratamiento de enfermedades causadas por estos patógenos es la incapacidad de agentes químicos (por ejemplo, antibióticos) de alcanzar los elementos de cribado que albergan el patógeno. Basado en este precedente, para el desarrollo de la presente invención los inventores de la presente invención han considerado que la proteína CsPP16 que tiene la SEQ. ID. No. 3, funciona como vehículo para transportar proteínas al interior de los elementos de cribado, que normalmente no son accesibles. Por lo tanto, sugerimos que una proteína con actividad antimicrobiana, tal como se define en las reivindicaciones, fusionada a CsPP16, tal como se define en las reivindicaciones, podría tener acceso al floema y particularmente al elemento de cribado, en el que el péptido ejerce su actividad antimicrobiana y/o antibacteriana. Para conseguir éxito en el planteamiento estratégico de la presente invención, fue necesario diseñar el vector de expresión de las proteínas de fusión CsPP16-péptido descrito aquí y de realizar una estrategia de transformación.

La presente invención propone la utilización de un gen que codifica la proteína CsPP16 fusionada con una proteína con actividad antimicrobiana, por ejemplo, con actividad antibacteriana; en este caso, por ejemplo, la lisozima humana, tal como se define en las reivindicaciones. La expresión de dicha proteína de fusión va a ser dirigida por un promotor específico de floema, por ejemplo, el cual previamente se ha caracterizado. Dicho promotor regula la expresión de una proteína que se requiere para mantener la elevada conductividad del floema, tal como por ejemplo el factor de despolimerización de actina 3 (ADF3), aunque otros factores que consigan el mismo efecto pueden ser utilizados en la presente invención.

En base a la literatura, los inventores de la presente invención seleccionaron proteínas con actividad antimicrobiana en otros sistemas, seleccionando a aquellas con actividad antimicrobiana en plantas. Debe notarse que los inventores de la presente invención utilizaron lisozima humana y defensina humana para evitar que las recombinantes generaran problemas inmunes en humanos, ya que los frutos cítricos están destinados para consumo humano.

Según la presente invención, las secuencias de las proteínas antibióticas fueron obtenidas de la base de datos GenBank (NCBI) y la secuencia de aminoácidos se convirtió a una secuencia de bases con la utilización más común de codones en cítricos. La información requerida para cambiar la utilización de codones está en la tabla 3.

Para proveer de los elementos esenciales para poder llevar a cabo la presente invención, a continuación se presenta la lista de codones de uso común para cítricos, disponible en la base de datos: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>.

<i>Indian citrus ringspot virus</i> [gbvrl]: 12	<i>Citrus idaeovirus</i> [gbvrl]: 1
<i>Citrus sinensis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i> [gbpln]: 3	<i>Citrus tatter leaf virus</i> [gbvrl]: 3
<i>Citrus natsudaaidai</i> [gbpln]: 1	<i>Cytoplasmic citrus leprosis virus</i> [gbvrl]: 18
<i>Citrus leaf blotch virus</i> [gbvrl]: 3	<i>Citrus leaf rugose virus</i> [gbvrl]: 4
<i>mitochondrion Citrus junos</i> [gbpln]: 1	<i>Citrus variegation virus</i> [gbvrl]: 17
<i>Citrus junos</i> [gbpln]: 7	<i>Citrus maxima</i> [gbpln]: 8
<i>Citrus sinensis</i> x <i>Citrus reticulata</i> [gbpln]: 1	<i>Citrus x paradisi</i> [gbpln]: 28
<i>Citrus aurantiifolia</i> [gbpln]: 1	<i>Citrus kinokuni</i> [gbpln]: 1
<i>Citrus latipes</i> [gbpln]: 1	<i>Citrus cv. Shiranuhi</i> [gbpln]: 12
<i>Citrus hystrix</i> [gbpln]: 1	<i>Citrus unshiu</i> [gbpln]: 64
<i>Microcitrus sp. citruspark01</i> [gbpln]: 1	<i>Mitochondrion Citrus jambhiri</i> [gbpln]: 1
<i>Citrus hybrid cultivar</i> [gbpln]: 1	<i>Citrus jambhiri</i> [gbpln]: 15
<i>Citrus yellow mosaic virus</i> [gbvrl]: 6	<i>Citrus psorosis virus</i> [gbvrl]: 9
<i>Citrus limon</i> [gbpln]: 11	<i>Citrus cv. Sainumphung</i> [gbpln]: 5
<i>Chloroplast Citrus sinensis</i> [gbpln]: 89	<i>Citrus iyo</i> [gbpln]: 2
<i>Citrus sinensis</i> [gbpln]: 116	<i>Citrus reticulata</i> [gbpln]: 3
<i>Citrus macrophylla</i> [gbpln]: 2	<i>Citrus clementina</i> [gbpln]: 4
<i>Citrus sudden death-associated virus</i> [gbvrl]: 4	<i>Citrus ringspot virus</i> [gbvrl]: 1

Citrus tristeza virus [gbvrl]: 476*Citrus clementina* x *Citrus reticulata* [gbpln]: 4

Para el diseño de las construcciones utilizadas en la presente invención, después de obtener la secuencia de los genes sintéticos, a éstos se agregaron secuencias reguladoras, por ejemplo del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador NOS. Sin embargo, otras secuencias reguladoras que funcionen de la misma manera pueden utilizarse para los fines de la presente invención.

Tabla 3. Utilización de codones comunes en *Citrus sinensis* x *Citrus reticulata*

<i>Citrus sinensis</i> x <i>Citrus reticulata</i> [gbpln]: CD (354 codones)				
Campos: [triplete] [frecuencia: por miles] ([número])				
UUU 19.8 (7)	UCU 14.1 (5)	UAU 22.6 (8)	UGU 5.6 (2)	
UUC 19.8 (7)	UCC 8.5 (3)	UAC 16.9 (6)	UGC 8.5 (3)	
UUA 2.8 (1)	UCA 14.1 (5)	UAA 0.0 (0)	UGA 0.0 (0)	
UUG 22.6 (8)	UCG 2.8 (1)	UAG 2.8 (1)	UGG 8.5 (3)	
CUU 22.6 (8)	CCU 14.1 (5)	CAU 28.2 (10)	CGU 2.8 (1)	
CUC 16.9 (6)	CCC 14.1 (5)	CAC 2.8 (1)	CGC 0.0 (0)	
CUA 16.9 (6)	CCA 19.8 (7)	CAA 28.2 (10)	CGA 2.8 (1)	
CUG 19.8 (7)	CCG 0.0 (0)	CAG 5.6 (2)	CGG 5.6 (2)	
AUU 42.4 (15)	ACU 8.5 (3)	AAU 25.4 (9)	AGU 16.9 (6)	
AUC 19.8 (7)	ACC 11.3 (4)	AAC 16.9 (6)	AGC 19.8 (7)	
AUA 8.5 (3)	ACA 14.1 (5)	AAA 25.4 (6)	AGA 8.5 (3)	
AUG 42.4 (15)	ACG 2.8 (1)	AAG 42.4 (15)	AGG 5.6 (2)	
GUU 33.9 (12)	GCU 22.6 (6)	GAU 36.7 (13)	GGU 36.7 (13)	
GUC 11.3 (4)	GCC 19.8 (8)	GAC 25.4 (9)	GGC 14.1 (5)	
GUA 11.3 (4)	GCA 14.1 (1)	GAA 28.2 (10)	GGA 22.6 (8)	
GUG 14.1 (5)	GCG 2.8 (1)	GAG 19.8 (7)	GGG 5.6 (2)	

NOTA: Al codificar GC 43,22% 1ª letra GC 51,98% 2ª letra GC 34,75% 3ª letra GC 42,94%

Todas las construcciones genéticas descritas en el presente documento contienen como promotor 1 al promotor d35S del virus del mosaico de la coliflor CaMV 35S y como secuencia terminadora a la secuencia NOS. Adicionalmente, otro grupo de construcciones contienen al promotor de expresión específica en floema 59880 de *Arabidopsis thaliana* dirigiendo la expresión de los péptidos antimicrobianos mencionados anteriormente, lo que permite la expresión solamente en el tejido vascular en el que se encuentra, por ejemplo, el microorganismo fitopatógeno. Todas las construcciones descritas en el presente documento contienen en sus extremos los bordes izquierdo y derecho del ADN-T de *Agrobacterium* y carecen de marcadores de selección.

El objetivo principal de la presente invención es proporcionar procedimientos para obtener plantas genéticamente modificadas o transgénicas que expresan una proteína de fusión mediante la cual adquieren resistencia frente a infecciones por microorganismos que afectan el floema de las plantas generando enfermedades, tal como la bacteria que causa la HLB. Uno de los procedimientos de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- 1) Conjuguar a una cepa de *Agrobacterium* un vector de expresión de ADN de la proteína CsPP16 fusionada a una molécula antibacteriana,
- 2) Inocular una planta susceptible a la infección por agentes microbianos que causan enfermedades, por ejemplo, agentes bacterianos que ocasionan HLB o enfermedades causadas por microorganismos que afectan el floema de las plantas, con dicha cepa de *Agrobacterium* que posee el vector de expresión,
- 3) Verificar la adquisición del vector y su expresión, su estabilidad en las plantas transformadas y sus descendientes, y verificar la resistencia adquirida.

En una realización, el procedimiento anterior comprende en la etapa 2), la inoculación de plantas infectadas previamente con el agente antimicrobiano causante de la enfermedad, con los vectores descritos en el presente documento.

Según la presente invención, se proporciona la construcción del vector de expresión, tal como se define en las reivindicaciones, el cual básicamente debe poseer el gen que codifica CsPP16 que tiene la SEQ. ID. No. 3 unida a través de un enlazador flexible que tiene la SEQ. ID. No. 4 al gen que codifica una proteína antimicrobiana que tiene una secuencia seleccionada del grupo que comprende la SEQ. ID. No. 5, SEQ. ID. No. 8, SEQ. ID. No. 9, SEQ. ID. No. 10, SEQ. ID. No. 11, SEQ. ID. No. 12, con especificidad para eliminar microorganismos que afectan el floema de las plantas, por ejemplo, bacterias localizadas en el floema de las plantas, en particular bacterias, tales como *Candidatus Liberibacter*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus* y/o *Candidatus Liberibacter americanus*, que ocasionan la infección HLB en especies de cítricos. En las realizaciones de la presente invención también están aquellos vectores de expresión que facilitan la expresión de una proteína de fusión seleccionada del grupo que comprende CsPP16-péptido con actividad antimicrobiana, CsPP16-péptido mieloides antimicrobiano, CsPP16-lisozima, CsPP16-Beta-defensina-1, CsPP16-Polifemusina-1, CsPP16-Taquiplesina, CsPP16-Protegrina-1, CsPP16-Magainina, CsPP16-Indolicidina, CsPP16-Cecropina, CsPP16-Sarcotoxina IA, CsPP16-Pirrococina y CsPP16-Defensinas, así como una mezcla de las mismas.

Otra realización de la presente invención es la posibilidad de generar resistencia a la condición "Zebra chip" (ZC) que ocurre en patatas por *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

5 Aún, otras realizaciones de la presente invención son las construcciones de los vectores de expresión mostradas en la figura 24, los cuales se caracterizan por poseer las siguientes secuencias:

- 10 • Unidad de expresión CsPP16-Lisozima, que contiene el borde izquierdo del ADN-T de *A. tumefaciens* (SEQ. ID. No. 1), la versión corta del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (SEQ. ID. No. 2), el gen que codifica la proteína 16K del floema de *Citrus aurantifolia*, ortóloga en cítricos o proteína CsPP16 (SEQ. ID. No. 3), un polienlazador flexible (SEQ. ID. No. 4), lisozima humana con uso de codones en cítricos (SEQ. ID. No. 5) y el terminador NOS y el borde derecho de ADN-T de *A. tumefaciens* (SEQ. ID. No. 6).
- 15 • Unidad de expresión CsPP16-Defensina, que contiene el borde izquierdo del ADN-T de *A. tumefaciens* (SEQ. ID. No. 1), el promotor 35S largo del virus del mosaico de la coliflor (SEQ. ID. No. 7), el gen que codifica la proteína 16K del floema de *Citrus aurantifolia* ortóloga en cítricos o proteína CsPP16 (SEQ. ID. No. 3), un polienlazador flexible (SEQ. ID. No. 4), defensina humana con uso de codones en cítricos (SEQ. ID. No. 8), el terminador NOS y el borde derecho del ADN-T de *A. tumefaciens* (SEQ. ID. No. 6).

20 También, y para los propósitos de la presente invención, las siguientes unidades de expresión también están comprendidas:

- 25 • Unidad de expresión CsPP16-Magainina que contiene todos los elementos indicados para la unidad de expresión CsPP16-Defensina, con excepción de la Defensina humana con uso de codones en cítricos (SEQ. ID. No. 8) que se sustituye por Magainina con uso de codones en cítricos (SEQ. ID. No. 9).
- Unidad de expresión CsPP16-Cecropina que contiene todos los elementos indicados para la unidad de expresión CsPP16-Defensina, con excepción de la Defensina humana con uso de codones en cítricos (SEQ. ID. No. 8) que se sustituye por Cecropina con uso de codones en cítricos (SEQ. ID. No. 10).
- 30 • Unidad de expresión CsPP16-Sarcotoxina que contiene todos los elementos indicados para la unidad de expresión CsPP16-Defensina, con excepción de la Defensina humana con uso de codones en cítricos (SEQ. ID. No. 8) que se sustituye por Sarcotoxina con uso de codones en cítricos (SEQ. ID. No. 11).
- Unidad de expresión CsPP16-Indolicidina que contiene todos los elementos indicados para la unidad de expresión CsPP16-Defensina, con excepción de la Defensina humana con uso de codones en cítricos (SEQ. ID. No. 8) que se sustituye por Indolicidina con uso de codones en cítricos (SEQ. ID. No. 12).

35 En una de las realizaciones de la presente invención, el promotor 35S corto (SEQ. ID. No. 2) o promotor largo (SEQ. ID. No. 7) del virus del mosaico de la coliflor que se encuentra en las unidades de expresión de la presente invención CsPP16-Lisozima, CsPP16-Defensina, CsPP16-Magainina, CsPP16-Cecropina, CsPP16-Sarcotoxina y CsPP16-Indolicidina, mencionadas anteriormente, puede sustituirse por el promotor vascular AT5G59880 (SEQ. ID. No. 13).

40 Las unidades de expresión mencionadas anteriormente fueron sintetizadas posteriormente por GenScript USA Inc., secuenciadas para verificar que no se insertaron mutaciones en el proceso de ensamblaje y clonadas en el vector con resistencia a antibiótico beta-lactámico. Los plásmidos obtenidos se transformaron por electroporación en las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*, seleccionando las bacterias transformantes con el antibiótico Carbenicilina a una concentración final de 100 µg/ml.

45 El primer procedimiento de transformación con las construcciones descritas anteriormente comprende, por ejemplo, la transformación genética de tallos y brotes de cítricos, los cuales se regeneran *in vitro* para obtener una plántula genéticamente modificada, la cual se injerta en un portainjerto o patrón, tal como naranja agria y las variedades volkameriana o macrophylla. El patrón puede provenir de una plántula de 1 cm, proveniente de la germinación de una semilla de naranja agria, o bien el patrón es una planta joven de cítricos, a la cual se le injerta lateralmente la yema genéticamente modificada para su crecimiento.

50 El segundo procedimiento de transformación con las construcciones descritas anteriormente comprende promover la generación de pequeñas áreas transformadas genéticamente de plantas adultas, sanas o enfermas con la bacteria que produce la HLB. Este involucra exponer el tejido vascular de tallos o ramas situados entre tejidos consumidores y productores (fotosintéticos). Esto se realiza por raspado hasta encontrar el tejido verde fotosintético y colocando ahí un algodón humedecido con tampón con una solución de *Agrobacterium* pretratada con acetosiringona y diluida en tampón con inductores de crecimiento vegetal (auxinas y citocininas). La planta o rama tratada se coloca en una bolsa para mantener en humedad elevada el parche con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* durante hasta tres días, retirando el apósito después del tratamiento indicado. Las plantas son expuestas a los tratamientos de dos días hasta un mes, obteniéndose en todos los casos la expresión de los antimicrobianos en los tejidos vasculares y acumulados en los tejidos consumidores, que son los sitios de infección de la bacteria. Según la presente invención, después de la transformación de las plantas enfermas, se monitorea la presencia del microorganismo causante de la enfermedad, por ejemplo, la bacteria causante de la HLB, la cual disminuye debido a los tratamientos de expresión de los antimicrobianos aplicados solos o en combinaciones. Las plantas enfermas que fueron tratadas mediante la

presente invención recuperaron su fotosíntesis, indicando que los tejidos vasculares ya no estaban bloqueados y que las plantas fueron capaces de florecer y llevar a cabo un adecuado llenado de fruto. Por su parte, las plantas con tratamiento con Defensina florecieron; la figura 21A muestra dos limones obtenidos, de 101 y 84 g, que se cortaron en su eje transversal, mostrando un mesocarpo simétrico. Esta apariencia es normal en frutos sanos, en

5
10
15
20
25
30
35

Los resultados obtenidos en la transformación de plantas enfermas de 1,20 m de altura mediante la presente invención y su evaluación hasta 210 días, muestran una disminución sustancial en los síntomas de la enfermedad HLB y la recuperación de las condiciones fisiológicas normales de la planta (crecimiento, producción de brotes, aumento de fotosíntesis, floración y llenado de frutos) (figura 17).

Además, la transformación genética de árboles jóvenes de 1,20 m, con certificado de sanidad del vivero certificado Emiliano Zapata, fueron expuestos a psíidos infectados en campo con la bacteria *Candidatus Liberibacter* en Tecomán Colima, México, bajo condiciones de bioseguridad (figura 22) obtuvo una cantidad de bacterias nula o

15
20
25
30
35

baja, en contraste con los árboles de control que fueron transformados con *Agrobacterium*, con plásmidos sin genes codificantes de los antimicrobianos mencionados anteriormente. Los árboles descritos fueron expuestos a psíidos infectados con *Candidatus Liberibacter*, y se evaluó la presencia de la bacteria después de 60 días. Dicha evaluación consistió en recoger 2 hojas fotosintéticas maduras y 2 hojas jóvenes, denominadas brotes. El ADN total de la vena central se aisló, y se estimó la cantidad de bacterias por PCR en tiempo real del gen 16S de *Candidatus Liberibacter* utilizando sondas fluorescentes. Los valores obtenidos fueron normalizados con el gen endógeno de limón COX (figura 23). Los resultados muestran que en el tratamiento con lisozima defensina, y una combinación de las mismas (Lis y Def), la cantidad de bacterias se reduce o no es detectable, en contraste con plantas control que no expresan los antimicrobianos.

Además, el segundo procedimiento que comprende la transformación de explantes y su regeneración vía cultivo de tejidos según la presente invención muestra que las plantas son capaces de regenerarse y son vigorosas. En estos experimentos, se obtuvieron plantas injertadas vigorosas expresando los antimicrobianos mencionados anteriormente, de los cuales se seleccionaron diez transformantes independientes para futuros ensayos en campo bajo condiciones de bioseguridad.

A continuación, los inventores de la presente invención describen como ejemplos dos construcciones usadas que incluyen las secuencias fusionadas, las cuales fueron sintetizadas, y ejemplos del procedimiento para obtener plantas genéticamente transformadas resistentes a la HLB. También incluyen una descripción que utiliza ejemplos para determinar el desempeño de las construcciones como vectores para la transferencia de los genes de fusión

35
40
45
50
55

diseñados. Los siguientes ejemplos se incluyen con el único propósito de ilustrar la presente invención, sin que impliquen limitaciones a su alcance.

Ejemplo 1. Obtención de unidades de expresión CsPP16 que contienen el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Para obtener dichas unidades de expresión de las secuencias indicadas en la tabla 4, éstas se sintetizaron y ensamblaron en el orden indicado; se secuenciaron para verificar que no se insertaron mutaciones en el proceso de ensamble y finalmente se clonaron en el vector de Genscript, que contenía resistencia al antibiótico carbenicilina.

Los plásmidos recombinantes resultantes se transformaron en células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*. Los inventores de la presente invención utilizaron el antibiótico carbenicilina, el cual es la versión sintética de la ampicilina y es más estable. Se extrajo ADN plasmídico de las bacterias resistentes, y se verificó la presencia del plásmido recombinante en gel de agarosa.

Para verificar la presencia del gen de interés con actividad antimicrobiana insertado en el vector o en la planta transformada mediante éste, se utilizaron oligonucleótidos específicos para su amplificación mediante PCR; por ejemplo en el caso de la lisozima, el oligonucleótido directo 3'-AGGTTTTTCGAAAGATGCGAACTTGCTAGAA-5' (SEQ. ID. No. 14) y el inverso 3'-AAACACCGCAACCTTGAACATATTGTCTGC-5' (SEQ. ID. No. 15); y en el caso de la defensina, el oligonucleótido directo 3'-ATGAGAGTTCTTTATCTTCTTTTCAGCTTC-5' (SEQ. ID. No. 16) y el inverso 3'-ACTTCTTCTTGAGCATCTTGACCTGGAA-5' (SEQ. ID. No. 17).

Ejemplo 2. Obtención de unidades de expresión CsPP16 que contienen el promotor vascular AT5G59880. Para la obtención de dichas unidades de expresión, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, la versión corta (SEQ. ID. No. 2) o la versión larga (SEQ. ID. No. 7), indicadas en las unidades de expresión de la tabla 4 se sustituyeron por el promotor vascular AT5G59880 (SEQ. ID. No. 13). Tal como en el ejemplo 1, se sintetizaron las secuencias resultantes y se ensamblaron en el orden indicado, se secuenciaron para verificar que no se insertaron mutaciones en el proceso de ensamble y finalmente se clonaron en el vector de la compañía Genscript, que contiene resistencia al antibiótico carbenicilina.

Tal como en el ejemplo 1, los plásmidos recombinantes resultantes se transformaron en células competentes de

Agrobacterium tumefaciens y *A. rhizogenes*. Los inventores de la presente invención utilizaron el antibiótico carbenicilina, que es la versión sintética de la ampicilina y es más estable. Se extrajo ADN plasmídico de las bacterias resistentes, y se verificó la presencia del plásmido recombinante en gel de agarosa.

5

Tabla 4

Unidad de expresión	Orden de ensamble y secuencia	SEQ. ID. No.
CsPP16-Lisozima	1. Borde izquierdo del ADN-T de <i>A. tumefaciens</i>	1
	2. Versión corta del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor	2
	3. Gen que codifica la proteína 16K del floema de <i>Citrus aurantifolia</i> ortóloga en cítricos o proteína CsPP16	3
	4. Polienlazador flexible	4
	5. Lisozima humana con uso de codones en cítricos	5
	6. Terminador NOS y borde derecho del ADN-T de <i>A. tumefaciens</i>	6
CsPP16-Defensina	1. Borde izquierdo del ADN-T de <i>A. tumefaciens</i>	1
	2. Versión corta del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor	2
	3. Gen que codifica la proteína 16K del floema de <i>Citrus aurantifolia</i> ortóloga en cítricos o proteína CsPP16	3
	4. Polienlazador flexible	4
	5. Defensina humana con uso de codones en cítricos	8
	6. Terminador NOS y borde derecho del ADN-T de <i>A. tumefaciens</i>	6
CsPP16-Magainina	1. Borde izquierdo del ADN-T de <i>A. tumefaciens</i>	1
	2. Versión corta del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor	2
	3. Gen que codifica la proteína 16K del floema de <i>Citrus aurantifolia</i> ortóloga en cítricos o proteína CsPP16	3
	4. Polienlazador flexible	4
	5. Magainina con uso de codones en cítricos	9
	6. Terminador NOS y borde derecho de ADN-T de <i>A. tumefaciens</i>	6
CsPP16-Cecropina	1. Borde izquierdo del ADN-T de <i>A. tumefaciens</i>	1
	2. Versión corta del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor	2
	3. Gen que codifica la proteína 16K del floema de <i>Citrus aurantifolia</i> ortóloga en cítricos o proteína CsPP16	3
	4. Polienlazador flexible	4
	5. Cecropina con uso de codones en cítricos	10
	6. Terminador NOS y borde derecho de ADN-T de <i>A. tumefaciens</i>	6
CsPP16-Sarcotoxina	1. Borde izquierdo del ADN-T de <i>A. tumefaciens</i>	1
	2. Versión corta del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor	2
	3. Gen que codifica la proteína 16K del floema de <i>Citrus aurantifolia</i> ortóloga en cítricos o proteína CsPP16	3
	4. Polienlazador flexible	4
	5. Sarcotoxina con uso de codones en cítricos	11
	6. Terminador NOS y borde derecho de ADN-T de <i>A. tumefaciens</i>	6
CsPP16-Indolicidina	1. Borde izquierdo del ADN-T de <i>A. tumefaciens</i>	1
	2. Versión corta del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor	2
	3. Gen que codifica la proteína 16K del floema de <i>Citrus aurantifolia</i> ortóloga en cítricos o proteína CsPP16	3
	4. Polienlazador flexible	4
	5. Indolicidina con uso de codones en cítricos	12
	6. Terminador NOS y borde derecho de ADN-T de <i>A. tumefaciens</i>	6

Para verificar la presencia del gen de interés con actividad antimicrobiana insertado en el vector o en la planta transformada de este modo, se utilizaron oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR; por ejemplo, en el caso de lisozima, el oligonucleótido directo 3'-AGGTTTTTCGAAAGATGCGAACTTGCTAGAA-5' (SEQ. ID. No. 14) y el inverso 3'-AAACACCGCAACCTTGAACATATTGTCTGC-5' (SEQ. ID. No. 15); y en el caso de defensina el oligonucleótido directo 3'-ATGAGAGTTCTTTATCTTCTTTTCAGCTTC-5' (SEQ. ID. No. 16) y el inverso 3'-ACTTCTTCTTGCAGCATCTTGTACCTGGAA-5' (SEQ. ID. No. 17).

10

15

Ejemplo 3. Expresión transitoria de las construcciones de la invención en plantas de limón mexicano infectadas con HLB, utilizando *Agrobacterium*. Se hizo crecer *Agrobacterium* en medio LB a 30 °C bajo agitación constante hasta alcanzar una D.O. de 0,4 (600 nm). A las células se agregó acetosiringona hasta una concentración final de 140 micromolar, incubando durante dos horas adicionales con el inductor. Las bacterias se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en medio de transformación (figura 7).

20

El procedimiento de inoculación de plantas adultas incluyó retirar la corteza lignificada con una lija, exponiendo el

tejido verde fotosintético. Un algodón prehumedecido con las bacterias recombinantes que contenían algunos de los vectores de expresión descritos en los ejemplos 1 y/o 2 se colocó sobre el tejido, y se resuspendió en medio de transformación. El algodón se fijó temporalmente alrededor del tejido fotosintético descubierto con plástico y la planta se cubrió con una bolsa de plástico y se mantuvo con humedad alta durante dos días. Después de la incubación, la bolsa y el algodón se retiraron. Las plantas continuaron regándose para mantener el contenido de agua adecuado que favoreciera la transferencia del ADN-T a la zona tratada.

Materiales de cítricos creados empleando patrones de limón volkameriano injertados en limón mexicano y/o limón persa, se utilizaron en los ensayos. Las plantas mostraron síntomas asociados a la HLB y su carga bacteriana de *Candidatus Liberibacter* fue confirmada por PCR en tiempo real. Se realizó el diseño experimental que se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Diseño experimental utilizado para transformar árboles maduros de limón.

Tratamiento	No. de plantas	No. de inoculaciones
Plantas enfermas con Lisozima	5	4
Plantas enfermas con Defensina	5	4
Plantas enfermas con Lisozima y Defensina	5	4
Plantas enfermas con transgen de control (GUS como gen informador)	5	4
Plantas enfermas con inoculación de agua	5	4
Plantas sanas	5	4
Plantas sanas con agua	1	4

La capacidad fotosintética de las plantas se midió utilizando un sistema IRGA a irradiación constante, haciendo diez mediciones por planta.

Las plantas se inocularon mediante el raspado del tejido leñoso de los tallos con un bisturí, en el que se depositó un algodón que contenía la solución bacteriana sobre la región descubierta. El algodón se cubrió con plástico, y la planta completa se cubrió con una bolsa grande de plástico para mantener la humedad elevada y favorecer la generación de tejido transformado (figura 8). Las plantas fueron regadas solamente con agua para evitar enmascarar los síntomas de la HLB. El análisis de las plantas se realizó a los 60 y 120 días después de la inoculación.

El análisis de las plantas se realizó a los 60 días después de la inoculación. Los inventores de la presente invención analizaron el efecto de la expresión de lisozima, defensina y la combinación de las mismas, además de controles sanos, enfermos y un control que consistió en utilizar el gen informador GUS, un indicador del evento de transformación genética.

La inoculación de las plantas con estos tratamientos implica la integración del ADN-T que contiene el gen de interés en el tejido expuesto. Generalmente, las especies avirulentas de *Agrobacterium* producen un pequeño tumor en la zona aplicada, evidencia de la transformación. Se analizó la presencia de tejido transformado en las plantas tratadas, encontrando pequeñas zonas tumorales, tal como se muestra en la figura 9.

Ejemplo 4. Medición de la fotosíntesis y el área foliar de las plantas tratadas según la presente invención. Se tomaron diez mediciones de cada planta, las cuales se registraron y promediaron en el programa Excel, siendo las unidades $\mu\text{mol CO}_2/\text{cm}^2 \cdot \text{S}^{-1}$. La figura 10 muestra el gráfico de los valores obtenidos. El valor de fijación de CO_2 de las plantas enfermas fue menor al de los tratamientos. Nótese que el valor obtenido en las plantas enfermas tratadas con GUS mostraron franca heterotrofia. Las plantas tratadas con las construcciones de la presente invención que incluyen péptidos antimicrobianos tienen mayor capacidad fotosintética, lo cual puede atribuirse a una mejora en el estatus fisiológico de la planta después de dos meses de la inoculación. A este tiempo (60 días), la fotosíntesis resultante después del tratamiento con defensina fue inferior que la obtenida con lisozima. Sin embargo, a los 210 días ambos tratamientos mostraron valores de fotosíntesis similares a los de las plantas sanas.

Al mismo tiempo, se cuantificó el número de brotes nuevos en estas plantas así como su tamaño. Tal como puede observarse en la figura 11, las plantas de control GUS (enfermas sin tratamiento antimicrobiano) mostraron menos de brotes nuevos, en la que los tratamientos con CsPP16-defensina y defensina/lisozima presentaron un número mayor. Los tratamientos comprendieron aplicar a la bacteria transformada con el vector que contenía CsPP16-defensina un segundo tratamiento con CsPP16-lisozima, y un tercer tratamiento con una mezcla de bacterias que contenían CsPP16-defensina y CsPP16-lisozima. Los inventores de la presente invención observaron consistentemente que los tratamientos con defensina producen un mayor número de brotes, lo cual puede deberse a que este gen podría actuar más rápidamente en el control de la bacteria *Candidatus Liberibacter*. Después de 210 días, el número de brotes en los tratamientos fue estadísticamente similar. Así mismo, la figura 12 muestra en una gráfica el tamaño de los brotes nuevos; en el que los tratamientos con CsPP16-defensina y CsPP16-lisozima mostraron un mayor tamaño. Tal como se ha descrito, a los 60 días no se observaron más diferencias a medida que progresaba el tiempo en los tratamientos. Nótese que en este periodo, las plantas no se fertilizaron para manifestar

los síntomas de la HLB, los cuales son más marcados cuando las plantas tienen estrés nutricional. La figura 12 muestra el aspecto de un brote obtenido con el tratamiento lisozima/defensina según la presente invención; el brote aparece sin síntomas y con áreas foliares similares a las plantas sanas.

5 Después de 60 días de inoculación, los brotes nuevos no presentaron ningún síntoma asociado a la HLB, en comparación con los brotes preexistentes a éstos, en los que a pesar de la inoculación los síntomas característicos de la HLB permanecieron. Esto fue para los inventores de la presente invención una indicación de que posiblemente debido a la acumulación excesiva de callosa en el floema, el libre tránsito de las proteínas a través de éste se bloquea impidiendo llegar hasta estos tejidos. Esto es consistente con los análisis de fotosíntesis previamente mostrados, en los que la heterotrofia en estos tejidos es evidente. Los brotes nuevos al no presentar ningún síntoma visible de la enfermedad, dirigieron a los inventores de la presente invención a concluir que es debido a los tratamientos con los antimicrobianos según la presente invención; la figura 13 muestra la apariencia de las plantas tratadas según la presente invención después de 100 días de tratamiento. También muestra la comparación de las plantas control y aquellas tratadas con antimicrobianos, en la que se observa una clara mejoría de los síntomas en los brotes de las plantas tratadas.

Se llevó a cabo la medición de áreas foliares antes y después de 60 días de tratamiento en los brotes nuevos de cada tratamiento, analizando 10 hojas por cada planta. Se promediaron las áreas foliares de cada planta y se analizaron por medio del gráfico que se muestra en la figura 14, en el que podemos observar un incremento en el área foliar de las plantas con el tratamiento antimicrobiano similar a las áreas foliares de la planta sana, contrario a lo que sucede con las plantas de control en las que observamos una disminución en las áreas foliares, posiblemente debido al avance de la enfermedad. Además, en las plantas inoculadas con *Agrobacterium*, observamos en el tronco el desarrollo de pequeños tumores en la zona de inoculación, lo que indicó la presencia de zonas hiperproductoras de los antimicrobianos, tal como se muestra en la figura 15.

25 **Ejemplo 5. Medición del contenido antimicrobiano en las plantas transformadas.** Los inventores de la presente invención obtuvieron muestras de plantas que consistían en hojas preexistentes y hojas nuevas. Las plantas se procesaron según los procedimientos de detección establecidos por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria de SAGARPA, México.

30 Brevemente, se diseccionó la vena central de la hoja y se cortó en pequeñas secciones con la ayuda de una navaja desechable. El tejido se pesó (100 mg) y se procesó de dos formas, una de ellas para la obtención de ADN total empleando un kit comercial de purificación, y la otra para el tratamiento con Etidio Mono Azida (EMA) y posterior purificación de ADN, para discriminar si el ADN utilizado como plantilla estuvo presente en bacterias vivas o muertas.

La figura 16 muestra los resultados de este análisis. Tal como se puede observar, la cantidad de bacterias vivas disminuyó en el tratamiento, aunque no se destruyó completamente. Se debe señalar que este ensayo de expresión transitoria expresa en regiones discretas de la planta el antimicrobiano utilizado, y no se puede controlar la cantidad producida. El gráfico muestra el tamaño total de la barra como indicación de la detección total de la bacterias y en color azul la cantidad de bacterias muertas, mientras que el color rojo muestra el número de bacterias vivas. Generalmente, los tratamientos tienen hasta un sexto de la carga en las plantas enfermas de control. Este resultado es muy prometedor considerando que estas plantas son quimeras productoras de antimicrobianos; utilizando procedimientos de transformación genética para obtener plantas completamente transformadas en todos los tejidos es posible lograr una resistencia a la enfermedad cercana al 100%.

El gráfico en la figura 17 muestra la relación de carga bacteriana viva/muerta después de 60 días de tratamiento, en la que se puede observar que la cantidad de bacterias vivas en las plantas que han recibido el tratamiento con el antimicrobiano es hasta 4 veces menor que las plantas control, en las que la cantidad de bacterias tanto muertas como vivas supera en mucho a las plantas tratadas.

55 **Ejemplo 6. Prueba de expresión estable en plantas de limón mexicano infectado con HLB.** La expresión estable de lisozima en limón mexicano se logra transformando explantes de limón, y una vez regenerados se injertan en patrones de limón, lo que permite la obtención de plantas maduras transgénicas que expresan la proteína de interés en un tiempo corto.

La germinación *in vitro* de semillas de limón mexicano se realizó en tubos de ensayo estériles que contenían medio de germinación, tal como se muestra en la figura 18. En la composición de dicho medio se encuentran elementos minerales, agua, hormonas, sustancias orgánicas, vitaminas y sacarosa que promueven la germinación de las semillas de limón. Las semillas se esterilizaron previamente con una solución de cloro al 30% durante media hora, seguido de tres lavados con agua estéril. La siembra de las semillas se realizó en condiciones estériles. Una vez sembradas las semillas, se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante aproximadamente de 2 a 3 semanas. Después de este tiempo se observó el brote del cotiledón, y se incubó nuevamente 1 semana a temperatura ambiente con fotoperiodo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad); para permitir la activación de la actividad fotosintética de la planta.

Las plantas obtenidas de esta manera se utilizaron, a continuación, para obtener explantes, los cuales fueron transformados por *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes* que contenían la construcción CsPP16-Lisozima.

5 Para la transformación de explantes de limón con *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, estas bacterias se hicieron crecer primero en medio LB a 30 °C con agitación hasta alcanzar una D.O. de 0,4 (600 nm). A las células se les agregó acetosiringona a una concentración final de 140 micromolar y se incubaron durante dos horas adicionales con el inductor. Las bacterias se cosecharon por centrifugación y se resuspendieron en medio de transformación. Los tallos de los limones germinados *in vitro* se cortaron a una longitud aproximada de 1 cm con una navaja previamente sumergida en medio de transformación en condiciones estériles. El exceso de líquido de los explantes cortados fue eliminado utilizando papel absorbente estéril. Los explantes se transfirieron en medio de cocultivo (MC), en el que se incubaron a temperatura ambiente durante 1-2 días en la oscuridad. Después de este tiempo, los explantes se retransfirieron a medio de regeneración (SRM) y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 4 semanas. Posteriormente, los explantes se incubaron durante otras 4 a 6 semanas a temperatura ambiente con fotoperiodo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad), hasta su completa regeneración. Los explantes se cambiaron a medio fresco SRM cada 4 semanas o en caso de contaminación. Las figuras 7, 8 y 19 muestran el proceso de transformación y regeneración de los explantes de limón mexicano.

20 Para la propagación de explantes transformados en diversos patrones de limón mexicano, estos se injertaron en patrones de limón volkameriano, citrange troyer o Schaub rugoso.

Los injertos en los patrones anteriores se realizaron haciendo un corte en forma de "V" a 15 cm aproximadamente de la base del patrón, y colocando cuidadosamente dentro de este corte explante transformado en su totalidad. Se aseguró el injerto con parafilm. Se regó la planta únicamente con agua, y se cubrió el injerto con una bolsa de plástico para mantener una humedad relativa alta y permitir la regeneración. Sesenta días después de la implantación del injerto, se analizó la expresión de lisozima por PCR punto final y qRT-PCR utilizando oligonucleótidos, tales como los descritos en los ejemplos 1 y 2.

30 La composición de los medios de cultivo utilizados para la transformación del limón mexicano fueron: medio LB (950 ml de agua destilada, 10 g de triptona, 5 gramos de extracto de levadura, 10 g de NaCl, con pH 7 ajustado con NaOH 1N (esta solución se ajusta a un volumen final de 1 litro con agua desionizada y se esteriliza); medio para germinar semillas de limón (1 litro de medio MS, en el que se disuelven 30 g de sacarosa y 2 g de gel rite); medio de cocultivo MC (1 litro de medio MS en el que se disuelven 2 mg de ácido indol-3-acético, 1 mg de 2-isopentil-adenina, 2 mg de ácido 1,4-diclorofenoxiacético, y 8 g de agar; el pH a 5,2 se ajusta con NaOH 1N y se esteriliza); medio de regeneración SRM (1 litro de medio MS en el que se disuelven 3 mg de 6-benzilaminopurina, 10 g de agar; el pH a 5,2 se ajusta con NaOH 1N y se esteriliza; una vez que el medio está tibio se agregan los antibióticos 250 mg/l de vancomicina y 500 mg/l de cefatoxima).

40 **Ejemplo 7. Transmisión de antimicrobianos a través de injertos.** Se realizaron transformaciones genéticas de cítricos de limón persa y limón mexicano sobre portainjertos o patrones de naranja amarga *C. volkameriana* y *C. macrophylla*. En estos ensayos, se transformaron los portainjertos antimicrobianos que contenían defensina, lisozima y una mezcla de las mismas, cada uno de ellos se fusionó traduccionalmente con la proteína CsPP16, que es la proteína de movimiento sistémico de 16kDa de cítricos. La transformación se realizó al exponer el tejido del tallo a un abrasivo, y posteriormente el tejido se puso en contacto con una solución de *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes*, que contenía las construcciones genéticas descritas (figura 8). Las plantas empleadas se injertaron en brotes infectados de HLB, los cuales presentaron los síntomas característicos de la enfermedad.

Las plantas fueron analizadas por la presencia de la proteína en injertos y por sus características agronómicas, tales como altura de la planta, fotosíntesis, área foliar y cuantificación de las bacterias.

50 Las plantas tratadas anteriormente se monitorearon durante un año, encontrándose que los nuevos brotes y frutos se produjeron con una cantidad reducida de bacterias con respecto a las cuentas iniciales. Se monitorearon hojas viejas y hojas nuevas, encontrándose la mayor concentración en las hojas viejas y no en los brotes nuevos. Debe mencionarse que el síntoma del moteado difuso no desapareció de las hojas maduras. Este hecho se interpreta como una incapacidad de movilizar el polímero de almidón de la hoja que genera este síntoma de moteado. La figura 25 muestra el comportamiento a un año del análisis de plantas enfermas con HLB y que fueron transformadas en sus portainjertos de volkameriana y macrophylla, así como ramas del injerto con las construcciones descritas.

60 Se recogieron muestras de hojas con síntomas, tales como hojas sistémicas asintomáticas, se extrajo su ADN y se cuantificó la presencia de CLA y del gen endógeno COX a través de técnicas de PCR en tiempo real. Una variante de este procedimiento, para detectar bacterias vivas en los tejidos analizados consistió en realizar la técnica de EMA PCR. De forma interesante, se muestra que las bacterias viva disminuyeron aproximadamente el 70%, y que se encuentran confinadas a tejidos viejos. En contraste, los tejidos jóvenes tienen valores muy bajos o por debajo del límite de detección de la técnica. La figura 25 muestra el comportamiento de la presencia de bacterias vivas en las plantas de control, que oscila entre el 100 y el 87 % de bacterias CLA. La fotosíntesis fue comparable entre plantas sanas y la de hojas jóvenes. Cabe señalar que las plantas fueron capaces de producir frutos esféricos con simetría

radial, característica de plantas con tejido vascular sano (figura 21).

5 Estas evidencias nos permiten aseverar que la utilización de patrones genéticamente transformados con proteínas de naturaleza supracelular es suficiente para conferir resistencia a la bacteria causante de la HLB o bien otras que estén presentes en los tejidos vasculares de las plantas.

Los frutos producidos por plantas enfermas tratadas con antimicrobianos según la presente invención mostraron calidad comercial y se utilizaron realizar ensayos toxicológicos.

10 Los frutos obtenidos de las plantas tratadas según la presente invención mostraron simetría característica de frutos sanos (figura 21), mostrando un corte transversal de un limón enfermo con HLB, que presenta lóculos asimétricos, mientras que un fruto proveniente de una planta enferma que recibió el tratamiento con antimicrobianos según la presente invención muestra una simetría comparada con el fruto proveniente de una planta sana.

15 **Ejemplo 8. Ensayo de toxicidad aguda en ratones.** Se alimentaron 10 ratones BALB-c por tratamiento con dieta normal y en lugar de agua simple se les proporcionó agua de limón con zumo al 2% de los frutos provenientes de plantas tratadas según la presente invención (RR09 Defensina y RR18 Lisozima). Los ratones se pesaron al inicio del experimento. Después de 30 días del experimento, se pesaron de nuevo y una muestra de sangre periférica fue obtenida por punción en vena caudal.

20 Tal como puede observarse en la figura 26, no hubo mortandad de los animales en los tratamientos realizados (lisozima y defensina, así como en el grupo control). De forma similar, los ratones mostraron pesos estadísticamente similares entre los tratamientos al final de la prueba.

25 La sangre recogida de los ratones se analizó a través de microbiometría hematológica. Cuando se compararon los valores obtenidos tanto del grupo control como de los tratamientos, estos estuvieron dentro de los intervalos propuestos como valores normales (tabla 6). Tal como puede observarse, la biometría hematológica de los ratones tratados fue similar a la de los ratones del grupo de control, obteniéndose valores en el intervalo que se informa como normal para ratones BALB-c de 10-14 semanas. Nótese que al final de la prueba de toxicidad aguda se obtuvo el 100% de supervivencia tanto en los animales tratados como en los animales control.

Tabla 6. Limón con HLB . Biometría hematológica

Componente	Rangos de referencia		Promedio		
	Mínimo	Máximo	Defensina	Lisozima	Control
Eritrocitos/ μ l	7	$1,2 \times 10^7$	2×10^6	$1,9 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
Plaquetas/ μ l	630.000	1.550.000	665.000	749.125	447.000
Leucocitos/ μ l	6.000	15.000	11.975	11.378	11.394
Linfocitos/ μ l	3.400	13.950	8.242	8.914	8.830
Segmentados/ μ l	480	7.200	1.922	1.926	1.922
Neutrófilos/ μ l	480	7.200	1.689	2.072	1.990
Monocitos/ μ l	60	1.050	570	203	146
Eosinófilos/ μ l	120	1.500	499	189	334
V.G.M. μ 3	57	93	78	78	77
Banda/ μ l	35	45	57	56	58
V.G.M. μ 3	45	55	51	49	51
Hemoglobina g/dl	12,2	16,2	17,2	14,6	12,9
H.G.M. pg	11	12,7	10,9	12,7	11,3
Proteínas plasmáticas totales	6,2	7,4	7,5	7,8	7,3

35 **Ejemplo 9. No se detectan transgenes en el polen de plantas tratadas.** Se recogieron polen y flores de plantas que fueron tratadas con los antimicrobianos según la presente invención, para lo cual se extrajo ADN total de polen y flores recogido de plantas tratadas y de control. Se amplificó el gen endógeno, no así el codificante de antimicrobianos, demostrando que las plantas producen polen y flores silvestres. Esta evidencia experimental muestra que el transgen no puede ser dispersado de forma inadvertida a otra planta potencialmente receptora; de forma similar, el transgen no estará presente en los frutos, lo que permite obtener un fruto no genéticamente modificado y por lo tanto, por ejemplo no sujeto a la ley de bioseguridad para organismos genéticamente modificados (OGM) que rigen la legislación mexicana actual.

40

Ejemplo 10. Ensayos en otros cítricos.

a) Transformación genética de limón persa, naranja de Valencia, pomelo y mandarina injertados en volkameriana. Además de los ensayos en limón mexicano con espinas, los inventores de la presente invención realizaron la inducción de la expresión de antimicrobianos según la presente invención en limón persa, naranja de Valencia, pomelo y mandarina, todos ellos injertados tanto en *Citrus macrophylla* como en *C. volkameriana* (tabla 7). Se trataron 100 plantas de cada variedad, de las cuales 25 se trataron con liozima, 25 con defensina y 25 con una mezcla de las mismas. Las 25 restantes se utilizaron como controles del experimento y se inocularon con agua.

Tabla 7

Tratamiento	Limón persa	Naranja de Valencia	Pomelo	Mandarina
Liozima	25	25	25	25
Defensina	25	25	25	25
Lis/Def	25	25	25	25
Control	25	25	25	25

Árboles de un año de edad con tamaños promedio de 1,5 m y con certificado de seguridad del Vivero Francisco Villa en Tamaulipas México, se inocularon tal como se ha descrito previamente para limón mexicano. Las plantas estuvieron en cámara de alta humedad durante 3 días y posteriormente se transplantaron a microtúneles preparados con mallas antiáfidos.

Las mallas se retiraron para permitir la entrada de psílidos infectados con CLA, ya que el área de biocontención está localizada en una zona endémica de HLB en Tecomán, Colima, México. Se monitoreó la presencia de psílidos infectados, así como la posible infección de plantas con tratamiento y de control en los cultivos referidos. Después de 8 meses de siembra, no se observaron síntomas ni la detección positiva de bacterias cuando se emplearon procedimientos moleculares de detección de CLA en las plantas tratadas, no así en las plantas de control, las cuales se infectaron y mostraron síntomas asociados a la presencia de HLB.

Junto con las cuantificaciones de las bacterias, se monitoreó su crecimiento y su capacidad fotosintética, en los que no se encontraron diferencias significativas entre las plantas con tratamiento y las plantas control. Un año después de los tratamientos, los niveles de bacterias son muy bajos o están por debajo de los límites de detección de la técnica utilizada (PCR en tiempo real con sondas Taqman).

b) Transformación genética de árboles productivos de limón mexicano injertados en *Citrus volkameriana*. Se seleccionaron 24 árboles productivos de 3 años de edad dentro de la zona endémica de HLB en Tecomán, Colima, México, y la presencia de la bacteria causante de la HLB fue cuantificada en ellas, produciendo títulos elevados en muestras de hojas sintomáticas con moteado difuso. Las plantas se sometieron a tratamiento de inducción de la expresión de antimicrobianos, tal como se describió anteriormente, con una distribución mostrada en la tabla 8.

Tabla 8

Arbol	Tratamiento	Color	Arbol	Tratamiento	Color
1	Liozima	Rojo	13	Control	Blanco
2	Defensina	Verde	14	Lis/Def	Azul
3	Lis/Def	Azul	15	Defensina	Verde
4	Control	Blanco	16	Liozima	Rojo
5	Liozima	Rojo	17	Control	Blanco
6	Defensina	Verde	18	Lis/Def	Azul
7	Lis/Def	Azul	19	Defensina	Verde
8	Control	Blanco	20	Liozima	Rojo
9	Liozima	Rojo	21	Control	Blanco
10	Defensina	Verde	22	Lis/Def	Azul
11	Lis/Def	Azul	23	Defensina	Verde
12	Control	Blanco	24	Liozima	Rojo

Los árboles de tres años después de haberse plantado tenían un tamaño promedio de 3 m. Las plantas estuvieron biocontenidas en túneles de estructura de aluminio y malla antiáfidos. El acceso fue restringido por dos puertas de entrada a la propiedad y los invernaderos tenían puertas con candados.

Los árboles se marcaron colocando un listón con el color del tratamiento (tabla 8) y una etiqueta de aluminio con el número del árbol en su tronco.

Tal como se observa en la figura 27, árboles adultos de limón mexicano bajo confinamiento a los 3 meses generaron ramificaciones, en las que algunas de las primeras hojas mostraron síntomas. Sin embargo, la extensión de los síntomas se confinó a esa área. Además, se observó que las nuevas ramificaciones no tenían síntomas de la enfermedad 4 meses después del tratamiento según la presente invención. La evaluación a los 9 meses después del

tratamiento muestra árboles simétricos con brotes y floración normal. Los brotes nuevos tienen menos síntomas, tales como moteado difuso o carecen de ellos. Su tasa fotosintética es alta, indicando un buen estado fisiológico.

5 El aspecto de las plantas que se hicieron crecer en los microtúneles después de 12 meses (limón mexicano) y 6 meses de tratamiento (limón persa, naranja, pomelo y mandarina) según la presente invención, mostraron crecimiento, así como la aparición de ramificaciones sin síntomas de HLB (figura 28). Además, las plantas que se hicieron crecer bajo biocontención, producen brotes libres de CLa cuando reciben el tratamiento antimicrobiano según la presente invención (figura 29).

10 La medición de parámetros fotosintéticos mostró que las plantas tratadas según la presente invención tienen valores de fotosíntesis similares a las plantas del vivero crecidas en ausencia del psílido. Así mismo, las plantas tratadas producen flores y tienen un llenado de fruto de calidad comercial (figura 30). El aspecto de las plantas tratadas con antimicrobianos a cinco meses de estar en contacto con el psílido es normal, no presentan síntomas de HLB en hojas preexistentes y en brotes nuevos. En contraste, las plantas de control sin tratamiento con antimicrobianos muestran en el mismo lote la presencia de síntomas en sus hojas y tienen en promedio menor número de ramificaciones. La figura 28 (panel inferior derecho) muestra los síntomas de una planta no tratada, la cual muestra los síntomas característicos de la enfermedad.

20 La figura 21 muestra las diferencias significativas entre los frutos de un limón sano, el cual presenta carpelos con simetría radial (panel izquierdo), mientras que el fruto producido por un árbol enfermo presenta un desarrollo asimétrico de los carpelos y la aparición de dos cromosomas acrocéntricos (panel central). Como resultado del tratamiento de árboles de limón inicialmente enfermos y tratados posteriormente según la presente invención, se obtienen frutos muy parecidos a los frutos del árbol sano (panel derecho).

25 Además, se estimó el contenido de bacterias a los tres meses, mostrando que las bacterias están presentes tanto en hojas maduras como en los nuevos brotes. En contraste, a pesar de que las bacterias se detectan en hojas maduras ya existentes desde el inicio del tratamiento, las hojas nuevas se han reducido significativamente en número. En relación a la fotosíntesis, las plantas de control sin tratamiento muestran menor fotosíntesis en contraste con los tres tratamientos evaluados (tratamiento 1: defensina, tratamiento 2: lisozima y el tratamiento 3: mezcla de defensina con lisozima) (figura 31).

35 En relación a los árboles de limón persa, mandarina, pomelo y naranja, se evaluaron las plantas en función de sus parámetros agronómicos, encontrando que no hay diferencias significativas a los seis meses después del tratamiento en relación a su área foliar. Sin embargo, el contenido de CLa es diferente en las plantas control, las cuales ya muestran presencia de bacterias y síntomas característicos de la HLB (figura 32).

Ejemplo 11. Análisis bromatológico del zumo de limón. Se recogieron frutos de limón derivados de árboles tratados con defensina, lisozima y una mezcla de las mismas, además de limones de árboles de control. Se extrajo el zumo con un exprimidor y se envió para la determinación de parámetros bromatológicos según las normas mexicanas y de la FDA para zumos. Los resultados se muestran en la figura 33. Tal como se observa, las concentraciones de calcio, fierro, el contenido energético, las cenizas, los hidratos de carbono disponibles, el sodio, la vitamina C (ácido ascórbico) y la humedad son similares entre los zumos de frutos sometidos al tratamiento de la presente invención y el zumo de control, lo que demuestra la equivalencia sustancial entre dichos zumos.

45 **Ejemplo 12. Inmunodetección de la proteína defensina en limón transgénico y evidencia de la presencia de transgenes.** Se procesaron plantas de limón modificadas genéticamente que expresaban el antimicrobiano defensina o lisozima según la presente invención, para ser incluidas en parafina y realizar ensayos de inmunolocalización. Se realizaron cortes semifinos los cuales se desparafinaron e hidrataron para ser incubados posteriormente con anticuerpos anti-beta-defensina humana. El primer anticuerpo generado en cabra se inmunodetectó con anticuerpo de cabra anticonejo acoplado a fosfatasa alcalina y se reveló con BCIP y NBT, que generan un color azul-violeta, indicativo de la presencia de la proteína inmunodetectada. Tal como muestra la figura 34, la defensina se localizó principalmente en el floema de la planta transformada.

55 Además y mediante PCR punto final, en las plantas transformadas según la presente invención se detectaron los genes que codifican los antimicrobianos mencionados anteriormente (figura 35), lo cual constituye una evidencia molecular de la presencia de dichos transgenes en las plantas modificadas genéticamente producidas vía cultivo de tejidos. Utilizando técnicas de PCR, se han identificado los sitios de inserción en el genoma de los cítricos GM.

60 **Ejemplo 13. Morfología de polen obtenido de plantas tratadas.** Se recogió polen de las plantas tratadas según la presente invención, al cual se fotografió y midió para evaluar su equivalencia sustancial. La figura 36 (panel A) muestra imágenes representativas del polen, y se puede observar que sus características morfológicas son similares a las de las plantas de control.

65 Se obtuvo el área promedio del polen y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (figura 36, panel B). Los resultados no muestran alteraciones en el área o en la morfología del polen obtenido de las plantas tratadas.

Tal como puede observarse de lo anterior, según la presente invención es posible obtener plantas modificadas genéticamente que expresan proteínas con actividad antimicrobiana, tales como los cítricos probados, los cuales tienen la capacidad de protegerse de la infección causada por *Candidatus Liberibacter asiaticus*, por ejemplo limón mexicano, limón persa, naranja, mandarina y pomelo. Además, la presente invención permite la obtención de portainjertos (patrones) de cítricos modificados genéticamente expresando proteínas antimicrobianas. Los patrones ensayados experimentales son *Citrus volkameriana* y *Citrus macrophylla*, los cuales son resistentes a infección por el virus de la tristeza de los cítricos. Los portainjertos modificados genéticamente son capaces de movilizar a los antimicrobianos a través del tejido vascular a los injertos de plantas susceptibles a la infección, tales como limón mexicano, limón persa, naranja, mandarina y pomelo, tal como se ha demostrado experimentalmente, y así proporcionar protección a los injertos. Los portainjertos tienen la ventaja de producir frutos convencionales sin la presencia de genes que codifican antimicrobianos, y los frutos no estarán sujetos, por ejemplo, a la ley de bioseguridad mexicana para la utilización de organismos modificados genéticamente. Esto también implica una gran seguridad en su consumo y producción.

Según la presente invención, para plantas sanas producidas en viveros certificados, se realiza la expresión transitoria de antimicrobianos a través de la inoculación de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene en su ADN-T las unidades de expresión de antimicrobianos. Esta inoculación se podrá realizar en plantas sanas, como un procedimiento preventivo. En el momento de su plantación en áreas endémicas, por ejemplo de HLB, las plantas no se podrán contagiar o bien mostrarán niveles muy bajos de bacterias, permitiéndoles así la generación de frutos convencionales, los cuales no estarán sujetos, por ejemplo, a la ley de bioseguridad mexicana para la utilización de organismos modificados genéticamente. Además, este producto puede emplearse en plantaciones nuevas o como reemplazo de plantas enfermas.

Para árboles productivos enfermos con HLB, según la presente invención se realiza la expresión transitoria de antimicrobianos a través de la inoculación de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene en su ADN-T a las unidades de expresión de antimicrobianos. Esta inoculación puede realizarse en plantas sanas como un procedimiento preventivo. En el momento de su plantación en áreas endémicas, tales como de HLB, las plantas no se contagiarán o mostrarán niveles muy bajos de bacterias, permitiéndoles así la generación de frutos convencionales, los cuales no estarán sujetos, por ejemplo, a la ley de bioseguridad para la utilización de organismos genéticamente modificados. Además, el producto puede ser utilizado en nuevas plantaciones o como reemplazo de plantas enfermas.

Referencias

- Bové J.M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88 (1), 7-37.
- Cervera, M., et.al. 1998. Genetic transformation and regeneration of mature tissue of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Res.* 7, 51-59.
- Cervera, M., et.al. 2004. Genetic transformation of mature citrus plants. *Methods Mol. Biol.* 286, 177-187.
- Corbesier L., et.al. 2007. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316: 1030-1033.
- Hartung J.S., et.al. 2011. Comparison of the 'Ca. *Liberibacter asiaticus*' genome adapted for an intracellular lifestyle with other members of the Rhizobiales. *PLoS One.* 6(8):e23289.
- Koh E.J., et.al. 2011. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". *Protoplasma* PMID: 21874517.
- Lin H., et.al. 2011. The complete genome sequence of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the bacterium associated with potato zebra chip disease. *PLoS One* 6: e19135.
- Lin M.K., Belanger H., Lee Y.J., Varkonyi-Gasic E., Taoka K., Miura E., Xoconostle-Cazares B., Gendler K., Jorgensen R.A., Phinney B., Lough T.J., Lucas W.J. 2007. FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. *Plant Cell* 19: 1488-1506.
- Lough T.J., et.al. 2006. Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu Rev Plant Biol* 57:203-232.
- Masschalck B., et.al. 2001. Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozymederived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol.* 67:339-344.
- Provencher L.M., et.al. 2001. Sucrose export defective1 encodes a novel protein implicated in chloroplast-to-nucleus signaling. *Plant Cell* 13:1127-1141.
- Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cazares B., Ham B.K., Li G., Lucas W.J. 2011. Vascular expression in *Arabidopsis* is predicted by the frequency of CT/GA-rich repeats in gene promoters. *Plant J* 67:130-144.
- Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cazares B., Kragler F. 2004. The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. *Curr Opin Plant Biol* 7: 641-650.
- Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cazares B., Lucas W.J. 2001. The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr Opin Plant Biol.* 4:202-209.
- Strategic Planning for the Florida Citrus Industry: Addressing Citrus Greening. 2010. Committee on the Strategic Planning for the Florida Citrus Industry: Addressing Citrus Greening Disease (Huanglongbing); National Research Council of the National Academies USA. ISBN 978-0-309-15207-5.

- Vaa Bel A.J., et.al. 2004. Pathogen-induced resistance and alarm signals in the phloem. Mol Plant Pathol 5:495-504.

5 - Xoonostle-Cazares B., Xiang Y., Ruiz-Medrano R., Wang H.L., Monzer J., Yoo B.C., McFarland K.C., Franceschi V.R., Lucas W.J. 1999. Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. Science. 283:94-98.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural,
Pesca y Alimentación

<120> Plantas resistentes a microorganismos fitopatógenos que crecen en tejidos vasculares

15 <130> Cinvestav17

<160> 17

20 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 162

<212> ADN

25 <213> Agrobacterium tumefaciens

<220>

<221> misc_feature

<223> Borde izquierdo del ADN-T de A. tumefaciens

30 <400> 1

```

cggttaaaac caccacagta cattaataaac gtccgcaatg tgttattaag ttgtctaagc      60
gtcaatttgt ttacaccaca atatatcctg ccaccagcca gccaacagct ccccgaccgg      120
cagctcggca caaaatcacc actcgatata ggcagcccat ag                          162
    
```

35 <210> 2

<211> 524

<212> ADN

<213> Virus del mosaico de la coliflor

<220>

40 <221> misc_feature

<223> Versión corta del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor

<400> 2

ES 2 831 386 T3

tcaaagattc aaatagagga cctaacagaa ctgcgccgtaa agactggcga acagttcata 60
 cagagtctct tacgactcaa tgacaagaag aaaatcttcg tcaacatggt ggagcacgac 120
 acacttgtct actccaaaaa tatcaaagat acagtctcag aagaccaaag ggcaattgag 180
 acttttcaac aaagggtaat atccggaaac ctctcggat tccattgccc agctatctgt 240
 cactttattg tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca tcattgcgat 300
 aaaggaaagg ccatcgttga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggacccccca 360
 cccacgagga gcatcgtgga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaa gcaagtggat 420
 tgatgtgata tctccactga cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac 480
 ccttcctcta tataaggaag ttcatttcat ttggagagaa cacg 524

<210> 3
 <211> 489
 <212> ADN
 <213> Citrus aurantifolia

5

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Gen que codifica la proteína 16K del floema de Citrus aurantifolia ortóloga en cítricos o proteína CsPP16

10

<400> 3

atggggatgg gaatgatgga ggtccatttg attagtggta aaggacttca agcccacgac 60
 cctcttaata aaccaattga cccttatgct gagatcaact tcaagggcca agaacgcatg 120
 agcaaagtgg ctaaaaatgc aggaccaa atcattatggg atgagaaatt taaattccta 180
 gccgagtacc ctgggagcgg tggtgacttc catatcttat tcaaggtcat ggacatgac 240
 gctatagatg gtgatgatta cattggcgat gtcaaaatag atgtcaagaa tttattagcg 300
 gaaggagtta gaaaaggaaa gtcggagatg ccgcctagaa tgtaccatgt cttagcacac 360
 aaaatccact tcaagggaga aattgaagtt ggagtgtcct tcaagctgca aggcggcggg 420
 ggatgtggag gatgttacc atgggaaaac cttagcggtg gtggtggtag cgggtggtggt 480
 ggtagcgggt 489

15

<210> 4
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Polienlazador flexible

25

<400> 4
 ggtggtgta gcggtggtg ttgtagcgct gctgct 36

30

<210> 5
 <211> 402
 <212> ADN

ES 2 831 386 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

5 <220>
<221> misc_feature
<223> Lisozima humana con uso de codones en cítricos

10 <400> 5

aaggttttcgc aaagatgcga acttgctaga acacttaaga gacttggtat ggatggttat 60

agaggtatta gccttgctaa ttggatgtgc cttgctaagt gggaaagcgg ttataataca 120

agagctacaa attataatga tagaagcaca gattatggta ttttccaaat taatagcaga 180

tattggagat gcaatgatgg taagacacca ggtgctgtta atgcttgcca tcttagctgc 240

agcgctcttc ttcaagataa tattgctgat aatattgctg atgctgttgc ttgcgctaag 300

agagttgtta gagatccaca aggtattaga gcttggggtg cttggagaaa tagatgccaa 360

aatagagatt gcagacaata tgttcaaggt tgcggtgttt ag 402

<210> 6
<211> 419
<212> ADN
<213> Agrobacterium tumefaciens

15 <220>
<221> misc_feature
<223> Terminador NOS y borde derecho de ADN-T de A. tumefaciens

20 <400> 6

gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctggtgc cggctttgcg 60

atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120

atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180

gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct 240

atgttactag atctttggat ctctgtggt tggcaaatgg acgaacggat aaaccttttc 300

acgccctttt aaatatccga ttattcctaat aaacgctctt ttctcttagg tttaccgcc 360

aatatctct gtcaaacact gatagtttaa actgaaggcg ggaaacgaca atctgctag 419

25 <210> 7
<211> 833
<212> ADN
<213> Virus del mosaico de la coliflor

30 <220>
<221> misc_feature
<223> Versión larga del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor

35 <400> 7

ES 2 831 386 T3

attagccttt tcaatttcag aaagaatgct aaccacaga tggtagaga ggcttacgca 60
 gcaggtctca tcaagacgat ctacccgagc aataatctcc aggaaatcaa ataccttccc 120
 aagaaggtta aagatgcagt caaaagattc aggactaact gcatcaagaa cacagagaaa 180
 gatataatttc tcaagatcag aagtactatt ccagtatgga cgattcaagg cttgcttcac 240
 aaaccaaggc aagtaataga gattggagtc tctaaaagg tagttcccac tgaatcaaag 300
 gccatggagt caaagattca aatagaggac ctaacagaac tcgccgtaaa gactggcgaa 360

 cagttcatac agagtctctt acgactcaat gacaagaaga aaatcttcgt caacatggtg 420
 gagcacgaca cacttgtcta ctccaaaaat atcaaagata cagtctcaga agaccaaagg 480
 gcaattgaga cttttcaaca aagggttaata tccggaaacc tcctcggatt ccattgcccc 540
 gctatctgtc actttattgt gaagatagtg gaaaaggaag gtggctccta caaatgccat 600
 cattgcgata aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat 660
 ggacccccac ccacgaggag catcgtgga aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag 720
 caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg acgcacaatc ccactatcct 780
 tcgcaagacc cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt tggagagaac acg 833

5 <210> 8
 <211> 195
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintético

<220>
 <221> misc_feature
 15 <223> Defensina humana con uso de codones en cítricos

<400> 8

atgagagttc tttatcttct tttcagcttc cttttcattt tccttatgcc acttccaggt 60
 gttttcgggtg gtattggtga tccagttaca tgccttaaga gcggtgctat ttgccatcca 120
 gttttctgcc caagaagata taagcaaatt ggtacatgcg gtcttccagg tacaagatgc 180
 tgcaagaaga agtag 195

20 <210> 9
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintético

<220>
 <221> misc_feature
 30 <223> Magainina con uso de codones en cítricos

ES 2 831 386 T3

	<400> 9		
	ggattggta agtatcttca tagcgctaag aagtttgga aggcttgggt tggtgaaatt	60	
	atgaatagct ag	72	
5	<210> 10 <211> 192 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> sintético		
	<220> <221> misc_feature		
15	<223> Cecropina con uso de codones en cítricos		
	<400> 10		
	atgaatttcg ctaagattct tagctttggt ttcgctcttg ttcttgctct tagcatgaca	60	
	agcgctgctc cagaaccaag atggaagatt ttcaagaaga ttgaaaagat gggtagaaat	120	
	attagagatg gtattgttaa ggctgggtcca gctattgaag ttcttggtag cgctaaggct	180	
	attggttaagt ag	192	
20	<210> 11 <211> 375 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
25	<220> <223> sintético		
	<220> <221> misc_feature		
30	<223> Sarcotoxina con uso de codones en cítricos		
	<400> 11		
	atgaattttc aaaatatttt catttttggt gctcttattc ttgctgtttt tgctgggtcaa	60	
	agccaagctg gttggcttaa gaagattggt aagaagattg aaagagttgg tcaacataca	120	
	gatgctacaa ttcaaggtct tggatttgct caacaagctg ctaatgttgc tgctacagct	180	
	agaggtatga attttcaaaa tattttcatt tttggtgctc ttattcttgc tgtttttgct	240	
	ggtcaaagcc aagctggttg gcttaagaag attggttaaga agattgaaag agttgggtcaa	300	
	catacagatg ctacaattca aggtcttgggt attgctcaac aagctgctaa tgttgctgct	360	
	acagctagag gtttag	375	
35	<210> 12 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
40	<220>		

ES 2 831 386 T3

<223> sintético

<220>
<221> misc_feature
5 <223> Indolizidina con uso de codones en cítricos

<400> 12
attgctga agaagtgga atggtggca tggagaagat gcaagtatta g 51

10 <210> 13
<211> 1151
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana

15 <220>
<221> misc_feature
<223> Promotor de expresión 59880 específico de floema de Arabidopsis thaliana

20 <400> 13

ttctcctaatac atacgcttat tggaaacatt aacgcggttt gctttatgca actttgaaac 60

atgtgctaatac ttgttgatat aaaatttggc tatttatact gtttagttta gtaaggaatt 120

aacacaaatg ttttagcgca ttattgcaca tttgtgtgaa ataatact attttcggga 180

aatcataat cgaaatagaa ttccaaaatt tccacgtggc atattatgaa aggaatattc 240

cagctcgggt aagctggcct ccatcaccgg ttatgatgaa aggtgagccg aaagtggagc 300

caacctgaga tgccccgat gagagccata tgcttcttcg accttcatt ctatattctt 360

tccttttaaa gatagcaact attgatcaaa aaaaagaaga aaaaagatag gaactataga 420

actatagtct ttttttttca acgaagaaca aatatatggt tatgaactat tcttaatgga 480

tggcacaaca gattttttga tttttttcta agaaattttg catgtgaata cataactaca 540

gttaattcca ttcaactggt acttttcttt gggtgaaaca atagggtggc aacttggcat 600

agatatcaac atcagagttt tgaacaaatc tatcatcatt taagaaatga tagaaaatca 660

agtattgttt ttcaaatcaa gaaatatcaa agaagaattc tgtattaagt ttagttctca 720

tggaagccat agaatatatc agaagtttga acaaacagc aatatatgg aataaaaaac 780

atagttattg gaataaatag aatagttatt tttttttggt tggcataaaa taaagaaaat 840

tatttgttca acaaattggt acagatttca cttatgtata ttttgaacta attcttattt 900

ttatattaat taaatcaaga ttttactttt gaaaaataat taatgaattt atgaaacaat 960

ctctatgtaa ataaaataaa gcaaattaa acgctcacac atgtttactt attcggacta 1020

gagagcttcc gcataaagct gaggaaaaaa aagagagaag acgcacaccg aagaaaacac 1080

acaagactcc attattctcc tgcttcttcg tctcttcaat tttttctct gagactagct 1140

ttgattcaac c 1151

ES 2 831 386 T3

<210> 14
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> sintético

<220>
10 <221> misc_feature
<223> Oligonucleótido directo para amplificación del gen de lisozima con uso de codones en cítricos

<400> 14
15 aggttttcga aagatgcgaa ctgctagaa 30

<210> 15
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20
<220>
<223> sintético

<220>
25 <221> misc_feature
<223> Oligonucleótido inverso para amplificación del gen de lisozima con uso de codones en cítricos

<400> 15
30 aaacaccgca acctgaaca tattgtctgc 30

<210> 16
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35
<220>
<223> sintético

<220>
40 <221> misc_feature
<223> Oligonucleótido directo para amplificación del gen de defensina con uso de codones en cítricos

<400> 16
45 atgagagttc tttatcttct ttcagcttc 30

<210> 17
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50
<220>
<223> sintético

<220>
55 <221> misc_feature
<223> Oligonucleótido inverso para amplificación del gen de defensina con uso de codones en cítricos

<400> 17
60 acttcttct gcagcatctt gtacctggaa 30

REIVINDICACIONES

1. Planta o partes de la misma, resistente a infecciones causadas por microorganismos que están restringidos al floema, en la que la planta incorpora en su genoma un gen quimérico que codifica una proteína de fusión que actúa como un transportador dentro del tejido vascular de la planta y tiene una actividad antimicrobiana, en la que dicho gen quimérico comprende un gen que codifica la proteína CsPP16 unida a un gen que codifica una proteína con actividad antimicrobiana, en la que ambos genes están unidos a través de un enlazador flexible, en la que dicho gen que codifica la proteína CsPP16 tiene la secuencia de SEQ. ID. No. 3, dicho enlazador flexible tiene la secuencia de SEQ. ID. No. 4 y dicho gen que codifica la proteína con actividad antimicrobiana tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que comprende SEQ. ID. No. 5, SEQ. ID. No. 8, SEQ. ID. No. 9, SEQ. ID. No. 10, SEQ. ID. No. 11, SEQ. ID. No. 12.
2. Planta, según la reivindicación 1, en la que dicho microorganismo es una bacteria.
3. Planta, según la reivindicación 2, en la que dicha bacteria se selecciona entre el grupo que comprende *Candidatus Liberobacter asiaticus*, *Candidatus Liberobacter africanus*, *Candidatus Liberobacter americanus* y *Candidatus Liberobacter solanacearum*.
4. Planta, según la reivindicación 1, en la que dicha planta se selecciona entre el grupo que comprende limones (*Citrus limon*), naranjas (*Citrus sinensis*), mandarinas (*Citrus reticulata*), pomelos (*Citrus reticulata x Citrus paradisi*), tangerinas (*Citrus paradisi*), *Citrus limonia*, *Citrus limettioides*, *Aeglopsis chevalieri Swingle*, *Atalantia missionis Oliver*, *Balsamocitrus dawei Stapf.*, *Calodendrum capensis Thunb.*, *Catharanthus roseus (L.) Citroncirus webberi*, *Citrus amblycarpa Ochse*, *Citrus aurantiifolia Swingle*, *Citrus aurantium L.*, *Citrus depressa Hayata*, *Citrus grandis (L.) Osbeck*, *Citrus hassaku Hort. ex Tanaka*, *Citrus hystrix DC.*, *Citrus ichangensis Swingle*, *Citrus jambhiri Lushington*, *Citrus junos Sieb. ex Tanaka*, *Citrus kabuchi Hort. ex Tanaka*, *Citrus limon (L.) Burm.*, *Citrus x limonia Osbeck*, *Citrus x nobilis Lour. "Ortanique"*, *Citrus maxima (pomelo/shaddock)*, *Citrus x nobilis Lour.*, *Citrus oto Hort. ex Tanaka*, *Citrus x paradisi Macfad.*, *Citrus reticulata Blanco*, *Citrus sinensis (L.) Osbeck*, *Citrus sunki Hort. ex Tanaka*, *Citrus unshiu (Mack.) Marc*, *Clausena indica Oliver*, *Clausena lansium (Lour.) Skeels*, *Cuscuta australis R. Br. (Convolvulaceae, Cuscutaceae)*, *Fortunella spp.*, *Limonia acidissima L.*, *Microcitrus australasica (F.J. Muell.) Swingle*, *Murraya koenigii (L.) Murraya paniculata (L.) Jack*, *Poncirus trifoliata (L.) Raf.*, *Swinglea glutinosa (Blanco) Merr.*, *Toddalia lanceolata Lam*, *Triphasia trifolia (Burm. f.) P. Wilson*, *Citrus indica Tanaka*, *Citrus limetta Risso* y *Citrus macroptera Montrons.*
5. Vector recombinante que comprende una unidad de expresión que expresa una proteína de fusión que actúa como un transportador dentro del tejido vascular de una planta y tiene una actividad antimicrobiana, en el que la unidad de expresión comprende un gen que codifica la proteína CsPP16 unido a un gen que codifica una proteína con actividad antimicrobiana, en el que ambos genes están unidos a través de un enlazador flexible, en el que dicho gen que codifica la proteína CsPP16 tiene la secuencia de SEQ. ID. No. 3, dicho enlazador flexible tiene la secuencia de SEQ. ID. No. 4 y dicho gen que codifica la proteína con actividad antimicrobiana tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que comprende SEQ. ID. No. 5, SEQ. ID. No. 8, SEQ. ID. No. 9, SEQ. ID. No. 10, SEQ. ID. No. 11, SEQ. ID. No. 12.
6. Célula huésped que comprende el vector recombinante, según la reivindicación 5, en la que dicha célula huésped es capaz de transferir material genético a una planta.
7. Célula huésped, según la reivindicación 6, en la que dicha célula es *Agrobacterium*.
8. Procedimiento para la obtención de una planta o partes de la misma resistente a infecciones causadas por microorganismos que están restringidos al floema, según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- conjugar a una célula huésped capaz de transferir material genético a una planta, el vector recombinante, según la reivindicación 5,
 - inocular una planta susceptible a infecciones causadas por microorganismos que están restringidos al floema, con la célula huésped obtenida en la etapa a), y
 - verificar la adquisición del vector y su expresión, su estabilidad en las plantas transformadas y verificar la resistencia adquirida.
9. Procedimiento para tratar una planta o partes de la misma infectada por microorganismos que están restringidos al floema, que comprende las etapas de:
- inocular la planta infectada con una célula huésped capaz de transferir material genético a una planta, en la que dicha célula huésped ha sido previamente conjugada con el vector recombinante de la reivindicación 5, y
 - verificar en la planta infectada la adquisición del vector y su expresión, su estabilidad en las plantas infectadas transformadas y verificar la resistencia adquirida a la infección.
10. Procedimiento, según la reivindicación 8 o 9, en el que en el paso a), la célula huésped capaz de transferir

material genético a una planta es *Agrobacterium*.

- 5 11. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que dicha *Agrobacterium* se selecciona del grupo que comprende *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*.
- 10 12. Procedimiento, según la reivindicación 8 o 9, en el que dicha planta se selecciona entre el grupo que comprende limones (*Citrus limon*), naranjos (*Citrus sinensis*), mandarinas (*Citrus reticulata*), pomelos (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*), tangerinas (*Citrus paradisi*), *Citrus limonia*, *Citrus limettioides*, *Aeglopsis chevalieri* Swingle, *Atalantia missionis* Oliver, *Balsamocitrus dawei* Stapf., *Calodendrum capensis* Thunb, *Catharanthus roseus* (L.) *Citroncirus webberi*, *Citrus amblycarpa* Ochse, *Citrus aurantiifolia* Swingle, *Citrus aurantium* L., *Citrus depressa* Hayata, *Citrus grandis* (L.) Osbeck, *Citrus hassaku* Hort. ex Tanaka, *Citrus hystrix* DC., *Citrus ichangensis* Swingle, *Citrus jambhiri* Lushington, *Citrus junos* Sieb. ex Tanaka, *Citrus kabuchi* Hort. ex Tanaka, *Citrus limon* (L.) Burm., *Citrus* x *limonia* Osbeck, *Citrus* x *nobilis* Lour. "Ortanique", *Citrus maxima* (pomelo/shaddock), *Citrus* x *nobilis* Lour., *Citrus oto* Hort. ex Tanaka, *Citrus* x *paradisi* Macfad., *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka, *Citrus unshiu* (Mack.) Marc, *Clausena indica* Oliver, *Clausena lansium* (Lour.) Skeels, *Cuscuta australis* R. Br. (*Convolvulaceae*, *Cuscutaceae*), *Fortunella* spp., *Limonia acidissima* L., *Microcitrus australasica* (F.J. Muell.) Swingle, *Murraya koenigii* (L.), *Murraya paniculata* (L.) Jack, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr., *Toddalia lanceolata* Lam, *Triphasia trifolia* (Burm. f.) P. Wilson, *Citrus indica* Tanaka, *Citrus limetta* Risso y *Citrus macroptera* Montrons
- 15 13. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que dicho microorganismo infeccioso se selecciona entre el grupo que comprende *Candidatus Liberobacter asiaticus*, *Candidatus Liberobacter africanus*, *Candidatus Liberobacter americanus* y *Candidatus Liberobacter solanacearum*.
- 20 14. Procedimiento, según la reivindicación 13, en el que dicho microorganismo infeccioso causa en la planta una enfermedad seleccionada entre el grupo que comprende la enfermedad Zebra chip y la enfermedad Huanglongbing.
- 25 15. Gen quimérico que codifica una proteína de fusión que actúa como un transportador dentro del tejido vascular de una planta y tiene una actividad antimicrobiana, que comprende un gen que codifica la proteína CsPP16 unido a un gen que codifica una proteína con actividad antimicrobiana, en el que ambos genes están unidos a través de un enlazador flexible en el que dicho gen que codifica la proteína CsPP16 tiene la secuencia de SEQ. ID. No. 3, el enlazador flexible tiene la secuencia de SEQ. ID. No. 4 y el gene que codifica la proteína con actividad antimicrobiana tiene una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEQ. ID. No. 5, SEQ. ID. No. 8, SEQ. ID. No. 9, SEQ. ID. No. 10, SEQ. ID. No. 11, SEQ. ID. No. 12.
- 30 16. Proteína que actúa como un transportador dentro del tejido vascular de una planta y tiene una actividad antimicrobiana, y en la que dicha proteína es codificada por el gen quimérico, según la reivindicación 15.
- 35 17. Composición para tratar una planta o partes de la misma infectada por microorganismos que están restringidos al floema, que comprende la célula huésped, según la reivindicación 6 en un vehículo agrónomicamente compatible.
- 40

Figura 1

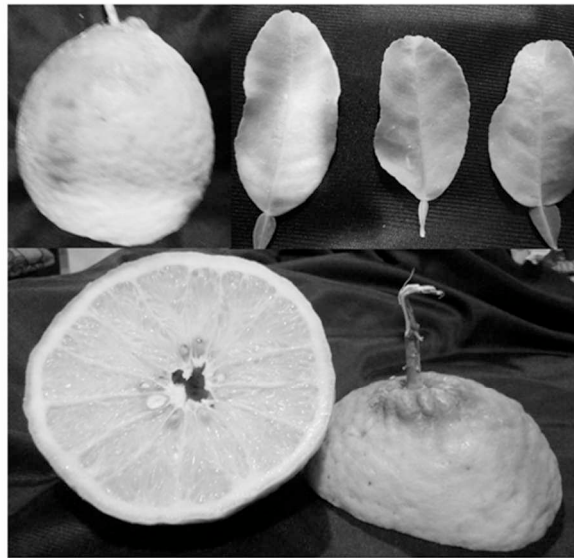


Figura 2

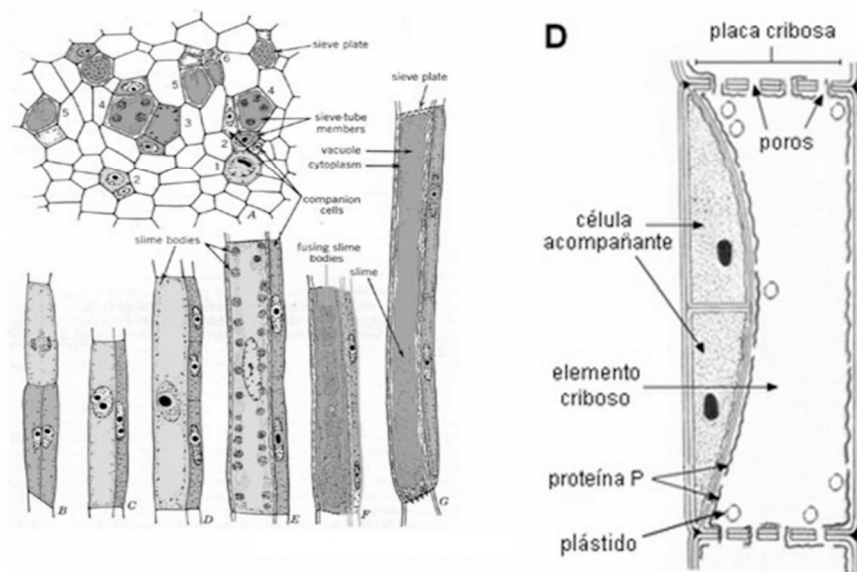


Figura 3



Figura 4

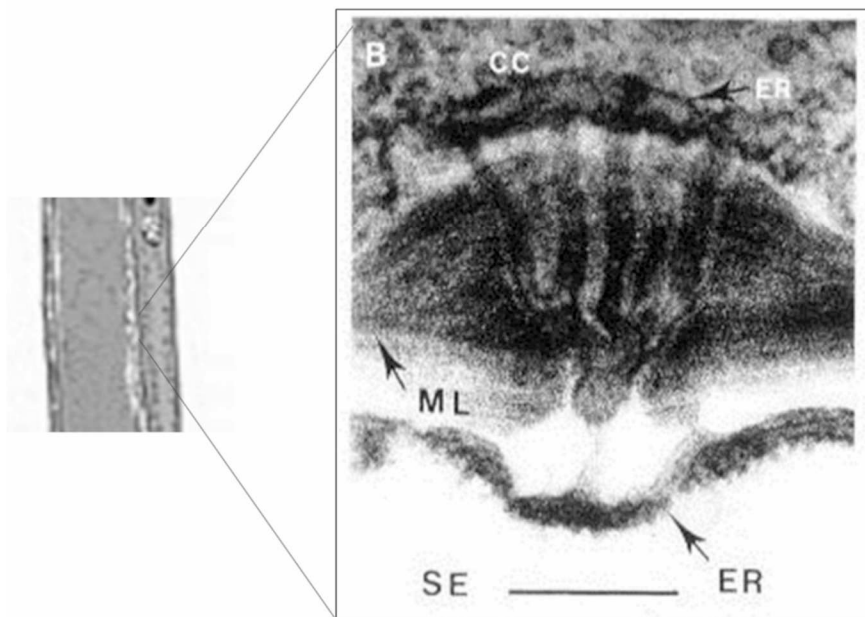
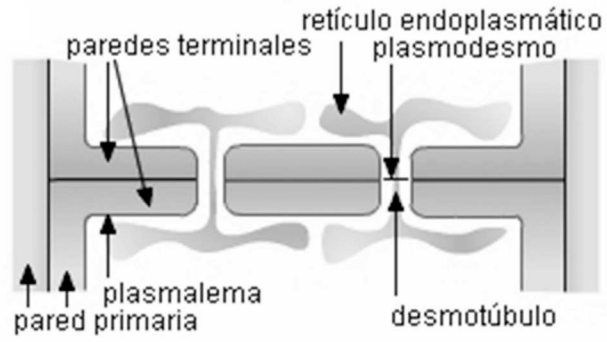


Figura 5

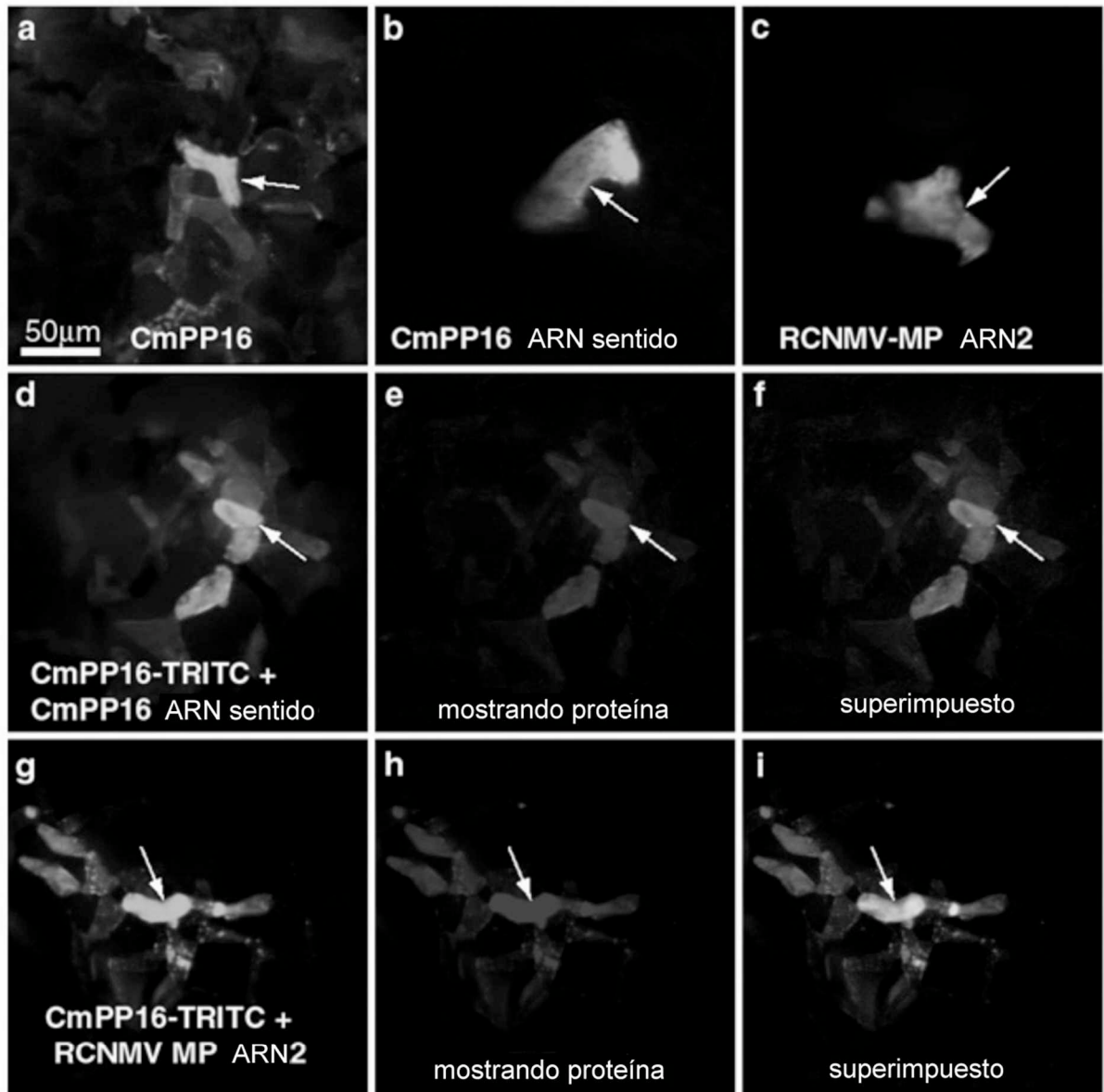


Figura 6

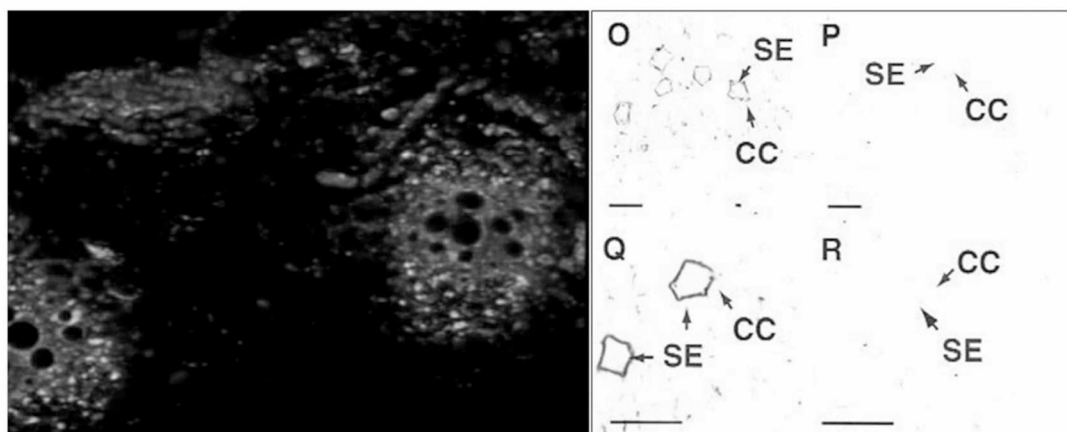


Figura 7

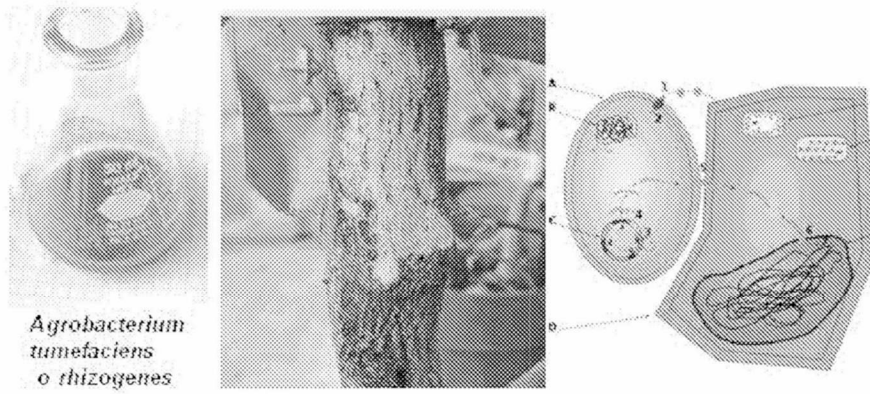


Figura 8



Figura 9

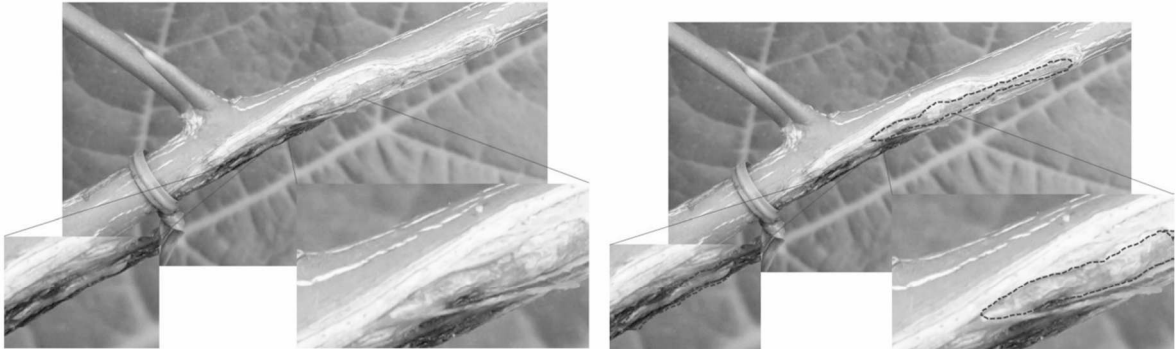


Figura 10

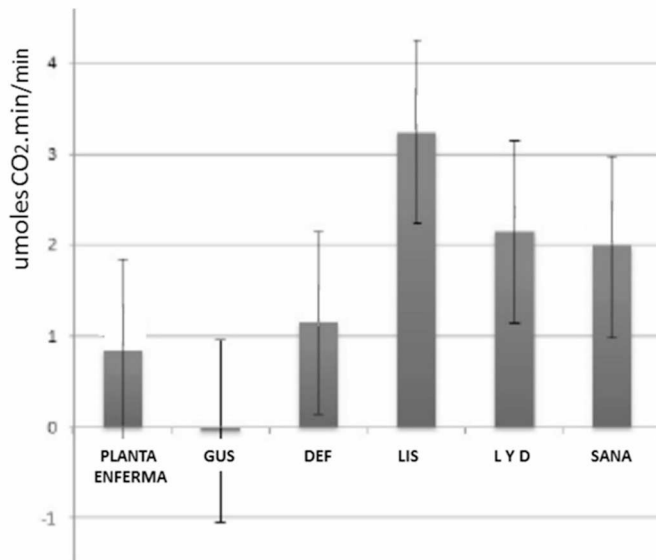


Figura 11

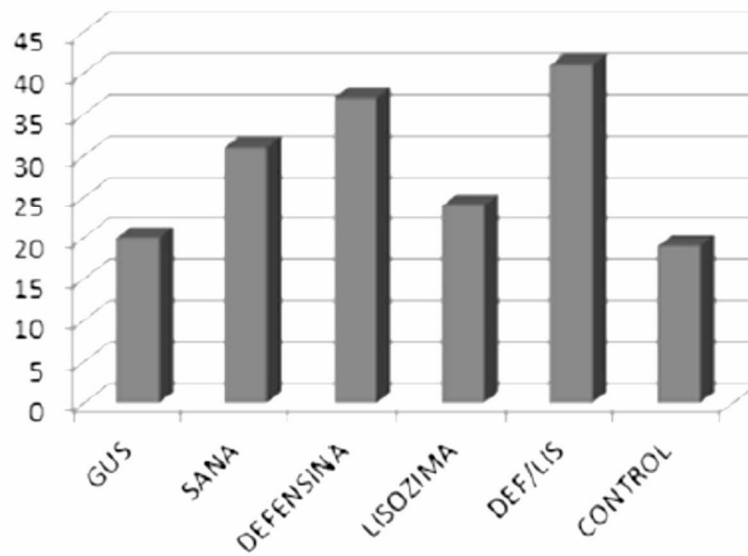


Figura 12

	GUS	SANA	DEFENSINA	LISOZIMA	DEF/LIS	CONTROL
	16,5	23,5	31	22,5	16,3	8,5
	7	23,7	23	39	15	15,8
	7,7	10,8	31,4	31	21,8	20
	17,5	20,5	18,8	22	21	12,1
	15	23,6	60	14,5	19	15,8
	11	20,4	16,2	69	13	14,4
	15,5		20,2	19,4	18	
	12,9		20	14	17,7	
			27,6	30,8		
				29,1		
DSVSTD	4,0	5,5	14,2	16,1	3,2	3,9

GUS	12,9
SANA	20,4
DEFENSINA	27,6
LISOZIMA	29,1
DEF/LIS	17,7
CONTROL	14,4

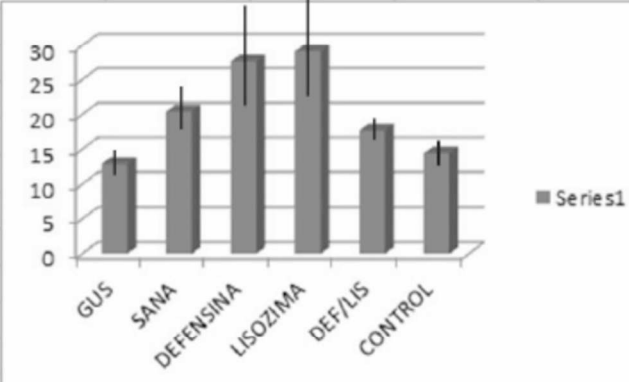


Figura 13

Defensina



Control



Figura 14

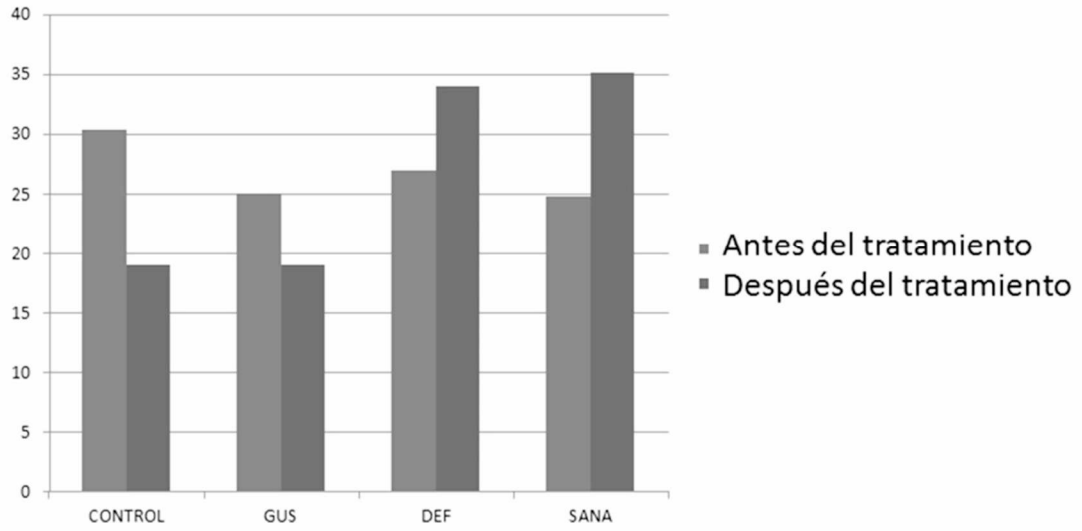


Figura 15

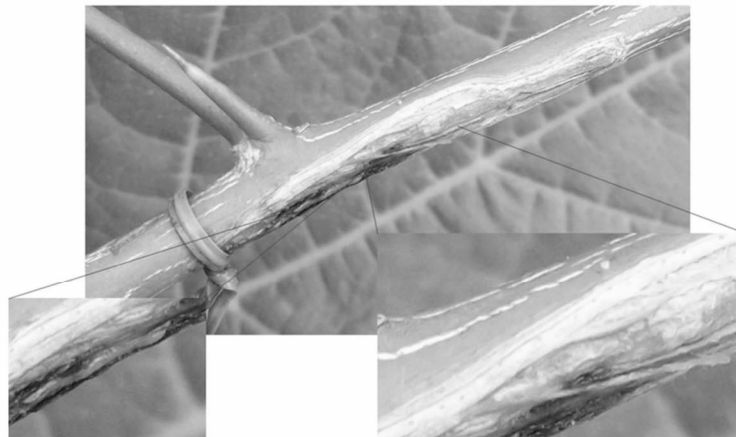


Figura 16

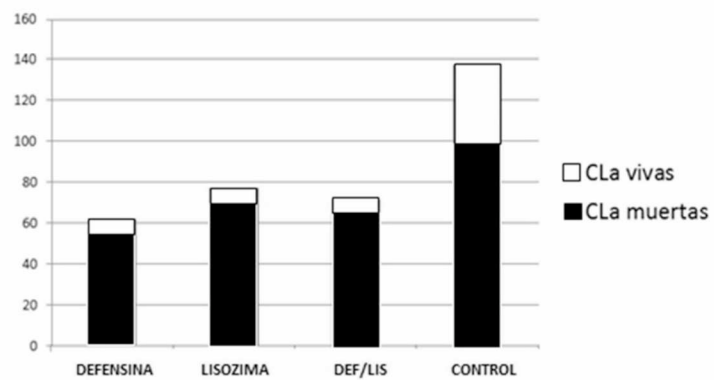
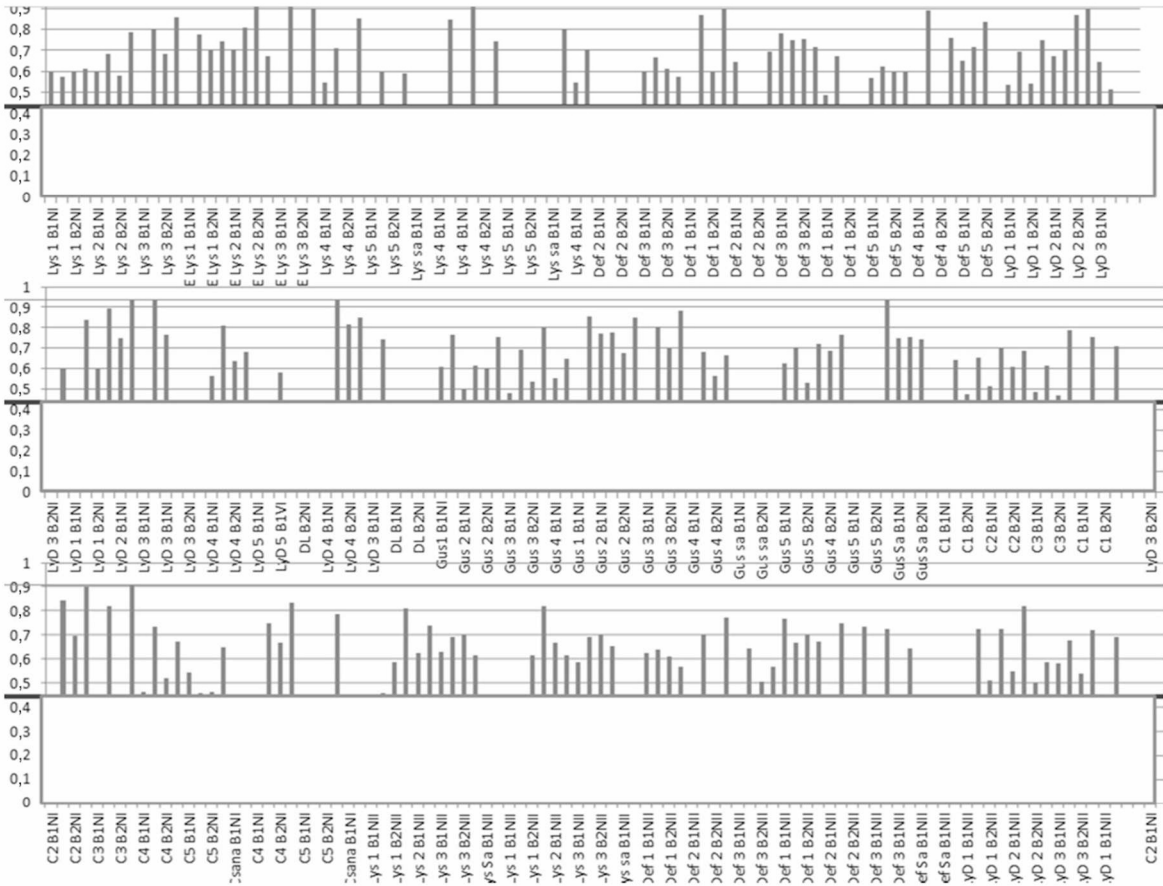


Figura 17

A



B

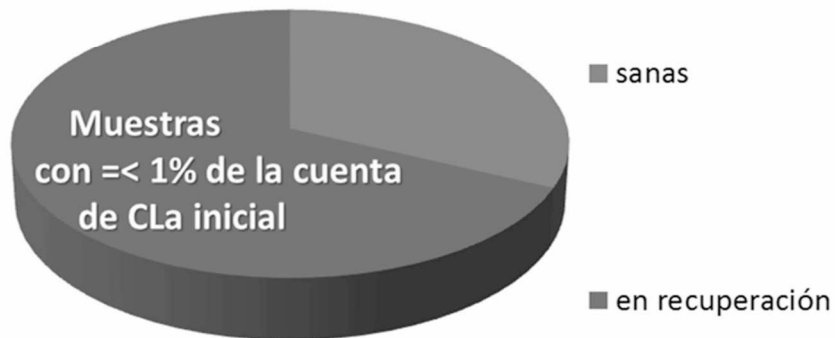


Figura 18



Figura 19

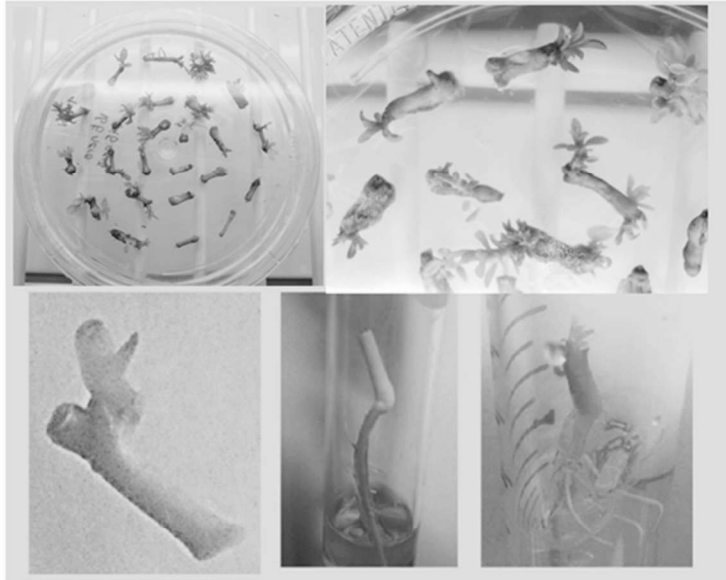
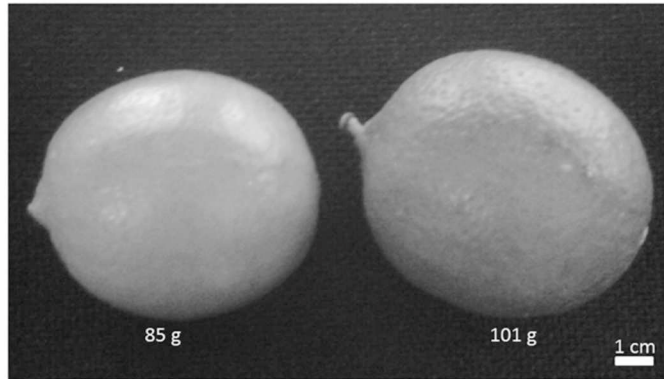


Figura 20



Figura 21

A



B



SANO

ENFERMO CON HLB

CsPP16-DEFENSINA

Figura 23

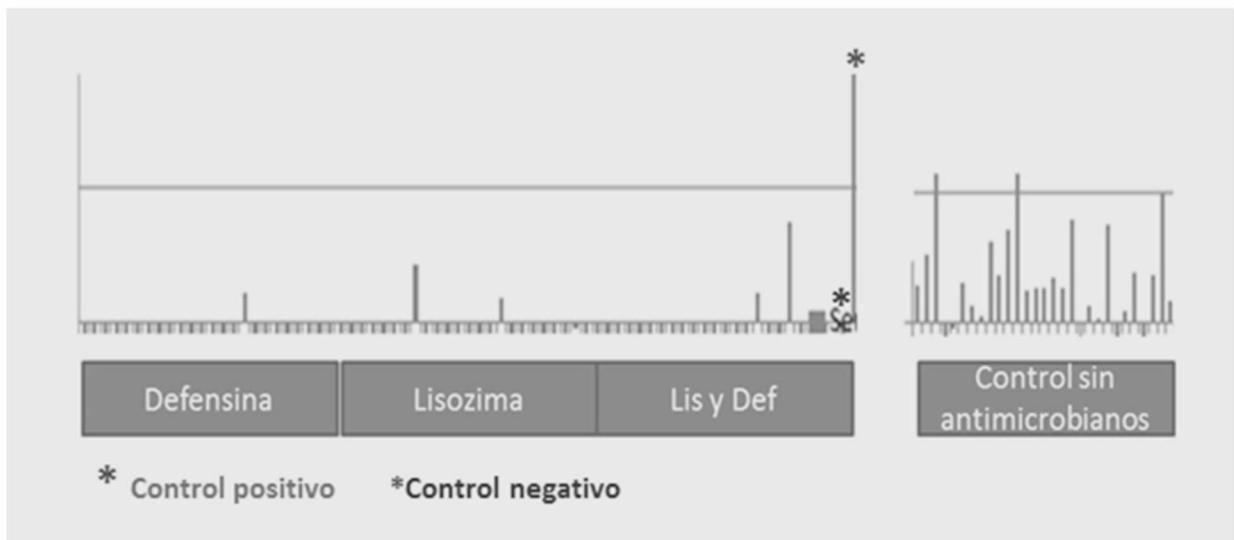


Figura 22



Figura 24

Construcciones para expresar péptidos antimicrobianos en floema

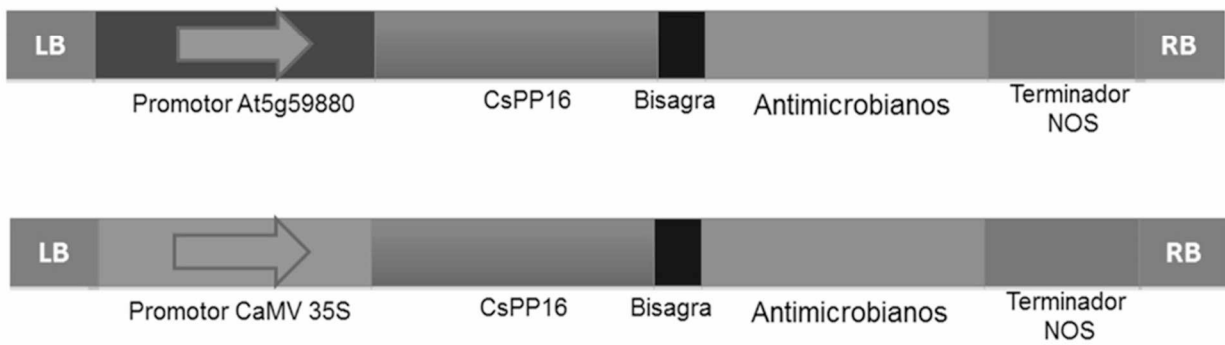


Figura 25

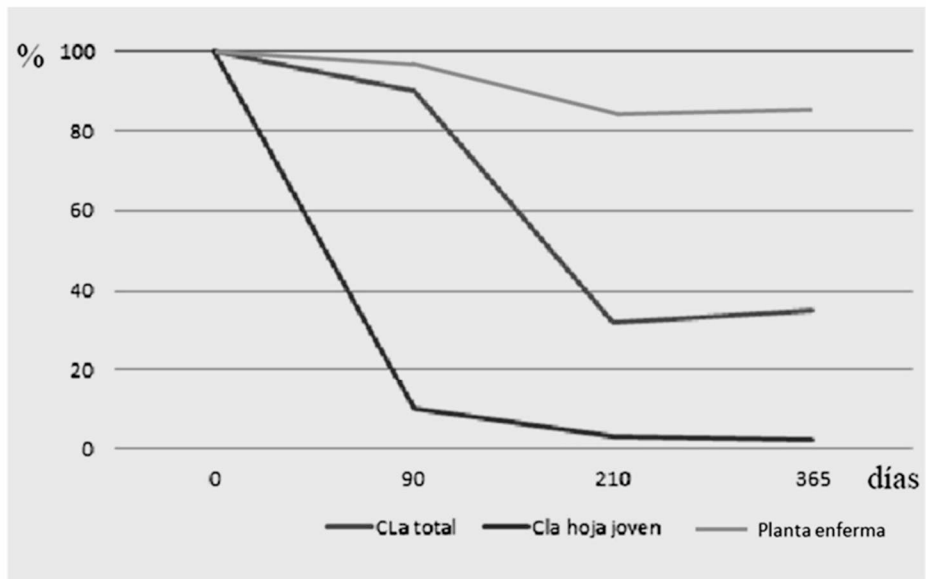


Figura 26

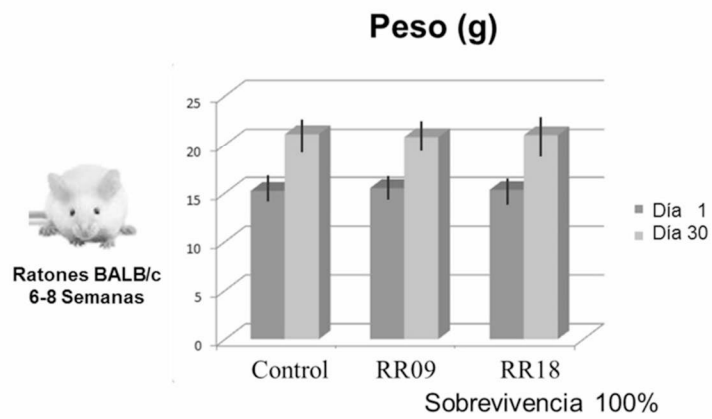


Figura 27



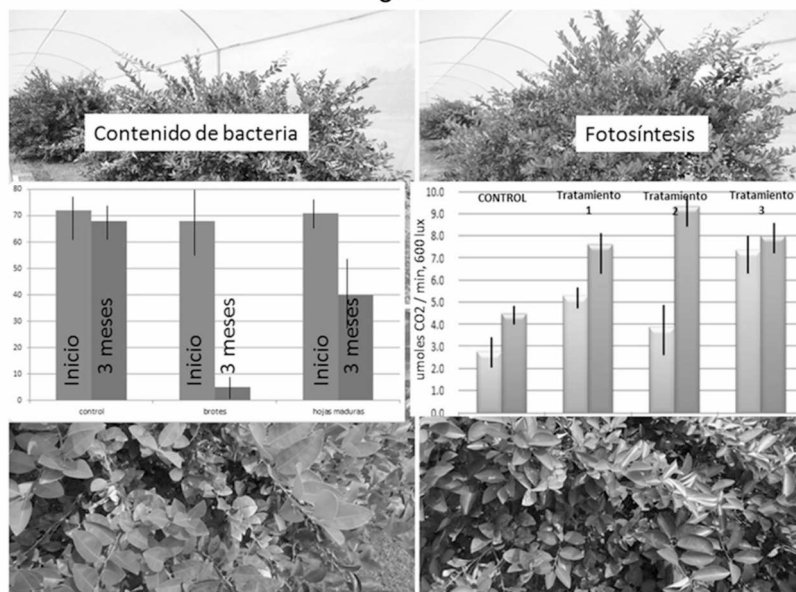
Figura 28



Figura 29



Figura 31



Tecomán, Colima.

Figura 30



Figura 32
A

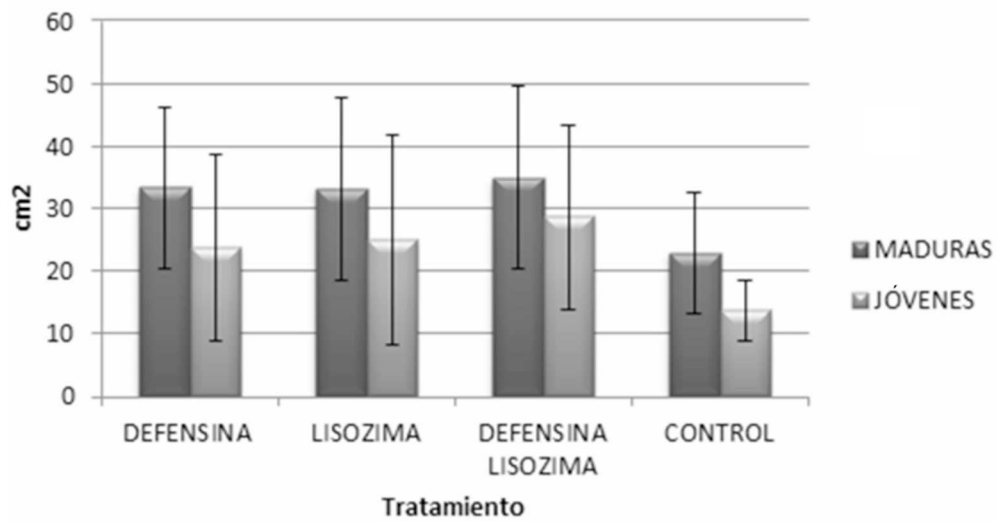
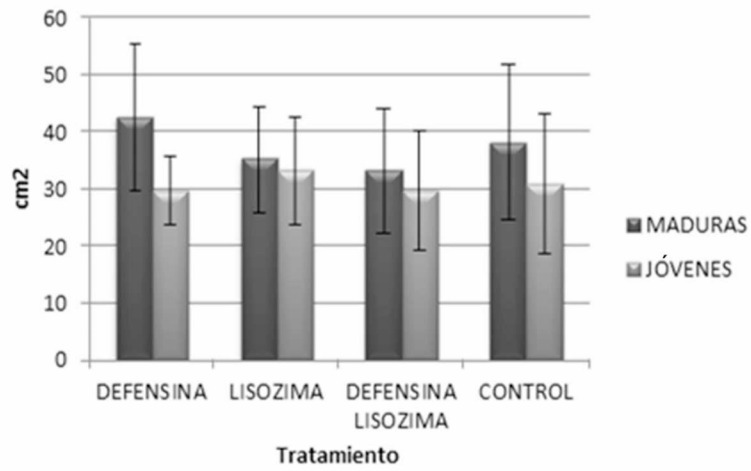
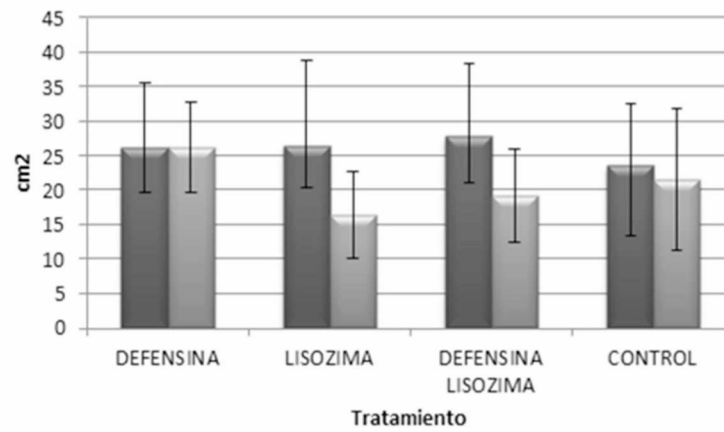


Figura 32 (continuación)
B



C



D

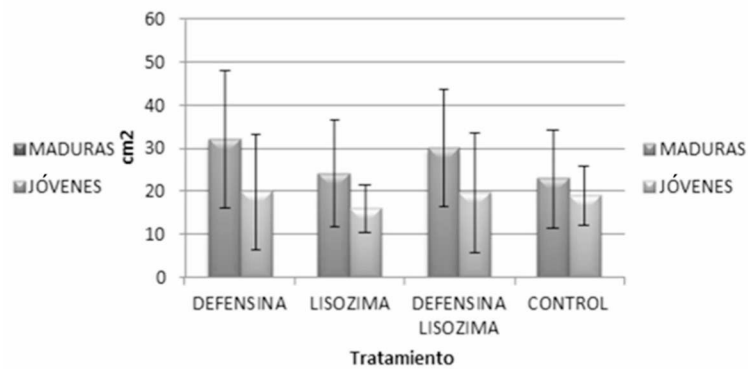


Figura 33

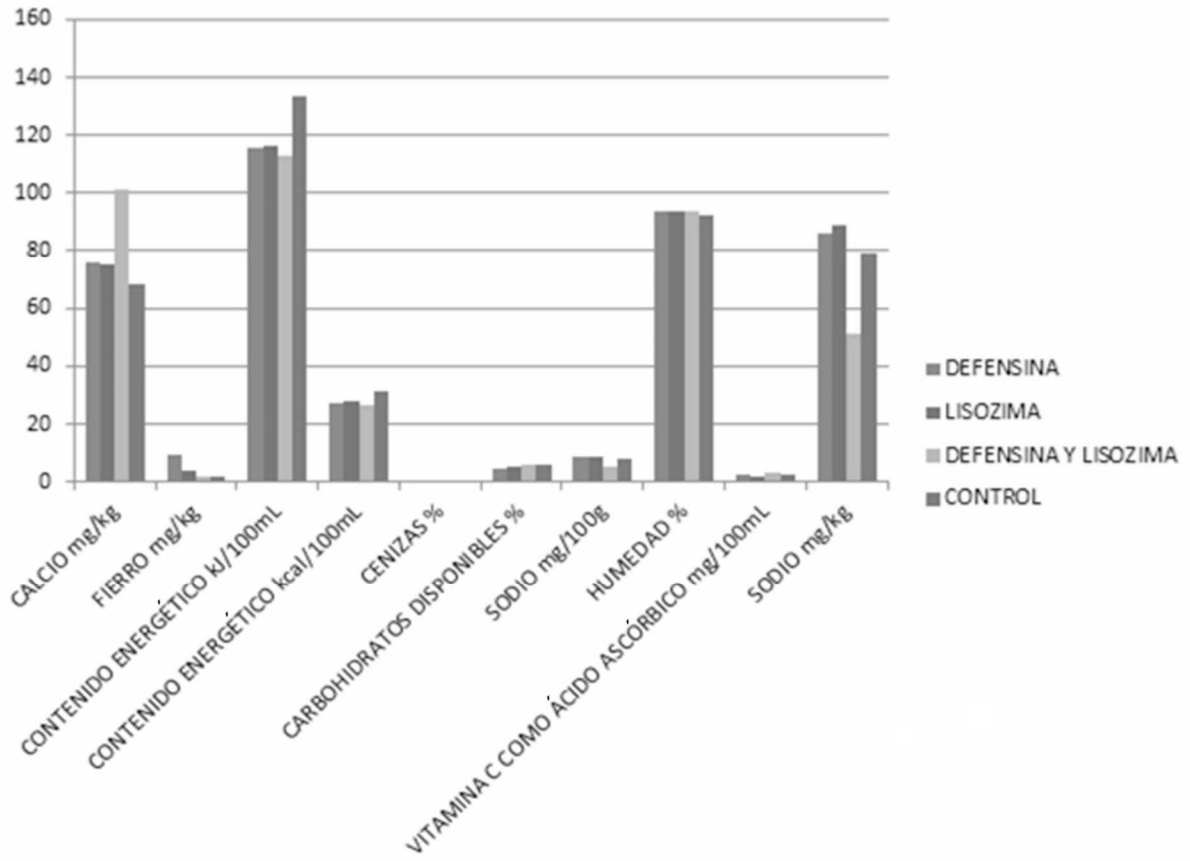


Figura 34

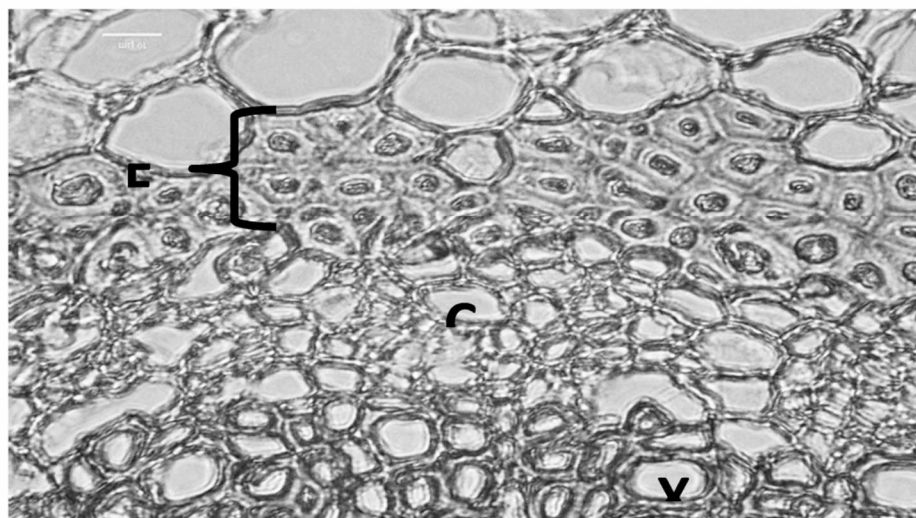


Figura 35

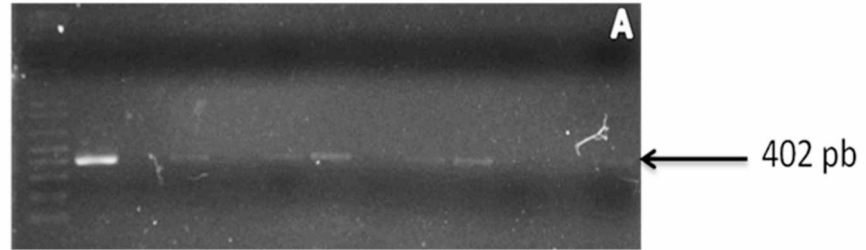
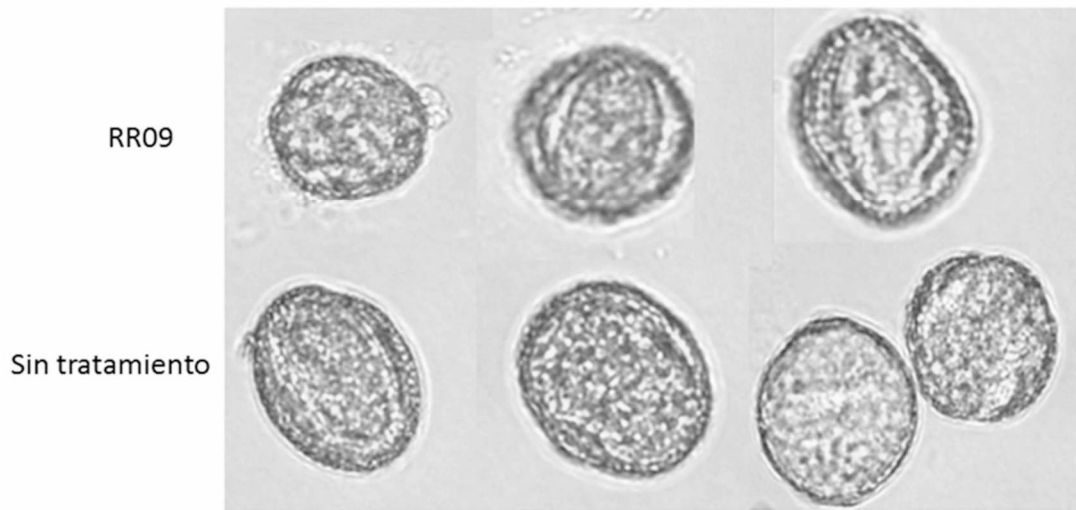
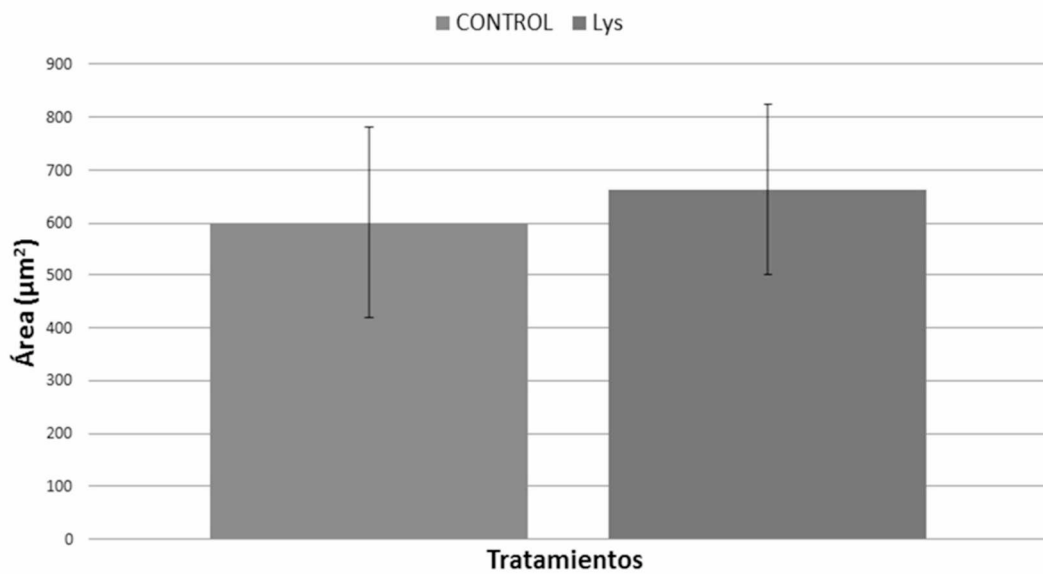


Figura 36
A



B



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 6455759 B
- US 7196057 B
- WO 2009064255 A
- WO 9928484 A

Literatura no patente citada en la descripción

- **BOVÉ et al.** *Strategic Planning for the Florida Citrus Industry: Addressing Citrus Greening*, 1974
- **BOVÉ J.M.** Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 2006, vol. 88 (1), 7-37
- **CERVERA, M.** Genetic transformation and regeneration of mature tissue of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Res.*, 1998, vol. 7, 51-59
- **CERVERA, M.** Genetic transformation of mature citrus plants. *Methods Mol. Biol.*, 2004, vol. 286, 177-187
- **CORBESIER L.** FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science*, 2007, vol. 316, 1030-1033
- **HARTUNG J.S.** Comparison of the 'Ca. Liberibacter asiaticus' genome adapted for an intracellular lifestyle with other members of the Rhizobiales. *PLoS One*, 2011, vol. 6 (8), e23289
- **KOH E.J.** Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with 'Candidatus Liberibacter asiaticus'. *Protoplasma*, 2011
- **LIN H.** The complete genome sequence of 'Candidatus Liberibacter solanacearum', the bacterium associated with potato zebra chip disease. *PLoS One*, 2011, vol. 6, e19135
- **LIN M.K.; BELANGER H.; LEE Y.J.; VARKONYI-GASIC E.; TAOKA K.; MIURA E.; XOCONOSTLE-CAZARES B.; GENDLER K.; JORGENSEN R.A.; PHINNEY B.** FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. *Plant Cell*, 2007, vol. 19, 1488-1506
- **LOUGH T.J.** Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, vol. 57, 203-232
- **MASSCHALCK B.** Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol*, 2001, vol. 67, 339-344
- **PROVENCHER L.M.** Sucrose export defective1 encodes a novel protein implicated in chloroplast-to-nucleus signaling. *Plant Cell*, 2001, vol. 13, 1127-1141
- **RUIZ-MEDRANO R.; XOCONOSTLE-CAZARES B.; HAM B.; K., LI G.; LUCAS W.J.** Vascular expression in Arabidopsis is predicted by the frequency of CT/GA-rich repeats in gene promoters. *Plant J*, 2011, vol. 67, 130-144
- **RUIZ-MEDRANO R.; XOCONOSTLE-CAZARES B.; KRAGLER F.** The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, vol. 7, 641-650
- **RUIZ-MEDRANO R.; XOCONOSTLE-CAZARES B.; LUCAS W.J.** The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, vol. 4, 202-209
- **VAA BEL A.J.** Pathogen-induced resistance and alarm signals in the phloem. *Mol Plant Pathol*, 2004, vol. 5, 495-504
- **XOCONOSTLE-CAZARES B.; XIANG Y.; RUIZ-MEDRANO R.; WANG H.L.; MONZER J.; YOO B.C.; MCFARLAND K.C.; FRANCESCHI V.R.; LUCAS W.J.** Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science*, 1999, vol. 283, 94-98