

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA MODIFICACIÓN DE PLANTAS

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias el cual ha sido presentado electrónicamente en formato ASCII y por medio de la presente se incorpora por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el día 23 de agosto de 2019, con un archivo denominado 51296-004W03_Sequence_Listing_08.23.19_ST25 y que tiene un tamaño de 12,136 bytes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la agricultura, el suministro de agentes biológicamente activos a las plantas para inducir modificaciones deseables en las plantas puede verse obstaculizado de varias maneras. Por ejemplo, los agentes modificadores de plantas, como los ácidos nucleicos o los péptidos, pueden ser susceptibles a la degradación durante el suministro. Además, el agente modificador de plantas necesita infiltrarse en varias partes de la planta, tejidos, sistema vascular y/o células, para modificar la planta. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica, de métodos y composición para administrar eficazmente agentes modificadores de plantas a las mismas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En el presente documento se describen composiciones modificadoras de plantas que incluyen una pluralidad de paquetes de mensajeros de plantas (PMP) que llevan un agente modificador de plantas. Las composiciones de la presente memoria son útiles en métodos para administrar agentes que

modifican plantas de una manera que introduce un rasgo de planta deseable, tal como un aumento en la aptitud de la planta.

En un primer aspecto, aquí se proporciona un método para administrar un ARN heterólogo a una planta, el método comprende proporcionar a una planta una composición que incluye una pluralidad de paquetes mensajeros de plantas (PMP), cada pluralidad comprende el ARN heterólogo, donde la composición es proporcionada en una concentración efectiva para aumentar la aptitud de una planta.

En algunas realizaciones, el ARN heterólogo es un ARN guía (ARNg). En algunas realizaciones, el ARNg es un componente de una ribonucleoproteína compleja (RNP), y cada pluralidad de PMP comprende el RNP.

En algunas realizaciones, los PMP son PMP con lípidos reconstituidos (LPMP).

En algunas realizaciones, los ARN heterólogos son encapsulados por los PMP.

En algunas realizaciones, cada uno de los PMP incluyen una vesícula extracelular (EV) de planta purificada.

En algunas realizaciones, los PMP en la composición están en una concentración efectiva para modificar un rasgo de la planta, en donde la modificación aumente la aptitud de la planta, por ejemplo, aumentar el desarrollo, crecimiento, rendimiento, resistencia a estresores abióticos o resistencia a estresores bióticos. En algunas realizaciones, el aumento en la aptitud de la planta es una modificación al período de floración, un aumento en la aptitud de la planta es un aumento en la calidad de los productos cosechados de la planta, una mejora en el sabor, la apariencia, o la vida útil

de un producto cosechado de la planta, o una disminución en la producción de un alérgeno que estimula una respuesta inmune en un animal.

En otro aspecto, aquí se proporciona una composición modificadora de plantas que incluye una pluralidad de PMP, en donde los PMP incluyen un agente modificador de plantas. En algunas realizaciones, los PMP en la composición están en una concentración efectiva para modificar un rasgo de la planta, tal como la aptitud de la misma. En algunas realizaciones, los PMP en la composición están en una concentración efectiva para aumentar la aptitud de una planta.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento una composición modificadora de plantas que incluye una pluralidad de paquetes de mensajeros de plantas (PMP), en donde los PMP incluyen un agente modificador de plantas y los PMP en la composición están en una concentración efectiva para modificar un rasgo de planta, en donde la modificación aumenta la aptitud de la planta.

En algunas realizaciones de las composiciones descritas aquí, el aumento en la aptitud es un aumento en el desarrollo, crecimiento, rendimiento, resistencia a estresores abióticos o resistencia a estresores bióticos. En algunas realizaciones, el aumento en la aptitud de la planta es un aumento en la resistencia a enfermedades, tolerancia a la sequía, tolerancia al calor, tolerancia al frío, tolerancia a la sal, tolerancia al metal, tolerancia a los herbicidas, tolerancia química, eficiencia en el uso del agua, utilización de nitrógeno, resistencia al estrés por nitrógeno, nitrógeno fijación, resistencia a plagas, resistencia a herbívoros, resistencia a patógenos,

rendimiento, rendimiento en condiciones limitadas por agua, vigor, crecimiento, capacidad fotosintética, nutrición, contenido de proteínas, contenido de carbohidratos, contenido de aceite, biomasa, longitud del brote, longitud de la raíz, arquitectura de la raíz, producción de semilla, semilla peso, producción de fruta o cantidad de productos cosechables. En algunas realizaciones, el aumento en la aptitud de la planta es un aumento en la calidad de los productos cosechados de la planta. En algunas realizaciones, el aumento en la aptitud de la planta es una mejora en el sabor, la apariencia o la vida útil de un producto cosechado de la planta. En algunas realizaciones, el aumento en la aptitud es una disminución en la producción de un alérgeno que estimula una respuesta inmune en un animal.

En algunas realizaciones de las composiciones descritas aquí, el agente modificador de plantas es un ácido nucleico heterólogo.

En otro aspecto, aquí se proporciona una composición modificadora de plantas que incluye una pluralidad de paquetes de mensajeros de plantas (PMP), en donde los PMP incluyen un ácido nucleico heterólogo y los PMP en la composición están en una concentración efectiva para modificar una planta, en donde la modificación aumenta la aptitud de la planta.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento una composición modificadora de plantas que incluye una pluralidad de paquetes de mensajeros de plantas (PMP), en donde los PMP incluyen un ácido nucleico heterólogo y los PMP en la composición están en una concentración efectiva para aumentar la aptitud de la planta.

En algunas realizaciones donde el agente modificador de plantas es un ácido nucleico heterólogo, el ácido nucleico heterólogo es un ADN, un ARN, un ANP o una molécula híbrida de ADN-ARN. En algunas realizaciones, el ARN es un ARN mensajero (ARNm), un ARN guía (ARNg) o un ARN inhibidor. En algunas realizaciones, el ARN inhibidor es ARNi, ARNsh o ARNmi. En algunas realizaciones, el ARN inhibidor inhibe la expresión de un gen en una planta.

En algunas realizaciones donde el agente modificador de plantas es un ácido nucleico heterólogo, el ácido nucleico es un ARNm, un ARNm modificado o una molécula de ADN que, en la planta, aumenta la expresión de una enzima, una proteína formadora de poros, una señalización ligando, un péptido penetrante de células, un factor de transcripción, un receptor, un anticuerpo, un nanocuerpo, una proteína de edición genética, una riboproteína, un aptámero de proteína o una chaperona. En algunas realizaciones, el aumento en la expresión en la planta es un aumento en la expresión de aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100% en relación con un nivel de referencia (por ejemplo, la expresión en una planta no tratada). En algunas realizaciones, el aumento en la expresión en la planta es un aumento en la expresión de aproximadamente 2 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 25 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 75 veces, o aproximadamente 100 veces o más, en relación con un nivel de referencia (por ejemplo, la expresión en una planta no tratada).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un ARN antisentido, un ARNip, un ARNsh, un ARNmi, un ARNi, un ANP, un morfolino, un ARN, un ARNip, una ribozima, una ADNzima, un aptámero, un ARNcirc, un ARNg, o una molécula de ADN que, en la planta, disminuye la expresión de una enzima, un factor de transcripción, una proteína secretora, un factor estructural, una riboproteína, un aptámero de proteína, una chaperona, un receptor, un ligando de señalización o un transportador. En algunas realizaciones, la disminución en la expresión en la planta es una disminución en la expresión de aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100% en relación con un nivel de referencia (por ejemplo, la expresión en una planta no tratada). En algunas realizaciones, la disminución en la expresión en la planta es una disminución en la expresión de aproximadamente 2 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 25 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 75 veces, o aproximadamente 100 veces o más, en relación con un nivel de referencia (por ejemplo, la expresión en una planta no tratada).

En algunas realizaciones donde el agente modificador de plantas es un ácido nucleico heterólogo, el ácido nucleico heterólogo es una construcción que no se integra en el genoma de la planta. En otras realizaciones, el ácido nucleico heterólogo es una construcción que se integra (por ejemplo, se integra de manera estable) en el genoma de la planta.

En algunas realizaciones de las composiciones descritas aquí, el agente modificador de plantas es un péptido heterólogo. En algunas realizaciones, el péptido es una

enzima, proteína formadora de poros, ligando de señalización, péptido penetrante celular, factor de transcripción, receptor, anticuerpo, nanocuerpo, proteína de edición génica, riboproteína, un aptámero de proteína o chaperona. En algunas realizaciones, el péptido disminuye la expresión de un gen en la planta. En algunas realizaciones, el péptido aumenta la expresión de un gen en la planta.

En otro aspecto más, se proporciona en el presente documento una composición modificadora de plantas que incluye una pluralidad de paquetes de mensajeros de plantas (PMP), en donde los PMP incluyen un péptido heterólogo y los PMP en la composición están en una concentración efectiva para aumentar la aptitud de la planta. En algunas realizaciones, el péptido es una enzima, proteína formadora de poros, ligando de señalización, péptido penetrante celular, factor de transcripción, receptor, anticuerpo, nanocuerpo, proteína de edición génica, riboproteína, un aptámero de proteína o chaperona. En algunas realizaciones, el péptido disminuye la expresión de un gen en la planta. En algunas realizaciones, el péptido aumenta la expresión de un gen en la planta.

En algunas realizaciones de las composiciones descritas en el presente documento, los PMP incluyen dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10) diferentes agentes modificadores de plantas. En algunas realizaciones, los dos o más agentes modificadores de plantas diferentes incluyen un ácido nucleico heterólogo y un péptido heterólogo. En ciertas realizaciones, el agente modificador de plantas heterólogo es uno que se enumera en la sección titulada "Agentes Modificadores De Plantas Heterólogos" de la Descripción Detallada en este documento.

En algunas realizaciones de las composiciones descritas en este documento, el agente modificador de plantas está encapsulado por los PMP.

En algunas realizaciones de las composiciones descritas en el presente documento, el agente modificador de plantas está incrustado en la superficie de los PMP.

En algunas realizaciones de las composiciones descritas en el presente documento, el agente modificador de plantas se conjuga con la superficie de los PMP.

En algunas realizaciones, la composición es estable durante al menos 24 horas (por ejemplo, al menos 24 horas, 30 horas o 40 horas), al menos 48 horas (por ejemplo, al menos 48 horas (=2 días), 3 días, 4 días, 5 días o 6 días), al menos siete días (por ejemplo, al menos siete días (=1 semana), al menos 2 semanas, al menos 3 semanas o al menos 4 semanas), o al menos 30 días (por ejemplo, al menos 30 días, al menos 60 días o al menos 90 días). En algunas realizaciones, la composición es estable a una temperatura de al menos 24°C (por ejemplo, al menos 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 37°C, 42°C o más de 42°C), al menos 20°C (por ejemplo, al menos 20°C, 21°C, 22°C o 23°C), al menos 4°C (por ejemplo, al menos 5°C, 10°C o 15°C), al menos -20°C (por ejemplo, al menos -20°C, -15°C, -10°C, -5°C, o 0°C), o al menos -80°C (por ejemplo, al menos -80°C, -70°C, -60°C, -50°C, -40°C o -30°C). En algunas realizaciones, los PMP son estables en nitrógeno líquido (aproximadamente -195.8°C). En algunas realizaciones, la composición es estable durante al menos un día a temperatura ambiente y/o estable durante al menos una semana a 4°C. En algunas realizaciones, la composición es estable bajo radiación UV. En algunas

realizaciones, la composición es estable durante un período definido en este documento bajo la temperatura en el hábitat natural de una planta.

En algunas realizaciones de las composiciones descritas aquí, los PMP pueden incluir una pluralidad de proteínas (es decir, proteínas PMP), y la concentración de PMP puede medirse como la concentración de proteínas PMP en el mismo. En algunas realizaciones, la pluralidad de PMP en la composición está a una concentración de al menos 0.025 µg de proteína PMP/ml (por ejemplo, al menos 0.025, 0.05, 0,1 o 0.5 µg de proteína PMP/ml), al menos 1 µg de proteína PMP/ml (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 µg de proteína PMP/ml), al menos 10 µg de proteína PMP/ml (por ejemplo, al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 45 µg de proteína PMP/ml), al menos 50 µg de proteína PMP/ml (por ejemplo, al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o 95 µg de proteína PMP/ml), al menos 100 µg de proteína PMP/ml (por ejemplo, Al menos 100, 125, 150, 175, 200 o 225 µg de proteína PMP/ml), al menos 250 µg de proteína PMP/ml (por ejemplo, al menos 250, 300, 350, 400, 450 o 500 µg de proteína PMP/ml), o al menos 500 µg de proteína PMP/ml (por ejemplo, al menos 500, 600, 700, 800 o 900 µg de proteína PMP/ml). En algunas realizaciones, la pluralidad de PMP en la composición es a una concentración de al menos 1 mg de proteína PMP/ml (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 proteínas PMP/ml) o al menos 10 mg de proteína PMP/ml (por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg de proteína PMP/ml).

En algunas realizaciones de las composiciones descritas en el presente documento, los PMP incluyen una vesícula

extracelular (EV) de planta purificada, o un segmento o extracto de la misma. En algunas realizaciones, el EV vegetal es una vesícula extracelular (EV) vegetal modificada. En ciertas realizaciones, el EV vegetal es un exosoma vegetal o una microvesícula vegetal. En algunas realizaciones, los PMP incluyen un marcador EV de planta, como los descritos en el Anexo.

En algunas realizaciones de las composiciones descritas aquí, la pluralidad de PMP puede ser pura. Por ejemplo, la composición puede estar sustancialmente libre (por ejemplo, tiene menos del 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 2%) de orgánulos vegetales tales como cloroplastos, mitocondrias o núcleos).

En algunas realizaciones de las composiciones descritas aquí, la planta es una planta agrícola u hortícola. En algunas realizaciones, la planta agrícola es una planta de soja, una planta de trigo o una planta de maíz, una planta de tomate o una planta de alfalfa.

En algunas realizaciones de las composiciones descritas en el presente documento, la composición se formula para el suministro a una planta. En algunas realizaciones, la composición está formulada para la entrega a una hoja, polen, semilla, raíz, fruto, brote o flor de la planta. En algunas realizaciones, la composición incluye un vehículo agrícolamente aceptable.

En algunas realizaciones de las composiciones descritas en el presente documento, la composición se formula para estabilizar los PMP.

En algunas realizaciones de las composiciones descritas aquí, la composición modificadora de plantas no es pesticida.

En algunas realizaciones de las composiciones descritas

en el presente documento, la composición se formula como una composición líquida, sólida, en aerosol, en pasta, en gel o gaseosa.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento una composición modificadora de plantas que incluye una pluralidad de PMP, en donde los PMP se producen mediante un proceso que incluye los pasos de: (a) proporcionar una muestra inicial de una planta, o una parte de la misma, donde la planta o parte de ella comprenden EV; (b) aislar una fracción PMP bruta de la muestra inicial, en donde la fracción PMP bruta tiene un nivel disminuido de al menos un contaminante o un componente indeseado de la planta o de parte de la misma en relación con el nivel en la muestra inicial; (c) purificar la fracción PMP bruta, produciendo así una pluralidad de PMP bruta, en donde la pluralidad de PMP bruta tiene un nivel disminuido de al menos un contaminante o un componente indeseado de la planta o parte de la misma en relación con el nivel en la fracción EV bruta; y (d) cargar la pluralidad bruta de los PMP con un agente modificador de plantas; y, opcionalmente, (e) formular la etapa de los PMP (d) para suministrar a una planta.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento una planta que incluye cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas proporcionadas en el presente documento.

En otro aspecto más, se proporciona en el presente documento un método para administrar una composición modificadora de plantas a una planta que incluye poner en contacto la planta con la composición de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas proporcionadas en el

presente documento.

En otro aspecto, se proporciona aquí un método para modificar una planta, el método incluye entregar a la planta una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas proporcionadas en el presente documento, en donde el método modifica la planta y por lo tanto introduce o aumenta un rasgo beneficioso en la planta (por ejemplo, aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más de 100%) en relación con una planta no tratada.

En otro aspecto, se proporciona aquí un método para aumentar la aptitud de una planta, el método incluye entregar a la planta una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas proporcionadas en este documento, en donde el método aumenta la aptitud de la planta (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) en relación con una planta no tratada.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, la composición modificadora de plantas se administra a una hoja, semilla, polen, raíz, fruto, brote, flor o parte de la misma. En algunas realizaciones, la composición modificadora de plantas se entrega a una célula de la planta. En algunas realizaciones, la composición modificadora de plantas se administra al protoplasto de la planta. En algunas realizaciones, la composición modificadora de plantas se administra a un tejido de la planta. Por ejemplo, la composición puede administrarse al tejido meristemático de la planta (por ejemplo, meristema apical, meristema lateral o meristema intercalar). En algunos casos,

la composición se administra al tejido permanente de la planta (por ejemplo, tejidos simples (por ejemplo, parénquima, colénquima o esclerénquima) o tejido permanente complejo (por ejemplo, xilema o floema)). En algunos casos, la composición se entrega a un embrión de planta.

En otro aspecto, se proporciona aquí un método para aumentar la aptitud de una planta, el método incluye poner en contacto el polen de la planta con una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas en el presente documento, en donde el método aumenta la aptitud de la planta (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) una planta no tratada.

En otro aspecto, se proporciona aquí un método para aumentar la aptitud de una planta, el método incluye poner en contacto una semilla de la planta con una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas descritas en este documento, en donde el método aumenta la aptitud de la planta (por ejemplo, aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) relativo a una planta no tratada.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un método que incluye poner en contacto un protoplasto de la planta con una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas en el presente documento, en donde el método aumenta la aptitud de la planta (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) en relación con una planta no tratada.

En otro aspecto, se proporciona aquí un método para

aumentar la aptitud de una planta, el método incluye poner en contacto una célula de planta de la planta con una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas en este documento, en donde el método aumenta la aptitud de la planta (por ejemplo, aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) relativo a una planta no tratada.

En otro aspecto, en este documento se proporciona un método para aumentar la aptitud de una planta, el método incluye poner en contacto el tejido meristemático de la planta con una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas en el presente documento, en donde el método aumenta la aptitud de la planta (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) a una planta no tratada.

En otro aspecto, se proporciona aquí un método para aumentar la aptitud de una planta, el método incluye poner en contacto un embrión de la planta con una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas en este documento, en donde el método aumenta la aptitud de la planta (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) a una planta no tratada.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en este documento, el aumento en la aptitud es un aumento (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) en desarrollo, crecimiento, rendimiento, resistencia a estresores abióticos o resistencia a estresores bióticos.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en este documento, el aumento en la aptitud de la planta es un aumento (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) en resistencia a enfermedades, tolerancia a la sequía, tolerancia al calor, tolerancia al frío, tolerancia a la sal, tolerancia al metal, tolerancia a herbicidas, tolerancia química, eficiencia en el uso del agua, utilización de nitrógeno, resistencia al estrés por nitrógeno, fijación de nitrógeno, resistencia a plagas, resistencia a herbívoros, resistencia a patógenos, rendimiento, rendimiento en condiciones limitadas por agua, vigor, crecimiento, capacidad fotosintética, nutrición, contenido de proteínas, contenido de carbohidratos, contenido de aceite, biomasa, longitud del brote, longitud de la raíz, arquitectura raíz, producción de semilla, peso de semilla, producción de fruta o cantidad de productos cosechables.

En algunas realizaciones, el aumento en la aptitud es una floración temprana. En algunas realizaciones de los métodos descritos en este documento, el aumento en la aptitud de la planta es un aumento (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) en calidad de productos cosechados de la planta.

En algunas realizaciones de los métodos descritos aquí, el aumento en la aptitud de la planta es una mejora en el sabor o la apariencia de un producto cosechado de la planta.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en este documento, el aumento en la aptitud de la planta es un aumento en la vida útil de un producto cosechado de la planta

(por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%).

En algunas realizaciones de los métodos descritos en este documento, el aumento en la aptitud es una disminución (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) en la producción de un alérgeno (por ejemplo, Polen) que estimula una respuesta inmune en un animal (por ejemplo, Humano).

En algunas realizaciones de los métodos de la presente memoria, la planta es una planta agrícola u hortícola. En algunas realizaciones, la planta es una planta de soja, una planta de trigo, una planta de maíz, una planta de tomate o una planta de alfalfa.

En algunas realizaciones de los métodos de la presente memoria, la composición modificadora de plantas se administra como un líquido, un sólido, un aerosol, una pasta, un gel o un gas.

En otro aspecto, se proporciona aquí una formulación agrícola que incluye cualquier composición descrita aquí y un vehículo o excipiente adecuado para uso agrícola. La formulación puede estar en forma líquida, sólida (por ejemplo, Gránulo, gránulo, polvo, polvo seco o humectable), aerosol, pasta, gel o forma gaseosa. La formulación puede configurarse (y/o combinarse con instrucciones) para diluirse (por ejemplo, la composición es un sólido soluble o sólido dispersable en agua), pulverizarse, pintarse, inyectarse o aplicarse a una planta, suelo o semillas.

En otro aspecto, se proporcionan aquí kits que incluyen cualquier composición descrita en este documento e instrucciones para su uso como composición modificadora de

plantas. En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos, los PMP son PMP con lípidos reconstituidos (LPMP). En algunas realizaciones, los LPMP comprenden un lípido catiónico exógeno. En algunas realizaciones, cada uno de los PMP modificados comprenden al menos 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más del 90% de lípido catiónico. En algunas realizaciones, el lípido catiónico es DOTAP o colesterol DC.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente Descripción detallada y las reivindicaciones.

Definiciones

Como se usa en este documento, el término "composición modificadora de plantas" se refiere a una composición que incluye una pluralidad de PMP, en donde los PMP incluyen un agente modificador de plantas.

Como se usa en el presente documento, "entregar" o "contactar" se refiere a aplicar a una planta, una composición modificadora de plantas, ya sea directamente en la planta o adyacente a la planta, en una región donde la composición es efectiva para alterar la aptitud de la planta. En los métodos en donde la composición se contacta directamente con una planta, la composición se puede contactar con toda la planta o solo con una parte de la planta.

Como se usa en este documento, el término "cantidad efectiva", "concentración efectiva" o "concentración efectiva para" se refiere a una cantidad de un PMP, o un agente modificador de plantas heterólogo en el mismo (por ejemplo, un polinucleótido o un péptido), suficiente para efectuar el

resultado recitado, por ejemplo, modificar una planta (por ejemplo, aumentar la aptitud de la planta) o alcanzar un nivel objetivo (por ejemplo, un nivel predeterminado o umbral) en una planta objetivo.

5 Como se usa en el presente documento, el término "formulado para suministro a una planta" se refiere a una composición modificadora de plantas que incluye un vehículo
10 agrícolamente aceptable. Como se usa en el presente documento, un vehículo o excipiente "agrícolamente aceptable" es uno que es adecuado para usar en agricultura, por ejemplo,
15 para usar en plantas. En ciertas realizaciones, el vehículo o excipiente agrícolamente aceptable no tiene efectos secundarios adversos indebidos para las plantas, el medio ambiente, o para los humanos o animales que consumen los
20 productos agrícolas resultantes derivados de los mismos con una relación beneficio / riesgo razonable.

 Como se usa en el presente documento, "aumentar la aptitud de una planta" se refiere a un aumento en la aptitud de la planta que resulta directamente del contacto con una
25 composición modificadora de plantas descrita en este documento e incluye, por ejemplo, un rendimiento mejorado, un vigor mejorado de la planta, o calidad o cantidad mejorada de un producto cosechado de la planta, una mejora en los rasgos previos o posteriores a la cosecha que se consideran
30 deseables para la agricultura u horticultura (por ejemplo, sabor, apariencia, vida útil), o para una mejora de los rasgos que de otra manera beneficiarían a los humanos (por ejemplo, disminución de la producción de alérgenos). Un rendimiento mejorado de una planta se relaciona con un
35 aumento en el rendimiento de un producto (por ejemplo, medido

por la biomasa de la planta, el rendimiento de grano, semilla o fruta, el contenido de proteína, el contenido de carbohidratos o aceite o el área de la hoja) de la planta en una cantidad medible sobre el rendimiento del mismo producto de la planta producido en las mismas condiciones, pero sin la aplicación de las composiciones instantáneas o en comparación con la aplicación de agentes modificadores de plantas convencionales (por ejemplo, agentes modificadores de plantas entregados sin un PMP). Por ejemplo, el rendimiento puede incrementarse en al menos aproximadamente 0.5%, aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 4%, aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 100% o más del 100%. El rendimiento puede expresarse en términos de una cantidad en peso o volumen de la planta o un producto de la planta en alguna base. La base puede expresarse en términos de tiempo, área de crecimiento, peso de las plantas producidas o cantidad de materia prima utilizada. Un aumento en la aptitud de la planta también se puede medir por otros medios, como un aumento o mejora de la calificación de vigor, aumento en el soporte (el número de plantas por unidad de área), aumento en la altura de la planta, aumento en la circunferencia del tallo, aumento en el dosel de la planta, mejora en la apariencia (como un color más verde de la hoja medido visualmente), mejora en la calificación de la raíz, aumento en la emergencia de plántulas, contenido de proteína, aumento en el tamaño de la hoja, aumento en el número de hojas, menos

5 hojas basales muertas, aumento en la resistencia de la
macollera, disminución de los requerimientos de nutrientes o
fertilizantes, aumento de la germinación de la semilla,
aumento de la productividad de la macolla, aumento de la
floración, aumento de la maduración de la semilla o del grano
o madurez de la semilla, menos verso de la planta
(alojamiento), mayor crecimiento de brotes o cualquier
combinación de estos factores, en una cantidad medible o
notable sobre el mismo factor de la planta producida en las
10 mismas condiciones, pero sin la administración de las
composiciones instantáneas o con aplicador ion de agentes
agrícolas convencionales.

 Como se usa en este documento, el término "heterólogo"
se refiere a un agente (por ejemplo, un agente modificador de
15 una planta) que es (1) exógeno a la planta (por ejemplo, que
proviene de una fuente que no es la planta o parte de la
planta de la que se produce el PMP) (por ejemplo, agregado de
los PMP utilizando métodos de carga de aproximación
descriptos aquí mismo, o (2) endógeno a la célula vegetal o
20 al tejido a partir del cual se produce el PMP, pero presente
en el PMP (por ejemplo, agregado de PMP utilizando métodos de
carga de aproximación descriptos aquí mismo, ingeniería
genética, in vitro o in vivo) a una concentración que es más
alta que la encontrada en la naturaleza (por ejemplo, mayor a
25 la concentración que se encuentra en forma natural) vesícula
extracelular de planta presente).

 Como se usa en el presente documento, el término
"agente funcional" se refiere a un agente (por ejemplo, un
péptido o ácido nucleico) que está o puede estar asociado con
30 PMP (por ejemplo, cargado en PMP o sobre él (por ejemplo,

encapsulado, incrustado o conjugado) a PMP) usando métodos in vivo o in vitro y es capaz de efectuar el resultado recitado (por ejemplo, modificar una planta) de acuerdo con las presentes composiciones o métodos.

5 Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" y "polinucleótido" son intercambiables y se refieren a ARN o ADN que es lineal o ramificado, monocatenario o bicatenario, o un híbrido del mismo, independientemente de su longitud (por ejemplo, al menos 2,
10 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1000 o más ácidos nucleicos). El término también abarca híbridos de ARN / ADN. Los nucleótidos están típicamente unidos en un ácido nucleico por enlaces fosfodiéster, aunque el término "ácido nucleico" también abarca análogos de ácido
15 nucleico que tienen otros tipos de enlaces o cadenas principales (por ejemplo, Fosforamida, fosforotioato, fosforoditioato, O-metilfosforoamidato, morfolino, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico de glicerol (GNA), ácido nucleico de treosa (TNA) y enlaces o cadenas
20 principales de ácido nucleico peptídico (PNA), entre otros). Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios, bicatenarios o contener porciones de secuencias tanto monocatenarias como bicatenarias. Un ácido nucleico puede contener cualquier combinación de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, así
25 como cualquier combinación de bases, que incluyen, por ejemplo, adenina, timina, citosina, guanina, uracilo y bases modificadas o no canónicas (incluidas, por ejemplo, hipoxantina, xantina, 7-metilguanina, 5,6-dihidrouracilo, 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina).

30 Como se usa en el presente documento, el término

"péptido", "proteína" o "polipéptido" abarca cualquier cadena de aminoácidos naturales o no naturales (aminoácidos D o L), independientemente de su longitud (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 100 o más aminoácidos), la presencia o ausencia de modificaciones postraduccionales (por ejemplo, glucosilación o fosforilación), o la presencia de, por ejemplo, uno o más grupos no aminoacilo (por ejemplo, azúcar, lípidos, etc.) unidos covalentemente al péptido e incluye, por ejemplo, proteínas naturales, polipéptidos y péptidos sintéticos o recombinantes, moléculas híbridas, peptoides o peptidomiméticos.

Como se usa en este documento, el "porcentaje de identidad" entre dos secuencias se determina mediante el algoritmo BLAST 2.0, que se describe en Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica.

Como se usa en el presente documento, el término "planta" se refiere a plantas enteras, órganos vegetales, tejidos vegetales, semillas, células vegetales, semillas y progenie de los mismos. Las células vegetales incluyen, sin limitación, células de semillas, cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen y microsporas. Las partes de las plantas incluyen tejidos diferenciados e indiferenciados que incluyen, entre otros: raíces, tallos, brotes, hojas, polen, semillas, frutos, productos cosechados, tejido tumoral, savia (por ejemplo, Savia de xilema y savia de floema) y varias formas. de

células y cultivo (por ejemplo, células individuales, protoplastos, embriones y tejido calloso). El tejido vegetal puede estar en una planta o en un órgano vegetal, tejido o cultivo celular. Además, una planta puede modificarse genéticamente para producir una proteína o ARN heterólogo, por ejemplo, de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas en los métodos o composiciones descritos en este documento.

Como se usa en el presente documento, el término "vesícula extracelular de planta", "EV de planta", o "EV" se refiere a una estructura de bicapa lipídica cerrada que puede ser liberada de una planta. Opcionalmente, el EV de planta incluye uno o más marcadores EV de planta. Como se usa en el presente, el término "marcador EV de planta" se refiere a un componente que está naturalmente asociado con una planta, como una proteína vegetal, un ácido nucleico vegetal, una molécula pequeña vegetal, un lípido vegetal, o una combinación de los mismos, que incluye, pero no limitado a ninguno de los marcadores EV de la planta enumerados en el Anexo. En algunos casos, el marcador EV de la planta puede usarse como un marcador de identificación del EV de la planta, pero no es un agente plaguicida. En algunos casos, el marcador EV de la planta puede usarse como un marcador de identificación del EV de la planta y también como un agente plaguicida (por ejemplo, asociado con o encapsulado por la pluralidad de los PMP, o no asociado directamente con o encapsulado por la pluralidad de los PMP).

Como se usa en el presente documento, el término "paquete de mensajería de planta" o "PMP" se refiere a una estructura lipídica (por ejemplo, una estructura de bicapa

lipídica, unilamelar, multilamelar; por ejemplo, una estructura lipídica vesicular), que tiene aproximadamente 5-2000 nm (por ejemplo, al menos 5-1000 nm, al menos 5-500 nm, al menos 400-500 nm, al menos 25-250 nm, al menos 50-150 nm, o al menos 70-120 nm) en diámetro que se deriva del (por ejemplo, del enriquecimiento, aislamiento o purificación) origen de la planta, o segmento, porción o extracto de la misma, incluyendo componentes lipídicos o no lipídicos (por ejemplo, péptidos, ácidos nucleicos o moléculas pequeñas) asociadas con la misma y que han sido enriquecidos, aislados o purificados de una planta, una parte de la planta, o una célula vegetal, el enriquecimiento o aislamiento eliminando uno o más contaminantes o componentes indeseados de origen vegetal. Los PMP pueden ser preparaciones altamente purificadas que pueden ser liberadas de los EV. Preferiblemente, al menos 1% de contaminantes o componentes indeseados de origen vegetal son eliminados (por ejemplo, al menos 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99%, o 100%) de uno o más contaminantes o componentes indeseados de origen vegetal, por ejemplo, de componentes de la pared celular de la planta, pectina, orgánulos vegetales (por ejemplo, mitocondrias, plastos como cloroplastos, leucoplastos o amiloplastos, y núcleos), cromatina vegetal (por ejemplo, un cromosoma vegetal), o agregados moleculares de plantas (por ejemplo, agregados de proteínas, agregados de ácidos nucleicos de proteínas, agregados de lipoproteínas o estructuras lípido proteicas). Preferentemente, un PMP es al menos 30% puro (por ejemplo, al menos 40% puro, al menos 50% puro, al menos 60% puro, al menos 70% puro, al menos 80% puro, al menos 90%

puro, al menos 99% puro, o 100% puro) en relación a uno o más contaminantes o componentes indeseados de origen vegetal medidos por peso (w/w), imágenes multiespectrales (% transmitancia), o conductividad (S/m).

5 En algunos casos, el PMP es un lípido extraído de PMP(LPMP). Como se usa en el presente, los términos "lípidos extraídos de PMP" y "LPMP" se refieren al PMP que ha sido derivado de una estructura lipídica (por ejemplo, una bicapa lipídica, estructura unilamelar, multilamelar; por ejemplo, 10 una estructura lipídica vesicular) derivada de (por ejemplo, enriquecido, aislado o purificado) origen vegetal, donde la estructura lipídica es alterada (por ejemplo, alterado por extracción de lípidos) y reensamblado o reconstituido en una fase líquida (por ejemplo, una fase líquida que contiene una 15 carga) usando métodos estándares, por ejemplo, reconstituido por un método que comprende una hidratación de una capa lipídica y/o diluyente inyectable, para producir LPMP, tal como se describe en el presente documento. La forma del método, si se desea, incluir otra sonicación, tratamiento de 20 congelamiento/derretimiento, y/o extrusión de lípidos, por ejemplo, para reducir el tamaño de los PMP reconstituidos. Un PMP (por ejemplo, un LPMP) puede comprender entre 10% y 100% lípidos derivados de la estructura lipídica proveniente de origen vegetal, por ejemplo, puede contener al menos 10%, al 25 menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o 100% de lípidos derivados de estructuras lipídicas de origen vegetal. Un PMP (por ejemplo, un LPMP) puede comprender todos o una fracción de las especies de lípidos 30 presentes en la estructura lipídica de origen vegetal, por

ejemplo, puede contener al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, o 100% de las especies de lípidos presentes en la estructura lipídica de origen vegetal. Un PMP (por ejemplo, un LPMP) puede comprender nada, una fracción, o todas las especies de proteínas presentes en la estructura lipídica de origen vegetal, por ejemplo, puede contener 0%, menos de 1%, menos de 5%, menos de 10%, menos de 15%, menos de 20%, menos de 30%, menos de 40%, menos de 50%, menos de 60%, menos de 70%, menos de 80%, menos de 90%, menos de 100%, o 100% de especies de proteínas presentes en la estructura lipídica de origen vegetal. En algunos casos, la bicapa lipídica del PMP (por ejemplo, LPMP) no contiene proteínas. En algunos casos, la estructura lipídica del PMP (por ejemplo, LPMP) contiene una cantidad reducida de proteínas relacionada con la estructura lipídica de origen vegetal. PMP (por ejemplo, LPMP) puede incluir opcionalmente lípidos exógenos, por ejemplo, lípidos que son (1) exógenos a la planta (por ejemplo, originado de una fuente que no es la planta o parte de la planta de la cual el PMP es producido) (por ejemplo, agregado de PMP usando los métodos descritos aquí mismos) o (2) endógenos a la célula de la planta o tejidos de donde el PMP es producido, pero presente en el PMP (por ejemplo, agregado al PMP usando métodos descritos en el presente, ingeniería genética, métodos in vitro o in vivo) en una concentración que es mayor a la que se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, mayor a la concentración encontrada de manera natural en una vesícula extracelular de planta). La composición lipídica del PMP puede incluir 0%, menos que 1%, o al menos 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%,

60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o más de 95% de lípidos exógenos. Ejemplares de lípidos exógenos incluyen lípidos catiónicos, lípidos ionizables, lípidos zwitteriónicos, y lipidoide.

Los PMP pueden incluir opcionalmente agentes, tal como los agentes funcionales heterólogos, por ejemplo, agentes modificadores de plantas, agentes plaguicidas, agentes fertilizantes, agentes terapéuticos, polinucleótidos, polipéptidos o moléculas pequeñas. Los PMP pueden llevar o asociarse con agentes adicionales (por ejemplo, agentes modificadores de plantas) en una variedad de maneras para permitir la entrega del agente a una planta objetivo, por ejemplo, encapsulando el agente, incorporación del agente en la estructura de la bicapa lipídica o asociación del agente (por ejemplo, por conjugación) con la superficie de la estructura de la bicapa lipídica. Se pueden incorporar agentes funcionales heterólogos, clasificado en los PMP ya sea in vivo (por ejemplo, en planta) o in vitro (por ejemplo, en cultivo de tejidos, en cultivo celular o incorporado sintéticamente).

Como se usa en el presente documento, el término "lípidio catiónico" se refiere a una molécula anfifílico (por ejemplo, un lípidio o un lipidoide) que contiene un grupo catiónico (por ejemplo, una cabeza de grupo catiónico).

Como se usa en el presente documento, el término "lipidoide" se refiere a una molécula que tiene una o más características de un lípidio.

Como se usa en el presente documento, el término "agente modificador de plantas" se refiere a un agente que puede alterar las propiedades genéticas (por ejemplo, aumentar la expresión génica, disminuir la expresión génica o

alterar de otro modo la secuencia de nucleótidos de ADN o ARN) o las propiedades bioquímicas de una planta de alguna manera los resultados en un aumento en la aptitud de la planta.

5 Como se usa en el presente documento, el término "composición PMP estable" se refiere a una composición de PMP que durante un período de tiempo (por ejemplo, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 30 días, al menos 60 días o al menos 90 días) retiene al menos 10 5% (por ejemplo, al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%) del número inicial de PMP (por ejemplo, PMP por mL de solución) en relación con el número de PMP en la composición 15 PMP (por ejemplo, al momento de la producción o formulación) opcionalmente en un rango de temperatura definida (por ejemplo, una temperatura del al menos 24°C (por ejemplo, al menos 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, o 30°C), al menos 20°C (por ejemplo, al menos 20°C, 21°C, 22°C, o 23°C), al 20 menos 4°C (por ejemplo, al menos 5°C, 10°C, o 15°C), al menos -20°C (por ejemplo, al menos -20°C, -15°C, -10°C, -5°C, o 0°C), o -80°C (por ejemplo, al menos -80°C, -70°C, -60°C, -50°C, 40°C, o -30°C)); o conserva al menos 5% (por ejemplo, al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 25 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%) de su actividad (por ejemplo, actividad plaguicida y/o repelente) en relación con la actividad inicial de los PMP (por ejemplo, en el momento de la producción o formulación) opcionalmente en un rango de temperatura definido (por ejemplo, una 30 temperatura de al menos 24°C (por ejemplo, al menos 24°C,

25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C o 30°C), al menos 20°C (por ejemplo, al menos 20°C, 21°C, 22°C o 23°C), al menos 4°C (por ejemplo, al menos 5°C, 10°C o 15°C), al menos -20°C (por ejemplo, al menos -20°C, -15°C, -10°C, -5°C o 0°C), o -80°C (por ejemplo, al menos -80°C, -70°C, -60°C, -50°C, -40°C o -30°C)).

Como se usa en el presente documento, el término "no tratado" se refiere a una planta que no ha sido contactada o entregada con una composición modificadora de plantas, incluida una planta separada que no ha sido entregada con la composición modificadora de plantas, la misma planta sometida a un tratamiento evaluado en un momento antes de la entrega de las composiciones modificadoras de plantas, o la misma planta sometida a tratamiento evaluada en una parte no tratada de la planta.

Como se usa en el presente, el término "saco de jugo" o "jugo vesicular" se refiere a un jugo que contiene componentes de membranas-unidas del endocarpio (carpel) de un hesperidio, por ejemplo, una fruta cítrica. En algunos aspectos, los sacos de jugos son separados de otras porciones de fruta, por ejemplo, la cáscara (exocarpio o flavedo), la cáscara interior (mesocarpio, albedo, o médula), la columna central (placenta), las paredes de los gajos, o las semillas. En algunos aspectos, los sacos de jugos son sacos de jugos de toronja, un limón, una lima, o una naranja.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1AEs un diagrama esquemático que muestra un protocolo para la producción de PMP de toronja usando un paso de jugo destructivo que implica el uso de un mezclador, seguido de ultracentrifugación y purificación en gradiente de

sacarosa. Se incluyen imágenes del jugo de toronja después de la centrifugación a 1000 x g durante 10 minutos y el patrón de banda de gradiente de sacarosa después de la ultracentrifugación a 150,000 x g durante 2 horas.

5 Figura 1B Es un gráfico de la distribución de partículas PMP medida por el Spectradyne NCS1.

Figura 2 Es un diagrama esquemático que muestra un protocolo para la producción de PMP de toronja usando un paso de jugo suave que implica el uso de un filtro de malla,
10 seguido de ultracentrifugación y purificación en gradiente de sacarosa. Se incluyen imágenes del jugo de toronja después de la centrifugación a 1000 x g durante 10 minutos y el patrón de banda de gradiente de sacarosa después de la ultracentrifugación a 150,000 x g durante 2 horas.

15 Figura 3A Es un diagrama esquemático que muestra un protocolo para la producción de PMP de toronja usando ultracentrifugación, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para aislar las fracciones que contienen PMP. Las fracciones SEC eluidas se analizan para determinar
20 la concentración de partículas (NanoFCM), el tamaño medio de partículas (NanoFCM) y la concentración de proteínas (BCA).

Figura 3B Es un gráfico que muestra la concentración de partículas por ml en fracciones de cromatografía de exclusión por tamaño eluido (SEC) (NanoFCM). Las fracciones que
25 contienen la mayoría de los PMP ("fracción PMP") se indican con una flecha. Los PMP se eluyen en las fracciones 2-4.

Figura 3C Es un conjunto de gráficos y una tabla que muestra el tamaño de partícula en nm para fracciones SEC seleccionadas, medido con NanoFCM. Los gráficos muestran la
30 distribución del tamaño de PMP en las fracciones 1, 3, 5 y 8.

Figura 3D Es un gráfico que muestra la concentración de proteína en µg/ml en fracciones SEC, medida con un ensayo BCA. La fracción que contiene la mayoría de los PMP ("fracción PMP") está etiquetada y una flecha indica una fracción que contiene contaminantes.

Figura 4A Es un diagrama esquemático que muestra un protocolo para la producción escalada de PMP a partir de 1 litro de jugo de toronja (~7 toronjas) usando una prensa de jugo, seguido de una centrifugación diferencial para eliminar escombros grandes, concentración de jugo 100 x usando TFF y exclusión de tamaño cromatografía (SEC) para aislar las fracciones que contienen PMP. Las fracciones de elución SEC se analizan para determinar la concentración de partículas (NanoFCM), el tamaño medio de partículas (NanoFCM) y la concentración de proteínas (BCA).

Figura 4B Es un par de gráficos que muestran la concentración de proteínas (ensayo BCA, panel superior) y la concentración de partículas (NanoFCM, panel inferior) del volumen de elución SEC (ml) de un material de partida escalado de 1000 ml de jugo de toronja, que muestra una gran cantidad de contaminantes en los últimos volúmenes de elución SEC.

Figura 4C Es un gráfico que muestra que la incubación de la fracción PMP de toronja cruda con una concentración final de EDTA 50 mM, pH 7.15 seguido de diálisis durante la noche usando una membrana de 300 kDa, eliminó con éxito los contaminantes presentes en las fracciones de elución SEC tardías, como lo muestra la absorbancia a 280 nm. No hubo diferencias en los tampones de diálisis utilizados (PBS sin calcio / magnesio pH 7.4, MES pH 6, Tris pH 8.6).

Figura 4D Es un gráfico que muestra que la incubación de la fracción PMP de toronja cruda con una concentración final de EDTA 50 mM, pH 7.15, seguido de diálisis durante la noche usando una membrana de 300 kDa, eliminó con éxito los contaminantes presentes en las fracciones de elución tardía después de la SEC, como se muestra en El análisis de proteínas BCA, que, además de detectar proteínas, es sensible a la presencia de azúcares y pectinas. No hubo diferencias en los tampones de diálisis utilizados (PBS sin calcio / magnesio pH 7.4, MES pH 6, Tris pH 8.6).

Figura 5A Es un gráfico que muestra la concentración de partículas (partículas/ml) en fracciones SEC de cultivo de células vegetales BMS eluidas, medida por citometría de nano flujo (NanoFCM). Los PMP se eluyeron en las fracciones SEC 4-6.

Figura 5B Es un gráfico que muestra la absorbancia a 280 nm (A.U.) en fracciones BMS SEC eluidas, medida en un espectrofotómetro SpectraMax®. Los PMP se eluyeron en las fracciones 4-6; las fracciones 9-13 contenían contaminantes.

Figura 5C Es un gráfico que muestra la concentración de proteína (µg/ml) en fracciones SEC BMS eluidas, según lo determinado por análisis BCA. Los PMP se eluyeron en las fracciones 4-6; las fracciones 9-13 contenían contaminantes.

Figura 5D Es un diagrama de dispersión que muestra partículas en las fracciones SEC BMS que contienen PMP combinadas, medida por citometría de nano-flujo (NanoFCM). La concentración de PMP (partículas/ml) se determinó utilizando un patrón de perlas de acuerdo con las instrucciones de NanoFCM.

Figura 5E Es un gráfico que muestra la distribución de

tamaños de BMS PMP (nm) para las partículas activadas (fondo sustraído) de La Figura 5D. El tamaño medio de PMP (nm) se determinó utilizando estándares de cuentas Exo de acuerdo con las instrucciones de NanoFCM.

Figura 6A Es un diagrama de dispersión y un gráfico que muestra el tamaño de partícula en PMP de limón marcadas con AF488, medido por citometría de nanoflujo (NanoFCM). El panel superior es un diagrama de dispersión que muestra PMP de limón marcadas con AF488. Las partículas se activaron en la señal de fluorescencia FITC, en relación con las partículas no marcadas y la señal de fondo. La eficacia del etiquetado fue del 89.4% según lo determinado por el número de partículas fluorescentes en relación con el número total de partículas detectadas. La concentración final de AF488-PMP (2.91×10^{12} PMP/ml) se determinó a partir del número de partículas fluorescentes y utilizando un patrón de perlas con una concentración conocida de acuerdo con las instrucciones de NanoFCM. El panel inferior es un gráfico de distribución de tamaño (nm) de PMP de limón marcadas con 488. El tamaño medio de PMP se determinó utilizando los estándares de cuentas Exo de acuerdo con las instrucciones de NanoFCM. El tamaño medio del limón AF488-PMPs fue 79.4 nm $\pm$ 14.7 nm (SD).

Figura 6B Es un conjunto de fotomicrografías que muestran la absorción de PMP de limón (LM) marcadas con Alexa Fluor® 488 (AF488) por las líneas celulares de plantas Glycine max (soja), Tritium aestivum (trigo) y cultivo de células BMS de maíz. Los paneles de Brightfield muestran la posición de las celdas; paneles etiquetados "GFP" muestran fluorescencia de AF488. La absorción de PMP por una célula se

indica por la presencia de la señal AF488 en la célula. El AF488 libre ("tinte libre") se muestra como control.

Figura 7 Es un par de diagramas y un conjunto de fotomicrografías que muestran la absorción de PMP de limón (LM) y pomelo (GF) marcadas con DL800 por plántulas de *Arabidopsis thaliana* y brotes de alfalfa. Se muestra la intensidad de fluorescencia del colorante DL800. La intensidad de la fluorescencia se midió a las 22 hpt (horas después del tratamiento) para las plántulas de *Arabidopsis thaliana* y a las 24 hpt para los brotes de alfalfa. Las plántulas incubadas sin tinte ("control negativo") y con tinte DL800 libre ("solo tinte DL800") se muestran como controles.

Figura 8A Es una descripción experimental del tratamiento de brotes de alfalfa con PMP marcadas con DyLight800nm que se produjeron con o sin tratamiento con pectinasa.

Figura 8B Es un mapa de calor infrarrojo que muestra la absorción de PMP de limón purificadas en brotes de alfalfa, que muestra que el tratamiento con pectinasa durante la producción de PMP de limón, seguido del etiquetado DL800nm de los PMP purificadas, no afecta la absorción o el transporte de PMP. Las imágenes infrarrojas se toman en un escáner Odyssey.

Figura 9A Es un conjunto de fotomicrografías que muestran la fluorescencia del colorante DiR a 750nm en dos semanas de edad de plántulas de *Arabidopsis thaliana* que no fueron tratadas (no tratada) o fueron tratadas con PMP con lípidos reconstituidos (LPMP) de limón (LM) teñidos con DiR (LM-LPMP-DiR). Las imágenes se tomaron en un escáner

fluorescente iBright 1500.

Figura 9B Es un conjunto de fotomicrografías que muestran la fluorescencia del colorante DiR a 750 nm en dos semanas de edad de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* que fueron tratadas con un control DiR o fueron tratadas con una toronja (GF) LPMP teñidos con DiR (GF-LPMP-DiR). Las imágenes se tomaron con un escáner fluorescente iBright 1500.

Figura 10A Es un gráfico de barras que muestran el análisis de la expresión del gen RT-qPCR de FLOWERING WAGENINGEN (FWA) relacionado con ubiquitina (UBI) en plantas *Arabidopsis thaliana* dCas9-SunTag-VP64 tratadas por 48h con LPMP cargados con una cantidad equimolar de FWA-gRNA 4 y 17 (LPMP sgRNA) y LPMP con agregado de colesterol DC cargado con una cantidad equimolar de FWA-gRNA 4 y 17 (DCCol sgRNA). Las plantas tratadas con una cantidad equivalente de la mezcla duplicada de FWA-gRNA 4/17 (sgARN4/17) y LPMP con agregados de colesterol DC cargadas solo con tracrARN (no gARN) (DC-Col tracrARN) son provistas como controles. Los datos son medios presentados son $\pm$ SD. * $p < 0.05$, unidireccional ANOVA con el test Sidak post hoc.

Figura 10B Es una gráfico de barras mostrando un pliegue de inducción de FWA en plantas *Arabidopsis thaliana* dCas9-SunTagVP64 tratadas durante 48h con LPMP cargadas con una cantidad equimolar de FWA-gARN 4 y 17 (LPMP sgARN) y LPMP con agregado de colesterol DC cargado con una cantidad equimolar de FWA-gARN 4 y 17 (DC-Col sgARN) relacionado con una mezcla duplicada de control FWA-gARN 4/17 (sgARN4/17), tal como se midió usando el análisis de la expresión del gen RT-qPCR. Los datos medios presentados son $\pm$ SD. * $p < 0.05$, unidireccional ANOVA con el test post hoc Sidak.

Figura 10C Es un gráfico de barras mostrando un pliegue de inducción de ATISOPENTENYL DIPHOSPHE ISOMERASE 2 (IPP2) en plantas *Arabidopsis thaliana* dCas9-SunTag-VP64 tratadas por 48h con LPMP cargadas con una cantidad equimolar de FWA-gARN 4 y 17 (LPMP sgARN) y LPMP con agregados de colesterol DC cargado con una cantidad equimolar de FWA-gARN 4 y 17 (DC-Col sgARN) relacionado con una mezcla duplicada de control FWA-gARN 4/17 (sgARN4/17), como se midió usando el análisis de la expresión gen RT-qPCR. Los datos medios presentados son $\pm$ SD. * $p < 0.05$, unidireccional ANOVA con test post hoc.

Figura 11 Es un diagrama esquemático mostrando un proceso de trabajo para la preparación de PMP con lípidos reconstituidos (LPMP) del PMP de la toronja y el limón.

Figura 12 Es un gráfico mostrando la frecuencia relativa de las partículas de un tamaño dado (nm) en LPMP; LPMP con agregado de colesterol DC (DC-Col); Y LPMP con agregado DOTAP (DOTAP). Los datos fueron adquiridos por NanoFCM usando los estándares de concentración y tamaño provistos por el productor.

Figura 13A Es un gráfico mostrando la potencia zeta (mV) de LPMP que no comprende los lípidos agregados (LPMP) y LPMP que comprenden el 25% o 40% de DOTAP o colesterol DC como se midió usando dispersión dinámica de luz (DLS). Los datos medios presentados son $\pm$ SD.

Figura 13B Es un gráfico de barras mostrando el porcentaje de Flúor Alexa 555-etiquetado siARN entrada que fue recuperado de los LPMP después de la carga de LPMP de lípidos de toronja que no comprenden lípidos agregados (LPMP) y lípidos de toronja LPMP que comprenden el 20% DOTAP.

Figura 13C Es un gráfico de barras mostrando el

porcentaje de etiqueta ATTO TracrARN entrada que fue recuperado de los LPMP después de la carga de LPMP de lípidos de limón que no comprenden lípidos agregados (LPMP) y los lípidos de limón LPMP que comprenden el 40% de colesterol DC (DC-Col).

Figura 13D Es un gráfico de barras mostrando concentración TracrARN ($\mu\text{g/mL}$) en los LPMP que comprende el 40% de colesterol DC que no ha sido tratado o que han sido desintegrados usando Triton-X100 y heparina (+TX +heparina), como se midió usando el análisis Quant-iT™ RiboGreen®.

Figura 14A Es un micrografo de crio electrones mostrando los LPMP reconstituido de los lípidos de limón extraídos. Barra de escala: 500 nm.

Figura 14B Es un gráfico mostrando la frecuencia relativa de partículas de un diámetro esférico equivalente (nm) en los LPMP reconstituido de los lípidos de limón extraídos, como se midió usando un microscopio de crio electrones.

Figura 15 Es un conjunto de fotomicrografías mostrando la fase de contraste (columna izquierda), fluorescencia ATTO 550 (columna central), y vistas fusionadas de células de maíz Black Mexican Sweet (BMS) tratadas con LPMP que no comprenden lípidos agregados (fila central) y los LPMP que comprenden el 40% de colesterol DC (DC-Col). Las células que fueron tratadas solo con H₂O son provistas como control negativo (paneles superiores). Absorción de los LPMP o LPMP modificados con colesterol DC por una célula como es indicado por la presencia de TracrARN señal ATTO 550 en la célula. Barra de escala: 100 μm .

Aquí se presentan composiciones y métodos relacionados para modificar plantas (por ejemplo, aumentar el estado físico de la planta) usando composiciones modificadoras de plantas que incluyen paquetes de mensajeros de plantas (PMP), conjuntos de lípidos producidos total o parcialmente a partir de vesículas extracelulares (EV) de plantas, o segmentos, porciones o extractos de los mismos. Los PMP proporcionadas en el presente documento incluyen agentes modificadores de plantas. También se incluyen formulaciones modificadoras de plantas en donde los PMP se proporcionan en forma sustancialmente pura o formas concentradas. Las composiciones y formulaciones modificadoras de plantas descritas en el presente documento pueden administrarse directamente a una planta para modificar plantas de manera de introducir rasgos vegetales deseables en una planta (por ejemplo, para aumentar la aptitud de la planta), tal como una planta agrícola u hortícola.

I. Composiciones Modificadoras De Plantas

Las composiciones modificadoras de plantas descritas en el presente documento incluyen una pluralidad de paquetes de mensajeros de plantas (PMP). Una PMP es una estructura lipídica (por ejemplo, Bicapa lipídica, estructura unilamelar o multilamelar) que incluye un EV de planta, o segmento, porción o extracto (por ejemplo, Extracto lipídico) del mismo. Los EV de planta se refieren a una estructura de bicapa lipídica cerrada que se encuentra de forma natural en una planta y que tiene un diámetro de aproximadamente 5-1000 nm. Las plantas EV pueden originarse a partir de una variedad de vías de biogénesis de plantas. En la naturaleza, los EV vegetales se pueden encontrar en los compartimentos

intracelulares y extracelulares de las plantas, como el apoplasto de la planta, el compartimento ubicado fuera de la membrana plasmática y formado por un continuo de paredes celulares y el espacio extracelular. Alternativamente, los PMP pueden enriquecerse de EV vegetales encontrados en medios de cultivo celular tras la secreción de las células vegetales. Los EV de planta se pueden separar de las plantas (por ejemplo, de los fluidos apoplásicos) así produciendo PMP, mediante una variedad de métodos, descritos más adelante en este documento. Los PMP en el presente documento incluyen además un agente modificador de plantas heterólogo, que puede introducirse usando una variedad de métodos in vivo o in vitro, tales como los descritos adicionalmente en el presente documento.

Los PMP pueden incluir EV de plantas, o segmentos, porciones o extractos de los mismos. Opcionalmente, los PMP también pueden incluir lípidos exógenos además de los lípidos derivados de los EV vegetales. En algunas realizaciones, los EV de la planta tienen un diámetro de aproximadamente 5-2000 nm. Por ejemplo, el PMP puede incluir un EV de planta, o segmento, porción o extracto del mismo, que tiene un diámetro medio de aproximadamente 5-50 nm, aproximadamente 50-100 nm, aproximadamente 100-150 nm, aproximadamente 150-200 nm, aproximadamente 200-250 nm, aproximadamente 250-300 nm, aproximadamente 300-350 nm, aproximadamente 350-400 nm, aproximadamente 400-450 nm, aproximadamente 450-500 nm, aproximadamente 500-550 nm, aproximadamente 550-600 nm, aproximadamente 600-650 nm, aproximadamente 650-700 nm, aproximadamente 700-750 nm, aproximadamente 750-800 nm, aproximadamente 800-850 nm, aproximadamente 850-900 nm,

aproximadamente 900-950 nm, aproximadamente 950-1000 nm, aproximadamente 1000-1250 nm, aproximadamente 1250-1500 nm, aproximadamente 1500-1750 nm, o aproximadamente 1750-2000 nm.

En algunos casos, el PMP incluye un EV de planta, o segmento, porción o extracto del mismo, que tiene un diámetro medio de

aproximadamente 5-950 nm, aproximadamente 5-900 nm,

aproximadamente 5-850 nm, aproximadamente 5-800 nm,

aproximadamente 5-750 nm, aproximadamente 5-700 nm,

aproximadamente 5-650 nm, aproximadamente 5-600 nm,

aproximadamente 5-550 nm, aproximadamente 5-500 nm,

aproximadamente 5-450 nm, aproximadamente 5-400 nm,

aproximadamente 5-350 nm, aproximadamente 5-300 nm,

aproximadamente 5-250 nm, aproximadamente 5-200 nm,

aproximadamente 5-150 nm, aproximadamente 5-100 nm,

aproximadamente 5-50 nm o aproximadamente 5-25 nm. En ciertos casos, el EV de la planta, o segmento, porción o extracto del mismo, tiene un diámetro medio de aproximadamente 50-200 nm.

En ciertos casos, el EV de la planta, o segmento, porción o extracto del mismo, tiene un diámetro medio de

aproximadamente 50-300 nm. En ciertos casos, el EV de la planta, o segmento, porción o extracto del mismo, tiene un

diámetro medio de aproximadamente 200-500 nm. En ciertos casos, el EV de la planta, o segmento, porción o extracto del mismo, tiene un diámetro medio de aproximadamente 30-150 nm.

En algunos casos, el PMP puede incluir un EV de planta, o segmento, porción o extracto del mismo, que tiene un diámetro medio de al menos 5 nm, al menos 50 nm, al menos 100 nm, al menos 150 nm, al menos 200 nm, al menos 250 nm, al menos 300 nm, al menos 350 nm, al menos 400 nm, al menos 450 nm, al menos 500 nm, al menos 550 nm, al menos 600 nm, al

menos 650 nm, al menos 700 nm, al menos 750 nm, al menos 800 nm, al menos 850 nm, al menos 900 nm, al menos 950 nm o al menos 1000 nm. En algunos casos, el PMP incluye un EV de planta, o segmento, porción o extracto del mismo, que tiene un diámetro medio inferior a 1000 nm, inferior a 950 nm, inferior a 900 nm, inferior a 850 nm, inferior a 800 nm, menos de 750 nm, menos de 700 nm, menos de 650 nm, menos de 600 nm, menos de 550 nm, menos de 500 nm, menos de 450 nm, menos de 400 nm, menos de 350 nm, menos de 300 nm, menos de 250 nm, menos de 200 nm, menos de 150 nm, menos de 100 nm o menos de 50 nm. Se puede usar una variedad de métodos (por ejemplo, un método de dispersión dinámica de la luz) estándar en la técnica para medir el diámetro de partícula del EV de la planta, o segmento, porción o extracto de los mismos.

En algunos casos, el PMP puede incluir un EV de planta, o segmento, porción o extracto del mismo, que tiene un área de superficie media de 77 nm^2 a $3.2 \times 10^6 \text{ nm}^2$ (por ejemplo, $77\text{--}100 \text{ nm}^2$, $100\text{--}1000 \text{ nm}^2$, $1000\text{--}1 \times 10^4 \text{ nm}^2$, $1 \times 10^4\text{--}1 \times 10^5 \text{ nm}^2$, $1 \times 10^5\text{--}1 \times 10^6 \text{ nm}^2$, or $1 \times 10^6\text{--}3.2 \times 10^6 \text{ nm}^2$). En algunos casos, el PMP puede incluir un EV de planta, o segmento, porción o extracto del mismo, que tiene un volumen medio de 65 nm^3 to $5.3 \times 10^8 \text{ nm}^3$ (por ejemplo, $65\text{--}100 \text{ nm}^3$, $100\text{--}1000 \text{ nm}^3$, $1000\text{--}1 \times 10^4 \text{ nm}^3$, $1 \times 10^4\text{--}1 \times 10^5 \text{ nm}^3$, $1 \times 10^5\text{--}1 \times 10^6 \text{ nm}^3$, $1 \times 10^6\text{--}1 \times 10^7 \text{ nm}^3$, $1 \times 10^7\text{--}1 \times 10^8 \text{ nm}^3$, $1 \times 10^8\text{--}5.3 \times 10^8 \text{ nm}^3$). En algunos casos, el PMP puede incluir un EV de planta, o segmento, porción o extracto del mismo, que tiene una superficie media de al menos 77 nm^2 , (por ejemplo, al menos 77 nm^2 , al menos 100 nm^2 , al menos 1000 nm^2 , al menos $1 \times 10^4 \text{ nm}^2$, al menos $1 \times 10^5 \text{ nm}^2$, al menos $1 \times 10^6 \text{ nm}^2$, o al menos $2 \times 10^6 \text{ nm}^2$). En algunos casos, el PMP puede incluir un EV de planta, o segmento, porción o extracto del mismo, que tiene

un volumen medio de al menos 65 nm³ (por ejemplo, al menos 65 nm³, al menos 100 nm³, al menos 1000 nm³, al menos 1x10⁴ nm³, al menos 1x10⁵ nm³, al menos 1x10⁶ nm³, al menos 1x10⁷ nm³, al menos 1x10⁸ nm³, al menos 2x10⁸ nm³, al menos 3x10⁸ nm³, al menos 4x10⁸ nm³, o al menos 5x10⁸ nm³.

En algunos casos, el PMP puede tener el mismo tamaño que el EV o segmento, extracto o porción de la planta. Alternativamente, el PMP puede tener un tamaño diferente al EV de la planta inicial del que se produce el PMP. Por ejemplo, el PMP puede tener un diámetro de aproximadamente 5-2000 nm de diámetro. Por ejemplo, el PMP puede tener un diámetro medio de aproximadamente 5-50 nm, aproximadamente 50-100 nm, aproximadamente 100-150 nm, aproximadamente 150-200 nm, aproximadamente 200-250 nm, aproximadamente 250-300 nm, aproximadamente 300-350 nm, aproximadamente 350-400 nm, aproximadamente 400-450 nm, aproximadamente 450-500 nm, aproximadamente 500-550 nm, aproximadamente 550-600 nm, aproximadamente 600-650 nm, aproximadamente 650-700 nm, aproximadamente 700-750 nm, aproximadamente 750-800 nm, aproximadamente 800-850 nm, aproximadamente 850-900 nm, aproximadamente 900-950 nm, aproximadamente 950-1000 nm, aproximadamente 1000-1200 nm, aproximadamente 1200-1400 nm, aproximadamente 1400-1600 nm, aproximadamente 1600 - 1800 nm, o aproximadamente 1800 - 2000 nm. En algunos casos, el PMP puede tener un diámetro medio de al menos 5 nm, al menos 50 nm, al menos 100 nm, al menos 150 nm, al menos 200 nm, al menos 250 nm, al menos 300 nm, al menos 350 nm, al menos 400 nm, al menos 450 nm, al menos 500 nm, al menos 550 nm, al menos 600 nm, al menos 650 nm, al menos 700 nm, al menos 750 nm, al menos 800 nm, al menos 850 nm, al menos 900 nm, al

menos 950 nm, al menos 1000 nm, al menos 1200 nm, al menos 1400 nm, al menos 1600 nm, al menos 1800 nm o aproximadamente 2000 nm. Se puede usar una variedad de métodos (por ejemplo, un método dinámico de dispersión de luz) estándar en la técnica para medir el diámetro de partícula de los PMP. En algunos casos, el tamaño de la PMP se determina después de la carga de agentes modificadores de plantas heterólogos, o después de otras modificaciones a la PMP.

En algunos casos, el PMP puede tener una superficie media de 77 nm^2 a $1.3 \times 10^7 \text{ nm}^2$ (por ejemplo, $77\text{-}100 \text{ nm}^2$, $100\text{-}1000 \text{ nm}^2$, $1000\text{-}1 \times 10^4 \text{ nm}^2$, $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5 \text{ nm}^2$, $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6 \text{ nm}^2$, or $1 \times 10^6\text{-}1.3 \times 10^7 \text{ nm}^2$). En algunos casos, el PMP puede tener un volumen medio de 65 nm^3 a $4.2 \times 10^9 \text{ nm}^3$ (por ejemplo, $65\text{-}100 \text{ nm}^3$, $100 - 1000 \text{ nm}^3$, $1000\text{-}1 \times 10^4 \text{ nm}^3$, $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5 \text{ nm}^3$, $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6 \text{ nm}^3$, $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7 \text{ nm}^3$, $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8 \text{ nm}^3$, $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9 \text{ nm}^3$, or $1 \times 10^9 - 4.2 \times 10^9 \text{ nm}^3$). En algunos casos, el PMP tiene una superficie media de al menos 77 nm^2 , (por ejemplo, al menos 77 nm^2 , al menos 100 nm^2 , al menos 1000 nm^2 , al menos $1 \times 10^4 \text{ nm}^2$, al menos $1 \times 10^5 \text{ nm}^2$, al menos $1 \times 10^6 \text{ nm}^2$, or al menos $1 \times 10^7 \text{ nm}^2$). En algunos casos, el PMP tiene un volumen medio de al menos 65 nm^3 (por ejemplo, al menos 65 nm^3 , al menos 100 nm^3 , al menos 1000 nm^3 , al menos $1 \times 10^4 \text{ nm}^3$, al menos $1 \times 10^5 \text{ nm}^3$, al menos $1 \times 10^6 \text{ nm}^3$, al menos $1 \times 10^7 \text{ nm}^3$, al menos $1 \times 10^8 \text{ nm}^3$, al menos $1 \times 10^9 \text{ nm}^3$, al menos $2 \times 10^9 \text{ nm}^3$, al menos $3 \times 10^9 \text{ nm}^3$, o al menos $4 \times 10^9 \text{ nm}^3$).

En algunos casos, el PMP puede incluir una planta intacta EV. Alternativamente, el PMP puede incluir un segmento, porción o extracto del área de superficie completa de la vesícula (por ejemplo, un segmento, porción o extracto que incluye menos del 100% (por ejemplo, menos del 90%, menos

del 80%, menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 10%, menos del 10%, menos del 5% o menos del 1%) de la superficie total de la vesícula) de una planta EV. El segmento, porción o extracto puede tener cualquier forma, como un segmento circunferencial, segmento esférico (por ejemplo, hemisferio), segmento curvilíneo, segmento lineal o segmento plano. En los casos en que el segmento es un segmento esférico de la vesícula, el segmento esférico puede representar uno que surge de la división de una vesícula esférica a lo largo de un par de líneas paralelas, o uno que surge de la división de una vesícula esférica a lo largo de un par de líneas no paralelas. En consecuencia, la pluralidad de PMP puede incluir una pluralidad de EV de plantas intactos, una pluralidad de segmentos, porciones o extractos de EV de plantas, o una mezcla de segmentos de EV de plantas intactos y segmentos. Un experto en la materia apreciará que la proporción de EV de plantas intactas y segmentadas dependerá del método de aislamiento particular utilizado. Por ejemplo, moler o mezclar una planta, o parte de ella, puede producir PMP que contienen un mayor porcentaje de segmentos, porciones o extractos EV de plantas que un método de extracción no destructivo, como la infiltración al vacío.

En los casos en que el PMP incluye un segmento, porción o extracto de un EV de planta, el segmento, porción o extracto de EV puede tener un área de superficie media menor que la de una vesícula intacta, por ejemplo, un área de superficie promedio menor que 77 nm^2 , 100 nm^2 , 1000 nm^2 , $1 \times 10^4 \text{ nm}^2$, $1 \times 10^5 \text{ nm}^2$, $1 \times 10^6 \text{ nm}^2$, o $3.2 \times 10^6 \text{ nm}^2$). En algunos casos, el segmento, la porción o el extracto EV tiene un área de

superficie inferior a 70 nm², 60 nm², 50 nm², 40 nm², 30 nm², 20 nm², o 10 nm²). En algunos casos, el PMP puede incluir un EV de planta, o segmento, porción o extracto del mismo, que tiene un volumen medio menor que el de una vesícula intacta, por ejemplo, un volumen medio menor que 65 nm³, 100 nm³, 1000 nm³, 1x10⁴ nm³, 1x10⁵ nm³, 1x10⁶ nm³, 1x10⁷ nm³, 1x10⁸ nm³, o 5.3x10⁸ nm³).

En los casos en que el PMP incluye un extracto de un EV vegetal, por ejemplo, en los casos en que el PMP incluye lípidos extraídos (por ejemplo, con cloroformo) de un EV vegetal, el PMP puede incluir al menos 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más del 99%, de lípidos extraídos (por ejemplo, con cloroformo) de una planta EV. Los PMP en la pluralidad pueden incluir segmentos EV vegetales y/o lípidos extraídos EV vegetales o una mezcla de los mismos.

Aquí se detallan más detalles sobre los métodos para producir PMP, marcadores EV de plantas que pueden asociarse con PMP y formulaciones para composiciones que incluyen PMP.

A. Métodos De Producción

Los PMP pueden producirse desde los EV de plantas, o un segmento, porción o extracto (por ejemplo, extracto de lípidos) de los mismos, que se encuentran naturalmente en plantas, o partes de los mismos, incluidos tejidos vegetales o células vegetales. Un método ejemplar para producir PMP incluye (a) proporcionar una muestra inicial de una planta, o una parte de la misma; donde la planta o parte de ella comprende los EV; y (b) aislar una fracción en bruto de PMP de la muestra inicial tiene un nivel disminuido de al menos un contaminante o componente indeseado de la planta o parte

de la misma en relación con el nivel en la muestra inicial. El método puede incluir además una etapa adicional (c) que comprende la purificación de la fracción PMP bruta, produciendo así una pluralidad de PMP pura, donde la pluralidad de PMP puro tiene un nivel disminuido de al menos un contaminante o componente indeseado de la planta o parte de la misma en relación con el nivel de la fracción EV bruta. Cada paso de producción se analiza con más detalle a continuación. Métodos ejemplares con respecto al aislamiento y purificación de los PMP se encuentran, por ejemplo, en Rutter e Innes, *Plant Physiol.* 173 (1): 728-741, 2017; Rutter y col., *Bio. Protocol.* 7 (17): e2533, 2017; Regente et al, *J de Exp. Biol.* 68 (20): 5485-5496, 2017; Mu y col., *Mol. Nutr. Food Res.*, 58, 1561-1573, 2014, y Regente et al, *FEBS Letters.* 583: 3363-3366, 2009, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia.

En algunos casos, se puede aislar una pluralidad de PMP a partir de una planta mediante un proceso que incluye los pasos de: (a) proporcionar una muestra inicial de una planta, o una parte de la misma; donde la planta o parte de ella comprende EV; (b) aislar una fracción PMP bruta de la muestra inicial, en donde la fracción PMP bruta tiene un nivel disminuido de al menos un contaminante o componente indeseado de la planta o parte de ella en relación con el nivel en la muestra inicial (por ejemplo, un nivel que disminuye en al menos 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99% o 100%); y (c) purificar la fracción PMP bruta, produciendo así una pluralidad de PMP puro, en donde la pluralidad de PMP puro tiene un nivel disminuido de al menos un contaminante o

componente indeseado de la planta o parte de ella en relación con el nivel de la fracción EV bruta (por ejemplo, un nivel que disminuye en al menos 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99% o 100%).

Los PMP proporcionadas en este documento pueden incluir un EV de planta, o un segmento, porción o extracto del mismo, producido a partir de una variedad de plantas. Los PMP pueden producirse a partir de cualquier género de plantas (vasculares o no vasculares), incluidas, entre otras, angiospermas (plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas), gimnospermas, helechos, selaginellas, colas de caballo, psilofitas, licofitos, algas (por ejemplo, Unicelulares o multicelulares, por ejemplo, archaeplastida), o briófitas. En ciertos casos, los PMP se pueden producir usando una planta vascular, por ejemplo, monocotiledóneas o dicotiledóneas o gimnospermas. Por ejemplo, los PMP se pueden producir usando alfalfa, manzana, Arabidopsis, plátano, cebada, canola, ricino, achicoria, crisantemo, trébol, cacao, café, algodón, semillas de algodón, maíz, crambe, arándano, pepino, dendrobium, dioscorea, eucalipto, festuca, lino, gladiolo, liliacea, linaza, mijo, melón, mostaza, avena, palma aceitera, colza, papaya, maní, piña, plantas ornamentales, Phaseolus, papa, colza, arroz, centeno, centeno, cártamo, sésamo, sorgo, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, fresa, tabaco, tomate, césped, trigo o cultivos vegetales como lechuga, apio, brócoli, coliflor, cucurbitáceas; árboles frutales y de nueces, como manzana, pera, durazno, naranja, pomelo, limón, lima, almendra, nuez, nuez, avellana; vides, como Toronja, kiwi, lúpulo; arbustos y

zarzas de frutas, como frambuesa, mora, grosella espinosa; árboles forestales, como fresnos, pinos, abetos, arces, robles, castaños, populares; con alfalfa, canola, ricino, maíz, algodón, crambe, lino, linaza, mostaza, palma aceitera, colza, maní, papa, arroz, cártamo, sésamo, soja, remolacha azucarera, girasol, tabaco, tomate o trigo.

Los PMP se pueden producir usando una planta completa (por ejemplo, rosetas o plántulas enteras) o alternativamente de una o más partes de la planta (por ejemplo, hoja, semilla, raíz, fruta, verdura, polen, savia de floema o savia de xilema). Por ejemplo, los PMP se pueden producir usando brotes de órganos / estructuras vegetativas (por ejemplo, hojas, tallos o tubérculos), raíces, flores y órganos / estructuras florales (por ejemplo, polen, brácteas, sépalos, pétalos, estambres, carpelos, anteras u óvulos), semillas (incluido embrión, endospermo o cubierta de semillas), fruta (el ovario maduro), savia (por ejemplo, floema o savia del xilema), tejido vegetal (por ejemplo, tejido vascular, tejido molido, tejido tumoral o similares) y células (por ejemplo, células individuales, protoplastos, embriones, tejido calloso, células protectoras, óvulos o similares) o progenie de la misma. Por ejemplo, la etapa de aislamiento puede implicar (a) proporcionar una planta, o una parte de la misma, en donde la parte de la planta es una hoja de Arabidopsis. La planta puede estar en cualquier etapa de desarrollo. Por ejemplo, el PMP se puede producir usando plántulas, por ejemplo, plántulas de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas u 8 semanas (por ejemplo, plántulas de Arabidopsis). Otros PMP ejemplares pueden incluir PMP producidos usando raíces (por

ejemplo, raíces de jengibre), jugo de frutas (por ejemplo, jugo de toronja), vegetales (por ejemplo, brócoli), polen (por ejemplo, polen de oliva), savia de floema (por ejemplo, savia de floema de Arabidopsis), o savia de xilema (por ejemplo, savia de xilema de plantas de tomate).

Los PMP se pueden producir usando una planta, o parte de ella, por una variedad de métodos. Cualquier método que permita la liberación de la fracción apoplástica de una planta que contiene EV, o una fracción extracelular que contenga PMP que comprenden EV secretados (por ejemplo, medios de cultivo celular) es adecuado en los presentes métodos. Los EV se pueden separar de las plantas o parte de ellas mediante métodos destructivos (por ejemplo, Molienda o mezcla de una planta o cualquier parte de la planta) o no destructivos (lavado o infiltración al vacío de una planta o cualquier parte de la planta). Por ejemplo, la planta, o parte de ella, se puede infiltrar al vacío, moler, mezclar o una combinación de las mismas para aislar EV de la planta o parte de la planta, así produciendo PMP. Por ejemplo, la etapa de aislamiento puede implicar (b) aislar una fracción PMP bruta de la muestra inicial (por ejemplo, una planta o parte de la misma, o una muestra derivada de una planta o parte de la misma) la fracción PMP bruta tiene un nivel disminuido de al menos un contaminante o un componente indeseado de la planta o parte de la misma, en donde la etapa de aislamiento implica infiltrar al vacío la planta (por ejemplo, con un tampón de aislamiento de vesículas) para liberar y recoger la fracción apoplástica. Alternativamente, la etapa de aislamiento puede implicar moler o mezclar la planta para liberar los EV, así produciendo PMP.

Al aislar los EV de la planta, así produciendo PMP, los PMP se pueden separar o recoger en una fracción de PMP de la planta en bruto (por ejemplo, una fracción apoplástica). Por ejemplo, la etapa de separación puede implicar separar la pluralidad de PMP en una fracción PMP cruda usando centrifugación (por ejemplo, centrifugación diferencial o ultracentrifugación) y/o filtración para separar la fracción que contiene PMP de contaminantes grandes, incluyendo restos de tejido vegetal, células vegetales u orgánulos de células vegetales (por ejemplo, núcleos o cloroplasto). Como tal, la fracción PMP en crudo tendrá un número reducido de contaminantes grandes, incluidos los restos de tejido vegetal o las células vegetales, en comparación con la muestra inicial de origen vegetal o parte de la planta. Dependiendo del método utilizado, la fracción PMP en bruto puede comprender adicionalmente un nivel disminuido de orgánulos de células de la planta (por ejemplo, núcleos, mitocondrias o cloroplastos), en comparación con la muestra inicial de origen vegetal o parte de la planta.

En algunos casos, la etapa de aislamiento puede implicar separar la pluralidad de PMP en una fracción PMP en crudo usando centrifugación (por ejemplo, centrifugación diferencial o ultracentrifugación) y/o filtración para separar la fracción que contiene EV de las células vegetales o restos celulares. En tales casos, la fracción PMP en crudo tendrá un número reducido de células vegetales o desechos celulares, en comparación con la muestra inicial de origen vegetal o parte de la planta.

La fracción PMP en bruto puede purificarse adicionalmente mediante métodos de purificación adicionales

para producir una pluralidad de PMP pura. Por ejemplo, la fracción PMP bruta se puede separar de otros componentes de la planta mediante ultracentrifugación, por ejemplo, usando un gradiente de densidad (yodixanol o sacarosa) y/o el uso de otros enfoques para eliminar componentes agregados (por ejemplo, precipitación o cromatografía de exclusión por tamaño). Los PMP puros resultantes pueden tener un nivel disminuido de contaminantes o componentes indeseados de origen vegetal (por ejemplo, uno o más componentes que no son PMP, como agregados de proteínas, agregados de ácido nucleico, agregados de ácido nucleico de proteínas, lipoproteínas libres, estructuras lipidoproteicas), núcleos, componentes de la pared celular, orgánulos celulares o una combinación de los mismos) en relación con una o más fracciones generadas durante las etapas de separación anteriores, o en relación con un nivel umbral preestablecido, por ejemplo, una especificación de liberación comercial. Por ejemplo, los PMP puros pueden tener un nivel disminuido (por ejemplo, aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, o más del 100%; o aproximadamente 2 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces o más de 100 veces) de orgánulos vegetales o pared celular componentes relativos al nivel en la muestra inicial. En algunos casos, los PMP puros están sustancialmente libres (por ejemplo, tiene niveles indetectables) de uno o más componentes que no son PMP, como agregados de proteínas, agregados de ácido nucleico, agregados de proteína-ácido nucleico, lipoproteínas libres, estructuras lipidoproteicas), núcleos, componentes de la pared celular, orgánulos celulares, o una combinación de los

mismos. Se pueden encontrar ejemplos adicionales de los pasos de liberación y separación en el Ejemplo 1. Los PMP pueden estar a una concentración de, por ejemplo, 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , o más que 1×10^{13} PMP/mL.

Por ejemplo, los agregados de proteínas pueden eliminarse de los PMP. Por ejemplo, los PMP se pueden tomar a través de un rango de pH (por ejemplo, medido con una sonda de pH) para precipitar los agregados de proteínas en la solución. El pH se puede ajustar a, por ejemplo, pH 3, pH 5, pH 7, pH 9 o pH 11 con la adición de, por ejemplo, hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. Una vez que la solución está al pH especificado, se puede filtrar para eliminar las partículas. Alternativamente, los PMP pueden flocularse mediante la adición de polímeros cargados, como Polymin-P o Praestol 2640. Brevemente, Polymin-P o Praestol 2640 se agrega a la solución y se mezcla con un impulsor. La solución se puede filtrar para eliminar las partículas. Alternativamente, los agregados pueden solubilizarse aumentando la concentración de sal. Por ejemplo, se puede agregar NaCl a los PMP hasta que esté en, por ejemplo, 1 mol/L. La solución se puede filtrar para aislar los PMP. Alternativamente, los agregados se solubilizan aumentando la temperatura. Por ejemplo, los PMP se pueden calentar bajo mezcla hasta que la solución haya alcanzado una temperatura uniforme de, por ejemplo, 50°C durante 5 minutos. La mezcla de PMP se puede filtrar para aislar los PMP. Alternativamente, los contaminantes solubles de las

soluciones de PMP se pueden separar mediante una columna de cromatografía de exclusión por tamaño de acuerdo con los procedimientos estándar, donde los PMP se eluyen en las primeras fracciones, mientras que las proteínas y las ribonucleoproteínas y algunas lipoproteínas se eluyen más tarde. La eficiencia de la eliminación de agregados de proteínas se puede determinar midiendo y comparando la concentración de proteínas antes y después de la eliminación de los agregados de proteínas mediante la cuantificación de proteínas BCA / Bradford.

Cualquiera de los métodos de producción descritos en este documento puede complementarse con cualquier método cuantitativo o cualitativo conocido en la técnica para caracterizar o identificar los PMP en cualquier etapa del proceso de producción. Los PMP pueden caracterizarse por una variedad de métodos de análisis para estimar el rendimiento de PMP, la concentración de PMP, la pureza de PMP, la composición de PMP o los tamaños de PMP. Los PMP se pueden evaluar mediante varios métodos conocidos en la técnica que permiten la visualización, cuantificación o caracterización cualitativa (por ejemplo, identificación de la composición) de los PMP, como microscopía (por ejemplo, microscopía electrónica de transmisión), dispersión dinámica de luz, nanopartículas seguimiento, espectroscopia (por ejemplo, análisis infrarrojo de transformada de Fourier) o espectrometría de masas (análisis de proteínas y lípidos). En ciertos casos, los métodos (por ejemplo, Espectroscopia de masas) pueden usarse para identificar marcadores EV de plantas presentes en el PMP, como los marcadores descritos en el Anexo. Para ayudar en el análisis y la caracterización, de

la fracción PMP, los PMP pueden marcarse o teñirse adicionalmente. Por ejemplo, los PMP pueden teñirse con yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DIOC6), un colorante lipofílico fluorescente, PKH67 (Sigma Aldrich); Alexa Fluor® 488 (Thermo Fisher Scientific), o DyLight™ 800 (Thermo Fisher). En ausencia de formas sofisticadas de seguimiento de nanopartículas, este enfoque relativamente simple cuantifica el contenido total de la membrana y puede utilizarse para medir indirectamente la concentración de PMP (Rutter e Innes, Plant Physiol. 173 (1): 728-741, 2017; Rutter et al, Bio. Protocol.7 (17): e2533, 2017). Para mediciones más precisas y para evaluar las distribuciones de tamaño de los PMP, se puede utilizar el seguimiento de nanopartículas.

Durante el proceso de producción, los PMP pueden prepararse opcionalmente de modo que los PMP están en una concentración aumentada (por ejemplo, aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más de 100%; o aproximadamente 2 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces o más de 100 veces) en relación con el nivel de EV en una muestra de control o inicial. Los PMP pueden constituir aproximadamente del 0.1% a aproximadamente el 100% de la composición modificadora de plantas, como cualquiera de aproximadamente el 0.01% a aproximadamente el 100%, aproximadamente el 1% a aproximadamente el 99,9%, aproximadamente el 0.1% a aproximadamente el 10%, aproximadamente 1% a aproximadamente 25%, aproximadamente 10% a aproximadamente 50%, o aproximadamente 50% a aproximadamente 99%. En algunos casos, la composición incluye al menos cualquiera de 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%,

40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de PMP, por ejemplo, medido por peso/vol, porcentaje de composición de proteína PMP y/o porcentaje de composición lipídica (por ejemplo, midiendo lípidos marcados con fluorescencia); ver, por ejemplo, el Ejemplo 3). En algunos casos, los agentes concentrados se usan como productos comerciales concentrados, por ejemplo, el usuario final puede diluir el producto comercial, que tiene una concentración sustancialmente más baja de ingrediente activo. En algunas realizaciones, la composición se formula como una formulación concentrada modificadora de plantas, por ejemplo, una formulación concentrada de volumen ultra bajo.

Como se ilustra en el Ejemplo 1, los PMP se pueden producir usando una variedad de plantas, o partes de las mismas (por ejemplo, el apoplasto de la hoja, el apoplasto de la semilla, la raíz, la fruta, la verdura, el polen, el floema o la savia de xilema). Por ejemplo, los PMP pueden aislarse de la fracción apoplástica de una planta, como el apoplasto de una hoja (por ejemplo, hoja de *Arabidopsis thaliana* de apoplasto) o el apoplasto de semillas (por ejemplo, Apoplasto de semillas de girasol). Otros PMP ejemplares se producen usando raíces (por ejemplo, raíces de jengibre), jugo de fruta (por ejemplo, jugo de toronja), vegetales (por ejemplo, brócoli), polen (por ejemplo, polen de aceituna), savia de floema (por ejemplo, savia de floema de *Arabidopsis*), savia de xilema (por ejemplo, savia de xilema de la planta de tomate) o sobrenadante de cultivo celular (por ejemplo, sobrenadante de cultivo de células de tabaco BY2). Este ejemplo demuestra aún más la producción de PMP a partir de estas diversas fuentes de plantas.

Como se ilustra en el Ejemplo 2, los PMP pueden purificarse mediante una variedad de métodos, por ejemplo, usando un gradiente de densidad (yodixanol o sacarosa) junto con ultracentrifugación y/o métodos para eliminar contaminantes agregados, por ejemplo, precipitación o cromatografía de exclusión por tamaño. Por ejemplo, el Ejemplo 2 ilustra la purificación de PMP que se han obtenido a través de los pasos de separación descritos en el Ejemplo 1. Además, los PMP se pueden caracterizar de acuerdo con los métodos ilustrados en el Ejemplo 3.

En algunos casos, los PMP de las presentes composiciones y métodos pueden producirse a partir de una planta, o parte de la misma, y usarse sin modificación adicional a la PMP. En otros casos, el PMP puede modificarse antes de su uso, como se describe más adelante en este documento.

B. Marcadores EV De Planta

Los PMP de las presentes composiciones y métodos pueden tener una gama de marcadores que identifican la PMP como producida usando un EV de planta, y/o que incluye un segmento, porción o extracto del mismo. Como se usa en el presente documento, el término "marcador EV de planta" se refiere a un componente que está naturalmente asociado con una planta e incorporado dentro o sobre el EV planta en planta, tal como una proteína vegetal, un ácido nucleico vegetal, una molécula pequeña de planta, un lípido vegetal, o una combinación de los mismos. Se pueden encontrar ejemplos de marcadores EV de plantas, por ejemplo, en Rutter e Innes, Plant Physiol. 173 (1): 728-741, 2017; Raimondo y col., Oncotarget. 6 (23): 19514, 2015; Ju y col., Mol. Terapia. 21

(7): 1345-1357, 2013; Wang et al., Molecular Therapy. 22 (3): 522-534, 2014; y Regente et al, J de Exp. Biol. 68 (20): 5485-5496, 2017; cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia. Ejemplos adicionales de marcadores EV de plantas se enumeran en el Anexo, y se describen más detalladamente aquí.

En algunos casos, el marcador EV vegetal puede incluir un lípido vegetal. Los ejemplos de marcadores de lípidos de plantas que se pueden encontrar en la PMP incluyen fitosterol, campesterol, β -sitosterol, estigmasterol, avenasterol, glicosil inositol fosforil ceramidas (GIPC), glicolípidos (por ejemplo, monogalactosildiacilglicerol (MGDG) o digalactosildiacilglicerol) o digalglicerol (digalactosildiacilglicerol) o una combinación de los mismos. Por ejemplo, el PMP puede incluir GIPC, que representan la clase principal de esfingolípidos en las plantas y son uno de los lípidos de membrana más abundantes en las plantas. Otros marcadores EV de la planta pueden incluir lípidos que se acumulan en las plantas en respuesta a estresores abióticos o bióticos (por ejemplo, infección bacteriana o fúngica), como el ácido fosfatídico (PA) o fosfato de fosfatidilinositol-4 (PI4P).

Alternativamente, el marcador EV vegetal puede incluir una proteína vegetal. En algunos casos, el marcador EV de la planta de proteína puede ser una proteína antimicrobiana producida naturalmente por las plantas, incluidas las proteínas de defensa que las plantas secretan en respuesta a estresores abióticos o bióticos (por ejemplo, infección bacteriana o fúngica). Las proteínas de defensa de patógenos vegetales incluyen proteínas solubles de proteína receptora

de proteína de asociación de factor sensible a N-etilmaleimida (SNARE) (por ejemplo, Syntaxin-121 (SYP121; GenBank N° de acceso: NP_187788.1 o NP_974288.1), Penetración1 (PEN1; N° de acceso GenBank: NP_567462.1)) o Penetración del transportador ABC3 (PEN3; número de acceso de GenBank: NP_191283.2). Otros ejemplos de marcadores EV de plantas incluyen proteínas que facilitan el transporte a larga distancia de ARN en plantas, incluidas proteínas de floema (por ejemplo, Proteína de floema2-A1 (PP2-A1), número de acceso de GenBank: NP_193719.1), lípidos dependientes de calcio. proteínas de unión o lectinas (por ejemplo, lectinas relacionadas con la jacalina, por ejemplo, *Helianthus annuus* jacalin (Helja; GenBank: AHZ86978.1). Por ejemplo, la proteína de unión al ARN puede ser la proteína de unión al ARN rica en glicina-7 (GRP7; GenBank Accession Número: NP_179760.1). Además, las proteínas que regulan la función plasmodesmática se pueden encontrar en algunos casos en EVs de plantas, incluidas proteínas como Synap-Totgamin AA (N° de acceso de GenBank: NP_565495.1). En algunos casos, el marcador EV de plantas puede incluir una proteína involucrada en el metabolismo de los lípidos, como la fosfolipasa C o la fosfolipasa D. En algunos casos, el marcador de proteína puede carecer de un péptido señal que se asocie típicamente con proteínas secretadas. En ciertos casos donde el marcador EV de la planta es una proteína. Las proteínas secretoras no convencionales parecen compartir varias características comunes como (i) falta de una secuencia líder, (ii) ausencia de modificaciones postraduccionales (PTM) específicas para ER o aparato de Golgi, y/o (iii) secreción no afectada por brefeldina A que bloquea la vía de secreción clásica

dependiente de ER / Golgi. Un experto en la materia puede usar una variedad de herramientas de libre acceso para el público (por ejemplo, la base de datos SecretomeP; SUBA3 (base de datos de localización subcelular para proteínas de Arabidopsis)) para evaluar una proteína para una secuencia de señal, o la falta de ella.

En los casos en que el marcador EV de la planta es una proteína, la proteína puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia para un marcador EV de planta, como cualquiera de los marcadores EV de planta enumerados en el Anexo. Por ejemplo, la proteína puede tener una secuencia de aminoácidos que tenga al menos 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, Identidad de secuencia del 95%, 98%, 99% o 100% a PEN1 de Arabidopsis thaliana (Número de acceso de GenBank: NP_567462.1).

En algunos casos, el marcador EV vegetal incluye un ácido nucleico codificado en plantas, por ejemplo, un ARN vegetal, un ADN vegetal o un PNA vegetal. Por ejemplo, el PMP puede incluir ARNdc, ARNm, un ARN viral, un ARNmicro (ARNmi) o un pequeño ARN interferente (ARNsi) codificado por una planta. En algunos casos, el ácido nucleico puede ser uno que está asociado con una proteína que facilita el transporte a larga distancia de ARN en las plantas, como se discute aquí. En algunos casos, el marcador EV de la planta de ácido nucleico puede ser uno involucrado en el silenciamiento génico inducido por el huésped (HIGS), que es el proceso por el cual las plantas silencian las transcripciones extrañas de plagas de plantas (por ejemplo, patógenos como hongos). Por

ejemplo, el ácido nucleico puede ser uno que silencia los genes bacterianos o fúngicos. En algunos casos, el ácido nucleico puede ser un ARNmicro, como miR159 o miR166, que se dirigen a genes en un patógeno fúngico (por ejemplo, *Verticillium dahliae*). En algunos casos, la proteína puede estar involucrada en el transporte de compuestos de defensa de la planta, como las proteínas involucradas en el transporte y metabolismo del glucosinolato (GSL), incluido el transportador de glucosinolato-1 -1 (GTR1; número de acceso de GenBank: NP_566896.2), transportador de glucosinolato -2 (GTR2; NP_201074.1), o Modificador Epitioespecífico 1 (ESM1; NP_188037.1).

En los casos en que el marcador EV de la planta es un ácido nucleico, el ácido nucleico puede tener una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia para un marcador EV de planta, por ejemplo, como los que codifican los marcadores EV de planta enumerados en el Anexo. Por ejemplo, el ácido nucleico puede tener una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia para miR159 o miR166.

En algunos casos, el marcador EV de la planta incluye un compuesto producido por las plantas. Por ejemplo, el compuesto puede ser un compuesto de defensa producido en respuesta a estresores abióticos o bióticos, como los metabolitos secundarios. Uno de esos metabolitos secundarios que se encuentran en los PMP son los glucosinolatos (GSL), que son metabolitos secundarios que contienen nitrógeno y

azufre y se encuentran principalmente en las plantas de Brassicaceae. Otros metabolitos secundarios pueden incluir aleloquímicos.

En algunos casos, el PMP también puede identificarse como producido usando un EV de planta basado en la falta de ciertos marcadores (por ejemplo, Lípidos, polipéptidos o polinucleótidos) que normalmente no son producidos por plantas, pero generalmente están asociados con otros organismos (por ejemplo, marcadores de EV animales, EV bacterianos o EV fúngicos). Por ejemplo, en algunos casos, el PMP carece de lípidos que se encuentran típicamente en EV animales, EV bacterianos o EV fúngicos. En algunos casos, el PMP carece de los lípidos típicos de los EV animales (por ejemplo, Esfingomielina). En algunos casos, el PMP no contiene lípidos típicos de EV bacterianos o membranas bacterianas (por ejemplo, LPS). En algunos casos, el PMP carece de los lípidos típicos de las membranas fúngicas (por ejemplo, ergosterol).

Los marcadores EV de plantas se pueden identificar utilizando cualquier enfoque conocido en la técnica que permita la identificación de moléculas pequeñas (por ejemplo, espectroscopía de masas, espectrometría de masas), lípidos (por ejemplo, Espectroscopía de masas, espectrometría de masas), proteínas (por ejemplo, Espectroscopía de masas, inmunotransferencia), o ácidos nucleicos (por ejemplo, análisis por PCR). En algunos casos, una composición de PMP descrita en el presente documento incluye una cantidad detectable, por ejemplo, una cantidad umbral predeterminada, de un marcador EV vegetal descrito en el presente documento.

C. Carga De Agentes

Los PMP pueden modificarse para incluir un agente modificador de plantas heterólogo, como los descritos aquí. Los PMP pueden transportar o asociarse con dichos agentes por una variedad de medios para permitir el suministro del agente a una planta objetivo, por ejemplo, encapsulando el agente, incorporando el componente en la estructura de la bicapa lipídica o asociando el componente (por ejemplo, por conjugación) con la superficie de la estructura de bicapa lipídica de la PMP.

El agente modificador de plantas heterólogo puede incorporarse o cargarse en los PMP mediante cualquier método conocido en la técnica que permita la asociación, directa o indirecta, entre la PMP y el agente. Los agentes modificadores de plantas heterólogos pueden incorporarse a los PMP mediante un método in vivo (por ejemplo, en planta, por ejemplo, mediante la producción de PMP a partir de una planta transgénica que incluye el agente heterólogo) o in vitro (por ejemplo, en cultivo de tejidos, o en cultivo celular), o ambos métodos in vivo e in vitro.

En los casos en que los PMP se cargan con un agente modificador de plantas heterólogo in vivo, los PMP se pueden producir usando EV, o un segmento o porciones de los mismos, o un extracto que contiene EV que se ha cargado en planta. Los métodos en planta incluyen la expresión del agente modificador de plantas heterólogo en una planta que ha sido modificada genéticamente para expresar el agente modificador de plantas heterólogo para cargar en EV. En algunos casos, el agente modificador de plantas heterólogo es exógeno a la planta. Alternativamente, el agente modificador de plantas heterólogo puede encontrarse naturalmente en la planta, pero

diseñado para expresarse a un nivel elevado en relación con el nivel encontrado en una planta no modificada genéticamente.

En algunos casos, los PMP se pueden cargar (por ejemplo, puede ser encapsulado por) hacia o in vitro. La sustancia se puede cargar en los PMP utilizando, entre otros, métodos físicos, químicos y/o biológicos (por ejemplo, en cultivo de tejidos o en cultivo celular). Por ejemplo, el agente modificador de plantas heterólogo puede introducirse en PMP por uno o más de electroporación, sonicación, difusión pasiva, agitación, extracción lipídica o extrusión. Los PMP cargados se pueden evaluar para confirmar la presencia o el nivel del agente cargado utilizando una variedad de métodos, como HPLC (por ejemplo, para evaluar moléculas pequeñas); inmunotransferencia (por ejemplo, para evaluar proteínas); y PCR cuantitativa (por ejemplo, para evaluar nucleótidos). Sin embargo, los expertos en la materia deben apreciar que la carga de una sustancia de interés en PMP no se limita a los métodos ilustrados anteriormente.

En algunos casos, el agente modificador de plantas heterólogo puede conjugarse con el PMP, en donde el agente modificador de plantas heterólogo está conectado o unido, indirecta o directamente, al PMP. Por ejemplo, uno o más agentes modificadores de plantas pueden unirse químicamente a una PMP, de modo que uno o más agentes modificadores de plantas se unan (por ejemplo, mediante enlaces covalentes o iónicos) directamente a la bicapa lipídica de la PMP. En algunos casos, la conjugación de varios agentes modificadores de plantas a los PMP puede lograrse mezclando primero uno o más agentes modificadores de plantas heterólogos con un

agente de reticulación apropiado (por ejemplo, N-etilcarbodiimida ("EDC")), que generalmente se utiliza como un agente activador de carboxilo para la unión de amidas con aminas primarias y también reacciona con grupos fosfato) en un disolvente adecuado. Después de un período de incubación suficiente para permitir que el agente modificador de plantas heterólogo se una al agente de reticulación, la mezcla del agente de reticulación / agente modificador de plantas heteróloga se puede combinar con los PMP y, después de otro período de incubación, someter a un gradiente de sacarosa (por ejemplo, y gradiente de sacarosa al 8, 30, 45 y 60%) para separar el agente modificador de plantas heterólogo libre y los PMP libres de los agentes modificadores de plantas conjugados con los PMP. Como parte de la combinación de la mezcla con un gradiente de sacarosa y un paso de centrifugación que lo acompaña, los PMP conjugadas con los agentes modificadores de plantas se ven como una banda en el gradiente de sacarosa, de modo que los PMP conjugadas se pueden recoger, lavar y disuelto en una solución adecuada para su uso como se describe en el presente documento.

En algunos casos, los PMP están asociadas de manera estable con el agente modificador de plantas heterólogo antes y después de la entrega de la PMP, por ejemplo, a una planta. En otros casos, los PMP están asociadas con el agente modificador de plantas heterólogo de tal manera que el agente modificador de plantas heterólogo se disocia de la PMP después de la entrega de la PMP, por ejemplo, a una planta.

Los PMP pueden modificarse aún más con otros componentes (por ejemplo, lípidos, por ejemplo, esteroides, por ejemplo, colesterol; o moléculas pequeñas) para alterar

aún más las características funcionales y estructurales de la PMP. Por ejemplo, los PMP pueden modificarse aún más con moléculas estabilizadoras que aumentan la estabilidad de la PMP (por ejemplo, durante al menos un día a temperatura ambiente, y/o estable durante al menos una semana a 4°C).

Los PMP pueden cargarse con diversas concentraciones del agente modificador de plantas heterólogo, dependiendo del agente o uso particular. Por ejemplo, en algunos casos, los PMP se cargan de tal manera que la composición modificadora de plantas descrita en el presente documento incluye aproximadamente 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 (o cualquier rango entre aproximadamente 0.001 y 95) o más% en peso de un agente modificador de plantas. En algunos casos, los PMP se cargan de tal manera que la composición modificadora de plantas incluye aproximadamente 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.0, 0.1, 0.01, 0.001 (o cualquier rango entre aproximadamente 95 y 0.001) o menos por ciento en peso de un agente modificador de plantas. Por ejemplo, la composición modificadora de plantas puede incluir aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.01% en peso, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.1% en peso, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1% en peso, aproximadamente 1 a aproximadamente 5% en peso, o aproximadamente 5 a aproximadamente 10% en peso, aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso del agente modificador de plantas. En algunos casos, los PMP pueden cargarse con aproximadamente 1, 5, 10, 50, 100, 200 o 500, 1,000, 2,000 (o cualquier rango entre aproximadamente 1 y 2,000) o más µg/ml de un agente modificador de plantas. En

algunos casos, los PMP pueden cargarse con aproximadamente 2,000, 1,000, 500, 200, 100, 50, 10, 5, 1 (o cualquier rango entre aproximadamente 2,000 y 1) o menos $\mu\text{g/ml}$ de un agente modificador de plantas,

5 en algunos casos, los PMP se cargan de tal manera que la composición modificadora de plantas descrita en el presente documento incluye al menos 0.001% en peso, al menos 0.01% en peso, al menos 0.1% en peso, al menos 1,0% en peso, al menos 2% en peso, al menos 3% en peso, al menos 4% en peso, al menos 5% en peso, al menos 6% en peso, al menos 7%
10 en peso, al menos 8% en peso, al menos 9% en peso, al menos 10% en peso, al menos 15% en peso, al menos 20% en peso, al menos 30% en peso, al menos 40% en peso, al menos 50% en peso, al menos 60% en peso, al menos 70% en peso, al menos 80% en peso, al menos 90% en peso, o al menos 95% en peso de un agente modificador de plantas. En algunos casos, los PMP pueden cargarse con al menos 1 $\mu\text{g/ml}$, al menos 5 $\mu\text{g/ml}$, al menos 10 $\mu\text{g/ml}$, al menos 50 $\mu\text{g/ml}$, al menos 100 $\mu\text{g/ml}$, al menos 200 $\mu\text{g/ml}$, al menos 500 $\mu\text{g/ml}$, al menos 1,000 $\mu\text{g/ml}$, al menos 2,000 $\mu\text{g/ml}$ de un agente modificador de plantas.
20

En la sección titulada "Agentes modificadores de plantas heterólogos" se detallan más ejemplos de agentes modificadores de plantas particulares que pueden cargarse en los PMP.

25 D. Formulaciones

Para permitir la facilidad de aplicación, manipulación, transporte, almacenamiento y actividad, las composiciones modificadoras de plantas pueden formularse con otras sustancias tales como vehículos aceptables para la agricultura. La composición modificadora de plantas puede
30

formularse en, por ejemplo, cebos, emulsiones concentradas, polvos, concentrados emulsionables, fumigantes, geles, gránulos, microencapsulaciones, tratamientos de semillas, concentrados en suspensión, suspoemulsiones, tabletas, líquidos solubles en agua, gránulos dispersables en agua o secos. fluidos, polvos humectables y soluciones de volumen ultra bajo.

Las composiciones modificadoras de plantas se pueden aplicar como suspensiones acuosas o emulsiones preparadas a partir de formulaciones concentradas de tales agentes. Tales formulaciones solubles en agua, suspendibles en agua o emulsionables son sólidos, generalmente conocidos como polvos humectables, o gránulos dispersables en agua, o líquidos generalmente conocidos como concentrados emulsionables, o suspensiones acuosas. Los polvos humectables, que pueden compactarse para formar gránulos dispersables en agua, comprenden una mezcla íntima de la composición modificadora de plantas, un vehículo y tensioactivos. El portador generalmente se selecciona entre las arcillas de atapulgita, las arcillas de montmorillonita, las tierras de diatomeas o los silicatos purificados. Los tensioactivos efectivos, que incluyen de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 10% del polvo humectable, se encuentran entre ligninas sulfonatadas, naftalenosulfonatos condensados, naftalenosulfonatos, alquilbencenosulfonatos, sulfatos de alquilo y tensioactivos no iónicos tales como aductos de óxido de etileno de alquilfenoles.

Los concentrados emulsionables pueden comprender una concentración adecuada de PMP y/o agentes modificadores de plantas, como de aproximadamente 50 a aproximadamente 500

gramos por litro de líquido disuelto en un vehículo que sea un solvente miscible en agua o una mezcla de solvente orgánico inmiscible en agua y emulsionantes. Los disolventes orgánicos útiles incluyen compuestos aromáticos, especialmente xilenos y fracciones de petróleo, especialmente las porciones naftalénicas y olefínicas de petróleo de alto punto de ebullición tales como la nafta aromática pesada. También se pueden usar otros disolventes orgánicos, como los disolventes terpénicos que incluyen derivados de colofonia, cetonas alifáticas como la ciclohexanona y alcoholes complejos como el 2-etoxietanol. Los emulsionantes adecuados para concentrados emulsionables se seleccionan de tensioactivos aniónicos y no iónicos convencionales.

Las suspensiones acuosas comprenden suspensiones de composiciones modificadoras de plantas insolubles en agua dispersas en un vehículo acuoso a una concentración en el intervalo de aproximadamente 5% a aproximadamente 50% en peso. Las suspensiones se preparan moliendo finamente el agente activo y mezclándolo vigorosamente en un vehículo compuesto de agua y tensioactivos. También se pueden agregar ingredientes, como sales inorgánicas y gomas sintéticas o naturales, para aumentar la densidad y la viscosidad del vehículo acuoso.

Las composiciones modificadoras de plantas también se pueden aplicar como composiciones granulares que son particularmente útiles para aplicaciones en el suelo. Las composiciones granulares usualmente contienen de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 10% en peso de la composición modificadora de plantas, dispersada en un vehículo que comprende arcilla o una sustancia similar.

Dichas composiciones se preparan habitualmente disolviendo la formulación en un disolvente adecuado y aplicándola a un vehículo granular que se ha formado previamente al tamaño de partícula apropiado, en el intervalo de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 3 mm. Dichas composiciones también pueden formularse haciendo una masa o pasta del vehículo y compuesto y triturando y secando para obtener el tamaño de partícula granular deseado.

Los polvos que contienen las presentes composiciones se preparan mezclando íntimamente la composición modificadora de plantas en forma de polvo con un vehículo agrícola polvoriento adecuado, tal como arcilla de caolín, roca volcánica molida, y similares. Los polvos pueden contener adecuadamente de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% de los paquetes. Se pueden aplicar como aderezo para semillas o como aplicación de follaje con una máquina sopladora de polvo.

Es igualmente práctico aplicar la presente formulación en forma de solución en un solvente orgánico apropiado, generalmente aceite de petróleo, como los aceites en aerosol, que se usan ampliamente en la química agrícola.

La composición modificadora de plantas también se puede aplicar en forma de una composición de aerosol. En tales composiciones, los paquetes se disuelven o dispersan en un vehículo, que es una mezcla propulsora generadora de presión. La composición de aerosol se envasa en un recipiente desde el cual se dispensa la mezcla a través de una válvula atomizadora.

Otra realización es una emulsión de aceite en agua, en donde la emulsión comprende glóbulos oleosos que están

provistos cada uno de un revestimiento de cristal líquido laminar y se dispersan en una fase acuosa, en donde cada glóbulo oleoso comprende al menos un compuesto que es agrícolamente activo, y está recubierto individualmente con una capa monolamellar u oligolamellar que incluye: (1) al menos un agente tensioactivo lipofílico no iónico, (2) al menos un agente tensioactivo hidrofílico no iónico y (3) al menos una superficie iónica agente activo, en donde los glóbulos tienen un diámetro medio de partícula de menos de 800 nanómetros. Se divulga más información sobre la realización en la publicación de patente estadounidense 20070027034 publicada el 1 de febrero de 2007. Para facilitar su uso, esta realización se denominará "OIWE".

Además, generalmente, cuando las moléculas descritas anteriormente se usan en una formulación, dicha formulación también puede contener otros componentes. Estos componentes incluyen, entre otros, (esta es una lista no exhaustiva y no mutuamente excluyente) humectantes, esparcidores, adhesivos, penetrantes, tampones, agentes secuestrantes, agentes reductores de deriva, agentes de compatibilidad, agentes antiespumantes, limpieza agentes y emulsionantes. Algunos componentes se describen inmediatamente.

Un agente humectante es una sustancia que cuando se agrega a un líquido aumenta el poder de propagación o penetración del líquido al reducir la tensión interfacial entre el líquido y la superficie sobre la que se está extendiendo. Los agentes humectantes se usan para dos funciones principales en las formulaciones agroquímicas: durante el procesamiento y la fabricación para aumentar la velocidad de humectación de los polvos en agua para hacer

concentrados para líquidos solubles o concentrados en suspensión; y durante la mezcla de un producto con agua en un tanque de pulverización para reducir el tiempo de humectación de los polvos humectables y mejorar la penetración del agua en gránulos dispersables en agua. Ejemplos de agentes humectantes utilizados en polvo humectable, concentrado en suspensión y formulaciones de gránulos dispersables en agua son: laurilsulfato de sodio; dioctil sulfosuccinato de sodio; alquil fenol etoxilatos; y alcohol alifático etoxilatos.

Un agente dispersante es una sustancia que se adsorbe en la superficie de las partículas y ayuda a preservar el estado de dispersión de las partículas y evita que se reagrupen. Los agentes dispersantes se agregan a las formulaciones agroquímicas para facilitar la dispersión y la suspensión durante la fabricación, y para asegurar que las partículas se dispersen en agua en un tanque de rociado. Son ampliamente utilizados en polvos humectables, concentrados en suspensión y gránulos dispersables en agua. Los tensioactivos que se usan como agentes dispersantes tienen la capacidad de adsorberse fuertemente sobre una superficie de partículas y proporcionar una barrera cargada o estérica para la reagrupación de partículas. Los tensioactivos más utilizados son aniónicos, no iónicos o mezclas de los dos tipos. Para las formulaciones de polvo humectable, los agentes dispersantes más comunes son los lignosulfonatos de sodio. Para los concentrados en suspensión, se obtienen muy buena adsorción y estabilización utilizando polielectrolitos, tales como condensados de naftalenosulfonato de sodio formaldehído. También se usan ésteres de fosfato de etoxilato de tristirilfenol. Los no iónicos, como los condensados de óxido

de alquilaril etileno y los copolímeros de bloque EO-PO, a veces se combinan con aniónicos como agentes dispersantes para concentrados en suspensión. En los últimos años, se han desarrollado nuevos tipos de tensioactivos poliméricos de muy alto peso molecular como agentes dispersantes. Estos tienen "esqueletos" hidrofóbicos muy largos y una gran cantidad de cadenas de óxido de etileno que forman los "dientes" de un tensioactivo "peine". Estos polímeros de alto peso molecular pueden dar muy buena estabilidad a largo plazo a los concentrados en suspensión porque las cadenas principales hidrófobas tienen muchos puntos de anclaje en las superficies de las partículas. Ejemplos de agentes dispersantes utilizados en formulaciones agroquímicas son: lignosulfonatos de sodio; condensados de naftalenosulfonato de sodio formaldehído; ésteres de tristirilfenol etoxilato fosfato; alcohol alifático etoxilatos; alquil etoxilatos; copolímeros de bloque EO-PO (óxido de etileno - óxido de propileno); y copolímeros de injerto.

Un agente emulsionante es una sustancia que estabiliza una suspensión de gotas de una fase líquida en otra fase líquida. Sin el agente emulsionante, los dos líquidos se separarían en dos fases líquidas inmiscibles. Las mezclas de emulsionantes más utilizadas contienen alquilfenol o alcohol alifático con doce o más unidades de óxido de etileno y la sal de calcio soluble en aceite del ácido dodecilbencenosulfónico. Un rango de valores de equilibrio hidrófilo-lipófilo ("HLB") de 8 a 18 normalmente proporcionará buenas emulsiones estables. La estabilidad de la emulsión a veces puede mejorarse mediante la adición de una pequeña cantidad de un tensioactivo de copolímero de

bloque EO-PO.

Un agente solubilizante es un tensioactivo que formará micelas en agua a concentraciones superiores a la concentración crítica de micelas. Las micelas pueden entonces disolver o solubilizar materiales insolubles en agua dentro de la parte hidrofóbica de la micela. Los tipos de tensioactivos utilizados habitualmente para la solubilización son los no iónicos, los monooleatos de sorbitán, los etoxilatos de monooleato de sorbitán y los ésteres de oleato de metilo.

Los tensioactivos a veces se usan, ya sea solos o con otros aditivos, como aceites minerales o vegetales, como adyuvantes para mezclas de tanque de pulverización para mejorar el rendimiento biológico de la composición modificadora de plantas en el objetivo. Los tipos de tensioactivos utilizados para la mejora biológica dependen generalmente de la naturaleza y el modo de acción de la composición modificadora de plantas. Sin embargo, a menudo son no iónicos tales como: alquil etoxilatos; alcohol alifático lineal etoxilatos; amina alifática etoxilatos.

Un vehículo o diluyente en una formulación agrícola es un material agregado a la composición modificadora de plantas para dar un producto de la resistencia requerida. Los portadores suelen ser materiales con alta capacidad de absorción, mientras que los diluyentes suelen ser materiales con baja capacidad de absorción. Los portadores y diluyentes se usan en la formulación de polvos, polvos humectables, gránulos y gránulos dispersables en agua.

Los disolventes orgánicos se utilizan principalmente en la formulación de concentrados emulsionables, emulsiones de

aceite en agua, suspoemulsiones y formulaciones de ultra bajo volumen, y en menor medida, formulaciones granulares. Algunas veces se usan mezclas de solventes. Los primeros grupos principales de solventes son los aceites parafínicos alifáticos como el queroseno o las parafinas refinadas. El segundo grupo principal (y el más común) comprende los solventes aromáticos tales como xileno y fracciones de mayor peso molecular de solventes aromáticos C9 y C10. Los hidrocarburos clorados son útiles como codisolventes para evitar la cristalización de composiciones modificadoras de plantas cuando la formulación se emulsiona en agua. Los alcoholes a veces se usan como codisolventes para aumentar el poder disolvente. Otros solventes pueden incluir aceites vegetales, aceites de semillas y ésteres de aceites vegetales y de semillas.

Los espesantes o agentes gelificantes se usan principalmente en la formulación de concentrados en suspensión, emulsiones y suspoemulsiones para modificar la reología o las propiedades de flujo del líquido y evitar la separación y sedimentación de las partículas o gotas dispersas. Los agentes espesantes, gelificantes y anti-sedimentación generalmente se dividen en dos categorías, a saber, partículas insolubles en agua y polímeros solubles en agua. Es posible producir formulaciones de concentrados en suspensión utilizando arcillas y sílices. Los ejemplos de este tipo de materiales incluyen, entre otros, montmorillonita, bentonita, silicato de aluminio y magnesio y atapulgita. Los polisacáridos solubles en agua se han utilizado como agentes gelificantes espesantes durante muchos años. Los tipos de polisacáridos más comúnmente utilizados

son extractos naturales de semillas y algas o son derivados sintéticos de celulosa. Los ejemplos de estos tipos de materiales incluyen, pero no se limitan a, goma guar; goma de algarrobo; carragenano; alginatos; metilcelulosa; carboximetilcelulosa de sodio (SCMC); hidroxietilcelulosa (HEC). Otros tipos de agentes anti-sedimentación se basan en almidones modificados, poliacrilatos, alcohol polivinílico y óxido de polietileno. Otro buen agente antisolución es la goma de xantano.

Los microorganismos pueden causar el deterioro de los productos formulados. Por lo tanto, los agentes de conservación se usan para eliminar o reducir su efecto. Los ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a: ácido propiónico y su sal de sodio; ácido sórbico y sus sales de sodio o potasio; ácido benzoico y su sal de sodio; sal de sodio del ácido p-hidroxibenzoico; p-hidroxibenzoato de metilo; y 1,2-benzisotiazolin-3-ona (BIT).

La presencia de tensioactivos a menudo hace que las formulaciones a base de agua formen espuma durante las operaciones de mezcla en la producción y en la aplicación a través de un tanque de pulverización. Con el fin de reducir la tendencia a la formación de espuma, a menudo se agregan agentes antiespumantes durante la etapa de producción o antes de llenar las botellas. En general, hay dos tipos de agentes antiespumantes, a saber, siliconas y no siliconas. Las siliconas son generalmente emulsiones acuosas de dimetilpolisiloxano, mientras que los agentes antiespumantes que no son de silicona son aceites insolubles en agua, como octanol y nonanol, o sílice. En ambos casos, la función del agente antiespumante es desplazar el tensioactivo de la

interfaz aire-agua.

Los agentes "verdes" (por ejemplo, Adyuvantes, tensioactivos, solventes) pueden reducir la huella ambiental general de las formulaciones de protección de cultivos. Los
5 agentes verdes son biodegradables y generalmente se derivan de fuentes naturales y/o sostenibles, por ejemplo, fuentes vegetales y animales. Ejemplos específicos son: aceites vegetales, aceites de semillas y sus ésteres, también alquilpoliglucósidos alcoxilados.

En algunos casos, la composición modificadora de
10 plantas se puede liofilizar o liofilizar. Ver la patente de EE.UU. N ° 4.311.712. La composición modificadora de plantas puede reconstituirse más tarde en contacto con agua u otro líquido. Se pueden agregar otros componentes a los
15 liofilizados o reconstituidos, por ejemplo, otros agentes modificadores de plantas, vehículos agrícolas aceptables u otros materiales de acuerdo con las formulaciones descritas en este documento.

Otras características opcionales de la composición
20 incluyen vehículos y/o vehículos de entrega que protegen la composición modificadora de plantas contra las condiciones UV o ácidas. En algunos casos, el vehículo de entrega contiene un tampón de pH. En algunos casos, la composición está formulada para tener un pH en el intervalo de aproximadamente
25 4.5 a aproximadamente 9.0, que incluye, por ejemplo, intervalos de pH de aproximadamente cualquiera de 5.0 a aproximadamente 8.0, de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 7.5, o de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 7.0.

Para obtener más información sobre formulaciones
30 agrícolas, consulte "Chemistry and Technology of Agrochemical

Formulations" edited by D. A. Knowles, copyright 1998 de Kluwer Academic Publishers. También ver, "Insecticides in Agriculture and Environment-Retrospects and Prospects" de A. S. Perry, I. Yamamoto, I. Ishaaya, and R. Perry, copyright 1998 de Springer-Verlag.

II. Métodos De Modificación De Plantas

Las composiciones modificadoras de plantas descritas en el presente documento son útiles en una variedad de métodos. Los presentes métodos implican administrar las composiciones modificadoras de plantas descritas en el presente documento a una planta, tales como las descritas en el presente documento. Las composiciones y los métodos relacionados se pueden usar para modificar una planta o una parte de la planta (por ejemplo, hojas, raíces, flores, frutos o semillas) para aumentar la aptitud de las plantas. Los detalles de cada uno de estos métodos se describen más adelante.

A. Entrega A Una Planta

En este documento se proporcionan métodos para administrar una composición modificadora de plantas a una planta (por ejemplo, como los descritos en la sección titulada "Plantas"). Se incluyen métodos para administrar una composición modificadora de plantas a una planta poniendo en contacto la planta, o parte de la misma, con una composición modificadora de plantas. Los métodos son útiles para modificar la planta para aumentar la aptitud de una planta.

En un aspecto, se proporciona aquí un método para aumentar la aptitud de una planta, el método incluye entregar a la planta la composición modificadora de plantas descrita en este documento (por ejemplo, en una cantidad y duración

efectiva) para aumentar la aptitud de la planta en relación con una planta no tratada (por ejemplo, una planta que no ha recibido la composición modificadora de plantas).

Un aumento en la aptitud de la planta como consecuencia del suministro de una composición modificadora de plantas puede manifestarse de varias maneras, por ejemplo, dando como resultado una mejor producción de la planta, por ejemplo, un rendimiento mejorado, un vigor mejorado de la planta. planta o calidad del producto cosechado de la planta, una mejora en los rasgos previos o posteriores a la cosecha que se consideran deseables para la agricultura u horticultura (por ejemplo, sabor, apariencia, vida útil), o para una mejora de los rasgos que de otro modo beneficiarían a los humanos (por ejemplo, disminución de la producción de alérgenos). Un rendimiento mejorado de una planta se relaciona con un aumento en el rendimiento de un producto (por ejemplo, medido por la biomasa de la planta, el rendimiento de grano, semilla o fruta, el contenido de proteína, el contenido de carbohidratos o aceite o el área de la hoja) de la planta en una cantidad medible sobre el rendimiento del mismo producto de la planta producido en las mismas condiciones, pero sin la aplicación de las composiciones instantáneas o en comparación con la aplicación de agentes modificadores de plantas convencionales (por ejemplo, agentes modificadores de plantas entregados sin PMP). Por ejemplo, el rendimiento puede incrementarse en al menos aproximadamente 0.5%, aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 4%, aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%,

aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 100% o más del 100%. En algunos casos, el método es efectivo para aumentar el rendimiento en aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces o más de 100 veces en relación con una planta no tratada. El rendimiento puede expresarse en términos de una cantidad en peso o volumen de la planta o un producto de la planta en alguna base. La base puede expresarse en términos de tiempo, área de crecimiento, peso de las plantas producidas o cantidad de materia prima utilizada. Por ejemplo, dichos métodos pueden aumentar el rendimiento de los tejidos vegetales, incluidos, entre otros: semillas, frutos, granos, cápsulas, tubérculos, raíces y hojas.

Un aumento en la aptitud de una planta como consecuencia del suministro de una composición modificadora de plantas también se puede medir por otros medios, como un aumento o mejora de la calificación de vigor, el soporte (el número de plantas por unidad de área), altura de la planta, circunferencia del tallo, longitud del tallo, número de hoja, tamaño de la hoja, dosel de la planta, apariencia visual (como un color de hoja más verde), clasificación de la raíz, emergencia, contenido de proteína, macollamiento aumentado, hojas más grandes, más hojas, hojas basales menos muertas, macollas más fuertes, menos fertilizante necesario, menos semillas necesarias, macollos más productivos, floración más temprana, madurez temprana de grano o semilla, menos verso de planta (alojamiento), mayor crecimiento de brotes, germinación más temprana o cualquier combinación de estos factores, en una cantidad medible o notable sobre el mismo

factor de la planta producida en las mismas condiciones, pero sin la administración de las composiciones instantáneas o con la aplicación de agentes modificadores de plantas convencionales (por ejemplo, agentes modificadores de plantas administrados sin PMP).

En consecuencia, en este documento se proporciona un método para modificar una planta, el método incluye la entrega a la planta de una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas proporcionadas en el presente documento, en donde el método modifica la planta y por lo tanto introduce o aumenta un rasgo beneficioso en la planta (por ejemplo, aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) relativo a una planta no tratada. En particular, el método puede aumentar la aptitud de la planta (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) en relación con una planta no tratada.

En algunos casos, el aumento en la aptitud de la planta es un aumento (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) en resistencia a enfermedades, tolerancia a la sequía, tolerancia al calor, tolerancia al frío, tolerancia a la sal, tolerancia al metal, tolerancia a los herbicidas, tolerancia química, eficiencia en el uso del agua, utilización de nitrógeno, resistencia al estrés por nitrógeno, nitrógeno fijación, resistencia a plagas, resistencia a herbívoros, resistencia a patógenos, rendimiento, rendimiento en condiciones limitadas por agua, vigor, crecimiento, capacidad fotosintética, nutrición, contenido de proteínas, contenido

de carbohidratos, contenido de aceite, biomasa, longitud del brote, longitud de la raíz, arquitectura de la raíz, semilla peso o cantidad de productos cosechables.

En algunos casos, el aumento en la condición física es un aumento (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) en desarrollo, crecimiento, rendimiento, resistencia a estresores abióticos o resistencia a estresores bióticos. Un estrés abiótico se refiere a una condición de estrés ambiental a la que está sujeta una planta o una parte de la planta que incluye, por ejemplo, estrés por sequía, estrés por sal, estrés por calor, estrés por frío y bajo estrés por nutrientes. Un estrés biótico se refiere a una condición de estrés ambiental a la que está sujeta una planta o parte de la planta que incluye, p. estrés por nematodos, estrés por herbivoría de insectos, estrés por hongos patógenos, estrés por bacterias patógenas o estrés por patógenos virales. El estrés puede ser temporal, por ejemplo, varias horas, varios días, varios meses o permanente, por ejemplo, toda la vida de la planta.

En algunos casos, el aumento en la aptitud de la planta es un aumento (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) en calidad de productos cosechados de la planta. Por ejemplo, el aumento en la aptitud de la planta puede ser una mejora en las características comercialmente favorables (por ejemplo, sabor o apariencia) de un producto cosechado de la planta. En otros casos, el aumento en la aptitud de la planta es un aumento en la vida útil de un producto cosechado de la planta (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%,

30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%).

Alternativamente, el aumento en la aptitud física puede ser una alteración de un rasgo que es beneficioso para la salud humana o animal, como una reducción en la producción de alérgenos. Por ejemplo, el aumento en la aptitud física puede ser una disminución (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) en la producción de un alérgeno (por ejemplo, Polen) que estimula una respuesta inmune en un animal (por ejemplo, un humano).

La modificación de la planta (por ejemplo, aumento de la aptitud) puede surgir de la modificación de una o más partes de la planta. Por ejemplo, la planta puede modificarse contactando hojas, semillas, polen, raíces, frutos, brotes, flores, células, protoplastos o tejidos (por ejemplo, tejido meristemático) de la planta. Como tal, en otro aspecto, el presente documento proporciona un método para aumentar la aptitud de una planta, el método incluye poner en contacto el polen de la planta con una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas en el presente documento, en donde el método aumenta la aptitud de la planta (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) en relación con una planta no tratada.

En otro aspecto más, se proporciona aquí un método para aumentar la aptitud de una planta, el método incluye poner en contacto una semilla de la planta con una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas descritas en este documento, en donde el método aumenta la aptitud de la planta. planta (por ejemplo, en aproximadamente

1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) en relación con una planta no tratada.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un método que incluye poner en contacto un protoplasto de la planta con una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas en el presente documento, en donde el método aumenta la aptitud de la planta (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) en relación con una planta no tratada.

En un aspecto adicional, se proporciona aquí un método para aumentar la aptitud de una planta, el método incluye poner en contacto una célula de planta de la planta con una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas en la presente, en donde el método aumenta la aptitud de la planta. planta (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) en relación con una planta no tratada.

En otro aspecto, en este documento se proporciona un método para aumentar la aptitud de una planta, el método incluye poner en contacto el tejido meristemático de la planta con una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas en el presente documento, en donde el método aumenta la aptitud de la planta (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) a una planta no tratada.

En otro aspecto, se proporciona aquí un método para aumentar la aptitud de una planta, el método incluye poner en

contacto un embrión de la planta con una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones modificadoras de plantas en este documento, en donde el método aumenta la aptitud de la planta (por ejemplo, en aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100%) a una planta no tratada.

B. Métodos De Aplicación

Una planta descrita en el presente documento puede exponerse a cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento de cualquier manera adecuada que permita administrar o administrar la composición a la planta. La composición modificadora de plantas puede administrarse sola o en combinación con otras sustancias activas (por ejemplo, agentes fertilizantes) o inactivas y puede aplicarse, por ejemplo, mediante pulverización, inyección (por ejemplo, microinyección), a través de las plantas, vertiendo, sumergiendo, en forma de líquidos concentrados, geles, soluciones, suspensiones, aerosoles, polvos, gránulos, briquetas, ladrillos y similares, formulados para proporcionar una concentración efectiva de la composición modificadora de plantas. Las cantidades y ubicaciones para la aplicación de las composiciones descritas en el presente documento generalmente están determinadas por el hábitat de la planta, la etapa del ciclo de vida en donde la planta puede ser dirigida por la composición modificadora de plantas, el sitio donde se realizará la aplicación y el estado físico y características funcionales de la composición modificadora de plantas.

En algunos casos, la composición se rocía directamente sobre una planta, por ejemplo, en cultivos, mediante

dispersión con mochila, dispersión aérea, fumigación, etc. En los casos en que la composición modificadora de plantas se dispersa en una planta, la planta que recibe la composición modificadora de plantas puede encontrarse en cualquier etapa de crecimiento. Por ejemplo, las composiciones modificadoras de plantas formuladas se pueden aplicar como recubrimiento de semillas o tratamiento de raíces en las primeras etapas del crecimiento de las plantas o como un tratamiento total de las plantas en las etapas posteriores del ciclo del cultivo. En algunos casos, la composición modificadora de plantas puede aplicarse como agente tópico a una planta.

Además, la composición modificadora de plantas puede aplicarse (por ejemplo, en el suelo en donde crece una planta, o en el agua que se usa para regar la planta) como un agente sistémico que se absorbe y distribuye a través de los tejidos de una planta. En algunos casos, las plantas u organismos alimentarios pueden transformarse genéticamente para expresar la composición modificadora de plantas.

La liberación retardada o continua también se puede lograr recubriendo la composición modificadora de plantas o una composición con la composición o composiciones modificadoras de plantas con una capa de recubrimiento soluble o bioerosionable, como la gelatina, cuyo recubrimiento se disuelve o erosiona en el entorno de uso, para luego poner a disposición la composición modificadora de plantas, o dispersando el agente en una matriz soluble o erosionable. Tales dispositivos de liberación y/o dispensación continua pueden emplearse ventajosamente para mantener consistentemente una concentración efectiva de una o más de las composiciones modificadoras de plantas descritas

en este documento.

En algunos casos, la composición modificadora de plantas se entrega a una parte de la planta, por ejemplo, una hoja, semilla, polen, raíz, fruto, brote o flor, o un tejido, célula o protoplasto de la misma. En algunos casos, la composición modificadora de plantas se entrega a una célula de la planta. En algunos casos, la composición modificadora de plantas se entrega a un protoplasto de la planta. En algunos casos, la composición modificadora de plantas se entrega a un tejido de la planta. Por ejemplo, la composición puede administrarse al tejido meristemático de la planta (por ejemplo, meristema apical, meristema lateral o meristema intercalar). En algunos casos, la composición se administra al tejido permanente de la planta (por ejemplo, tejidos simples (por ejemplo, parénquima, colénquima o esclerenquima) o tejido permanente complejo (por ejemplo, xilema o floema)). En algunos casos, la composición se entrega a un embrión de planta.

En algunos casos, la composición modificadora de plantas puede recomendarse para la aplicación en el campo como una cantidad de PMP por hectárea (g/ha o kg/ha) o la cantidad de ingrediente activo (por ejemplo, agente modificador de plantas) o equivalente de ácido por hectárea (kg ai/ha o g ai/ha). En algunos casos, puede requerirse una menor cantidad de agente modificador de plantas en las presentes composiciones para aplicarse al suelo, medios vegetales, tejido vegetal de semillas o plantas para lograr los mismos resultados que cuando el agente modificador de plantas se aplica en una composición que carece de PMP. Por ejemplo, la cantidad de agente modificador de plantas se

puede aplicar a niveles de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 50 o 100 veces (o cualquier rango entre aproximadamente 2 y aproximadamente 100 veces, por ejemplo aproximadamente 2 a 10 veces; aproximadamente 5 a 15 veces, aproximadamente 10 a 20 veces; aproximadamente 10 a 50 veces) menos que la misma planta modificadora agente aplicado en una composición no PMP, por ejemplo, aplicación directa del mismo agente modificador de plantas sin PMP. Las composiciones modificadoras de plantas de la invención pueden aplicarse en una variedad de cantidades por hectárea, por ejemplo, a aproximadamente 0.0001, 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 1, 2, 10, 100, 1,000, 2,000, 5,000 (o cualquier oscilan entre aproximadamente 0,0001 y 5,000) kg/ha. Por ejemplo, aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 0.01, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10, aproximadamente 10 a aproximadamente 1,000, aproximadamente 1,000 a aproximadamente 5,000 kg/ha.

III. Plantas

Se puede administrar o tratar una variedad de plantas con una composición modificadora de plantas descrita en este documento. Las plantas que pueden recibir una composición modificadora de plantas (es decir, "tratada") de acuerdo con los presentes métodos incluyen plantas enteras y partes de las mismas, que incluyen, entre otros, brotes de órganos / estructuras vegetativas (por ejemplo, hojas, tallos y tubérculos), raíces, flores y estructuras / órganos florales (por ejemplo, brácteas, sépalos, pétalos, estambres, carpelos, anteras y óvulos), semillas (incluidos embriones, endospermo, cotiledones y cubierta de semillas) y frutos (el ovario maduro), plantas tejido (por ejemplo, tejido vascular,

tejido molido y similares) y células (por ejemplo, células protectoras, óvulos y similares), y la progenie de los mismos. Las partes de la planta pueden referirse además a partes de la planta, como el brote, la raíz, el tallo, las semillas, las estípulas, las hojas, los pétalos, las flores, los óvulos, las brácteas, las ramas, los pecíolos, los entrenudos, la corteza, la pubescencia, los macollos, los rizomas, las frondas, las hojas, polen, estambre y similares.

La clase de plantas que pueden tratarse en un método divulgado en el presente documento incluye la clase de plantas superiores e inferiores, incluidas las angiospermas (plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas), gimnospermas, helechos, colas de caballo, psilófitos, lipófitos, briófitos y algas (por ejemplo, multicelulares o algas). algas unicelulares). Las plantas que pueden tratarse de acuerdo con los métodos actuales incluyen además cualquier planta vascular, por ejemplo monocotiledóneas o dicotiledóneas o gimnospermas, que incluyen, pero no se limitan a, alfalfa, manzana, arabidopsis, plátano, cebada, canola, ricino, crisantemo, trébol, cacao, café, algodón, algodón, maíz, crambe, arándano, pepino, dendrobium, dioscorea, eucalipto, festuca, lino, gladiolo, liliacea, linaza, mijo, melón, mostaza, avena, aceite de palma, colza, papaya, maní, piña, plantas ornamentales, Phaseolus, papa, colza, arroz, centeno, hierba de centeno, cártamo, sésamo, sorgo, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, fresa, tabaco, tomate, césped, trigo y cultivos de hortalizas como lechuga, apio, brócoli, coliflor, cucurbitáceas; árboles frutales y de nueces, como manzana, pera, durazno, naranja, pomelo, limón, lima, almendra, nuez, nuez, avellana; vides, como Toronja

(por ejemplo, un viñedo), kiwi, lúpulo; arbustos y zarzas de frutas, como frambuesa, mora, grosella espinosa; árboles forestales, como fresnos, pinos, abetos, arces, robles, castaños, populares; con alfalfa, canola, ricino, maíz, algodón, crambe, lino, linaza, mostaza, palma aceitera, colza, maní, papa, arroz, cártamo, sésamo, soja, remolacha azucarera, girasol, tabaco, tomate y trigo. Las plantas que pueden tratarse de acuerdo con los métodos de la presente invención incluyen cualquier planta de cultivo, por ejemplo, cultivo de forraje, cultivo de semillas oleaginosas, cultivo de granos, cultivo de frutas, cultivo de vegetales, cultivo de fibras, cultivo de especias, cultivo de nueces, cultivo de césped, azúcar. cultivo, cultivo de bebidas y cultivo forestal. En ciertos casos, la planta de cultivo que se trata en el método es una planta de soja. En otros casos determinados, la planta de cultivo es el trigo. En ciertos casos, la planta de cultivo es el maíz. En ciertos casos, la planta de cultivo es el algodón. En ciertos casos, la planta de cultivo es la alfalfa. En ciertos casos, la planta de cultivo es la remolacha azucarera. En ciertos casos, la planta de cultivo es el arroz. En ciertos casos, la planta de cultivo es la papa. En ciertos casos, la planta de cultivo es el tomate.

En ciertos casos, la planta es un cultivo. Los ejemplos de tales plantas de cultivo incluyen, entre otros, plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas que incluyen, entre otras, legumbres forrajeras o forrajeras, plantas ornamentales, cultivos alimentarios, árboles o arbustos seleccionados de *Acer* spp., *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ananas comosus*, *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Asparagus officinalis*, *Beta*

vulgaris, Brassica spp. (por ejemplo, Brassica napus, Brassica rapa ssp. (canola, colza, nabo), Camellia sinensis, Canna indica, Cannabis saliva, Capsicum spp., Castanea spp., Cichorium endivia, Citrullus lanatus, Citrus spp., Cocos spp., Coffea spp., Coriandrum sativum, Corylus spp., Crataegus spp., Cucurbita spp., Cucumis spp., Daucus carota, Fagus spp., Ficus carica, Fragaria spp., Ginkgo biloba, Glycine spp. (Por ejemplo, Glycine max, Soja hispida o Soja max), Gossypium hirsutum, Helianthus spp. (Por ejemplo, Helianthus annuus), Hibiscus spp., Hordeum spp. (Por ejemplo, Hordeum vulgare), Ipomoea batatas, Juglans spp., Lactuca sativa, Linum usitatissimum, Litchi chinensis Lotus spp., Luffa acutangula, Lupinus spp., Lycopersicon spp. (Por ejemplo, Lycopersicon esculentum, Lycopersicon lycopersicum, Lycopersicon pyriforme), Malus spp., Medicago sativa, Mentha spp., Miscanthus sinensis, Morus nigra, Musa spp., Olea spp., Oryza spp. (Por ejemplo, Oryza sativa, Oryza latifolia), Panicum miliaceum, Panicum virgatum, Passiflora edulis, Petroselinum crispum, Phaseolus spp., Pinus spp., Pistacia vera, Pisum spp., Poa spp., Populus spp., Prunus spp., Pyrus communis, Quercus spp., Raphanus sativus, Rheum rhabarbarum, Ribes spp., Ricinus communis, Rubus spp., Saccharum spp., Salix sp., Sambucus spp., Secale cereale, Sesamum spp., Sinapis spp., Solanum spp. (por ejemplo, Solanum tuberosum, Solanum integrifolium o Solanum lycopersicum), Sorghum bicolor, Sorghum halepense, Spinacia spp., Tamarindus indica, Theobroma cacao, Trifolium spp., Triticosecale rimpaui, Triticum spp. (por ejemplo, Triticum aestivum, Triticum durum, Triticum turgidum, Triticum hybernum, Triticum macha, Triticum sativum o Triticum vulgare), Vaccinium spp., Vicia

spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp. y *Zea mays*. En ciertas realizaciones, la planta de cultivo es arroz, colza, canola, soja, maíz (maíz), algodón, caña de azúcar, alfalfa, sorgo o trigo.

5 En ciertos casos, las composiciones y los métodos se pueden usar para tratar plantas post-cosecha o partes de plantas, alimentos o productos alimenticios. En algunos casos, el producto alimenticio o alimenticio es un producto alimenticio o alimenticio no vegetal (por ejemplo, un
10 producto comestible para humanos, animales veterinarios o ganado (por ejemplo, hongos)).

 La planta o parte de planta para usar en la presente invención incluye plantas de cualquier etapa del desarrollo de la planta. En ciertos casos, el parto puede ocurrir
15 durante las etapas de germinación, crecimiento de plántulas, crecimiento vegetativo y crecimiento reproductivo. En ciertos casos, la entrega a la planta ocurre durante las etapas de crecimiento vegetativo y reproductivo. En algunos casos, la composición se entrega al polen de la planta. En algunos
20 casos, la composición se entrega a una semilla de la planta. En algunos casos, la composición se entrega a un protoplasto de la planta. En algunos casos, la composición se entrega a un tejido de la planta. Por ejemplo, la composición puede administrarse al tejido meristemático de la planta (por
25 ejemplo, meristema apical, meristema lateral o meristema intercalar). En algunos casos, la composición se administra al tejido permanente de la planta (por ejemplo, tejidos simples (por ejemplo, parénquima, colénquima o esclerenquima) o tejido permanente complejo (por ejemplo, xilema o floema)).
30 En algunos casos, la composición se entrega a un embrión de

planta. En algunos casos, la composición se entrega a una célula vegetal. Las etapas de crecimiento vegetativo y reproductivo también se denominan en este documento como plantas "adultas" o "maduras".

5 En los casos en que la composición se entrega a una parte de la planta, la parte de la planta puede ser modificada por el agente modificador de plantas. Alternativamente, el agente modificador de plantas puede distribuirse a otras partes de la planta que posteriormente son modificadas por el agente modificador de plantas.

Iv. Agentes Modificadores De Plantas Heterólogos

10 Las composiciones modificadoras de plantas descritas en el presente documento incluyen uno o más agentes modificadores de plantas heterólogos. Por ejemplo, los PMP pueden encapsular el agente modificador de plantas heterólogo. Alternativa o adicionalmente, el agente modificador de plantas heterólogo puede incrustarse o conjugarse en la superficie de la PMP.

20 En algunos casos, el agente modificador de plantas puede incluir un péptido o un ácido nucleico. El agente modificador de plantas puede ser un agente que aumenta la aptitud de una variedad de plantas o puede ser uno que se dirige a una o más plantas específicas (por ejemplo, una especie específica o géneros de plantas). Además, en algunos casos, las composiciones modificadoras de plantas incluyen 25 dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10) diferentes agentes modificadores de plantas. En algunos casos, el agente modificador de plantas heterólogo puede incluir una ribonucleoproteína (RNP), por ejemplo, incluye 30 una o más moléculas ARN asociadas con una o más proteínas

unidas ARN.

Además, en algunos casos, se puede modificar el agente modificador de plantas heterólogo (por ejemplo, un agente que incluye una molécula de ácido nucleico o péptido). Por ejemplo, la modificación puede ser una modificación química, por ejemplo, conjugación a un marcador, por ejemplo, marcador fluorescente o marcador radiactivo. En otros ejemplos, la modificación puede incluir conjugación o enlace operativo a un resto que mejora la estabilidad, la administración, el direccionamiento, la biodisponibilidad o la vida media del agente, por ejemplo, un lípido, un glicano, un polímero (por ejemplo, PEG), un resto catiónico

A continuación, se describen ejemplos de agentes modificadores de plantas heterólogos (por ejemplo, péptidos o ácidos nucleicos) que se pueden usar en las composiciones y métodos modificadores de plantas descritos actualmente.

A. Polipéptidos

Las composiciones modificadoras de plantas (por ejemplo, PMP) descritas en el presente documento pueden incluir un polipéptido heterólogo. En algunos casos, las composiciones modificadoras de plantas descritas en el presente documento incluyen un polipéptido o fragmentos funcionales o derivado del mismo que modifica una planta (por ejemplo, por ejemplo, aumenta la aptitud de la planta). Por ejemplo, el polipéptido puede aumentar la aptitud de una planta. Una composición modificadora de plantas que incluye un polipéptido como se describe en el presente documento puede ponerse en contacto con una planta en una cantidad y durante un tiempo suficiente para: (a) alcanzar un nivel objetivo (por ejemplo, un nivel predeterminado o umbral) de

concentración de polipéptido; y (b) modificar la planta (por ejemplo, aumentar la aptitud de la planta).

Los ejemplos de polipéptidos que se pueden usar en el presente documento pueden incluir una enzima (por ejemplo, una recombinasa metabólica, una helicasa, una integrasa, una ARNasa, una ADNasa o una proteína de ubiquitinación), una proteína formadora de poros, un ligando de señalización, una célula que penetra péptido, un factor de transcripción, un receptor, un anticuerpo, un nanocuerpo, una proteína de edición genética (por ejemplo, sistema CRISPR-Cas, TALEN o dedo de zinc), riboproteína, un aptámero de proteína o una chaperona.

Los polipéptidos incluidos en el presente documento pueden incluir polipéptidos naturales o variantes producidas recombinantemente. En algunos casos, el polipéptido puede ser un fragmento funcional o variantes del mismo (por ejemplo, un fragmento enzimáticamente activo o una variante del mismo). Por ejemplo, el polipéptido puede ser una variante funcionalmente activa de cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento con al menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad, por ejemplo, sobre una región especificada o sobre la secuencia completa, a una secuencia de un polipéptido descrito aquí o un polipéptido natural. En algunos casos, el polipéptido puede tener al menos un 50% (por ejemplo, al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o más) de identidad con una proteína de interés.

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden formularse en una composición para cualquiera de los

usos descritos en el presente documento. Las composiciones descritas en el presente documento pueden incluir cualquier número o tipo (por ejemplo, clases) de polipéptidos, como al menos aproximadamente uno de 1 polipéptido, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 o más polipéptidos. Una concentración adecuada de cada polipéptido en la composición depende de factores tales como la eficacia, la estabilidad del polipéptido, el número de polipéptidos distintos en la composición, la formulación y los métodos de aplicación de la composición. En algunos casos, cada polipéptido en una composición líquida es de aproximadamente 0.1 ng/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En algunos casos, cada polipéptido en una composición sólida es de aproximadamente 0.1 ng/ga aproximadamente 100 mg/g.

Los métodos para fabricar un polipéptido son rutinarios en la técnica. Véase, en general, Smales & James (Eds.), *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press (2005); y Crommelin, Sindelar & Meibohm (Eds.), *Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications*, Springer (2013).

Los métodos para producir un polipéptido implican la expresión en células vegetales, aunque las proteínas recombinantes también se pueden producir usando células de insectos, levaduras, bacterias, células de mamíferos u otras células bajo el control de los promotores apropiados. Los vectores de expresión en mamíferos pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuado, o secuencias de 5' o 3' flanqueantes no transcritas, y secuencias de 5' o 3' no traducidas, como sitios de unión a ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios de donantes y aceptores de

empalmes y secuencias de terminación. Las secuencias de ADN derivadas del genoma viral SV40, por ejemplo, los sitios de origen SV40, promotor temprano, potenciador, empalme y poliadenilación, pueden usarse para proporcionar los otros
5 elementos genéticos requeridos para la expresión de una secuencia de ADN heterólogo. Los vectores de clonación y expresión apropiados para usar con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamíferos se describen en Green & Sambrook, Molecular Cloning: A
10 Laboratory Manual (Cuarta edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012).

Se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar y fabricar un agente polipéptido recombinante. Los ejemplos de sistemas de
15 expresión de mamíferos incluyen células CHO, células COS, líneas celulares HeLa y BHK. Los procesos de cultivo de células huésped para la producción de proteínas terapéuticas se describen, por ejemplo, en Zhou y Kantardjieff (Eds.), Cultivos de células de mamíferos para la fabricación de
20 productos biológicos (Avances en ingeniería bioquímica / biotecnología), Springer (2014). La purificación de proteínas se describe en Franks, Protein Biotechnology: Isolation, Characterization, and Stabilization, Humana Press (2013); y en Cutler, Protein Purification Protocols (Methods in
25 Molecular Biology), Humana Press (2010). Formulation of protein therapeutics is described in Meyer (Ed.), Therapeutic Proteína Drug Products: Practical Approaches to formulation in the Laboratory, Manufacturing, y the Clinic, Woodhead Publishing Series (2012).

30 En algunos casos, la composición modificadora de

plantas incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, un agente descrito aquí puede ser un anticuerpo que bloquea o potencia la actividad y/o función de un componente de la planta. El anticuerpo puede actuar como un antagonista o agonista de un polipéptido (por ejemplo, enzima o receptor celular) en la planta. La fabricación y el uso de anticuerpos contra un antígeno diana se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Zhiqiang An (Ed.), *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, 1st Edition, Wiley, 2009 and also Greenfield (Ed.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, 2a Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013, para métodos de fabricación de anticuerpos recombinantes, que incluyen ingeniería de anticuerpos, uso de oligonucleótidos degenerados, 5'-RACE, presentación de fagos y mutagénesis; prueba de anticuerpos y caracterización; farmacocinética y farmacodinámica de anticuerpos; purificación y almacenamiento de anticuerpos; y técnicas de cribado y etiquetado.

B. Ácidos Nucleicos

En algunos casos, los PMP descritas en el presente documento incluyen un ácido nucleico heterólogo. Numerosos ácidos nucleicos son útiles en las composiciones modificadoras de plantas y los métodos descritos en este documento. Las composiciones modificadoras de plantas descritas en el presente documento pueden incluir cualquier número o tipo (por ejemplo, clases) de ácidos nucleicos (por ejemplo, molécula de ADN o molécula de ARN, por ejemplo, ARNm, ARN guía (ARNg) o molécula inhibitoria de ARN (por ejemplo, ARNip, ARNsh), o ARNmi), o una molécula híbrida de ADN-ARN), como al menos aproximadamente 1 clase o variante de

un ácido nucleico, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 o más clases o variantes de ácidos nucleicos. Una concentración adecuada de cada ácido nucleico en la composición depende de factores tales como la eficacia, la estabilidad del ácido nucleico, el número de ácidos nucleicos distintos, la formulación y los métodos de aplicación de la composición. Los ejemplos de ácidos nucleicos útiles aquí incluyen un ARN antisentido, un sustrato dicer micro ARN interferentes (ARNdsi), un ARN interferente corto (ARNip), una horquilla corta (ARNsh), un ARNmicro (ARNmi), un ARNi (ARN interferente asimétrico), un ácido nucleico peptídico (PNA), un morfolino, Dpiwi (ARNpi), una ribozima, una desoxirribozima (ADNzima), un aptámero (ADN, ARN), un ARN circular (ARNcirc), un ARN guía (ARNg) o una molécula de ADN. El ácido nucleico se puede asociar con otros factores (por ejemplo, polipéptidos) de cualquier manera conocida en la técnica para garantizar que los ácidos nucleicos sean estables, por ejemplo, resistentes a la nucleasa. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden ser resistentes a las nucleasas cuando se complejan con proteínas.

Una composición modificadora de plantas que incluye un ácido nucleico como se describe en el presente documento puede ponerse en contacto con una planta en una cantidad y durante un tiempo suficiente para: (a) alcanzar un nivel objetivo (por ejemplo, un nivel predeterminado o umbral) de concentración de ácido nucleico; y (b) modificar la planta (por ejemplo, aumentar la aptitud de la planta).

(a) Péptidos De Codificación De Ácido Nucleico

En algunos casos, la composición modificadora de plantas incluye un ácido nucleico que codifica un

polipéptido. Los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido pueden tener una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50,000 nucleótidos (nts), aproximadamente 25 a aproximadamente 100 nts, aproximadamente 50 a aproximadamente 150 nts, aproximadamente 100 a aproximadamente 200 nts, aproximadamente 150 a aproximadamente 250 nts, aproximadamente 200 a aproximadamente 300 nts, aproximadamente 250 a aproximadamente 350 nts, aproximadamente 300 a aproximadamente 500 nts, aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 nts, aproximadamente 50 a aproximadamente 1000 nts, aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 nts, aproximadamente 1000 a aproximadamente 2000 nts, aproximadamente 2000 a aproximadamente 3000 nts, aproximadamente 3000 a aproximadamente 4000 nts, aproximadamente 4000 a aproximadamente 5000 nts, aproximadamente 5000 a aproximadamente 6000 nts, aproximadamente 6000 a aproximadamente 7000 nts, aproximadamente 7000 a aproximadamente 8000 nts, aproximadamente 8000 a aproximadamente 9000 nts, aproximadamente 9000 a aproximadamente 10,000 nts, aproximadamente 10,000 a aproximadamente 15,000 nts, aproximadamente 10,000 a aproximadamente 20,000 nts, aproximadamente 10,000 a aproximadamente 25,000 nts, aproximadamente 10,000 a aproximadamente 30,000 nts, aproximadamente 10,000 a aproximadamente 40,000 nts, aproximadamente 10,000 a aproximadamente 45,000 nts, aproximadamente 10,000 a aproximadamente 50,000 nts, o cualquier rango entre ellos.

La composición modificadora de plantas también puede

incluir variantes funcionalmente activas de una secuencia de ácido nucleico de interés. En algunos casos, la variante de los ácidos nucleicos tiene al menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad, por ejemplo, sobre una región especificada o sobre la secuencia completa, a una secuencia de un ácido nucleico de interés. En algunos casos, la invención incluye un polipéptido funcionalmente activo codificado por una variante de ácido nucleico como se describe aquí. En algunos casos, el polipéptido funcionalmente activo codificado por la variante de ácido nucleico tiene al menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad, por ejemplo, sobre una región especificada o sobre la secuencia de aminoácidos completa, a una secuencia de un polipéptido de interés o la secuencia de polipéptidos derivados naturalmente.

Ciertos métodos para expresar un ácido nucleico que codifica una proteína pueden implicar la expresión en células, incluyendo insectos, levaduras, plantas, bacterias u otras células bajo el control de los promotores apropiados. Los vectores de expresión pueden incluir elementos no transcritos, tales como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados, y otras secuencias no transcritas flanqueantes 5' o 3', y secuencias no traducidas 5' o 3' tales como sitios de unión a ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, empalme sitios donantes y aceptores, y secuencias de terminación. Las secuencias de ADN derivadas del genoma viral SV40, por ejemplo, los sitios de origen

SV40, promotor temprano, potenciador, empalme y poliadenilación, pueden usarse para proporcionar los otros elementos genéticos requeridos para la expresión de una secuencia de ADN heterólogo. Los vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamíferos se describen en Green et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cuarta edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

La modificación genética usando métodos recombinantes es generalmente conocida en la técnica. Se puede obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen deseado utilizando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, seleccionando bibliotecas de células que expresan el gen, derivando el gen de un vector que se sabe que incluye el mismo, o aislando directamente de células y tejidos que lo contienen, utilizando técnicas estándar. Alternativamente, un gen de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

La expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos se logra típicamente uniéndolos operativamente un ácido nucleico que codifica el gen de interés a un promotor, e incorporando la construcción en un vector de expresión. Los vectores de expresión pueden ser adecuados para la replicación y expresión en bacterias. Los vectores de expresión también pueden ser adecuados para la replicación e integración en eucariotas. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

Elementos promotores adicionales, por ejemplo, potenciadores, regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Típicamente, estos se encuentran en la región 30-110 pares de bases (pb) aguas arriba del sitio de inicio, aunque recientemente se ha demostrado que varios promotores también contienen elementos funcionales aguas abajo del sitio de inicio. El espacio entre los elementos promotores con frecuencia es flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven uno con respecto al otro. En el promotor de timidina quinasa (tk), el espacio entre los elementos del promotor se puede aumentar a 50 pb de separación antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de manera cooperativa o independiente para activar la transcripción.

Un ejemplo de un promotor adecuado es el citomegalovirus temprano inmediato (CMV) secuencia promotora. Esta secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte capaz de conducir altos niveles de expresión de cualquier secuencia polinucleotídica unida operativamente a la misma. Otro ejemplo de un promotor adecuado es el factor de crecimiento de alargamiento-1 α (EF-1 α). Sin embargo, también se pueden usar otras secuencias promotoras constitutivas, que incluyen, entre otras, el promotor temprano del virus simio 40 (SV40), el virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor de repetición terminal larga (LTR) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), MoMuLV promotor, un promotor del virus de la leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-

Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos tales como, entre otros, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y El promotor de la creatina quinasa.

5 Alternativamente, el promotor puede ser un promotor inducible. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de activar la expresión de la secuencia de polinucleótidos que está unida operativamente cuando se desea dicha expresión, o apagar la expresión cuando
10 no se desea la expresión. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.

El vector de expresión a introducir también puede
15 contener un gen marcador seleccionable o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de células de expresión de la población de células que se busca transfectar o infectar a través de vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede transportarse en un
20 fragmento de ADN separado y usarse en un procedimiento de cotransfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes informadores pueden estar flanqueados con secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células huésped. Los marcadores seleccionables útiles
25 incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como neo y similares.

Los genes informadores pueden usarse para identificar células potencialmente transformadas y para evaluar la funcionalidad de secuencias reguladoras. En general, un gen
30 indicador es un gen que no está presente en la fuente del

receptor o que no lo expresa y que codifica un polipéptido cuya expresión se manifiesta por alguna propiedad fácilmente detectable, por ejemplo, actividad enzimática. La expresión del gen informador se analiza en un momento adecuado después de que el ADN se haya introducido en las células receptoras. Los genes informadores adecuados pueden incluir genes que codifican luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada o el gen de la proteína fluorescente verde (por ejemplo, Ui-Tei et al., FEBS Letters 479: 79-82, 2000). Los sistemas de expresión adecuados son bien conocidos y pueden prepararse usando técnicas conocidas u obtenerse comercialmente. En general, la construcción con la región flanqueante mínima de 5' que muestra el nivel más alto de expresión del gen informador se identifica como el promotor. Dichas regiones promotoras pueden estar vinculadas a un gen indicador y usarse para evaluar a los agentes para la capacidad de modular la transcripción impulsada por el promotor.

En algunos casos, un organismo puede modificarse genéticamente para alterar la expresión de una o más proteínas. La expresión de una o más proteínas puede modificarse durante un tiempo específico, por ejemplo, el estado de desarrollo o diferenciación del organismo. En un caso, la invención incluye una composición para alterar la expresión de una o más proteínas, por ejemplo, proteínas que afectan la actividad, estructura o función. La expresión de una o más proteínas puede estar restringida a una (s) ubicación (es) específica (s) o generalizada en todo el organismo.

(b) ARNm Sintético

La composición modificadora de plantas puede incluir una molécula de ARNm sintética, por ejemplo, una molécula de ARNm sintética que codifica un polipéptido. La molécula de ARNm sintético puede modificarse, por ejemplo, químicamente. La molécula de ARNm puede sintetizarse químicamente o transcribirse in vitro. La molécula de ARNm puede disponerse en un plásmido, por ejemplo, un vector viral, un vector bacteriano o un vector de expresión eucariota. En algunos ejemplos, la molécula de ARNm puede administrarse a las células mediante transfección, electroporación o transducción (por ejemplo, transducción adenoviral o lentiviral).

En algunos casos, el agente de ARN modificado de interés descrito en este documento tiene nucleósidos o nucleótidos modificados. Dichas modificaciones son conocidas y se describen, por ejemplo, en el documento WO 2012/019168. Se describen modificaciones adicionales, por ejemplo, en el documento WO 2015/038892; WO 2015/038892; WO 2015/089511; WO 2015/196130; WO 2015/196118 y WO 2015/196128 A2.

En algunos casos, el ARN modificado que codifica un polipéptido de interés tiene una o más modificaciones terminales, por ejemplo, una estructura de tapa de 5' y/o una cola poli-A (por ejemplo, de entre 100 y 200 nucleótidos de longitud). La estructura de la tapa 5' se puede seleccionar del grupo que consiste en Cap0, Cap1, ARCA, inosina, N1-metil-guanosina, 2'fluoro-guanosina, 7-deaza-guanosina, 8-oxo-guanosina, 2-amino-guanosina, LNA-guanosina y 2-azido-guanosina. En algunos casos, los ARN modificados también contienen un 5' UTR que incluye al menos una secuencia de Kozak y un 3' UTR. Dichas modificaciones son conocidas y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2012/135805 y WO

2013/052523. Se describen modificaciones terminales adicionales, por ejemplo, en los documentos WO 2014/164253 y WO 2016/011306, WO 2012/045075 y WO 2014/093924. En el documento WO 2014/028429 se describen enzimas quiméricas para sintetizar moléculas de ARN protegidas (por ejemplo, ARNm modificado) que pueden incluir al menos una modificación química.

En algunos casos, un ARNm modificado se puede ciclar, o concatemerizar, para generar una molécula competente en traducción para ayudar a las interacciones entre las proteínas de unión de poli-A y las proteínas de unión de extremo 5'. El mecanismo de ciclación o concatemerización puede ocurrir a través de al menos 3 rutas diferentes: 1) química, 2) enzimática y 3) catalizada por ribozima. El enlace 5'-/3' recién formado puede ser intramolecular o intermolecular. Dichas modificaciones se describen, por ejemplo, en el documento WO 2013/151736.

Los métodos para fabricar y purificar ARN modificados son conocidos y se describen en la técnica. Por ejemplo, los ARN modificados se elaboran utilizando solo síntesis enzimática de transcripción in vitro (IVT). Los métodos para preparar polinucleótidos IVT son conocidos en la técnica y se describen en WO 2013/151666, WO 2013/151668, WO 2013/151663, WO 2013/151669, WO 2013/151670, WO 2013/151664, WO 2013/151665, WO 2013/151671, WO 2013/151672, WO 2013/151667 y WO 2013/151736. Los métodos de purificación incluyen la purificación de una transcripción de ARN que incluye una cola de poliA poniendo en contacto la muestra con una superficie unida a una pluralidad de timidinas o derivados de la misma y/o una pluralidad de uracilos o derivados de la misma (poliT

/ U) en condiciones tales que la transcripción de ARN se une a la superficie y eluye el transcrito de ARN purificado de la superficie (documento WO 2014/152031); usando cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, anión) que permite la separación de ARN más largos de hasta 10,000 nucleótidos de longitud mediante un método escalable (documento WO 2014/144767); y someter una muestra de ARNm modificada al tratamiento con ADNsa (documento WO 2014/152030).

Las formulaciones de ARN modificados son conocidas y se describen, por ejemplo, en el documento WO 2013/090648. Por ejemplo, la formulación puede ser, pero no se limita a, nanopartículas, microesferas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), lipidoides, lipoplex, liposoma, polímeros, carbohidratos (incluidos azúcares simples), lípidos catiónicos, gel de fibrina, hidrogel de fibrina, pegamento de fibrina, sellador de fibrina, fibrinógeno, trombina, nanopartículas lipídicas eliminadas rápidamente (reLNP) y combinaciones de las mismas.

Los ARN modificados que codifican polipéptidos en los campos de enfermedades humanas, anticuerpos, virus y una variedad de entornos in vivo son conocidos y se describen, por ejemplo, en la Tabla 6 de las Publicaciones Internacionales Nos. WO 2013/151666, WO 2013/151668, WO 2013/151663, WO 2013/151669, WO 2013/151670, WO 2013/151664, WO 2013/151665, WO 2013/151736; Tablas 6 y 7 Publicación internacional N° WO 2013/151672; Tablas 6, 178 y 179 de la Publicación internacional No. WO 2013/151671; Tablas 6, 185 y 186 de la publicación internacional no WO 2013/151667. Cualquiera de los anteriores puede sintetizarse como un polinucleótido IVT, un polinucleótido quimérico o un

polinucleótido circular, y cada uno puede incluir uno o más nucleótidos modificados o modificaciones terminales.

(c) ARN Inhibidor

En algunos casos, la composición modificadora de plantas incluye una molécula inhibitoria de ARN, por ejemplo, que actúa a través de la vía de interferencia de ARN (ARNi). En algunos casos, la molécula inhibitoria de ARN disminuye el nivel de expresión génica en una planta y/o disminuye el nivel de una proteína en la planta. En algunos casos, la molécula inhibitoria de ARN inhibe la expresión de un gen vegetal. Por ejemplo, una molécula inhibitoria de ARN puede incluir un ARN interferente corto, un ARN de horquilla corto y/o un ARNmico que se dirige a un gen en la planta. Ciertas moléculas de ARN pueden inhibir la expresión génica a través del proceso biológico de interferencia de ARN (ARNi). Las moléculas de ARNi incluyen estructuras similares a ARN o ARN que típicamente contienen 15-50 pares de bases (como aproximadamente 18-25 pares de bases) y que tienen una secuencia de nucleobase idéntica (complementaria) o casi idéntica (sustancialmente complementaria) a una secuencia codificante en un gen objetivo expresado dentro de la célula. Las moléculas de ARNi incluyen, pero no se limitan a: un sustrato dicer micro ARN interferente (ARNdsi), ARN interferentes cortos (ARNip), ARN de doble cadena (ARNdc), ARN de horquilla corta (ARNsh), meroduplexes, sustratos de dicer e interferencia de ARN multivalente (Patentes de EE. UU. 8.084.599 8,349,809, 8.513.207 y 9.200.276). Un ARNsh es una molécula de ARN que incluye un giro en horquilla que disminuye la expresión de genes diana a través de ARNi. Los ARNsh pueden administrarse a las células en forma de

plásmidos, por ejemplo, vectores virales o bacterianos, por ejemplo, por transfección, electroporación o transducción). Un ARNmicro es una molécula de ARN no codificante que típicamente tiene una longitud de aproximadamente 22 nucleótidos. Los ARNmi se unen a los sitios objetivo en las moléculas de ARNm y silencian el ARNm, por ejemplo, al causar la escisión del ARNm, la desestabilización del ARNm y/o la inhibición de la traducción del ARNm. En algunos casos, la molécula inhibitoria de ARN disminuye el nivel o actividad de un regulador negativo de la función. En otros casos, la molécula inhibidora de ARN disminuye el nivel y/o actividad de un inhibidor de un regulador positivo de la función. La molécula inhibitoria de ARN puede sintetizarse químicamente o transcribirse in vitro.

En algunos casos, el ácido nucleico es un ADN, un ARN o un PNA. En algunos casos, el ARN es un ARN inhibidor. En algunos casos, el ARN inhibidor inhibe la expresión génica en una planta. En algunos casos, el ácido nucleico es un ARNm, un ARNm modificado o una molécula de ADN que, en la planta, aumenta la expresión de una enzima (por ejemplo, una recombinasa metabólica, una helicasa, una integrasa, una ARNasa, una ADNasa o una proteína de ubiquitinación), una proteína formadora de poros, un ligando de señalización, un péptido penetrante celular, un factor de transcripción, un receptor, un anticuerpo, un nanocuerpo, una proteína de edición génica (por ejemplo, sistema CRISPR-Cas, TALEN o dedo de zinc), riboproteína, un aptámero de proteínas o una chaperona. En algunos casos, el ácido nucleico es un ARNm, un ARNm modificado o una molécula de ADN que aumenta la expresión de una enzima (por ejemplo, una enzima metabólica,

una enzima recombinasa, una enzima helicasa, una enzima integrasa, una enzima ARNasa, una enzima ADNse, o una proteína de ubiquitinación), una proteína formadora de poros, un ligando de señalización, un péptido penetrante celular, un factor de transcripción, un receptor, un anticuerpo, un nanocuerpo, una proteína de edición de genes (por ejemplo, un sistema CRISPR-Cas, un TALEN, o un dedo de zinc), una riboproteína, un aptámero de proteína o una chaperona. En algunos casos, el aumento en la expresión en la planta es un aumento en la expresión de aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100% en relación con un nivel de referencia (por ejemplo, la expresión en una planta no tratada). En algunos casos, el aumento en la expresión en la planta es un aumento en la expresión de aproximadamente 2 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 25 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 75 veces, o aproximadamente 100 veces o más, en relación con un nivel de referencia (por ejemplo, la expresión en una planta no tratada).

En algunos casos, el ácido nucleico es un ARN antisentido, un ARNip, un ARNsh, un ARNmi, un ARNai, un PNA, un morfolino, un LNA, un ARNpi, una ribozima, una ADNzima, un aptámero (ADN, ARN), un ARNcirc, un ARNg o moléculas de ADN (por ejemplo, un polinucleótido antisentido) para reducir, en la planta, la expresión de, por ejemplo, una enzima (una enzima metabólica, una enzima recombinasa, una enzima helicasa, una enzima integrasa, una ARNasa enzima, una enzima ADNsa, una enzima polimerasa, una proteína de

ubiquitinaación, una enzima de control de superóxido o una enzima de producción de energía), un factor de transcripción, una proteína secretora, un factor estructural (actina, quinesina o tubulina), una riboproteína, un aptámero de proteínas, una chaperona, un receptor, un ligando de señalización o un transportador. En algunos casos, la disminución en la expresión en la planta es una disminución en la expresión de aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100% en relación con un nivel de referencia (por ejemplo, la expresión en una planta no tratada). En algunos casos, la disminución de la expresión en la planta es una disminución de la expresión de aproximadamente 2 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 25 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 75 veces, o aproximadamente 100 veces o más, en relación con un nivel de referencia (por ejemplo, la expresión en una planta no tratada).

Las moléculas de ARNi incluyen una secuencia sustancialmente complementaria, o completamente complementaria, para todo o un fragmento de un gen diana. Las moléculas de ARNi pueden complementar secuencias en el límite entre intrones y exones para evitar la maduración de transcripciones de ARN nucleares recientemente generadas de genes específicos en ARNm para la transcripción. Las moléculas de ARNi complementarias de genes específicos pueden hibridarse con el ARNm para un gen objetivo y evitar su traducción. La molécula antisentido puede ser ADN, ARN o un derivado o híbrido del mismo. Los ejemplos de tales moléculas

derivadas incluyen, pero no se limitan a, ácido nucleico peptídico (PNA) y moléculas basadas en fosforotioato como la guanidina desoxirribonucleica (DNG) o la guanidina ribonucleica (RNG).

5 Las moléculas de ARNi pueden proporcionarse como ARN listo para usar sintetizado in vitro o como un gen antisentido transfectado en células que producirán moléculas de ARNi tras la transcripción. La hibridación con ARNm da como resultado la degradación de la molécula hibridada por
10 ARNasa H y/o la inhibición de la formación de complejos de traducción. Ambos resultan en una falla en la producción del producto del gen original.

La longitud de la molécula de ARNi que se hibrida con la transcripción de interés puede ser de aproximadamente 10
15 nucleótidos, entre aproximadamente 15 o 30 nucleótidos, o aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos. El grado de identidad de la secuencia antisentido para la transcripción dirigida puede ser al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos
20 90% o al menos 95.

Las moléculas de ARNi también pueden incluir voladizos, es decir, nucleótidos sobresalientes, típicamente no apareados, que no están directamente involucrados en la estructura helicoidal doble normalmente formada por las
25 secuencias centrales del par de hebras sentido y hebra antisentido definidas aquí. Las moléculas de ARNi pueden contener voladizos de 3' y/o 5' de aproximadamente 1-5 bases independientemente en cada una de las cadenas de sentido y cadenas antisentido. En algunos casos, tanto la cadena
30 sensorial como la cadena antisentido contienen voladizos de

3' y 5'. En algunos casos, uno o más de los nucleótidos salientes de 3' de una cadena de pares de bases con uno o más nucleótidos salientes de 5' de la otra cadena. En otros casos, uno o más de los nucleótidos salientes de 3' de una base de cadena no se emparejan con uno o más nucleótidos salientes de 5' de la otra cadena. Las cadenas sentido y antisentido de una molécula de ARNi pueden contener o no el mismo número de bases de nucleótidos. Las hebras antisentido y sentido pueden formar un dúplex en donde el extremo 5' solo tiene un extremo romo, el extremo 3' solo tiene un extremo romo, los extremos 5' y 3' son extremos romos, ni el extremo 5' ni el extremo 3' son extremos romos. En otro caso, uno o más de los nucleótidos en el voladizo contiene un tiofosfato, fosforotioato, desoxinucleótido invertido (unido de 3 a 3) o es un ribonucleótido o desoxinucleótido modificado.

Las moléculas pequeñas de ARN interferente (ARNsi) incluyen una secuencia de nucleótidos que es idéntica a aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleótidos contiguos del ARNm objetivo. En algunos casos, la secuencia de ARNip comienza con el dinucleótido AA, incluye un contenido de GC de aproximadamente 30-70% (aproximadamente 30-60%, aproximadamente 40-60% o aproximadamente 45%-55%), y no tiene un alto porcentaje de identidad con cualquier secuencia de nucleótidos distinta de la diana en el genoma en donde se va a introducir, por ejemplo, según lo determinado por la búsqueda BLAST estándar.

Los ARNpi y los ARNsh se asemejan a intermedios en la ruta de procesamiento de los genes endógenos de ARNmicro (ARNmi) (Bartel, Cell 116: 281-297, 2004). En algunos casos, los ARNip pueden funcionar como ARNmi y viceversa (Zeng et

al., Mol. Cell 9: 1327-1333, 2002; Doench et al., Genes Dev. 17: 438-442, 2003). Los ARNip exógenos regulan negativamente los ARNm con complementariedad de la semilla con respecto al ARNip (Birmingham et al., Nat. Methods 3: 199-204, 2006).
5 Múltiples sitios objetivo dentro de un UTR de 3' dan una regulación descendente más fuerte (Doench et al., Genes Dev. 17: 438-442, 2003).

Las secuencias de ARNsi efectivas conocidas y los sitios de unión afines también están bien representados en la literatura relevante. Las moléculas de ARNi se diseñan y producen fácilmente mediante tecnologías conocidas en la técnica. Además, existen herramientas computacionales que aumentan la posibilidad de encontrar motivos de secuencia efectivos y específicos (Pei et al., Nat. Methods 3 (9): 670-
10 676, 2006; Reynolds et al., Nat. Biotechnol. 22 (3): 326-330, 2004; Khvorova et al., Nat. Struct. Biol. 10 (9): 708-712, 2003; Schwarz et al., Cell 115 (2): 199-208, 2003; Ui-Tei et al., Nucleic Acids Res. 32 (3): 936-948, 2004; Heale et al., Nucleic Acids Res. 33 (3): e30, 2005; Chalk et al., Biochem.
15 Biophys. Res. Commun. 319 (1): 264-274, 2004; y Amarzguioui et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 316 (4): 1050-1058, 2004).

La molécula de ARNi modula la expresión de ARN codificado por un gen. Debido a que múltiples genes pueden compartir cierto grado de homología de secuencia entre sí, en algunos casos, la molécula de ARNi puede diseñarse para dirigirse a una clase de genes con suficiente homología de secuencia. En algunos casos, la molécula de ARNi puede contener una secuencia que tiene complementariedad con
25 secuencias que se comparten entre diferentes objetivos
30

genéticos o que son únicas para un objetivo genético específico. En algunos casos, la molécula de ARNi puede diseñarse para dirigirse a regiones conservadas de una secuencia de ARN que tiene homología entre varios genes y, por lo tanto, dirigirse a varios genes en una familia de genes (por ejemplo, diferentes isoformas de genes, variantes de empalme, genes mutantes, etc.). En algunos casos, la molécula de ARNi puede diseñarse para apuntar a una secuencia que es única para una secuencia de ARN específica de un solo gen.

Una molécula inhibitoria de ARN puede modificarse, por ejemplo, para contener nucleótidos modificados, por ejemplo, 2'-fluoro, 2'-o-metilo, 2'-desoxi, ácido nucleico desbloqueado, 2'-hidroxi, fosforotioato, 2'-tiouridina, 4'-tiouridina, 2'-desoxiuridina. Sin limitarse a la teoría, se cree que tales modificaciones pueden aumentar la resistencia a la nucleasa y/o la estabilidad del suero, o disminuir la inmunogenicidad.

En algunos casos, la molécula de ARNi está unida a un polímero de suministro a través de un enlace o enlazador fisiológicamente lábil. El conector fisiológicamente lábil se selecciona de manera que sufra una transformación química (por ejemplo, escisión) cuando está presente en ciertas condiciones fisiológicas (por ejemplo, enlace disulfuro escindido en el entorno reductor del citoplasma celular). La liberación de la molécula del polímero, mediante la escisión del enlace fisiológicamente lábil, facilita la interacción de la molécula con los componentes celulares apropiados para la actividad.

El conjugado de molécula de ARNi-polímero puede

formarse uniendo covalentemente la molécula al polímero. El polímero se polimeriza o modifica de modo que contenga un grupo reactivo A. La molécula de ARNi también se polimeriza o modifica de modo que contenga un grupo reactivo B. Los grupos reactivos A y B se eligen de modo que puedan unirse mediante un enlace covalente reversible utilizando métodos conocidos en la técnica.

La conjugación de la molécula de ARNi con el polímero se puede realizar en presencia de un exceso de polímero. Debido a que la molécula de ARNi y el polímero pueden tener una carga opuesta durante la conjugación, la presencia de un exceso de polímero puede reducir o eliminar la agregación del conjugado. Alternativamente, se puede usar un exceso de un polímero portador, tal como un polication. El exceso de polímero puede eliminarse del polímero conjugado antes de la administración del conjugado. Alternativamente, el exceso de polímero puede coadministrarse con el conjugado.

La fabricación y el uso de agentes inhibidores basados en ARN no codificante, como ribozimas, ARNasa P, ARNip y ARNmi, también se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en Sioud, RNA Therapeutics: Function, Design, and Delivery (Methods en biología molecular). Prensa de Humana (2010).

(d) Edición De Genes

Las composiciones modificadoras de plantas descritas en el presente documento pueden incluir un componente de un sistema de edición de genes. Por ejemplo, el agente puede introducir una alteración (por ejemplo, Inserción, delección (por ejemplo, Eliminación), translocación, inversión, mutación de un solo punto u otra mutación) en un gen en la

planta. Los sistemas ejemplares de edición de genes incluyen las nucleasas de dedo de zinc (ZFN), las nucleasas basadas en efectores similares a activadores de la transcripción (TALEN) y el sistema de repetición palindrómica corta espaciada entrecruzada reguladora (CRISPR). Los métodos basados en ZFN, TALEN y CRISPR se describen, por ejemplo, en Gaj et al., Trends Biotechnol. 31 (7): 397-405, 2013.

En un sistema CRISPR / Cas típico, una endonucleasa se dirige a una secuencia de nucleótidos diana (por ejemplo, Un sitio en el genoma que se debe editar en secuencia) mediante ARN de guía no codificantes específicos de secuencia que se dirigen a uno o dos secuencias de ADN trenzadas. Se han identificado tres clases (I-III) de sistemas CRISPR. Los sistemas CRISPR de clase II utilizan una única endonucleasa Cas (en lugar de múltiples proteínas Cas). Un sistema CRISPR de clase II incluye una endonucleasa Cas de tipo II como Cas9, un ARN CRISPR (ARNcr) y un ARNcr transactivador (traARNcr). El ARNcr contiene un ARN guía, es decir, típicamente una secuencia de ARN de aproximadamente 20 nucleótidos que corresponde a una secuencia de ADN objetivo. El ARNcr también contiene una región que se une al ARNcr para formar una estructura parcialmente bicatenaria que es escindida por la ARNasa III, dando como resultado un híbrido ARNcr / traARNcr. Los ARN sirven como guías para dirigir las proteínas Cas para silenciar secuencias específicas de ADN / ARN, dependiendo de la secuencia espaciadora. Ver, por ejemplo, Horvath et al., Science 327: 167-170, 2010; Makarova et al., Biology Direct 1: 7, 2006; Pennisi, Science 341: 833-836, 2013. La secuencia de ADN objetivo generalmente debe ser adyacente a un motivo adyacente protospacer (PAM) que es

específico para una endonucleasa Cas determinada; sin embargo, las secuencias PAM aparecen en un genoma dado. Las endonucleasas CRISPR identificadas a partir de varias especies procariotas tienen requisitos únicos de secuencia PAM; ejemplos de secuencias PAM incluyen 5'-NGG (SEQ ID NO: 1) (*Streptococcus pyogenes*), 5'-NNAGAA (SEQ ID NO: 2) (*Streptococcus thermophilus* CRISPR1), 5'-NGGNG (SEQ ID NO: 3) (*Streptococcus thermophilus* CRISPR3) y 5'-NNNGATT (SEQ ID NO: 4) (*meningitidis* por *Neisseria*). Algunas endonucleasas, por ejemplo, Las endonucleasas Cas9, están asociadas con sitios PAM ricos en G, por ejemplo, 5'-NGG (SEQ ID NO: 1), y realizan la escisión de extremo romo del ADN objetivo en una ubicación a 3 nucleótidos aguas arriba de (5' desde) el sitio PAM. Otro sistema CRISPR de clase II incluye la endonucleasa tipo V Cpf1, que es más pequeña que Cas9; Los ejemplos incluyen AsCpf1 (de *Acidaminococcus* sp.) y LbCpf1 (de *Lachnospiraceae* sp.). Las matrices CRISPR asociadas a Cpf1 se procesan en ARNcrs maduros sin el requisito de un traARNcr; en otras palabras, un sistema Cpf1 requiere solo la nucleasa Cpf1 y un ARNcr para escindir la secuencia de ADN objetivo. Las endonucleasas Cpf1 están asociadas con sitios PAM ricos en T, por ejemplo, 5'-TTN (SEQ ID NO: 5). Cpf1 también puede reconocer un motivo 5'-CTA PAM (SEQ ID NO: 6). Cpf1 escinde el ADN objetivo mediante la introducción de una rotura de doble cadena escalonada o desplazada con un voladizo de 4 o 5 nucleótidos 5' , por ejemplo, escindiendo un ADN objetivo con un desplazamiento de 5 nucleótidos o corte escalonado ubicado 18 nucleótidos aguas abajo de (3' desde) del sitio PAM en la cadena de codificación y 23 nucleótidos aguas abajo del sitio PAM en la cadena complementaria; El voladizo de 5 nucleótidos

que resulta de tal escisión compensatoria permite una edición más precisa del genoma por inserción de ADN por recombinación homóloga que por inserción en el ADN cortado de extremo romo. Ver, por ejemplo, Zetsche et al., Cell 163: 759-771, 2015.

5 A los fines de la edición de genes, las matrices CRISPR pueden diseñarse para contener una o múltiples secuencias de ARN guía correspondientes a una secuencia de ADN diana deseada; ver, por ejemplo, Cong et al., Science 339: 819-823, 2013; Ran et al., Nature Protocols 8: 2281-2308, 2013. Cas9
10 requiere al menos aproximadamente 16 o 17 nucleótidos de la secuencia de ARNg para que se produzca la escisión del ADN; para Cpf1 se necesitan al menos aproximadamente 16 nucleótidos de secuencia de ARNg para lograr la escisión de ADN detectable. En la práctica, las secuencias de ARN guía
15 generalmente están diseñadas para tener una longitud de entre 17-24 nucleótidos (por ejemplo, 19, 20 o 21 nucleótidos) y complementariedad con el gen objetivo o la secuencia de ácido nucleico. Los generadores y algoritmos de ARNg personalizados están disponibles comercialmente para su uso en el diseño de
20 ARN guía efectivos. La edición de genes también se ha logrado utilizando un ARN guía quimérico único (sARNg), una molécula de ARN simple diseñada (sintética) que imita un complejo ARNcr-traARNcr natural y contiene tanto un traARNcr (para unir la nucleasa) como al menos un ARNcr (para guiar la
25 nucleasa a la secuencia destinada a la edición). También se ha demostrado que los sARNg modificados químicamente son efectivos en la edición del genoma; ver, por ejemplo, Hendel et al., Nature Biotechnol. 985-991, 2015. En algunos casos, los agentes modificadores de plantas heterólogos incluyen una
30 ribonucleoproteína compleja (RNP) que comprende una o más

moléculas ARN, por ejemplo, una ARNg o una sARNg, y una o más proteínas unidas ARN, por ejemplo, una endonucleasa, por ejemplo, una endonucleasa Cas (por ejemplo, una endonucleasa Cas9).

5 Mientras que Cas9 de tipo salvaje genera roturas rupturas de doble cadena (DSB) en secuencias de ADN específicas dirigidas por un ARNg, están disponibles una serie de endonucleasas CRISPR que tienen funcionalidades modificadas, por ejemplo: una versión de nickasa de Cas9
10 genera solo una ruptura de cadena sencilla; un Cas9 catalíticamente inactivo (dCas9) no corta el ADN objetivo, pero interfiere con la transcripción por impedimento estérico. Además, dCas9 puede fusionarse con un efector para reprimir (CRISPRi) o activar (CRISPRa) la expresión de un gen
15 objetivo. Por ejemplo, Cas9 se puede fusionar con un represor transcripcional (por ejemplo, un dominio KRAB) o un activador transcripcional (por ejemplo, una fusión dCas9-VP64). Se puede utilizar un Cas9 catalíticamente inactivo (dCas9) fusionado con la nucleasa FokI (dCas9-FokI) para generar DSB
20 en secuencias diana homólogas a dos ARNg. Ver, por ejemplo, los numerosos plásmidos CRISPR / Cas9 divulgados y disponibles públicamente en el repositorio de Addgene (Addgene, 75 Sidney St., Suite 550A, Cambridge, MA 02139; addgene.org/crispr/). Ran et al., Cell 154: 1380-1389, 2013,
25 describen que una doble nickase Cas9 que introduce dos roturas separadas de doble cadena, cada una dirigida por un ARN guía separado, logra una edición más precisa del genoma.

La tecnología CRISPR para editar los genes de eucariotas se describe en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. US 2016/0138008 A1 y US 2015/0344912 A1, y
30

en las Patentes de EE. UU., 8,697,359, 8,771,945, 8,945,839, 8,999,641, 8,993,233, 8,895,308, 8,865,406, 8,889,478, 8,871,443, 8,889,356, 8,932,814, 8,795,965 y 8,906,616. La endonucleasa Cpf1 y los sitios de ARN y PAM de guía correspondientes se describen en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2016/0208243 A1.

En algunos casos, la modificación del genoma deseada implica una recombinación homóloga, en donde una o más rupturas de ADN bicatenario en la secuencia de nucleótidos diana es generada por la nucleasa guiada por ARN y el ARN (s) guía, seguido de la reparación de la (s) ruptura (s) utilizando un mecanismo de recombinación homóloga (reparación dirigida por homología). En tales casos, se proporciona a la célula o sujeto una plantilla de donante que codifica la secuencia de nucleótidos deseada para ser insertada o insertada en la ruptura de doble cadena; Los ejemplos de plantillas adecuadas incluyen plantillas de ADN de cadena sencilla y plantillas de ADN de cadena doble (por ejemplo, unidas al polipéptido descrito en el presente documento). En general, se proporciona una plantilla de donante que codifica un cambio de nucleótidos sobre una región de menos de aproximadamente 50 nucleótidos en forma de ADN monocatenario; Las plantillas de donantes más grandes (por ejemplo, más de 100 nucleótidos) a menudo se proporcionan como plásmidos de ADN bicatenarios. En algunos casos, la plantilla del donante se proporciona a la célula o al sujeto en una cantidad que es suficiente para lograr la reparación dirigida por homología deseada pero que no persiste en la célula o el sujeto después de un período de tiempo determinado (por ejemplo, después de uno o más ciclos de división celular). En algunos casos, una

plantilla de donante tiene una secuencia de nucleótidos central que difiere de la secuencia de nucleótidos diana (por ejemplo, una región genómica endógena homóloga) en al menos 1, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, a al menos 40, al menos 50 o más nucleótidos. Esta secuencia central está flanqueada por brazos de homología o regiones de alta identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos objetivo; en algunos casos, las regiones de alta identidad incluyen al menos 10, al menos 50, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 600, al menos 750, o al menos 1000 nucleótidos en cada lado de la secuencia central. En algunos casos donde la plantilla del donante tiene la forma de un ADN monocatenario, la secuencia central está flanqueada por brazos de homología que incluyen al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, o al menos 100 nucleótidos en cada lado de la secuencia central. En los casos en que la plantilla del donante tiene la forma de un ADN bicatenario, la secuencia central está flanqueada por brazos de homología que incluyen al menos 500, al menos 600, al menos 700, al menos 800, al menos 900 o al menos 1000 nucleótidos en cada lado de la secuencia central. En un caso, se introducen dos roturas separadas de doble cadena en la secuencia de nucleótidos objetivo de la célula o del sujeto con una doble nickasa Cas9 (véase Ran et al., Cell 154: 1380-1389, 2013), seguido de la entrega de la plantilla de donante.

En algunos casos, la composición incluye un ARNg y una nucleasa dirigida, por ejemplo, un Cas9, por ejemplo, un Cas9 de tipo salvaje, una Casasa de nickasa (por ejemplo, Cas9

D10A), un Cas9 muerto (dCas9), eSpCas9, Cpf1, C2C1 o C2C3, o un ácido nucleico que codifica dicha nucleasa. La elección de nucleasa y ARNg se determina por si la mutación dirigida es una delección, sustitución o adición de nucleótidos, por ejemplo, una eliminación, sustitución o adición de nucleótidos a una secuencia dirigida. Las fusiones de una endonucleasa catalíticamente inactiva, por ejemplo, un Cas9 muerto (dCas9, por ejemplo, D10A; H840A) atado con todo o una parte de (por ejemplo, la parte biológicamente activa de) un (uno o más) dominios efectores crean proteínas quiméricas que pueden unirse al polipéptido para guiar la composición a sitios de ADN específicos mediante una o más secuencias de ARN (sARNg) para modular la actividad y/o expresión de una o más secuencias de ácidos nucleicos diana. En algunos casos, la ARNg y la nucleasa dirigida son provistas como una ribonucleoproteína compleja (RNP).

En algunos casos, el agente incluye una guía de ARN (ARNg) para usar en un sistema CRISPR para la edición de genes. En algunos casos, el agente incluye una nucleasa de dedo de zinc (ZFN), o un ARNm que codifica un ZFN, que se dirige (por ejemplo, corta) una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de ADN) de un gen en la planta. En algunos casos, el agente incluye un TALEN, o un ARNm que codifica un TALEN, que se dirige (por ejemplo, corta) una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de ADN) en un gen en la planta.

Por ejemplo, el ARNg se puede utilizar en un sistema CRISPR para diseñar una alteración en un gen en la planta. En otros ejemplos, el ZFN y/o el TALEN pueden usarse para diseñar una alteración en un gen en la planta. Las

alteraciones ejemplares incluyen inserciones, deleciones (por ejemplo, Knockouts), translocaciones, inversiones, mutaciones de un solo punto u otras mutaciones. La alteración se puede introducir en el gen en una célula, por ejemplo, in vitro, ex vivo o in vivo. En algunos ejemplos, la alteración aumenta el nivel y/o actividad de un gen en la planta. En otros ejemplos, la alteración disminuye el nivel y/o la actividad de (por ejemplo, derriba o elimina) un gen en la planta. En otro ejemplo más, la alteración corrige un defecto (por ejemplo, una mutación que causa un defecto) en un gen en la planta.

En algunos casos, el sistema CRISPR se usa para editar (por ejemplo, para agregar o eliminar un par de bases) un gen objetivo en la planta. En otros casos, el sistema CRISPR se usa para introducir un codón de parada prematuro, por ejemplo, disminuyendo así la expresión de un gen diana. En otros casos, el sistema CRISPR se usa para desactivar un gen objetivo de manera reversible, por ejemplo, de manera similar a la interferencia de ARN. En algunos casos, el sistema CRISPR se usa para dirigir a Cas a un promotor de un gen, bloqueando estéricamente una ARN polimerasa.

En algunos casos, se puede generar un sistema CRISPR para editar un gen en la planta, utilizando la tecnología descrita, por ejemplo, en la Publicación de los Estados Unidos Núm. 20140068797, Cong, Science 339: 819-823, 2013; Tsai, Nature Biotechnol. 32: 6 569-576, 2014; Patente de Estados Unidos N°: 8.871.445; 8.865.406; 8.795.965; 8.771.945; y 8.697.359.

En algunos casos, la técnica de interferencia CRISPR (CRISPRi) se puede utilizar para la represión transcripcional

de genes específicos en la planta. En CRISPRi, una proteína Cas9 diseñada (por ejemplo, dCas9 nula nucleasa o proteína de fusión dCas9, por ejemplo, fusión dCas9 - KRAB o dCas9 - SID4X) puede emparejarse con un ARN guía específico de secuencia (sARNg). El complejo Cas9-ARNg puede bloquear la ARN polimerasa, lo que interfiere con el alargamiento de la transcripción. El complejo también puede bloquear el inicio de la transcripción al interferir con la unión del factor de transcripción. El método CRISPRi es específico con efectos mínimos fuera del objetivo y es multiplexable, por ejemplo, puede reprimir simultáneamente más de un gen (por ejemplo, usando múltiples ARNg). Además, el método CRISPRi permite la represión genética reversible.

En algunos casos, la activación de genes mediada por CRISPR (CRISPRa) puede usarse para la activación transcripcional de un gen en la planta. En la técnica CRISPRa, las proteínas de fusión dCas9 reclutan activadores transcripcionales. Por ejemplo, dCas9 puede fusionarse con polipéptidos (por ejemplo, Dominios de activación) como VP64 o el dominio de activación p65 (p65D) y usarse con sARNg (por ejemplo, Un solo sARNg o múltiples sARNgs), para activar un gen o genes en la planta. Se pueden reclutar múltiples activadores mediante el uso de múltiples sARNg, lo que puede aumentar la eficiencia de activación. Se puede usar una variedad de dominios de activación y dominios de activación simples o múltiples. Además de diseñar dCas9 para reclutar activadores, los sARNg también pueden diseñarse para reclutar activadores. Por ejemplo, los aptámeros de ARN pueden incorporarse en un ARNg para reclutar proteínas (por ejemplo, dominios de activación) tales como VP64. En algunos ejemplos,

el sistema mediador de activación sinérgica (SAM) se puede utilizar para la activación transcripcional. En SAM, los aptámeros MS2 se agregan al sARNg. MS2 recluta la proteína de recubrimiento MS2 (MCP) fusionada con p65AD y el factor de choque térmico 1 (HSF1).

Las técnicas CRISPRi y CRISPRa se describen con mayor detalle, por ejemplo, en Domínguez et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 17: 5-15, 2016, incorporado aquí como referencia. Además, las modificaciones epigenéticas mediadas por dCas9 y la activación y represión simultáneas utilizando sistemas CRISPR, como se describe en Domínguez et al., Pueden usarse para modular un gen en la planta.

V. Kits

La presente invención también proporciona un kit para la modificación de plantas, donde el kit incluye un recipiente que tiene una composición modificadora de plantas descrita aquí. El kit puede incluir además material instructivo para aplicar o entregar (por ejemplo, a una planta) la composición modificadora de planta para modificar una planta de acuerdo con un método de la presente invención. El experto en la materia apreciará que las instrucciones para aplicar la composición modificadora de plantas en los métodos de la presente invención pueden ser cualquier forma de instrucción. Dichas instrucciones incluyen, entre otras, material de instrucción escrito (como una etiqueta, un folleto, un folleto), material de instrucción oral (como en un casete de audio o CD) o instrucciones de video (como en una cinta de video o DVD).

Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de los métodos de la

invención. Se entiende que se pueden practicar varias otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Tabla de contenidos (Ejemplos):

5	Ejemplo 1	Aislamiento de Paquetes de mensajeros de plantas de las plantas
	Ejemplo 2	Producción de Paquetes de mensajeros de plantas purificadas (PMP)
10	Ejemplo 3	Caracterización del paquete mensajero de planta
	Ejemplo 4	Caracterización de la estabilidad del Paquete mensajero de plantas
	Ejemplo 5	Carga de PMP con carga
15	Ejemplo 6	Modificación de una planta mediante entrega de plásmido mediada por PMP en planta
	Ejemplo 7	Modificación de una planta mediante suministro de ácido nucleico corto mediado por PMP
	Ejemplo 8	Modificación de una planta mediante suministro de plásmido mediado por PMP a protoplastos
20	Ejemplo 9	Producción PMP de jugo frutas mixtas usando ultra centrifugación y purificación gradiente sucrosa
25	Ejemplo 10	Producción PMP de jugo de frutas en mallas prensadas usando ultra centrifugación y purificación gradiente sucrosa
	Ejemplo 11	Producción PMP usando ultra centrifugación y cromatografía de exclusión por tamaño
30	Ejemplo 12	Escala de producción PMP usando Filtración de Flujo Tangencial y Cromatografía de exclusión por tamaño combinada con diálisis/EDTA para

	reducir los contaminantes
Ejemplo 13	Producción PMP del medio de cultivo de la célula vegetal
Ejemplo 14	Absorción de PMP por medio de células vegetales
Ejemplo 15	Absorción de PMP en plantas
Ejemplo 16	Tratamiento de plántulas Arabidopsis thaliana con toronja recargada DOX de PMP
Ejemplo 17	Absorción de pectinasa-tratada con PMP por brotes de alfalfa
Ejemplo 18	Modificación de PMP usando lípidos catiónicos
Ejemplo 19	Modificación de una planta por PMP-mediado entregado a ARNg

Ejemplo 1: Aislamiento De Paquetes mensajeros de plantas de las Plantas

Este ejemplo describe el aislamiento de paquetes mensajeros de plantas crudas (PMP) de diversas fuentes vegetales, incluyendo el apoplasto de la hoja, el apoplasto de la semilla, la raíz, la fruta, la verdura, el polen, el floema, la savia de xilema y el medio de cultivo de células vegetales.

Diseño experimental:

a) Aislamiento PMP del apoplasto de las hojas de Arabidopsis thaliana

Las semillas de Arabidopsis (Arabidopsis thaliana Col-0) se esterilizan superficialmente con un 50% de lejía y se siembran en placas con 0.53 de medio Murashige y Skoog que contienen un 0,8% de agar. Las semillas se vernalizan durante

2 días a 4°C antes de pasar a condiciones de días cortos (días de 9 h, 22°C, 150 μ Em-2). Después de 1 semana, las plántulas se transfieren a Pro-Mix PGX. Las plantas se cultivan durante 4-6 semanas antes de la cosecha.

5 Los PMP se aíslan del lavado apoplástico de rosetas de Arabidopsis de 4-6 semanas de edad, según lo descrito por Rutter e Innes, Plant Physiol. 173 (1): 728-741, 2017. Brevemente, se cosechan rosetas enteras en la raíz y se infiltran al vacío con tampón de aislamiento de vesículas
10 (MES 20 mM, CaCl₂ 2 mM y NaCl 0,1 M, pH 6). Las plantas infiltradas se secan cuidadosamente para eliminar el exceso de líquido, se colocan dentro de jeringas de 30 ml y se centrifugan en tubos cónicos de 50 ml a 700 g durante 20 minutos a 2°C para recoger el líquido extracelular
15 apoplástico que contiene EV. A continuación, el fluido extracelular de apoplast se filtra a través de un filtro de 0,85 μ m para eliminar partículas grandes, y se purifican PMP como se describe en el Ejemplo 2.

b) Aislamiento PMP del apoplasto de semillas de girasol

20 Las semillas de girasol intactas (*H. annuus* L.), y se embeben en agua durante 2 horas, se pelan para eliminar el pericarpio, y el líquido extracelular apoplástico se extrae mediante un procedimiento de infiltración-centrifugación al vacío modificado, adaptado de Regente et al, FEBS Letters.
25 583: 3363-3366, 2009. Brevemente, las semillas se sumergen en tampón de aislamiento de vesículas (MES 20 mM, CaCl₂ 2 mM y NaCl 0,1 M, pH 6) y se someten a tres pulsos de vacío de 10 segundos, separados por intervalos de 30 segundos a una presión de 45 kPa. Las semillas infiltradas se recuperan, se
30 secan en papel de filtro, se colocan en filtros de vidrio

fritos y se centrifugan durante 20 minutos a 400 g a 4°C. El fluido extracelular de apoplast se recupera, se filtra a través de un filtro de 0,85 µm para eliminar partículas grandes, y se purifican PMP como se describe en el Ejemplo 2.

5 c) Aislamiento PMP de las raíces de jengibre

Las raíces de rizoma de jengibre fresco (*Zingiber officinale*) se adquieren de un proveedor local y se lavan 3 veces con PBS. Se tritura un total de 200 gramos de raíces lavadas en una mezcladora (mezcladora Osterizer de 12
10 velocidades) a la velocidad más alta durante 10 minutos (pausa 1 minuto por cada 1 minuto de mezcla), y los PMP se aíslan como se describe en Zhuang et al., J Vesículas extracelulares. 4 (1): 28713, 2015. Brevemente, el jugo de jengibre se centrifuga secuencialmente a 1.000 g durante 10
15 min, 3,000 g durante 20 min y 10,000 g durante 40 min para eliminar partículas grandes del sobrenadante que contiene PMP. Los PMP se purifican como se describe en el Ejemplo 2.

d) Aislamiento PMP del jugo de toronja

Las toronjas frescas (*Citrus × paradise*) se compran a un proveedor local, se les quita la piel y la fruta se presiona manualmente o se muele en una batidora (mezcladora Osterizer de 12 velocidades) a la velocidad más alta durante 10 minutos (pausa 1 minuto para cada minuto de mezcla) para recolectar el jugo, según lo descrito por Wang et al.,
20 Molecular Therapy. 22 (3): 522-534, 2014 con modificaciones menores. Brevemente, el jugo / pulpa de jugo se centrifuga secuencialmente a 1.000 g durante 10 min, 3,000 g durante 20
25 min y 10,000 g durante 40 min para eliminar partículas grandes del sobrenadante que contiene PMP. Los PMP se purifican como se describe en el Ejemplo 2.
30

e) Aislamiento PMP de las cabezas de brócoli

Los PMP de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*) se aíslan como se describió anteriormente (Deng et al., Molecular Therapy, 25 (7): 1641-1654, 2017). Brevemente, el brócoli fresco se compra a un proveedor local, se lava tres veces con PBS y se muele en una mezcladora (mezcladora Osterizer de 12 velocidades) a la velocidad más alta durante 10 minutos (pausa 1 minuto por cada minuto de mezcla). El jugo de brócoli luego se centrifuga secuencialmente a 1,000g por 10 min, 3,000g por 20 min, y 10,000g por 40 min para eliminar partículas grandes del sobrenadante que contiene PMP. Los PMP se purifican como se describe en el Ejemplo 2.

f) Aislamiento PMP del polen de oliva

Los EV de polen de olivo (*Olea europaea*) se aíslan como se describió previamente en Prado et al., Molecular Plant. 7 (3): 573-577, 2014. Brevemente, el polen de aceituna (0.1 g) se hidrata en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de transferirlo a placas de Petri (15 cm de diámetro) que contienen 20 ml de medio de germinación: 10% sacarosa, 0.03% Ca (NO₃)₂, 0.01% KNO₃, 0.02% MgSO₄ y 0.03% H₃BO₃. El polen germina a 30°C en la oscuridad durante 16 h. Los granos de polen se consideran germinados solo cuando el tubo es más largo que el diámetro del grano de polen. El medio cultivado que contiene PMP se recoge y se elimina de los restos de polen mediante dos filtraciones sucesivas en filtros de 0,85 um por centrifugación. Los PMP se purifican como se describe en el Ejemplo 2.

g) Aislamiento PMP de savia de floema de Arabidopsis

Las semillas de Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* Col-0) se esterilizan superficialmente con un 50% de lejía y se

siembran en placas con 0.53 de medio Murashige y Skoog que contienen un 0,8% de agar. Las semillas se vernalizan durante 2 días a 4°C antes de pasar a condiciones de días cortos (días de 9 h, 22°C, 150 μEm^{-2}). Después de 1 semana, las plántulas se transfieren a Pro-Mix PGX. Las plantas se cultivan durante 4-6 semanas antes de la cosecha.

La savia del floema de hojas de roseto de *Arabidopsis* de 4 a 6 semanas de edad se recoge como se describe por Tetyuk et al., JoVE. 80, 2013. Brevemente, las hojas se cortan en la base del pecíolo, se apilan y se colocan en un tubo de reacción que contiene K2-EDTA 20 mM durante una hora en la oscuridad para evitar el sellado de la herida. Las hojas se retiran suavemente del recipiente, se lavan a fondo con agua destilada para eliminar todo el EDTA, se colocan en un tubo limpio y se recoge la savia del floema durante 5-8 horas en la oscuridad. Se descartan las hojas, se filtra la savia del floema a través de un filtro de 0,85 μm para eliminar partículas grandes, y se purifican PMP como se describe en el Ejemplo 2.

h) Aislamiento PMP de la savia de xilema de la planta de tomate

Las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) se plantan en una sola maceta en un suelo rico en materia orgánica, como Sunshine Mix (Sun Gro Horticulture, Agawam, MA) y se mantienen en un invernadero entre 22°C y 28°C. Aproximadamente dos semanas después de la germinación, en la etapa de dos hojas verdaderas, las plántulas se trasplantan individualmente en macetas (10 cm de diámetro y 17 cm de profundidad) llenas de suelo arenoso estéril que contiene 90% de arena y 10% de mezcla orgánica. Las plantas se mantienen

en un invernadero a 22-28°C durante cuatro semanas.

La savia de xilema de plantas de tomate de 4 semanas de edad se recoge como se describe por Kohlen et al., Plant Physiology. 155 (2): 974-987, 2011. Brevemente, las plantas de tomate se decapitan por encima del hipocotilo, y se coloca un anillo de plástico alrededor del tallo. La savia de xilema acumulada se recoge durante 90 minutos después de la decapitación. La savia de Xylem se filtra a través de un filtro de 0,85 µm para eliminar partículas grandes, y los PMP se purifican como se describe en el Ejemplo 2.

i) Aislamiento PMP del medio de cultivo celular BY-2 de tabaco

Las células de tabaco BY-2 (Nicotiana tabacum L cv. Bright Yellow 2) se cultivan en la oscuridad a 26°C, en un agitador a 180 rpm en MS (Murashige y Skoog, 1962) compuesto por un medio de cultivo BY-2 (pH 5.8) Sales de MS (Duchefa, Haarlem, Países Bajos, a # M0221) suplementadas con 30 g/L de sacarosa, 2.0 mg/L de dihidrógeno fosfato de potasio, 0.1 g/L de mioinositol, 0.2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, y 1 mg/L de tiamina HCl. Las células BY-2 se subcultivan semanalmente transfiriendo 5% (v/v) de un cultivo celular de 7 días de antigüedad a 100 ml de medio líquido fresco. Después de 72-96 horas, se recoge el medio de cultivo BY-2 y se centrifuga a 300 g a 4°C durante 10 minutos para eliminar las células. El sobrenadante que contiene PMP se recoge y se elimina de los desechos por filtración en un filtro de 0,85 µm. Los PMP se purifican como se describe en el Ejemplo 2.

Ejemplo 2: Producción De Paquetes De Mensajeros De Plantas Purificadas (PMP)

Este ejemplo describe la producción de PMP purificadas

a partir de fracciones PMP brutas como se describe en el Ejemplo 1, usando ultrafiltración combinada con cromatografía de exclusión por tamaño, un gradiente de densidad (yodixanol o sacarosa) y la eliminación de agregados por precipitación o cromatografía de exclusión por tamaño.

Diseño experimental:

a) Producción de PMP de toronja purificada utilizando ultrafiltración combinada con cromatografía de exclusión por tamaño

La fracción PMP de toronja cruda del Ejemplo 1a se concentra usando un filtro de rotación Amicon de corte de peso molecular de 100 kDa (MWCO) (Merck Millipore). Posteriormente, la solución de PMP cruda concentrada se carga en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño PURE-EV (HansaBioMed Life Sciences Ltd) y se aísla de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las fracciones que contienen PMP purificadas se agrupan después de la elución. Opcionalmente, los PMP se pueden concentrar aún más utilizando un filtro giratorio Amicon MWCO de 100 kDa, o mediante filtración de flujo tangencial (TFF). Los PMP purificadas se analizan como se describe en el Ejemplo 3.

b) Producción de PMP purificada de Arabidopsis apoplast utilizando un gradiente de yodixanol

Los PMP de hoja de Arabidopsis crudos se aíslan como se describe en el Ejemplo 1a, y los PMP se purifican usando un gradiente de yodixanol como se describe en Rutter e Innes, Plant Physiol. 173 (1): 728-741, 2017. Para preparar gradientes discontinuos de iodoxanol (OptiPrep; Sigma-Aldrich), soluciones de 40% (v/v), 20% (v/v), 10% (v/v), y 5% (v/v) de yodixanol se crean diluyendo una solución madre

OptiPrep al 60% acuosa en tampón de aislamiento de vesículas (VIB; MES 20 mM, CaCl₂ 2 mM y NaCl 0,1 M, pH 6). El gradiente se forma colocando en capas 3 ml de solución al 40%, 3 ml de solución al 20%, 3 ml de solución al 10% y 2 ml de solución al 5%. La solución bruta PMP apoplast del Ejemplo 1a se centrifuga a 40,000 g durante 60 minutos a 4°C. El sedimento se resuspende en 0.5 ml de VIB y se coloca en capas en la parte superior del gradiente. La centrifugación se realiza a 100,000 g durante 17 ha 4°C. Los primeros 4.5 ml en la parte superior del gradiente se descartan, y posteriormente se recogen 3 volúmenes de 0.7 ml que contienen el apoplast Los PMP se recogen, se llevan hasta 3,5 ml con VIB y se centrifugan a 100,000 g durante 60 minutos a 4°C. Los gránulos se lavan con 3.5 ml de VIB y se repelen usando las mismas condiciones de centrifugación. Los gránulos de PMP purificados se combinan para análisis posteriores, como se describe en el Ejemplo 3.

c) Producción de PMP de toronja purificada utilizando un gradiente de sacarosa

Los PMP de jugo de pomelo crudo se aíslan como se describe en el Ejemplo 1d, se centrifugan a 150,000 g durante 90 minutos, y el sedimento que contiene PMP se resuspende en 1 ml de PBS como se describe (Mu et al., Molecular Nutrition & Food Research. 58 (7): 1561-1573, 2014). El sedimento resuspendido se transfiere a un gradiente de paso de sacarosa (8%/ 15%/ 30%/ 45%/ 60%) y se centrifuga a 150,000 g durante 120 minutos para producir PMP purificadas. Los PMP de toronja purificadas se cosechan de la interfaz 30%/45%, y posteriormente se analizan, como se describe en el Ejemplo 3.

d) Eliminación de agregados de PMP de toronja

Para eliminar los agregados de proteínas de los PMP de toronja producidas como se describe en el Ejemplo 1d o los PMP purificadas del Ejemplo 2a-c, se puede incluir una etapa de purificación adicional. La solución de PMP producida se toma a través de un rango de pH para precipitar los agregados de proteínas en la solución. El pH se ajusta a 3, 5, 7, 9 u 11 con la adición de hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. El pH se mide usando una sonda de pH calibrada. Una vez que la solución está al pH especificado, se filtra para eliminar las partículas. Alternativamente, la solución de PMP aislada puede flocularse mediante la adición de polímeros cargados, como Polymín-P o Praestol 2640. Brevemente, se agregan 2-5 g por L de Polymín-P o Praestol 2640 a la solución y se mezclan con un impulsor. La solución luego se filtra para eliminar las partículas. Alternativamente, los agregados se solubilizan aumentando la concentración de sal. Se agrega NaCl a la solución de PMP hasta que esté a 1 mol/L. La solución luego se filtra para purificar los PMP. Alternativamente, los agregados se solubilizan aumentando la temperatura. La mezcla de PMP aislada se calienta bajo mezcla hasta que alcanza una temperatura uniforme de 50°C durante 5 minutos. La mezcla de PMP se filtra luego para aislar los PMP. Alternativamente, los contaminantes solubles de las soluciones de PMP se separan por columna de cromatografía de exclusión por tamaño de acuerdo con procedimientos estándar, donde los PMP eluyen en las primeras fracciones, mientras que las proteínas y las ribonucleoproteínas y algunas lipoproteínas se eluyen más tarde. La eficiencia de la eliminación de agregados de proteínas se determina midiendo y comparando la concentración de proteínas antes y después de

la eliminación de los agregados de proteínas mediante la cuantificación de proteínas BCA / Bradford. Los PMP producidas se analizan como se describe en el Ejemplo 3.

Ejemplo 3: Caracterización Del Paquete Plant Messenger

Este ejemplo describe la caracterización de PMP producidos como se describe en el Ejemplo 1 o Ejemplo 2.

Diseño experimental:

a) Determinación de la concentración de PMP

La concentración de partículas PMP se determina mediante el Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) utilizando un Malvern NanoSight, o mediante la detección de pulso resistivo ajustable (TRPS) utilizando un iZon qNano, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de proteína de PMP purificados se determina mediante el uso del ensayo de proteínas DC (Bio-Rad). La concentración de lípidos de los PMP purificadas se determina usando un colorante lipofílico fluorescente, como DiOC6 (ICN Biomedicals) como lo describen Rutter e Innes, Plant Physiol. 173 (1): 728-741, 2017. Brevemente, los gránulos de PMP purificados del Ejemplo 2 se resuspenden en 100 ml de DiOC6 10 mM (ICN Biomedicals) diluido con tampón MES (MES 20 mM, pH 6) más 1% de inhibidor de proteasa vegetal cóctel (Sigma-Aldrich) y disulfuro de 2,29-dipiridilo 2 mM. Los PMP resuspendidas se incuban a 37°C durante 10 min, se lavan con 3 ml de tampón MES, se repelen (40,000 g, 60 min, a 4°C) y se resuspenden en tampón MES nuevo. La intensidad de fluorescencia de DiOC6 se mide a 485 nm de excitación y 535 nm de emisión.

b) Caracterización biofísica y molecular de PMP

Los PMP se caracterizan por microscopía electrónica y

crioelectrónica en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010, siguiendo el protocolo de Wu et al., Analyst. 140 (2): 386-406, 2015. El tamaño y el potencial zeta de los PMP también se miden utilizando un Zetasizer Malvern o iZon qNano, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los lípidos se aíslan de los PMP usando extracción con cloroformo y se caracterizan con LC-MS / MS como se demuestra en Xiao et al. Célula vegetal. 22 (10): 3193-3205, 2010. Los lípidos de glicosil inositol fosforilceramidas (GIPC) se extraen y purifican como describen Cacas et al., Plant Physiology. 170: 367-384, 2016, y analizados por LC-MS / MS como se describió anteriormente. El ARN, el ADN y las proteínas totales se caracterizan usando kits Quant-It de Thermo Fisher de acuerdo con las instrucciones. Las proteínas en los PMP se caracterizan por LC-MS / MS siguiendo el protocolo en Rutter e Innes, Plant Physiol. 173 (1): 728-741, 2017. El ARN y el ADN se extraen utilizando Trizol, se preparan en bibliotecas con el kit TruSeq Total RNA con Ribo-Zero Plant y el kit Nextera Mate Pair Library Prep de Illumina, y se secuencian en un Illumina MiSeq siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 4: Caracterización De La Estabilidad Del Paquete Plant Messenger

Este ejemplo describe la medición de la estabilidad de los

PMP en una amplia variedad de condiciones de almacenamiento y fisiológicas.

Diseño experimental:

Los PMP producidas como se describe en los Ejemplos 1 y 2 están sujetas a diversas condiciones. Los PMP se suspenden

en agua, sacarosa al 5% o PBS y se dejan durante 1, 7, 30 y 180 días a -20°C , 4°C , 20°C y 37°C . Los PMP también se suspenden en agua y se secan usando un sistema de evaporador rotativo y se dejan durante 1, 7 y 30, y 180 días a 4°C , 20°C y 37°C . Los PMP también se suspenden en agua o solución de sacarosa al 5%, se congelan instantáneamente en nitrógeno líquido y se liofilizan. Después de 1, 7, 30 y 180 días, los PMP secas y liofilizadas se resuspenden en agua. Los tres experimentos anteriores con condiciones a temperaturas superiores a 0°C también se exponen a un simulador de luz solar artificial para determinar la estabilidad del contenido en condiciones de luz ultravioleta simulada en exteriores. Los PMP también se someten a temperaturas de 37°C , 40°C , 45°C , 50°C y 55°C durante 1, 6 y 24 horas en soluciones tamponadas con un pH de 1, 3, 5, 7, y 9 con o sin la adición de 1 unidad de tripsina o en otros fluidos gástricos simulados.

Después de cada uno de estos tratamientos, los PMP se vuelven a comprar a 20°C , se neutralizan a pH 7.4 y se caracterizan usando algunos o todos los métodos descritos en el Ejemplo 3.

Ejemplo 5. Carga De PMP Con Carga

Este ejemplo describe métodos para cargar PMP con moléculas pequeñas, proteínas y ácidos nucleicos.

a) Carga de moléculas pequeñas en PMP

Los PMP se producen como se describe en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2. Para cargar moléculas pequeñas en PMP, los PMP se colocan en solución de PBS con la molécula pequeña en forma sólida o solubilizada. La solución se deja durante 1 hora a 22°C , de acuerdo con el protocolo de Sun, Mol. Ther.,

2010. Alternativamente, la solución se sónica para inducir poración y difusión en los exosomas de acuerdo con el protocolo de Wang et al, Nature Comm., 2013. Alternativamente, los PMP se electroporan de acuerdo con el protocolo de Wahlgren et al, Nucl. Ácidos Res. 2012.

Alternativamente, los lípidos de PMP se aíslan añadiendo 3.75 ml de MeOH: CHCl₃ 2: 1 (v/v) a 1 ml de PMP en PBS y se agitan vorticialmente. CHCl₃ (1.25 ml) y ddH₂O (1.25 ml) se agregan secuencialmente y se agitan vorticialmente. La mezcla se centrifuga luego a 2,000 r.p.m. durante 10 minutos a 22°C en tubos de vidrio para separar la mezcla en dos fases (fase acuosa y fase orgánica). La muestra de fase orgánica que contiene los lípidos de PMP se seca calentando bajo nitrógeno (2 psi). Para producir PMP pequeñas cargadas con moléculas, los lípidos PMP aislados se mezclan con la solución de molécula pequeña y se pasan a través de un extrusor de lípidos de acuerdo con el protocolo de Haney et al, J Contr. Rel., 2015.

Antes de su uso, los PMP cargadas se purifican usando métodos como se describe en el Ejemplo 2 para eliminar moléculas pequeñas no unidas. Los PMP cargadas se caracterizan como se describe en el Ejemplo 3, y su estabilidad se prueba como se describe en el Ejemplo 4.

b) Carga de proteínas o péptidos en PMP

Los PMP se producen como se describe en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2. Para cargar proteínas o péptidos en los PMP, los PMP se colocan en solución con la proteína o el péptido en PBS. Si la proteína o péptido es insoluble, el pH se ajusta hasta que sea soluble. Si la proteína o péptido sigue siendo insoluble, se usa la proteína o péptido insoluble. La

solución luego se sónica para inducir poración y difusión en los PMP según el protocolo de Wang et al, Nature Comm., 2013. Alternativamente, los PMP se electroporan según el protocolo de Wahlgren et al, Nucl. Ácidos Res. 2012

5 Alternativamente, los lípidos de PMP se aíslan añadiendo 3.75 ml de MeOH: CHCl₃ 2: 1 (v/v) a 1 ml de PMP en PBS y se agitan vorticialmente. CHCl₃ (1.25 ml) y ddH₂O (1.25 ml) se agregan secuencialmente y se agitan vorticialmente. La mezcla se centrifuga luego a 2,000 r.p.m. durante 10 minutos a 22°C en tubos de vidrio para separar la mezcla en dos fases (fase acuosa y fase orgánica). La muestra de fase orgánica que contiene los lípidos de PMP se seca calentando bajo nitrógeno (2 psi). Para producir PMP pequeñas cargadas con moléculas, los lípidos PMP aislados se mezclan con la solución de molécula pequeña y se pasan a través de un extrusor de lípidos de acuerdo con el protocolo de Haney et al, J Contr. Rel., 2015.

10 Antes de su uso, los PMP cargadas se purifican usando los métodos descritos en el Ejemplo 2 para eliminar los péptidos y proteínas no unidos. Los PMP cargadas se caracterizan como se describe en el Ejemplo 3, y su estabilidad se prueba como se describe en el Ejemplo 4. Para medir la carga de la proteína o péptido, el Ensayo de péptido colorimétrico cuantitativo de Pierce se usa en una pequeña muestra de los PMP cargadas y descargadas.

25 c) Carga de ácidos nucleicos en PMP

Los PMP se producen como se describe en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2. Para cargar ácidos nucleicos en PMP, los PMP se colocan en solución con el ácido nucleico en PBS. La solución luego se sonica para inducir poración y difusión en los PMP

30

según el protocolo de Wang et al, Nature Comm., 2013. Alternativamente, los PMP se electroporan según el protocolo de Wahlgren et al, Nucl. Ácidos Res. 2012

Alternativamente, los lípidos de PMP se aíslan añadiendo 3,75 ml de MeOH: CHCl₃ 2: 1 (v/v) a 1 ml de PMP en PBS y se agitan vorticialmente. CHCl₃ (1.25 ml) y ddH₂O (1.25 ml) se agregan secuencialmente y se agitan vorticialmente. La mezcla se centrifuga luego a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos a 22°C en tubos de vidrio para separar la mezcla en dos fases (fase acuosa y fase orgánica). La muestra de fase orgánica que contiene los lípidos de PMP se seca calentando bajo nitrógeno (2 psi). Para producir PMP pequeñas cargadas con moléculas, los lípidos PMP aislados se mezclan con la solución de molécula pequeña y se pasan a través de un extrusor de lípidos de acuerdo con el protocolo de Haney et al, J Contr. Rel., 2015.

Antes de su uso, los PMP se purifican utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 2 para eliminar los ácidos nucleicos no unidos. Los PMP cargadas se caracterizan como se describe en el Ejemplo 3, y su estabilidad se prueba como se describe en el Ejemplo 4. Los ácidos nucleicos que se cargan en los PMP se cuantifican usando un ensayo Quant-It de Thermo Fisher siguiendo las instrucciones del fabricante, o la fluorescencia se cuantifica con un lector de placas si los ácidos nucleicos están marcados con fluorescencia.

Ejemplo 6: Modificación De Una Planta Mediante Entrega De Plásmido Mediada Por PMP En Planta

Este ejemplo describe la carga y la entrega funcional de PMP cargados con plásmidos en planta, para afectar la aptitud de una planta. Este ejemplo demuestra además que los

PMP cargadas con plásmido son estables y retienen su actividad en un rango de procesamiento y condiciones ambientales.

En este ejemplo, el algodón se usa como planta modelo, los PMP de toronja como PMP modelo, y el vector de expresión de reportero pCambia1303 GUSA: mGFP5 se usa como un plásmido modelo.

Diseño terapéutico:

La solución PMP de toronja se formula con una dosis equivalente de 0, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml y 20 µg/ml de plásmido en agua estéril.

Protocolo experimental:

Carga de PMPs de toronja con un GUSA: plásmido indicador mGFP5

Los PMP se producen a partir de la toronja como se describe en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2. Para mostrar la entrega funcional de plásmidos por los PMP, los PMP de toronja se cargan con el plásmido indicador pCambia1303 (12.361 pb; adquirido de Marker Gene Technologies) que expresa genes de fusión A: mgfp5 indicados por una versión de doble potenciador del promotor CaMV35S y terminado por la señal de CaMV35S polyA. Tras la transcripción, tanto GUSA como mGFP5 se transcriben y pueden detectarse. El plásmido pCambia1303 se carga en PMP por los métodos descritos en el Ejemplo 5.

La encapsulación del plásmido en PMP se determina por análisis de PCR. El ADN genómico total se aísla de los PMP cargadas usando procedimientos estándar. Para el análisis por PCR, se añaden 50 ng de ADN total a una PCR de 10 µl que contiene 5 µl de RedTaq Readymix (Sigma Aldrich) y 0.1 µM de

cada par de cebadores para la amplificación del gen mgfp5: 5'-AAG GAG AAG AAC TTT TCA CTG GAG-3' (SEQ ID NO: 7) y 5'-AGT TCA TCC ATG CCA TGT GTA-3' (SEQ ID NO: 8). La amplificación por PCR se realiza en un termociclador con una desnaturalización inicial a 95°C durante 1 min, seguido de 30 ciclos a 95°C durante 1 min, 55°C durante 1 min, 68°C durante 1 min y una extensión final de 68°C por 10 min. Los productos de PCR se separan en un gel de agarosa al 1,0% usando electroforesis y se obtienen imágenes. El gel se puntúa por la presencia e intensidad del producto mgfp5 (≈ 700 pb), en comparación con las cantidades conocidas del plásmido pCambia1303. Los PMP cargadas con plásmido se formulan en agua a una concentración que proporciona un equivalente de una dosis de plásmido de 0, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ y 20 $\mu\text{g/ml}$ de plásmido en agua estéril., y una concentración equivalente de PMP descargados se utiliza como control. La estabilidad de los PMP cargadas con plásmido se mide como se describe en el Ejemplo 4.

Entrega Funcional De Pomelos Cargados Con Un Plásmido Indicador GUSA: Mgfp5 En Plantas De Algodón

Las semillas de algodón (*Gossypium hirsutum* y *Gossypium raimondii*) se obtienen a través del Sistema Nacional de Germoplasma de Plantas de EE. UU. Las semillas esterilizadas se envuelven en algodón absorbente húmedo, se colocan en placas de Petri y se colocan en una cámara de crecimiento a 25°C, 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ de intensidad de luz, con un fotoperíodo de 14 horas de luz / 10 horas de oscuridad durante 3 días para germinar. Las plántulas se cultivan en recipientes de cultivo estériles con la solución nutritiva de Hoagland (Sigma Aldrich) en condiciones de día largo (16/8 h de

fotoperíodo claro / oscuro) con temperaturas de 26/20°C día / noche. Después de 4 días, las plántulas con cotilidones completamente expandidos (antes de que apareciera la primera hoja verdadera) se usan para tratamientos con PMP.

5 Las plántulas de algodón de siete días de edad se transfieren a 0.5 x sales minerales Murashige y Skoog (MS) (Sigma Aldrich) con 1 x vitaminas MS (Sigma Aldrich) pH 5,6-5.8, con agarosa al 0.8% (p/v) y se tratan con una dosis efectiva de 0, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml y 20
10 µg/ml de plásmido en agua estéril (ddH₂O), y se utiliza una concentración equivalente de PMP sin carga como control, rociando toda la plántula con 1 ml de solución por planta, con 3 plantas por grupo. Alternativamente, antes del tratamiento con PMP, la parte inferior de los cotilidones de
15 la planta de algodón se perfora con una aguja de 25 G sin perforar a través de los cotilidones. Las soluciones de PMP (para esta aplicación formulada en medio VIB (MES 20 mM, CaCl₂ 2 mM y NaCl 0.1 M, pH 6) se infiltran manualmente desde la parte inferior de los cotilidones a través de los sitios
20 de la herida utilizando una jeringa sin aguja de 1 ml. Alternativamente, 4 días de edad. las plántulas se mantienen en condiciones de crecimiento hidropónico, y se añaden formulaciones de PMP cargadas con plásmido al medio de crecimiento para determinar la absorción de la raíz por los
25 PMP. Todas las plantas se transfieren a una cámara de crecimiento y se mantienen en condiciones de día largo (16 h/ 8 h de luz/ fotoperíodo oscuro) con una intensidad de luz de 90 µmol m⁻² s⁻¹ y temperaturas de 26/20°C día / noche.

Después de 1, 2, 3, 5, 8 y 14 días, se determina la
30 expresión de GFP y GUS para evaluar la entrega funcional de

los PMP cargadas con plásmido en las células vegetales. La proteína total se extrae de 100 mg de hojas frescas de algodón (métodos) y se agregan inhibidores de la proteasa vegetal. Western blot para GFP (Abcam ab1218), se realiza utilizando un control de carga de actina (Abcam ab197345). La expresión relativa de GFP normalizada a actina, se compara entre los tratamientos, formulaciones y controles de PMP cargados con plásmido. Además, antes del aislamiento de proteínas, las plantas de algodón se examinan para la expresión de GFP por microscopía fluorescente (EVOS2 FL).

La localización histoquímica de la actividad de GUS en las plantas y controles tratados con PMP cargados con plásmido se analiza después de incubar las plantas en tampón X-gluc (tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0, EDTA 10 mM, Tritón X-100 al 01%, potasio 0.5 mM ferrocianuro y 2 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido (X-gluc) a 37°C durante 12 h. Se recogen imágenes de campo brillante utilizando un microscopio de disección.

Los PMP de pomelo cargados con plásmido pCambia1303 entregan funcionalmente su carga a las células vegetales y transcriben con éxito las proteínas indicadoras codificadas en el plásmido.

Ejemplo 7: Modificación De Una Planta Mediante Suministro De Ácido Nucleico Corto Mediado Por PMP

Este ejemplo describe la carga y entrega funcional de PMP cortos cargados con ácidos nucleicos en planta, para afectar la aptitud de una planta. Este ejemplo demuestra además que los PMP cargadas con ácido nucleico corto son estables y retienen su actividad en un rango de procesamiento y condiciones ambientales. En este ejemplo, el algodón se usa

como planta modelo, los PMP de toronja como modelo PMP, y el aARNmi contra Cla1 se usa como modelo ARNdc.

Diseño terapéutico:

La solución PMP de toronja está formulada con una dosis efectiva de 0 (control negativo), 1, 5, 10 y 20 ng/μl de ARNdc en agua estéril.

Protocolo experimental:

Carga de PMPs de toronja con ARNdc CLA1

Para demostrar la absorción celular por los PMP en planta, los PMP de toronja se cargan con ARNmi artificiales (aARNmi, diseñados usando P-SAMS (p-sama.carringtonlab.org)) o ARNip de sustrato de dicer personalizado (DARNip, diseñado por IDT) dirigido a la fotosíntesis de algodón gen GrCLA1 (1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa). GrCLA1 es un gen homólogo del gen Arabidopsis Cloroplastos alterados 1 (AtCLA1), cuya pérdida de función produce un fenotipo albino en las hojas verdaderas, proporcionando un marcador visual para silenciar la eficiencia. Los oligonucleótidos se obtienen de IDT.

Los PMP se producen a partir de toronja como se describe en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2. Para determinar la captación de PMP, los PMP de toronja se cargan con dúplex grCLA1-aARNmi o GrCLA1-DARNip (Tabla 1), como se describe en el Ejemplo 5. Encapsulación aARNmi o DARNip de PMP se mide usando el kit de ensayo de ARN RiboGreen Quant-It, o usando un tinte fluorescente de control marcado con aARNmi o DARNip (IDT). Para determinar el efecto de PMP de los PMP cargadas con CLA1-aARNmi / DARNip versus PMP sin carga, las plántulas de algodón se tratan y analizan para silenciar el gen CLA1. Los PMP cargados con aARNmi o DARNip (denominados

colectivamente ARNdc) se formulan en agua a una concentración que proporciona un equivalente de una dosis efectiva de ARNdc de 0, 1, 5, 10 y 20 ng/μl en agua estéril, y una concentración equivalente de PMP descargados se entrega como control. La estabilidad es que los PMP cargadas con ARNdc se miden como se describe en el Ejemplo 4.

Suministro Funcional De PMP De Toronja Cargados Con ARNdc Dirigido A CLA1 En Plantas De Algodón

Las semillas de algodón (*Gossypium hirsutum* y *Gossypium raimondii*) se obtienen a través del Sistema Nacional de Germoplasma de Plantas de EE. UU. Las semillas esterilizadas se envuelven en algodón absorbente húmedo, se colocan en placas de Petri y se colocan en una cámara de crecimiento a 25°C, 150 μE m⁻² S⁻¹ de intensidad de luz, con un fotoperíodo de 14 horas de luz / 10 horas de oscuridad durante 3 días para germinar. Las plántulas se cultivan en recipientes de cultivo estériles con la solución nutritiva de Hoagland (Sigma Aldrich) en condiciones de día largo (16/8 h de fotoperíodo claro / oscuro) con temperaturas de 26/20°C día / noche. Después de 4 días, las plántulas con cotilidones completamente expandidos (antes de que apareciera la primera hoja verdadera) se usan para tratamientos con PMP.

Las plántulas de algodón de siete días de edad se transfieren a 0.5 x sales minerales Murashige y Skoog (MS) (Sigma Aldrich) con 1 x vitaminas MS (Sigma Aldrich) pH 5.6-5.8, con agarosa al 0.8% (p/v) y se tratan con una dosis efectiva de 0 (ddH₂O), 1, 5, 10 y 20 ng/μl de PMP cargados con ARNdc GrCLA1 y una concentración de partículas de PMP equivalente de PMP de toronja no modificada rociando la plántula completa, 1 ml de solución por planta, con 3 plantas

por grupo Alternativamente, antes del tratamiento con PMP, la parte inferior de los cotiledones de la planta de algodón se perfora con una aguja de 25 G sin perforar a través de los cotiledones. Las soluciones de PMP se infiltran manualmente desde la parte inferior de los cotiledones a través de los sitios de la herida utilizando una jeringa sin aguja de 1 ml. Las plantas se transfieren a una cámara de crecimiento y se mantienen en condiciones de día largo (16 h / 8 h de fotoperíodo claro / oscuro) con una intensidad de luz de 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperaturas de 26/20°C día / noche.

Después de 2, 5, 8 y 14 días, se examina la eficacia de silenciamiento génico del ARNdc de CLA1 por el nivel de expresión del ARNm de CLA1 endógeno usando la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR). El ARN total se extrae de 100 mg de hojas frescas de algodón usando el reactivo Trizol de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen) y se trata extensamente con DNasa I libre de RNasa (Promega). El ADNc de primera cadena se sintetiza a partir de 2 μg de ARN total con el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript™ (Invitrogen). Para estimar los niveles de las transcripciones de CLA1, qRT-PCR se realiza utilizando SYBR Green Real-Time PCR Master Mix (Thermo Scientific) con cebadores: GrCLA1q1_F 5'-CCAGGTGGGGCTTATGCATC-3' (SEQ ID NO: 9), GrCLA1q1_R 5'-CCACACCAAGGCTTGAACCC-3' (SEQ ID NO: 10), y GrCLA1'Q2__F2 S-GGCCGGATTACGAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 11), GrCLA1q2_R 5'-CGTCGAGATTGGCAGTTGGC-3' (SEQ ID NO: 12), y 18s RNA_F 5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA-3' (SEQ ID NO: 13), 18s RNA_R 5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3' (SEQ ID NO: 7), utilizando el siguiente programa: (a) 95 C por 5 min; (b) 40 ciclos de 94 C

por 30 s, 55 C por 30 s; y 72°C por 30 s. El gen 18S ARNr se usa como control interno para normalizar los resultados. El CLA1 elimina la eficiencia en algodón después del tratamiento con PMP cargados con ARNdc de CLA1 en comparación con PMP no modificados y controles de agua se determina calculando el valor de $\Delta\Delta Ct$, comparando la expresión de CLA1 normalizada después del tratamiento con PMP cargados con ARNdc, con expresión de CLA1 normalizada después del tratamiento con PMP no modificados.

Además, la eficacia de silenciamiento génico del ARNdc de CLA1 se examina mediante análisis de fotoenclavamiento fenotípico. Se fotografían las hojas de las plantas de algodón tratadas y no tratadas y se utiliza el software ImageJ para determinar el porcentaje de silenciamiento génico, que se refleja en el blanqueamiento fotográfico blanco en la hoja versus el color verde de la hoja de control. Se analizan tres hojas por planta para cuantificar el efecto del fotoblanqueamiento, y se evalúa la eficiencia de silenciamiento génico de los PMP cargadas con ARN de ARNdc CLA versus los controles.

Los PMP cargadas con ARN de ds CLA1 se administran funcionalmente en planta e inducen el silenciamiento génico de CLA1 y el fenotipo de fotoblanqueamiento en comparación con los PMP no modificadas y los controles de agua.

Tabla 1 GrCLA1-aARNmi y GrCLA1-DARNDip

Especies	Nombre Gen	Secuencia Referencia	Tipo	Nombre	ARNdc (5'-3')	ARNdc* (5'-3')
5 Gossypium hirsutum	GhCLA1	CotAD_7476 9_BGI- AD1_v1.0	aARNmi	aARNmi_ GhCL-1	UGGCAACAAUAUUUUUGUCUC (SEQ ID NO: 15)	GACAAAAAGAUUGU UGCCACA (SEQ ID NO: 16)
10 Gossypium hirsutum	GhCLA1	CotAD_7476 9_BGI- AD1_v1.0	aARNmi	aARNmi_ GhCL-2	UUAGUACCCUGCCUUUGCCAU (SEQ ID NO: 17)	GGCAAAGGAAGGGU ACUAACA (SEQ ID NO: 18)
10 Gossypium hirsutum	GhCLA1	CotAD_7476 9_BGI- AD1_v1.0	aARNmi	aARNmi_ GhCL-3	UACUUCGUGUGACUUUGCCAC (SEQ ID NO: 19)	GGCAAAGUAACACG AAGUACA (SEQ ID NO: 20)
15 Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_0126002 76	aARNmi	aARNmi_ GrCL-1	UGGCAACAAUAUUUUUGUCUC (SEQ ID NO: 21)	GACAAAAAGAUUGU UGCCACA (SEQ ID NO: 22)
15 Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_0126002 76	aARNmi	aARNmi_ GrCL-2	UCAGUACCCUGCCUUUGCCAU (SEQ ID NO: 23)	GGCAAAGGAAGGGU ACUGACA (SEQ ID NO: 24)
20 Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_0126002 76	aARNmi	aARNmi_ GrCL-3	UACUUCGUGUGACUUUGCCAC (SEQ ID NO: 25)	GGCAAAGUAACACG AAGUACA (SEQ ID NO: 26)

5

10

15

20

Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV010590 36	aARNmi	aARNmi_ GhCL-4	UUAGUGGCCAUCAACAGGCCG (SEQ ID NO: 27)	GCCUGUUGCUGGCC ACUAACA (SEQ ID NO: 28)
Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV010590 36	aARNmi	aARNmi_ GhCL-5	UAUCGAUGUUAGUGGCCACCU (SEQ ID NO:29)	GUGGCCACGAACAU CGAUACA (SEQ ID NO: 30)
Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV010590 36	aARNmi	aARNmi_ GhCL-6	UACCGGUACCCGUUGUUUCAC (SEQ ID NO: 31)	GAAACAACUGGUAC CGGUACA (SEQ ID NO: 32)
Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_0126002 76	DARNip	DARNip_ GrCL-1	CAGUCCACUUAGUAUCAUCAUC AAG (SEQ ID NO: 33)	CUUGAUGAUGAUAC UAAGUGGACUGUG (SEQ ID NO: 34)
Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_0126002 76	DARNip	DARNip_ GrCL-2	GUCCACUUAGUAUCAUCAAA GCA (SEQ ID NO: 35)	UGCUUGAUGAUGAU ACUAAGUGGACUG (SEQ ID NO: 36)
Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_0126002 76	DARNip	DARNip_ GrCL-3	AGUCCACUUAGUAUCAUCA AGC (SEQ ID NO: 37)	GCUUGAUGAUGAUA CUAAGUGGACUGU (SEQ ID NO:

						38)
5	Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_0126002 76	DARNip	DARNip_ GrCL-4	AAUCUUUCAUUGAUUGGAUAGC CTT (SEQ ID NO: 39) AAUGAAAGAUUUA (SEQ ID NO: 40)
10	Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_0126002 76	DARNip	DARNip_ GrCL-5	UGUGAUUUUACUCG UAAGGUUGUUGGG (SEQ ID NO: 42)
15	Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV010590 36	DARNip	DARNip_ GhCL-1	GAGAAUAGAAACUA AAUCAUCGAUGUU (SEQ ID NO: 44)
20	Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV010590 36	DARNip	DARNip_ GhCL-2	UUGAGAAUAGAAAC UAAAUCAUCGAUG (SEQ ID NO: 46)
	Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV010590 36	DARNip	DARNip_ GhCL-3	UGAGAAUAGAAACU AAAUCAUCGAUGU (SEQ ID NO: 48)

Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV010590 36	DARNip	DARNip_ GhCL-4	CGAUGAUUUAGUUUCUAUUCUC AAA (SEQ ID NO: 49)	UUUGAGAAUAGAAA CUAAAUCAUCGAU (SEQ ID NO: 50)
Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV010590 36	DARNip	DARNip_ GhCL-5	GAUAUGAUUGUUAUUCUUAUG ACA (SEQ ID NO: 51)	UGUCAUUAAGAAUA ACAAUCAUAUCAG (SEQ ID NO: 52)

Ejemplo 8: Modificación De Una Planta Mediante Suministro De Plásmido Mediado Por PMP A Protoplastos

Este ejemplo describe la carga y la entrega funcional de PMP cargadas con plásmido a los protoplastos, para afectar la aptitud de una planta. Este ejemplo demuestra además que los PMP cargadas con plásmido son estables y retienen su actividad en un rango de procesamiento y condiciones ambientales.

En este ejemplo, los protoplastos de soja se usan como un protoplasto modelo, los PMP BY-2 como modelo PMP, y el vector de expresión reportero pCambia1303 GUSA: mGFP5 se usa como un plásmido modelo.

Diseño terapéutico:

La solución BY-2 PMP está formulada con una dosis equivalente de 0, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml y 20 µg/ml de plásmido en agua estéril.

Protocolo experimental:

Carga de PMP BY-2 con un plásmido indicador GUSA: mGFP5

Los PMP se producen a partir de la línea celular BY-2 como se describe en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2. Para mostrar la entrega funcional de plásmidos por PMP, los PMP BY-2 se cargan con el plásmido informador pCambia1303 (12.361 pb; adquirido de Marker Gene Technologies) que expresa fusión gusA: genes informadores mgfp5 impulsados por una versión de doble potenciador del promotor CaMV35S y terminados por la señal de poliA CaMV35S. Tras la transcripción, tanto GUSA como mGFP5 se transcriben y pueden detectarse. El plásmido pCambia1303 se carga en PMP por los métodos descritos en el Ejemplo 5.

La encapsulación del plásmido en PMP se determina por análisis de PCR. El ADN genómico total se aísla de los PMP cargadas usando procedimientos estándar. Para el análisis por PCR, se añaden 50 ng de ADN total a una PCR de 10 µl que contiene 5 µl de RedTaq Readymix (Sigma Aldrich) y 0,1 µM de cada par de cebadores para la

amplificación del gen mgfp5: 5'-AAG GAG AAG AAC TTT TCA CTG GAG-3' (SEQ ID NO: 7) y 5'-AGT TCA TCC ATG CCA TGT GTA-3' (SEQ ID NO: 8). La amplificación por PCR se realiza en un termociclador con una desnaturalización inicial a 95°C durante 1 min, seguido de 30 ciclos a 95°C durante 1 min, 55°C durante 1 min, 68°C durante 1 min y una extensión final de 68°C durante 10 min. Los productos de PCR se separan en un gel de agarosa al 1.0% usando electroforesis y se obtienen imágenes. El gel se puntúa por la presencia e intensidad del producto mgfp5 (≈700 pb), en comparación con las cantidades conocidas del plásmido pCambia1303. Los PMP cargadas con plásmido se formulan en agua a una concentración que proporciona un equivalente de una dosis de plásmido de 0, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml y 20 µg/ml de plásmido en agua estéril., y una concentración equivalente de PMP descargados se utiliza como control. La estabilidad de los PMP cargadas con plásmido se mide como se describe en el Ejemplo 4.

Aislamiento De Protoplastos De Soja

Las semillas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) Se obtienen a través del Sistema Nacional de Germoplasma de Plantas de EE. UU. Se siembran 5 - 10 semillas de soja (Williams 82) en una maceta de 13 cm en una cámara de cultivo en condiciones de día largo (16 h de luz a 1,500 µmol m⁻² s⁻¹) a 25°C en la mezcla de suelo personalizada para la soja (el Relación 1: 1: 1 de suelo, perlita y arena de torpedo). Los protoplastos se aíslan según lo descrito por Wu y Hanzawa, 2018 J. Vis.Exp. (131), e57258. Brevemente, las hojas unifoliadas recién expandidas se cortan de plántulas de soja de 10 días de edad. Con una cuchilla de afeitar nueva, se retira la nervadura central de la hoja unifoliada y los restos se cortan en tiras de 0.5-1 mm. Usando un par de pinzas, las tiras foliares se transfieren inmediata y suavemente a 10 ml de solución enzimática recién preparada (MES, pH 5.7 20 mM, 2% (p/v) de celulasa CELF, 0.1% (p/v) de pectoliasa Y-23, 0.75 M de manitol, 0.2 mM de CaCl₂, 0.1% (p/v) de BSA, 0.5 mM de DTT) en un tubo de 15 ml. Infiltrar al vacío las tiras de hojas durante 15

minutos a temperatura ambiente, e incubar las tiras de hojas en la solución enzimática con agitación suave (40 rpm) con poca luz durante 4-6 ha temperatura ambiente. Se transfieren 10 ml de solución de enzima / protoplasto a un tubo de 50 ml vertiendo suavemente y se agregan 10 ml de solución W5 (MES 2 mM, pH 5.7, NaCl 154 mM, CaCl₂ 125 mM, KCl 5 mM) a temperatura ambiente para detener la digestión. La solución de enzimas / protoplastos se acumula en una malla de nylon limpia de 75 µm colocada en la parte superior de un tubo de 50 ml para eliminar los tejidos foliares no digeridos. La solución de flujo de enzimas / protoplastos se centrifuga a 100 x g en el tubo de 50 ml durante 1-2 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se elimina sin alterar el sedimento de protoplastos. Los protoplastos resuspendidos se diluyen a una concentración de 2×10^5 células/mL en solución W5 enfriada a 4°C contando el número de protoplastos en un hemocitómetro. Después del lavado, los protoplastos se resuspenden en solución MMG (MES 4 mM pH 5,7, manitol 400 mM, 15 mM MgCl₂) a una concentración de 2×10^5 células/mL a temperatura ambiente.

Suministro Funcional De PMP BY-2 Cargados Con Un Plásmido Indicador GUSA: Mgfp5 En Protoplastos De Soja

100 µL de protoplastos que contienen 2×10^4 protoplastos a 2×10^5 células/ml\)) se transfieren a una placa de fondo plano de 24 pocillos. Los protoplastos se tratan con una dosis efectiva de 0, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml y 20 µg/ml de plásmido en agua estéril (ddH₂O), y una concentración equivalente de PMP sin carga es utilizado como control. Si es necesario agregar más de 100 ul de solución PMP, los PMP se formulan en solución MMG y se siembran por triplicado por punto de tiempo.

Después de 2 h, 4 h, 6 h, 1d, 2d y 3d, se determina la expresión de GFP y GUS para evaluar la entrega funcional de los PMP cargadas con plásmido en protoplastos de soja. Las muestras se lavan 5 x 10 minutos con medio como se describe anteriormente. La proteína total se extrae de un pocillo completo de protoplastos tratados y se

realiza la transferencia Western para GFP (Abcam ab1218), usando un control de carga de actina (Abcam ab197345). La expresión relativa de GFP normalizada a actina, se compara entre los tratamientos, formulaciones y controles de PMP cargados con plásmido.

Además, 10 μ L de protoplastos lavados se colocan en un portaobjetos de vidrio y se examinan para determinar la expresión de GFP por microscopía fluorescente (EVOS2 FL).

La localización histoquímica de la actividad de GUS en los protoplastos y controles tratados con PMP cargados con plásmido se analiza después de la incubación de los protoplastos en tampón X-gluc (tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0, EDTA 10 mM, 0.1% Triton X-100, potasio 0.5 mM ferrocianuro y 2 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido (X-gluc) a 37°C durante 12 h. Se recogen imágenes de campo brillante utilizando un EVOS2 FL.

Los PMP BY-2 cargadas con plásmido pCambia1303 entregan funcionalmente su carga a protoplastos y transcriben con éxito las proteínas indicadoras codificadas en el plásmido.

Ejemplo 9: Producción De PMP A Partir De Jugo De Fruta Mezclado Usando Ultracentrifugación Y Purificación En Gradiente De Sacarosa

Este ejemplo describe la producción de los PMP se pueden producir a partir de la fruta mezclando la fruta y usando una combinación de centrifugación secuencial para eliminar escombros, ultracentrifugación para granular PMPs en bruto, y usando un gradiente de densidad de sacarosa para purificar PMPs. En este ejemplo, la toronja se usó como fruta modelo.

a) Producción de PMP de toronja por ultracentrifugación y purificación por gradiente de densidad de sacarosa

En La Figura 1A se muestra un flujo de trabajo para la producción de PMP de toronja usando una licuadora, ultracentrifugación y purificación en gradiente de sacarosa. Se compró una toronja roja de Whole Foods Market® local, y se removieron las membranas de albedo, flavedo y segmento para recolectar los sacos

de jugo, que se homogeneizaron usando una licuadora a la velocidad máxima durante 10 minutos. Cien ml de jugo se diluyeron 5 veces con PBS, seguido de una centrifugación posterior a 1000 x g durante 10 minutos, 3000 x g durante 20 minutos y 10,000 x g durante 40 minutos para eliminar los desechos grandes. Se ultracentrifugaron 28 ml de jugo aclarado en una microcentrífuga Sorvall™ MX 120 Plus a 150,000 x g durante 90 minutos a 4°C usando un rotor de cubeta oscilante S50-ST (4 x 7mL) para obtener un granulado de PMP crudo que se resuspendió en PBS pH 7.4. A continuación, se preparó un gradiente de sacarosa en Tris-HCL pH 7.2, los PMP crudas se colocaron en capas en la parte superior del gradiente de sacarosa (de arriba a abajo: 8, 15. 30. 45 y 60% de sacarosa), y se centrifugaron por ultracentrifugación a 150,000 x g por 120 minutos a 4°C usando un rotor de cuchara oscilante S50-ST (4 x 7mL). Se recogieron fracciones de un ml y se aislaron PMP en la interfaz 30-45%. Las fracciones se lavaron con PBS por ultracentrifugación a 150,000 x g durante 120 minutos a 4°C y los gránulos se disolvieron en una cantidad mínima de PBS.

La concentración de PMP (1×10^9 PMPs/mL) y el tamaño mediano de PMP (121.8 nm) se determinaron usando un analizador de partículas Spectradyme nCS1™, usando un cartucho TS-400 (Figura 1B). El potencial zeta se determinó usando un Malvern Zetasizer Ultra y fue -11.5 +/-0.357 mV.

Este ejemplo demuestra que los PMP de toronja pueden aislarse usando ultracentrifugación combinada con métodos de purificación en gradiente de sacarosa. Sin embargo, este método indujo una gelificación severa de las muestras en todos los pasos de producción de PMP y en la solución final de PMP.

Ejemplo 10: Producción De PMP A Partir De Jugo De Fruta Prensado En Malla Usando Ultracentrifugación Y Purificación En Gradiente De Sacarosa

Este ejemplo demuestra la reducción de los contaminantes de la

pared celular y la membrana celular durante el proceso de producción de PMP mediante el uso de un proceso de jugo más suave (filtro de malla). En este ejemplo, la toronja

se usó como fruta modelo.

a) El jugo suave reduce la gelificación durante la producción de PMP a partir de PMP de toronja

Los sacos de jugo se aislaron de una toronja roja como se describe en el Ejemplo 9. Para reducir la gelificación durante la producción de PMP, en lugar de usar un método de mezcla destructivo, los sacos de jugo se presionaron suavemente contra una malla de filtro de té para recoger el jugo y reducir la pared celular y la célula. contaminantes de membrana. Después de la centrifugación diferencial, el jugo era más claro que después de usar una licuadora, y se observó una banda limpia de sacarosa que contenía PMP en la intersección del 30-45% después de la centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (Figura 2). En general, hubo menos gelificación durante y después de la producción de PMP.

Nuestros datos muestran que el uso de un paso de jugo suave reduce la gelificación causada por contaminantes durante la producción de PMP en comparación con un método que comprende la mezcla.

Ejemplo 11: Producción De PMP Usando Cromatografía De Ultracentrifugación Y Exclusión Por Tamaño

Este ejemplo describe la producción de PMP a partir de frutas utilizando ultracentrifugación (UC) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). En este ejemplo, la toronja se usa como fruta modelo.

a) Producción de PMP de toronja utilizando UC y SEC

Los sacos de jugo se aislaron de una toronja roja, como se describe en el Ejemplo 9a, y se presionaron suavemente contra una malla de filtro de té para recoger 28 ml de jugo. El flujo de trabajo para la producción de PMP de toronja usando UC y SEC se representa en La Figura 3A. Brevemente, el jugo se sometió a centrifugación

diferencial a 1000 x g durante 10 minutos, 3000 x g durante 20 minutos y 10,000 x g durante 40 minutos para eliminar los desechos grandes. Se ultracentrifugaron 28 ml de jugo aclarado en una microcentrífuga Sorvall™ MX 120 Plus a 100,000 x g durante 60 minutos a 4°C usando un rotor de cubeta oscilante S50-ST (4 x 7mL) para obtener un sedimento de PMP crudo que se resuspendió en tampón MES (MES 20 mM, NaCl, pH 6). Después de lavar los gránulos dos veces con tampón MES, el gránulo final se resuspendió en 1 ml de PBS, pH 7.4. A continuación, utilizamos la cromatografía de exclusión por tamaño para eluir las fracciones que contienen PMP. Las fracciones de elución SEC se analizaron mediante citometría de flujo nanométrico utilizando un NanoFCM para determinar el tamaño y la concentración de PMP utilizando los estándares de concentración y tamaño proporcionados por el fabricante. Además, se determinaron la absorbancia a 280 nm (SpectraMax®) y la concentración de proteína (ensayo Pierce™ BCA, ThermoFisher) en fracciones SEC para identificar en qué fracciones se eluyen los PMP (Figuras 3B-3D). Las fracciones SEC 2-4 se identificaron como las fracciones que contienen PMP. El análisis de fracciones de elución anterior y posterior indicó que la fracción SEC 3 es la fracción principal que contiene PMP, con una concentración de 2.83×10^{11} PMPs/mL (57.2% de todas las partículas en el rango de tamaño de 50-120 nm), con una mediana tamaño de 83.6 nm +/-14.2 nm (SD). Mientras que las fracciones de elución tardías 8-13 tenían una concentración muy baja de partículas como se muestra por NanoFCM, los análisis de BCA detectaron contaminantes de proteínas en estas fracciones.

Nuestros datos muestran que TFF y SEC pueden usarse para aislar PMP purificados de contaminantes de liberación tardía, y que una combinación de los métodos de análisis utilizados aquí puede identificar fracciones de PMP de contaminantes de liberación tardía.

Ejemplo 12: Producción De PMP A Escala Mediante Filtración De Flujo Tangencial Y Cromatografía De Exclusión Por Tamaño Combinada

Con EDTA / Diálisis Para Reducir Contaminantes

Este ejemplo describe la producción a escala de PMP a partir de frutas mediante el uso de filtración de flujo tangencial (TFF) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), combinada con una incubación de EDTA para reducir la formación de macromoléculas de pectina y diálisis durante la noche para reducir contaminantes. En este ejemplo, la toronja se usa como fruta modelo.

a) Producción de PMP de toronja utilizando TFF y SEC

Las toronjas rojas se obtuvieron de Whole Foods Market® local, y se aislaron 1000 ml de jugo usando una prensa de jugo. El flujo de trabajo para la producción de PMP de toronja usando TFF y SEC se representa en La Figura 4A. El jugo se sometió a centrifugación diferencial a 1000 x g durante 10 minutos, 3000 x g durante 20 minutos y 10,000 x g durante 40 minutos para eliminar los desechos grandes. El jugo de toronja depurado se concentró y se lavó una vez usando un TFF (tamaño de poro de 5 nm) a 2 ml (100 x). A continuación, utilizamos la cromatografía de exclusión por tamaño para eluir las fracciones que contienen PMP. Las fracciones de elución SEC se analizaron mediante citometría de nano-flujo utilizando un NanoFCM para determinar la concentración de PMP utilizando los estándares de concentración y tamaño proporcionados por el fabricante. Además, se determinó la concentración de proteína (ensayo Pierce™ BCA, ThermoFisher) para las fracciones SEC para identificar las fracciones en donde se eluyen los PMP. La producción a escala de 1 litro de jugo (100 x concentrado) también concentró una gran cantidad de contaminantes en las fracciones tardías de SEC como se puede detectar mediante el ensayo BCA (Figura 4B, panel superior). El rendimiento total de PMP (Figura 4B, panel inferior) fue menor en la producción escalada en comparación con los aislamientos de toronja individuales, lo que puede indicar la pérdida de PMP.

b) Reducción de contaminantes por incubación y diálisis con EDTA

Las toronjas rojas se obtuvieron de Whole Foods Market® local, y se aislaron 800 ml de jugo usando una prensa de jugo. El jugo se sometió a centrifugación diferencial a 1000 x g durante 10 minutos, 3000 x g durante 20 minutos y 10,000 x g durante 40 minutos para eliminar escombros grandes, y se filtró a través de un filtro de 1 μm y 0.45 μm para eliminar partículas grandes. El jugo de toronja depurado se dividió en 4 grupos de tratamiento diferentes que contenían 125 ml de jugo cada uno. El Grupo de tratamiento 1 se procesó como se describe en el Ejemplo 12a, se concentró y se lavó (PBS) hasta una concentración final de 63x, y se sometió a SEC. Antes de TFF, se incubaron 475 ml de jugo con una concentración final de EDTA 50 mM, pH 7.15 durante 1,5 horas a temperatura ambiente para quelar el hierro y reducir la formación de macromoléculas de pectina. Posteriormente, el jugo se dividió en tres grupos de tratamiento que se sometieron a la concentración de TFF con un lavado de PBS (sin calcio / magnesio) pH 7.4, MES pH 6 o Tris pH 8.6 hasta una concentración final de jugo de 63X. A continuación, las muestras se dializaron en el mismo tampón de lavado durante la noche a 4°C utilizando una membrana de 300 kDa y se sometieron a SEC. En comparación con el alto pico de contaminante en las fracciones de elución tardía del control solo TFF, la incubación con EDTA seguida de diálisis durante la noche redujo fuertemente los contaminantes, como se muestra por la absorbancia a 280 nm (Figura 4C) y el análisis de proteínas BCA (Figura 4D), que es sensible a la presencia de azúcares y pectinas. No hubo diferencias en los tampones de diálisis utilizados (PBS sin calcio / magnesio pH 7.4, MES pH 6, Tris pH 8.6).

Nuestros datos indican que la incubación con EDTA seguido de diálisis reduce la cantidad de contaminantes co-purificados, facilitando la producción de PMP a escala.

Ejemplo 13: Producción De PMP A Partir De Medio De Cultivo De Células Vegetales

Este ejemplo describe la producción de los PMP a partir del

cultivo de células vegetales. En este ejemplo, la línea celular Zea mays Black Mexican Sweet (BMS) se usa como una línea celular modelo de planta.

a) Producción de PMP de la línea celular BMS de Zea mays

La línea celular Zea mays Black Mexican sweet (BMS) se adquirió de ABRC y se cultivó en medio basal Murashige y Skoog pH 5.8, que contiene 4.3 g/L de mezcla de sal basal Murashige y Skoog (Sigma M5524), sacarosa al 2% (S0389, Millipore Sigma), 1x solución de vitamina MS (M3900, Millipore Sigma), 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (D7299, Millipore Sigma) y 250 ug/L de tiamina HCL (V-014, Millipore Sigma), a 24°C con agitación (110 rpm), y se pasó 20% volumen / volumen cada 7 días.

Tres días después del paso, se recogieron 160 ml de células BMS y se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos para eliminar las células, y 10,000 x g durante 40 minutos para eliminar los desechos grandes. El medio se pasó a través de un filtro de 0.45 µm para eliminar partículas grandes, y el medio filtrado se concentró y se lavó (100 ml de tampón MES, MES 20 mM, NaCL 100 mM, pH 6) mediante TFF (tamaño de poro de 5 nm) a 4 ml (40x). Luego, utilizamos la cromatografía de exclusión por tamaño para eluir las fracciones que contienen PMP, que fueron analizadas por NanoFCM para determinar la concentración de PMP, por absorbancia a 280 nm (SpectraMax®) y por un ensayo de concentración de proteínas (ensayo Pierce™ BCA, ThermoFisher) para verificar el Fracciones que contienen PMP y fracciones tardías que contienen contaminantes (Figuras 5A-5C). Las fracciones 4-6 de SEC contenían PMP purificadas (las fracciones 9-13 contenían contaminantes) y se agruparon. NanoFCM determinó la concentración final de PMP (2.84×10^{10} PMPs/mL) y el tamaño medio de PMP (63.2 nm +/-12.3 nm SD) en las fracciones combinadas de PMP, utilizando los estándares de concentración y tamaño proporcionados por el fabricante (Figuras 5D- 5E).

Estos datos muestran que los PMP pueden aislarse, purificarse y

concentrarse a partir de medios de cultivo líquidos de plantas.

Ejemplo 14: Captación De PMP Por Las Células Vegetales

Este ejemplo describe la capacidad de los PMP para asociarse y ser absorbidas por las células vegetales. En este ejemplo, los PMP de limón se usan como PMP modelo, y las líneas celulares de soja, trigo y maíz se usan como células vegetales modelo.

a) Producción de PMP de toronja usando TFF combinado con SEC

Las toronjas orgánicas rojas (Florida) se obtuvieron de Whole Foods Market® local. Se recogió un litro de jugo de toronja usando una prensa de jugo, y posteriormente se centrifugó a 3000 x g durante 20 minutos, seguido de 10,000 x g durante 40 minutos para eliminar los desechos grandes. A continuación, se añadió EDTA 500 mM, pH 8.6, a una concentración final de EDTA 50 mM, pH 7, y la solución se incubó durante 30 minutos para quelar el calcio y evitar la formación de macromoléculas de pectina. Posteriormente, el jugo se pasó a través de filtros de 11 µm, 1 µm y 0.45 µm para eliminar partículas grandes. El jugo filtrado se concentró y se lavó (500 ml de PBS) mediante filtración de flujo tangencial (TFF) (tamaño de poro de 5 nm) a 400 ml (2.5x) y se dializó durante la noche en PBS a pH 7.4 (con un intercambio de medio) usando una membrana de diálisis de 300 kDa para eliminar contaminantes. Posteriormente, el jugo dializado se concentró adicionalmente por TFF hasta una concentración final de 50 ml (20x). A continuación, utilizamos la cromatografía de exclusión por tamaño para eluir las fracciones que contienen PMP, que se analizaron por absorbancia a 280 nm (SpectraMax®) y un ensayo de concentración de proteínas (ensayo Pierce™ BCA, ThermoFisher) para verificar las fracciones que contienen PMP y las fracciones tardías que contienen contaminantes. Las fracciones SEC 4-6 contenían PMP purificadas (las fracciones 8-14 contenían contaminantes), se agruparon y se esterilizaron por filtración mediante filtración secuencial usando filtros de jeringa de 0,8 µm, 0,45 µm y 0.22 µm. La concentración final de PMP (1.32×10^{11} PMPs/mL) y el tamaño medio de

PMP (71.9 nm $\pm$ 14.5 nm) en las fracciones combinadas de PMP esterilizadas se determinaron mediante NanoFCM usando estándares de concentración y tamaño proporcionados por el fabricante.

b) Producción de PMP de limón usando TFF combinado con SEC

Los limones se obtuvieron de un Whole Foods Market® local. Se recogió un litro de jugo de limón usando una prensa de jugo, y posteriormente se centrifugó a 3000 g durante 20 minutos, seguido de 10,000 g durante 40 minutos para eliminar los desechos grandes. A continuación, se añadió EDTA 500 mM, pH 8.6, a una concentración final de EDTA 50 mM, pH 7, y la solución se incubó durante 30 minutos para quelar el calcio y evitar la formación de macromoléculas de pectina. Posteriormente, el jugo se pasó a través de un filtro de café, filtros de 1 μ m y 0,45 μ m para eliminar partículas grandes. El jugo filtrado se concentró mediante filtración de flujo tangencial (TFF) (tamaño de poro de 5 nm) a 400 ml (concentrado 2.5x) y se dializó durante la noche en PBS pH 7.4 usando una membrana de diálisis de 300 kDa para eliminar contaminantes. Posteriormente, el jugo dializado se concentró adicionalmente por TFF hasta una concentración final de 50 ml (20 x). Luego, utilizamos la cromatografía de exclusión por tamaño para eluir las fracciones que contienen PMP, que se analizaron por absorbancia a 280 nm (SpectraMax®) y un ensayo de concentración de proteínas (ensayo Pierce™ BCA, ThermoFisher) para verificar las fracciones que contienen PMP y las fracciones tardías que contienen contaminantes. Las fracciones SEC 4-6 contenían PMP purificadas (las fracciones 8-14 contenían contaminantes), se agruparon y se esterilizaron por filtración mediante filtración secuencial usando filtros de jeringa de 0,8 μ m, 0,45 μ m y 0,22 μ m. NanoFCM determinó la concentración final de PMP (2.7×10^{11} PMPs/mL) y el tamaño medio de PMP (70.7 nm $\pm$ 15.8 nm) en las fracciones combinadas de PMP esterilizadas, utilizando los estándares de concentración y tamaño proporcionados por el fabricante.

c) Etiquetado de PMP de limón con Alexa Fluor 488 NHS Ester

Se produjeron PMP de limón como se describe en el Ejemplo 14b. Los PMP se marcaron con el Alexa Fluor 488® NHS Ester (Life Technologies, colorante de membrana covalente (AF488)). Brevemente, AF488 se disolvió en DMSO a una concentración final de 10 mg/ml, se mezclaron 200 ul de PMP (1,53E + 13 PMP/ml) con 5 ul de colorante, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador y se marcaron PMP. se lavaron 2-3 veces por ultracentrifugadora a 100,000 x g durante 1 hora a 4°C. Los gránulos se resuspendieron con 1.5 ml de agua ultrapura. Para controlar la presencia de posibles agregados de colorante, se preparó una muestra de control de solo colorante de acuerdo con el mismo procedimiento, agregando 200 ul de agua UltraPure en lugar de PMP. El sedimento de PMP marcado con AF488 final y el control de tinte AF488 solo se resuspendieron en una cantidad mínima de agua UltraPure y se caracterizaron por NanoFCM. La concentración final de PMP marcadas con 488 de limón fue de 2.91×10^{12} PMP/ml con un tamaño medio de AF488-PMP de 79.4 nm +/-14.7 nm y una eficiencia de etiquetado de 89.4% (Figura 6A).

d) Captación de PMP de limón marcadas con AF488 por las células vegetales

Las líneas celulares de plantas se compraron en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Glycine max, # PC-1026; Triticum aestivum, # PC-998) y ABRC (Zea mays, Black Mexican sweet (BMS), y se cultivaron en matraces ventilados desconfiados de 250 ml en la oscuridad, a 24°C con agitación (110 rpm). Glycine max y Triticum aestivum se cultivaron en 3.2 g/L de medio basal B-5 de Gamborg con compuestos orgánicos mínimos suplementados (G5893, Millipore Sigma) pH 5.5, suplementado con 2% de sacarosa y 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2.4D) (D7299, Millipore Sigma) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las células BMS se cultivaron en medio basal Murashige y Skoog pH 5.8, que contiene 4.3 g/L Murashige y Skoog Mezcla de sal basal (Sigma M5524), 2% de

sacarosa (S0389, Millipore Sigma), 1x solución de vitamina MS (M3900, Millipore Sigma), 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (D7299, Millipore Sigma) y 250 ug/L de tiamina HCL (V-014, Millipore Sigma).

Para el tratamiento con AF488-PMP, se tomaron 5 ml de las suspensiones celulares para determinar el porcentaje de volumen celular de paquete (PCV). El PCV se define como el volumen de células dividido por el volumen total de la parte proporcional del cultivo celular, y se expresa como un porcentaje. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 3900 rpm, y se determinó el volumen del sedimento celular. El% de PCV para BMS, Glycine max y Triticum aestivum fueron 20%, 15% y 18%, respectivamente. Para el experimento de absorción, el% de PCV de los cultivos se ajustó al 2%, diluyendo las células en su medio apropiado. A continuación, 125 µl de la suspensión de células vegetales se añadió.

La placa, y las muestras duplicadas se trataron con 125 µl de tampón MES (MES 200 mM + NaCl 10 mM, pH 6) solo (control negativo), solo colorante AF488 (control solo colorante) o una concentración final de 1×10^{12} AF488-PMP/ml diluido en tampón MES a 125 µl. Las células se incubaron durante 2 horas a 24°C en la oscuridad, se lavaron tres veces con 1 ml de tampón MES para eliminar AF488-PMP o colorante libre que no se había recogido, y se resuspendieron en 300 µl de tampón MES para obtener imágenes en un microscopio de epifluorescencia (EVOS FL Auto 2, Invitrogen). En comparación con el control de solo colorante AF488 que no tenía fluorescencia detectable, se pudo detectar una señal fluorescente variable en todas las líneas celulares de la planta, lo que indica la captación de PMP (Figura 6B). Las células de Triticum aestivum mostraron la señal de fluorescencia más fuerte, lo que indica que de las tres líneas celulares de plantas analizadas, tuvieron la mayor absorción de PMP de limón marcadas con AF488.

Nuestros datos muestran que las células vegetales pueden ingerir PMPs in vitro.

Ejemplo 15: Absorción De PMP En Plantas

Este ejemplo describe la absorción y transporte sistémico de los PMP en planta. En este ejemplo, los PMP de plántulas de pomelo, limón y *Arabidopsis thaliana* se usan como PMP modelo, y las plántulas de *Arabidopsis* y los brotes de alfalfa se usan como plantas modelo.

a) Etiquetado de PMP de limón y pomelo con DyLight 800 NHS Ester

Se produjeron PMP de pomelo y limón como se describe en los Ejemplos 14a y 14b. Los PMP se marcaron con el tinte de membrana covalente DyLight 800 NHS Ester (Life Technologies, # 46421) (DyL800). Brevemente, DyL800 se disolvió en DMSO a una concentración final de 10 mg/ml, se mezclaron 200 µl de PMP con 5 µl de colorante, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador, y los PMP marcadas se lavaron 2-3 veces por ultracentrifugación. a 100,000 x g durante 1 hora a 4°C y los sedimentos se resuspendieron con 1.5 ml de agua UltraPure. Para controlar la presencia de posibles agregados de colorante, se preparó una muestra de control de solo colorante de acuerdo con el mismo procedimiento, agregando 200 µl de agua UltraPure en lugar de PMP. El sedimento PMP marcado con DyL800 final y el control de tinte DyL800 solo se resuspendieron en una cantidad mínima de agua UltraPure y se caracterizaron por NanoFCM. La concentración final de PMP marcadas con toronja DyL800 fue de $4,44 \times 10^{12}$ PMPs/mL, y de PMP marcadas con DyL800 de limón fue $5,18 \times 10^{12}$ PMPs/mL. La eficiencia del etiquetado no se pudo determinar utilizando el NanoFCM, ya que no puede detectar infrarrojos.

b) Germinación y crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Se obtuvieron semillas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 de tipo silvestre del ABRC y se esterilizaron en superficie con etanol al 70%, incubación con blanqueador al 50% / tritón X-100 al 0.1% durante 10 minutos y 4 lavados ddH₂O estériles para eliminar la solución de blanqueo. Las semillas se estratificaron durante 1 día a 4°C en la

oscuridad. Se germinaron aproximadamente 250 semillas por placa de 100 cm² (prerrevestidas con 0.5% de suero de ternera fetal en agua), que contenían 20 ml de medio MS 0.5x (2.15 g/L de sales de Murashige y Skoog, 1% de sacarosa, pH 5.8), selladas con Cinta quirúrgica 3M y cultivada en una incubadora con un fotoperíodo de 16 h de luz a 23°C / 8 h de oscuridad a 21°C.

c) Captación de pomelo, limón y Ats PMP marcados con DyL800 por *Arabidopsis thaliana* y Alfalfa

Para evaluar si los PMP se pueden absorber y transportar sistémicamente en planta, las plántulas de *Arabidopsis* se germinaron en cultivo líquido como se describe en el Ejemplo 15b en la parte superior de un filtro de malla, para permitir que las raíces crezcan a través de la malla y para permitir una exposición parcial de At plántulas a una solución de PMP. Los brotes de alfalfa se obtuvieron de un supermercado local. Las plántulas de *Arabidopsis* de 9 días y los brotes de alfalfa se trataron con una solución de agua de 0.5 ml (control negativo), solo colorante DyL800 (control de colorante) PMP de toronja marcada con DyL800 ($1,6 \times 10^{10}$ PMP/ml), o limón (5.1×10^{10} PMP/ml) PMP en medio MS 0.5X por exposición parcial a la raíz (en plántulas en una malla que flota en una solución de PMP, o en brotes de alfalfa por exposición parcial a la raíz en un tubo Eppendorf de 1.5 ml) durante 22 o 24 horas, respectivamente, a 23°C. Las plantas se lavaron 3 veces en medio MS y se tomaron imágenes usando una cámara infrarroja Odyssey® CLx (Li-Cor).

En comparación con el control negativo (algo de autofluorescencia en las hojas de brotes de alfalfa) y el colorante solo, todas las fuentes de PMP mostraron una señal de fluorescencia (el blanco es una señal fluorescente alta, el negro no es señal) tanto en las plántulas de *Arabidopsis* como en los brotes de alfalfa, lo que indica que los PMP están ocupadas por ambas plantas (Figura 7). La presencia de señal de fluorescencia en las hojas de *Arabidopsis* o áreas de tallo de alfalfa que no estuvieron expuestas a

la solución de PMP indica el transporte activo de los PMP en planta. Como las concentraciones de tratamiento DyL800 no se normalizaron en este experimento, no es posible evaluar las diferencias de eficiencia de absorción de origen / objetivo.

Nuestros datos indican que los PMP derivados de diversas fuentes vegetales pueden ser utilizados y transportados en planta.

Ejemplo 16: Tratamiento De Plántulas De Arabidopsis Thaliana Con PMP De Toronja Cargadas Con DOX

Este ejemplo describe la carga de los PMP con una molécula pequeña con el propósito de disminuir la aptitud de una planta. En este ejemplo, la doxorubicina se usa como molécula pequeña modelo, y Arabidopsis thaliana se usa como planta modelo. La doxorubicina es un antibiótico de antraciclina citotóxico aislado de cultivos de Streptomyces peucetius var. cesio. La doxorubicina interactúa con el ADN por intercalación e inhibe tanto la replicación del ADN como la transcripción del ARN. Se ha demostrado que la doxorubicina es citotóxica en las plantas (Culierez-Mac et al, Plant Growth Regulation, (5): 155-164, 1987.

Los herbicidas efectivos y seguros son necesarios para prevenir la pérdida de rendimiento de los cultivos debido a las malas hierbas, al tiempo que protegen el medio ambiente de los efectos secundarios tóxicos del uso excesivo de herbicidas.

a) Producción de PMP de toronja usando TFF combinado con SEC

Las toronjas orgánicas rojas se obtuvieron de Whole Foods Market® local. Se recogieron cuatro litros de jugo de toronja usando una prensa de jugo, el pH se ajustó a pH 4 con NaOH, se incubó con 1U/mL de pectinasa (Sigma, 17389) para eliminar los contaminantes de pectina, y posteriormente se centrifugó a 3,000 g durante 20 minutos, seguido de 10,000 g durante 40 minutos para eliminar escombros grandes. A continuación, el jugo procesado se incubó con EDTA 500 mM pH 8.6, a una concentración final de EDTA 50 mM, pH 7.7 durante 30 minutos para quelar el calcio y prevenir la formación de

macromoléculas de pectina. Posteriormente, el jugo tratado con EDTA se pasó a través de un filtro de 11 μm , 1 μm y 0.45 μm para eliminar partículas grandes. El jugo filtrado se lavó y se concentró mediante filtración de flujo tangencial (TFF) usando un TFF de 300 kDa. El jugo se concentró 5x, seguido de un lavado de intercambio de 6 volúmenes con PBS, y se filtró adicionalmente a una concentración final de 198 ml (20 x). Luego, utilizamos la cromatografía de exclusión por tamaño para eluir las fracciones que contienen PMP, que se analizaron por absorbancia a 280 nm (SpectraMax®) y concentración de proteínas (ensayo Pierce™ BCA, ThermoFisher) para verificar las fracciones que contienen PMP y las fracciones tardías que contienen contaminantes. Las fracciones SEC 3-7 contenían PMP purificadas (las fracciones 9-12 contenían contaminantes), se agruparon, se esterilizaron por filtración mediante filtración secuencial usando filtros de jeringa de 0.8 μm , 0.45 μm y 0.22 μm , y se concentraron aún más mediante la granulación de PMP para 1.5 horas a 40,000 x g y resuspender el sedimento en 4 ml de agua destilada sin ADNasa / RNasa UltraPure™ (ThermoFisher, 10977023). La concentración final de PMP (7.56×10^{12} PMPs/mL) y el tamaño promedio de PMP (70.3 nm $\pm$ 12.4 nm SD) fueron determinados por NanoFCM, usando estándares de concentración y tamaño proporcionados por el fabricante. Los PMP de toronja producidas se usaron para cargar doxorubicina.

B) Carga De Doxorubicina En PMP De Toronja

Los PMP de pomelo producidas en el Ejemplo 16a se usaron para cargar doxorubicina (DOX). Se preparó una solución madre de doxorubicina (Sigma PHR1789) a una concentración de 10 mg/ml en agua UltraPure y se esterilizó por filtración (0.22 μm). Los PMP de toronja estériles (3 ml a una concentración de partículas de 7.56×10^{12} PMP/ml) se mezclaron con 1.29 ml de solución de DOX. La concentración final de DOX en la mezcla fue de 3 mg/ml. La mezcla se sonicó durante 20 minutos en un baño de sonicación (Branson 2800) con una temperatura que aumentó a 40°C y se mantuvo 15 minutos

adicionales en el baño sin sonicación. La mezcla se agitó durante 4 horas a 24°C, 100 rpm, en la oscuridad. A continuación, la mezcla se extruyó usando Avanti Mini Extruder (Avanti Lipids). Para reducir el número de bicapas lipídicas y el tamaño de partícula general, los PMP cargadas con DOX se extrusionaron de forma gradual y decreciente: 800 nm, 400 nm y 200 nm. La muestra extruida se esterilizó por filtración mediante un paso posterior a través de un filtro de 0.8 μm y 0.45 μm (Millipore, diámetro 13 mm) en una campana TC. Para eliminar el DOX descargado o débilmente unido, la muestra se purificó usando un enfoque de ultracentrifugación. Específicamente, la muestra se centrifugó a 100,000 x g durante 1 hora a 4°C en tubos de ultracentrífuga de 1,5 ml. El sobrenadante se recogió para su posterior análisis y se almacenó a 4°C. El sedimento se resuspendió en agua estéril y se ultracentrifugó en las mismas condiciones. Este paso se repitió cuatro veces. El sedimento final se resuspendió en agua ultrapura estéril y se mantuvo a 4°C hasta su uso posterior.

A continuación, se determinó la concentración de partículas y la capacidad de carga de PMP. El número total de PMP en la muestra (4.76×10^{12} PMP/ml) y el tamaño medio de partícula (72.8 nm +/-21 nm SD) se determinaron usando un NanoFCM. La concentración de DOX se evaluó mediante medición de intensidad de fluorescencia (Ex/Em =485/550 nm) usando un espectrofotómetro SpectraMax®. Se preparó una curva de calibración de DOX libre de 0 a 50 ug/mL en agua estéril. Para disociar los PMP cargadas con DOX y los complejos de DOX (apilamiento π - π), las muestras y los estándares se incubaron con SDS al 1% a 37°C durante 45 minutos antes de las mediciones de fluorescencia. La capacidad de carga (pg DOX por 1000 partículas) se calculó como la concentración de DOX (pg/mL) dividida por el número total de PMP (PMP/ml). La capacidad de carga de PMP-DOX fue de 1.2 pg de DOX por 1000 PMP. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la eficiencia de carga (el% de PMP cargados con DOX en comparación con el número total de PMP) no se pudo evaluar ya que el espectro de

fluorescencia DOX no se pudo detectar en el NanoFCM.

c) Tratamiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana* con PMP cargadas con doxorubicina

Se produjeron PMP de pomelo y se cargaron con doxorubicina como se describe en los Ejemplos 16a y 16b. Se obtuvieron semillas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 de tipo salvaje del ABRC, se esterilizaron en superficie con un 50% de blanqueador, se estratificaron durante 1-3 días a 4°C y germinaron en medio Murashige y Skoog (MS) de resistencia media (0.5x) suplementado con 0.5% de sacarosa, MES 2.5 mM, pH 5.6, que contiene agar al 0.8%, con un fotoperíodo de 16 h de luz 23°C / 8h de oscuridad 21°C.

Para probar si los PMP pueden entregar una carga de molécula pequeña en una planta, se transfirieron plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 7 días a medio MS líquido 0.5X en una placa de 24 pocillos (1 plántula por pocillo), y se trataron con PMP cargadas con DOX o DOX gratis con una dosis de DOX encapsulada de 0 (control negativo), 25 µM, 50 µM y 100 µM. La placa se cubrió con papel de aluminio y se incubó durante 24 horas. Se retiró el medio que contenía DOX, se lavaron las plántulas dos veces con medio MS ½X y se añadió medio fresco. Las plántulas se incubaron durante 3 días adicionales bajo un fotoperíodo normal (16 h de luz 23°C / 8 h de oscuridad 21°C). Luego, las plántulas se retiraron de la placa y se secaron con una toalla para obtener imágenes y se evaluó la citotoxicidad analizando el vigor de las hojas, el color de las hojas y la longitud de la raíz. La citotoxicidad se define por el acortamiento de las raíces, la pérdida del vigor de las hojas y la decoloración de las hojas (amarillo en lugar de verde) en comparación con un control de plántulas no tratadas. En comparación con DOX libre que solo mostró citotoxicidad a 100 µM de DOX (acortamiento de la raíz y decoloración de las hojas), los PMP cargadas con DOX fueron citotóxicas a 50 µM y 100 µM de DOX. Las plántulas tratadas con PMP-DOX 50 µM mostraron un amarilleamiento foliar severo con un vigor

reducido y acortamiento de las raíces. Nuestros datos indican que los PMP pueden cargarse y entregar una molécula pequeña en la planta, y que los PMP cargadas con doxorrubicina son dos veces más eficientes para inducir una respuesta citotóxica que la doxorrubicina libre.

Ejemplo 17. Absorción De PMP Tratadas Con Pectinasa Por Brotes De Alfalfa

Este ejemplo describe que la eliminación de pectinas durante el proceso de producción de PMP no afecta su absorción en la planta y el transporte sistémico. En este ejemplo, los PMP de limón se usaron como PMP modelo, y los brotes de alfalfa se usaron como planta modelo.

a) Producción de PMP de limón con o sin adición de pectinasa

Los limones se obtuvieron de un Whole Foods Market® local. Se recogió jugo de limón (1260 ml) usando una prensa de jugo, y se dividió en dos fracciones. No se trataron 630 ml y se ajustó el pH a 630 ml con NaOH y se incubó con pectinasa 6U/mL (Sigma, 17389) durante 1.45 horas a temperatura ambiente. El jugo tratado con pectinasa y sin tratar se centrifugó posteriormente a 3000 g durante 20 minutos, seguido de 10,000 g durante 40 minutos para eliminar los restos grandes. A continuación, el jugo procesado se incubó con EDTA 500 mM pH 8.6, a una concentración final de EDTA 50 mM, pH 7.19-7.25, durante 30 minutos a temperatura ambiente para quelar el calcio y evitar la formación de macromoléculas de pectina. Posteriormente, el jugo tratado con EDTA se pasó a través de un filtro de 11 μ m, 1 μ m y 0.45 μ m para eliminar partículas grandes. El jugo filtrado se lavó (260 ml de PBS durante el procedimiento TFF) y se concentró ~1,6x hasta un volumen total de 400 ml por filtración de flujo tangencial (TFF), y se dializó durante la noche en PBS, pH 7.4 usando una membrana de diálisis de 300 kDa. Posteriormente, el jugo dializado se concentró adicionalmente por TFF hasta una concentración final de 30 ml (~21x). Luego, utilizamos la cromatografía de exclusión por tamaño para eluir las fracciones que contienen PMP, y analizamos la

absorbancia de 280 nm (SpectraMax) para determinar las fracciones que contienen PMP de las fracciones de elución tardía que contienen contaminantes. Las fracciones SEC 4-6 (sin tratamiento con pectinasa) y las fracciones SEC 4-7 (con tratamiento con pectinasa) que contenían PMP purificadas se agruparon en los grupos de tratamiento individuales. Las fracciones SEC agrupadas se dializaron o/n en PBS, pH 7.4 usando una membrana de diálisis de 300 kDa. Las muestras se esterilizaron por filtración secuencial utilizando filtros de jeringa de 0.85 μm , 0.4 μm y 0.22 μm , y se concentraron adicionalmente mediante granulación de PMP durante 1.5 horas a 40,000 $\times$ g y finalmente el sedimento se resuspendió en agua ultrapura. La concentración final de PMP para los PMP de limón no tratadas fue 1.24×10^{12} PMP/ml y el tamaño medio de PMP fue 129 nm $\pm$ 12 nm SD; para los PMP de limón tratadas con pectinasa, la concentración final fue de 2.26×10^{12} PMP/ml y la mediana del tamaño de PMP fue de 130 nm $\pm$ 11 nm (SD), según lo determinado por citometría de nanoflujo (NanoFCM) utilizando los estándares de concentración y tamaño proporcionados por el fabricante.

b) Etiquetado de PMP de limón con DyLight 800 NHS Ester

Los PMP de limón tratadas y no tratadas con pectinasa se marcaron con el colorante de membrana covalente DyLight 800 NHS Ester (Life Technologies, # 46421) (DyL800). Brevemente, DyL800 se disolvió en DMSO a una concentración final de 10 mg/ml, se mezclaron 200 μl de PMP con 5 μl de colorante, se incubaron durante 1 h temperatura ambiente en un agitador, y los PMP marcadas se lavaron 2-3 veces por ultracentrifugación. a 100,000 $\times$ g durante 1 hora a 4°C y los sedimentos se resuspendieron con 1,5 ml de agua UltraPure. Para controlar la presencia de posibles agregados de colorante, se preparó una muestra de control de solo colorante de acuerdo con el mismo procedimiento, agregando 200 μl de agua UltraPure en lugar de PMP. El sedimento PMP marcado con DyL800 final y el control de tinte DyL800 solo se resuspendieron en una cantidad mínima de agua UltraPure y se

caracterizaron por NanoFCM. La concentración final de PMP de limón marcadas con Dyl800 no tratadas con pectinasa fue de 3.2×10^{12} PMP/ml, y de PML marcadas con pectinasa tratada con 5.57×10^{12} PMP/ml. La eficiencia del etiquetado no se pudo determinar utilizando el nanoFCM, ya que no puede detectar infrarrojos.

c) Tratamiento de brotes de alfalfa con DyL800-PMP tratadas y no tratadas con pectinasa

Para evaluar si la eliminación de pectina durante la producción de PMP afecta la absorción de PMP, los brotes de alfalfa se obtuvieron de un supermercado local, se trataron con PMP DyLight800-Lemon tratadas con pectinasa y sin tratar, agua (control negativo), solo colorante DyLight800nm (control de agregado de colorante) en Murashige y Skoog (MS) de resistencia media, suplementado con sacarosa al 0.5% y MES 2.5 mM, pH 5.6 durante 21 horas a 23°C (Figura 8A). Las plántulas se lavaron 3 veces en medio MS y se tomaron imágenes usando un generador de imágenes infrarrojas Odyssey. No hubo diferencias en la absorción y el transporte de PMP producidas con o sin tratamiento con pectinasa (Figura 8B).

Ejemplo 18: Modificación de los PMP usando lípidos catiónicos

Este ejemplo demuestra la capacidad para modificar la carga superficial, aumentar la capacidad de carga, y aumentar la absorción celular de los PMP en células vegetales, por modificación de los PMP con lípidos catiónicos. En este ejemplo, DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) y Colesterol DC (3β -[N(N',N'-dimetilaminoetanol)-carbamoil]colesterol) son usados como lípidos catiónicos modelos, los PMP de toronja y limón como modelos PMP, ARNsi/Transactivador de CRISPR ARN (TracrARN) como un modelo cargado negativamente, y Zea mays (maíz) Black Mexican sweet (BMS) como un modelo de línea celular.

Protocolo Experimental:

a) Producción de PMP de limón/toronja

La red orgánica de toronjas o limones amarillos orgánicos

fueron obtenidos de un supermercado local. Seis litros de jugo de toronja fueron recolectados usando una prensa de jugo, pH ajustado a pH 4 con NaOH, se incubó con 1U/mL de pectinasa (Sigma, 17389) para eliminar los contaminantes de pectina, y posteriormente se centrifugó a 3,000 g durante 20 minutos, seguido de 10,000g durante 40 minutos para eliminar escombros grandes. A continuación, el jugo procesado se incubó con EDTA 500 mM pH 8.6 a una concentración final de EDTA 50 mM, pH 7.7 durante 30 minutos para quelar el calcio y prevenir la formación de macromoléculas de pectina. Posteriormente, el jugo tratado con EDTA se pasó a través de un filtro de 11 μ m, 1 μ m y 0.45 μ m para eliminar partículas grandes. El jugo filtrado se lavó y se concentró mediante filtración de flujo tangencial (TFF) usando un TFF de 300 kDa. El jugo se concentró 10x, seguido de un lavado de intercambio de 10 volúmenes con PBS, y se concentró adicionalmente a una concentración final de 120 mL (50x). Luego, utilizamos la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para eludir las fracciones que contienen PMP, que se analizaron por absorbancia a 280 (SpectraMax®) y concentración de proteínas (Ensayo de proteínas Pierce™ BCA) para verificar las fracciones que contienen PMP y las fracciones tardías que contienen contaminantes. Las fracciones SEC 3-7 contenían PMP purificadas (las fracciones 9-12 contenían contaminantes) se agruparon, se esterilizaron por filtración mediante filtración secuencial usando filtros de jeringa 0.8 μ m, 0.45 μ m y 0.22 μ m, y se concentraron aún más mediante la granulación de PMP para 1.5 horas a 40,000x g y resuspender el sedimento en 4 mL de agua destilada sin ADNasa/RNasa UltraPure™ (ThermoFisher, 10977023). La concentración fina de PMP (7.56×10^{12} PMPs/mL) y el tamaño promedio de PMP (70.3 nm $\pm$ 12.4 nm SD) fueron determinados por NanoFCM, usando estándares de concentración y tamaño proporcionados por el fabricante. Los PMP de toronja (GF) o limón (LM) se usaron para extracción de lípidos usando el método Bligh-Dyer, como se describe a continuación.

b) Modificación de PMP con lípidos catiónicos

Para preparar PMP con lípidos reconstituidos (LPMP), extracción de lípidos total de una solución concentrada de PMP de toronja o limón se realizó usando el método Bligh-Dyer (Bligh and Dyer, *J Biolchem Physiol*, 37: 911-917, 1959). Brevemente, 1 mL de PMP concentrado (1012-1013 PMPs/mL) se mezcló con 3.5 mL de cloroformo: mezcla de metanol (1:2, v/v) y mezclado. Luego se agregaron 1.25mL de cloroformo y se mezclaron, seguido por agitación de 1.25 mL de agua esterilizada. Finalmente, la mezcla fue centrifugada a 300 g durante 5 minutos a RT. La base de la fase orgánica contiene lípidos que fueron recuperados y secados usando el sistema TurboVap®(Biotage®). Para modificar la composición de lípidos naturales de LPMP, lípidos catiónicos sintéticos (DOTAP, Colesterol DC) se disolvieron en cloroformo: metanol (9:1) y se agregó al extracto de lípidos PMP la cantidad de 25% o 40% (w/w) del total de lípidos, seguido de una mezcla enérgica. La capa de lípidos secos se prepare por medio de la evaporación del solvente con un flujo de gas inerte (por ejemplo, nitrógeno) o por evaporación usando el sistema TurboVap® (Figura 11). Para preparar la reconstrucción de los PMP de los lípidos extraídos, agua o tampón (por ejemplo, PBS) se agregó a la capa de lípidos secos y se dejó durante 1 hora a RT para hidratarlos. Las partículas de lípidos formados se encuentran sujetos a ciclos de congelamiento-derretimiento 10 o sonicación (Branson 2800 baño de sonicación, 10 min, RT). Luego, para reducir el número de bicapas lipídicas y el conjunto del tamaño de partículas, los lípidos PMP fueron extraídos a través filtros de polycarbonato de 0.8 µm, 0.4 µm y 0.2 µm usando un Mini Extruder (Avanti® Polar Lipids) (Figura 11). Si se requiere LPMP concentrado, las muestras se concentraron por ultra centrifugación a 100,000 x g durante 30 min a 4°C. El gránulo final fue suspendido en agua esterilizada UltraPure o PBS y mantenido a 4°C hasta un uso posterior. La concentración final LPMP y el tamaño medio LPMP (rango de 89-104 nm) se determinó por NanoFCM, usando estándares de

concentración y tamaño proporcionados por el fabricante. La carga superficial (potencial zeta) se midió por medio de una dispersión de luz dinámica usando Zetasizer (Malvern Panalytical). El rango de tamaño y concentraciones LPMP fue 83 ± 19 nm y 1.7×10^{12} LPMP/mL por LM LPMPs, 106 ± 25 nm y 6.54×10^{10} LPMPs/mL por LPMP modificados DOTAP, y 91 ± 17 nm y 3.08×10^{11} LPMPs/mL por colesterol DC de PMP modificados (Figura 12). Modificación de PMP con lípidos reconstituidos con lípidos catiónicos DOTAP y colesterol DC cambio la carga superficial de los LPMP: con incremento del contenido de lípidos catiónicos, la carga superficial de LPMP incrementada (Figura 13A). Análisis de imágenes Crio-EM de LPMP reconstruido de lípidos de limón extraídos conformando la esfericidad de los LPMP y distribución del tamaño de las partículas (68.7 ± 23 nm (SD)) (Figuras 14A y 14B).

c) Carga de lípidos catiónicos modificados PMP con carga negativa

Para cargar ARNsi/TracrARN, lípidos extraídos GF o LM fueron complementadas con lípidos catiónicos y secados como se describe más arriba. siRNA/TracrRNA disuelto en un agua libre de nucleasa o Duplex Buffer (IDT®) se agregó a la capa de lípidos secos a 1.5 nmol por 1 mg de lípidos PMP y se dejó durante 1 hora a RT para hidratarlos. Las partículas de lípidos formados fueron sometidas a ciclos de enfriamiento/descongelamiento 10 y expulsados a través de filtros de policarbonato 0.8 μ m, 0.4 μ m y 0.2 μ m usando una Mini Extrusora (Avanti® Polar Lipids) (Figura 11). La carga de los PMP se dializó durante la noche en PBS, usando un dispositivo de diálisis (Spectrum®) con una membrana de 100 kDa MWCO y luego se esterilizó usando filtros 0.2 μ m Polyethersulfone (PES). Adicionalmente, las muestras se purificaron y concentraron usando ultracentrifugación. Los PMP cargados se centrifugaron durante 30 minutos a $100,000 \times g$ a 4°C , el sobrenadante fue eliminado, y el gránulo fue suspendido en 1 mL PBS y concentrado a $100,000 \times g$ durante 30 minutos. Los gránulos resultantes fueron suspendidos en agua (para absorción celular de

células de plantas). El tamaño de los LPMP cargados y número de partículas se evaluaron con NanoFCM: el tamaño medio y la concentración de partículas fue 89 ± 15 nm y 1.54×10^{12} LPMPs/mL por LPMP no modificados, 104 ± 25 nm y 2.54×10^{11} LPMPs/mL por colesterol DC, y 100 ± 30 nm y 9.7×10^{11} LPMPs/mL por DOTAP. La carga ARN fue determinada por el ensayo Quant-iT™ RiboGreen™ o por la medición de la intensidad de la fluorescencia de la carga etiquetada (ARNs etiquetada con Flúor Alexa 555 o TracrRNA etiquetada con ATTO 550). La morfología y tamaño de los LPMP no modificados fue también analizado por un microscopio Criogénico Electrónico (Crio-EM) (Figuras 14A y 14B). El ensayo RiboGreen™ se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante en presencia de heparina (5 mg/mL) y 1% Triton-X100 para alisar PMP y liberar la carga encapsulada.

La modificación de los LPMP con lípidos catiónicos DOTAP y colesterol DC cambió la carga superficial de los LPMP y aumentó la carga negativamente (por ejemplo, ARN), como se compararon los LPMP sin lípidos catiónicos (Figs. 4A-4D).

d) Incremento de entrega de ARN a células vegetales por colesterol DC PMP modificado

Las células Zea mays, Black Mexican sweet (BMS) se adquirió en un Centro de Recursos Biológicos Arabidopsis (ABRC). Las células BMS se criaron en medio basal Murashige y Skoog, pH 5.8, que contiene 4.3 g/L mezcla de sal en medio basal Murashige y Skoog, (Sigma M5524), sacarosa al 2% (S0389, Millipore Sigma), 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenooxiacético (D7299, Millipore Sigma), 250 µg/L de tiamina HCL (V-014, Millipore Sigma) y 1x solución mixta de vitamina MS en ddH₂O. La 1x solución mixta de vitamina obtenida de niacina (N0761-100G, Millipore Sigma), clorhidrato Piridina (P6280-25G, Millipore Sigma), ácido pantoténico D sal hemicalcio (P5155-100G, Millipore Sigma), L-Asparagina (A4159-25G, Millipore Sigma), y Mio-inositol (I7508-100G, Millipore Sigma) en las respectivas concentraciones finales de 1.3 mg/L, 250 µg/L, 250 µg/L, 130 mg/L, y 200 mg/L. Las

células fueron criadas en frascos esterilizados cónicos 1L ventilados, en oscuras condiciones a 24°C con agitación (110 rpm). Para el tratamiento de células BMS, 10 mL de suspensiones de las células fueron tomadas para determinar el porcentaje del volumen del paquete de células (PCV). El PCV se define como el volumen de células divididas por el total del volumen proporcional de cultivo de células y se expresa como un porcentaje. Las células fueron centrifugadas durante 5 minutos a 3900 rpm, y el volumen de gránulos de células fue determinado. El % PCV para BMS del 20%. Para la absorción del experimento, el % PCV de los cultivos se ajustó al 4% de células diluidas en el medio como se describe más arriba. Los LPMP y LPMP modificados con colesterol DC fue cargado con TracrRNA etiquetado con ATTO 550 como se describe más arriba, esterilizado, y suspendido en agua esterilizada. El tamaño medio y la concentración de las partículas fue analizada por NanoFCM y fue 104 ± 25 nm y 2.54×10^{11} LPMPs/mL para DC-Col y 89 ± 15 nm y 1.54×10^{12} LPMPs/mL para LPMP no modificados. La cantidad de TracrARN ATTO 550 (IDT) en muestras fue cuantificada por Quant-iT™ RiboGreen®. 50 µL de ambos LPMP y LPMP modificado con colesterol DC que contiene 433 ng de TracrARN se agregó a una proporción de 450 µL de suspensión celular de plantas en un recipiente profundo 24 en duplicado. 50 µL de agua esterilizada Ultrapure se agregó a las células y se usó como un control negativo. Las células fueron incubadas durante 3 horas a 24°C en la oscuridad y fueron lavadas tres veces con 1 mL de agua esterilizada Ultrapure para eliminar partículas que no habían sido absorbidas por las células. Las células fueron suspendidas en 500 µL de agua esterilizada Ultrapure para representarse en un microscopio fluorescente (Olympus IX83). Comparado con el control negativo (agua esterilizada Ultrapure), el cual no tenía fluorescencia visible, una señal de variable fluorescente puede detectarse en células vegetales tratadas con LPMP y LPMP modificados con colesterol DC (Figura 15). Los LPMP modificados con colesterol DC muestran la señal fluorescente

más fuerte, indicando la modificación PMP que tiene la mayor entrega de TracrARN a las células vegetales. Nuestra información muestra que la modificación de los LPMP con lípidos catiónicos Colesterol DC perfeccionado con la absorción LMP de limón LPMP por células vegetales in vitro.

Ejemplo 19: Modificación de una planta por PMP mediado por la entrega de ARNg

Este ejemplo demuestra la carga y entrega funcional de los ácidos nucleicos cortos en planta para afectar la expresión del gen. Este ejemplo además demuestra que las cargas de ácido nucleico cortos PMP son estables y mantienen su actividad dentro de la planta. En este ejemplo, transgénico dCas9-SunTag-VP64 Arabidopsis thaliana es usado como planta modelo, los PMP de toronjas son usados como modelos PMP, y guías ARNs(gARNs) en el gen FLOWERING WAGENINGEN (FWA) son usados como modelos de ácidos nucleicos cortos (aproximadamente 35 kDa).

a) Absorción de PMP con lípidos reconstituidos por plantas íntegras

Previamente se demostró que los PMP naturales de limón y toronja puede ser tomado intacto de las raíces de la planta, incluyendo Arabidopsis thaliana (Ejemplo 15). En este ejemplo, se demostró que los PMP con lípidos reconstituidos (LPMP) pueden del mismo modo ser absorbidos por raíces Arabidopsis. Los lípidos se extrajeron de limón natural (LM) y PMP de toronja (GF) y reconstruidos como se describe en el Ejemplo 18. Los LPMP obtenidos por lo tanto fueron etiquetados con fluorescentes infrarrojos junto a colorantes lipófilos 1,1'-dioctadecilo-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine yodo (DiR) (Thermo Fisher). Véase que 3 µL de la solución de almacenada DiR (5 mg/mL) se agregó a 1 mg de lípidos PMP extraídos de toronja y limón. La capa de lípidos seca se prepare como se describe en el ejemplo 18, seguido de sonicación (10 min, RT, Branson 2800 baño de sonicación) y por medio

de extrusión de filtros de polycarbonato 0.8 μm , 0.4 μm , y 0.2 μm usando una Mini Extrusora (Avanti Polar Lipids). El colorante sin consolidar fue eliminado usando centrifugado de columnas de desalinización ZebaTM (40 kDa MWCO, Thermo Fisher Scientific) equilibrado con agua. El PMP etiquetado DiR fue concentrado en la unidad de filtro centrífuga Amicon® Ultra-0.5 (peso molecular de bloqueo (MWCO) 100 kDa). El lavado y filtrado de esterilización de las preparaciones LPMP etiquetadas DiR fueron diluidas 1:5 con líquido medio $\frac{1}{2}$ MS (mezcla de sal basal Murashige & Skoog basal (Sigma) 2.15 g/L, sacarosa 10 g/L, MES (Sigma) 0.5 g/L, pH 5.8 modificados con KOH), y 100 μL fueron proporcionales en los tubos estériles de 1.5 mL Eppendorf. Dos semanas de vida de plántulas Arabidopsis (Col-0 wild-type) fueron transferidas en tubos preparados Eppendorf usando pinzas estériles. El cuidado fue tomado solo en la tercera base de una raíz que fue sumergida. Cada tratamiento (control no tratado, control DiR, LM-LPMP-DiR, GF-LPMP-DiR), cinco plántulas fueron usados en tubos individuales. Los tubos fueron sellados, cubiertos con papel aluminio, y puestos en una incubadora de crecimiento de plantas durante 48 horas. Las plántulas fueron luego lavadas dos veces con agua que contenía 1% Tritón X-100 (Sigma) y una sola vez solo con agua. Las plántulas fueron secadas con toallas y ubicadas en un sistema de escáner iBright 1500 (Thermo Fisher) para representar a 750 nm (longitud de onda de secado DiR). Aumentar la señal fluorescente en plantas tratadas con LM-LPMP-DiR y GF-LPMP-DiR en comparación con controles donde fue observada (Figuras 9A y 9B), indicando la absorción de los LPMP por medio de plantas.

b) Modificación y carga de PMP con ARNg

Modificación y carga de PMP usados en este ejemplo son descriptos en el Ejemplo 18. Limón Natural PMP fue usado como Fuente de lípidos, y dos formulaciones diferentes fueron usadas: (1) LPMP no modificados y (2) LPMP con agregado de colesterol DC (DC-Col-LPMP). La guía ARNs (gARNs) usadas en este ejemplo se obtuvieron de

Tecnologías ADN Integrado (IDT). Para formar un dúplex funcional gARN, Alt-R® CRISPR-Cas9 secuencias crARN XT (23 bp) etiquetando el gen Arabidopsis FLOWERING WAGENINGEN (FWA) (At4g25530) fueron reconocidas como universal Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrARN (67 bp) siguiendo las instrucciones del fabricante. Dos secuencias diferentes crARN fueron usadas: FWA-g4 5'-ACGGAAAGATGTATGGGCTT-3' (SEQ ID No: 53) y FWA-g17 5'-AAACTAGGCCATCCATGGA-3' (Papikian et al., Nat Commun, 10: número de artículo 729, 2019) (SEQ ID No: 54). gARN dúplex 4 and 17 (SEQ ID Nos: 53 y 54) fueron mezcladas en cantidades equimolares y cargadas en LPMP como se describe en el Ejemplo 18. Las preparaciones de LPMP cargados fueron esterilizadas (0.2 um filtros estériles), lavados usando un método de ultra centrifugación (100,000 g, 30 min, 4°C), y suspendidos en 150 µL de agua esterilizada después de la ultra centrifugación. Concentración y tamaño medio de partículas fueron evaluadas por NanoFCM y cuantificadas con carga ARN usando el kit de ensayo Quant-iT™ RiboGreen™ ARN (Thermo Fisher) como se describe en el ejemplo 18 (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración y tamaño medio de carga gARN y carga tracrARN de PMP

Muestra	Número de partícula (P/ml)	Tamaño medio (nm)	Tamaño SD (nm)	Contenido ARN (ng/ul)
LPMP-ARNg	1.11E+12	88.5	21.4	11.21
DC-Col-ARNg	1.17E+12	105.0	23.6	487.17
DC-ColtracrARN	1.37E+12	103.7	22.6	379.81

c) Entrega Funcional de limón PMP cargada con ARNg etiquetado FWA en dCas9-SunTag-VP64 *Arabidopsis thaliana*

En este ejemplo, se tomó ventaja del sistema dCas9-SunTag-VP64 en transgénicos *Arabidopsis thaliana* (Papikian et al., Nat Commun, 10: Número de artículo 729, 2019). En este sistema, el cual consiste de dos módulos, una endonucleasa Cas9 desactivada (dCas9) se fusiona con las repeticiones del péptido GCN4 y el activador transcripcional VP64 se fusionan con una cadena simple de un fragmento variable fragmento anticuerpo GCN4, permitiendo copias múltiples de VP64 para asociar con una proteína dCas9 simple. Al suministrar gARNs correspondiente con la secuencia promotora de un gen de interés (en este caso, FWA), este sistema dCas9-SunTag-VP64 (se refiere como SunTag de aquí en adelante) puede usarse como un 'dispositivo guiado' para activar la expresión genética. Las semillas transgénicas SunTag plantas *Arabidopsis thaliana* (Papikian et al., Nat Commun, 10: número de artículo 729, 2019) fueron obtenidas del centro de recursos biológicos *Arabidopsis* (ABRC). Las semillas fueron esterilizadas de la siguiente manera: 70% de etanol durante 1 minuto, 50% de decolorante doméstico con 0.1% de Tritón X-100 (Sigma) durante 10 minutos, lavados tres veces con agua desionizada estéril. Semillas esterilizadas fueron suspendidas en 0.1% agarosa estéril y clasificadas a 4°C durante tres días en la oscuridad. Las semillas fueron luego ubicadas en platos de ½ MS (mezcla de sal basal Murashige & Skoog (Sigma) 2.15 g/L, 10 g/L de sucrosa, MES (Sigma) 0.5 g/L, phytoagar (Duchefa) 5 g/L, pH 5.8 modificados con KOH) complementadas con 35 mg/L Hygromycin B (GoldBio) para seleccionar SunTag semillas positiva entre la separación de la población T2. Las placas fueron selladas con cinta adhesiva médica (3M) y fueron ubicadas en una incubadora de crecimiento de plantas con luz durante 6 horas para estimular la germinación.

Las placas luego fueron cubiertas con papel aluminio durante 48 horas, desenvueltas, y las semillas criadas durante tres días bajo

condiciones de crecimiento normales (16 horas de luz, 23°C/21°C día/noche). Las semillas resistentes a Hygromycin B mostradas en un típico fenotipo etiolado (alargado hipocótilo relacionado con plántulas no resistentes; plántulas no resistentes secas). Esta selección de protocolo fue previamente descripta por Harrison et al., Métodos de Plantas, 2: Número de artículo 19, 2006.

Plántulas resistentes (ocho por tratamiento, combinados) fueron tomados de placas con pinzas esterilizadas y ubicadas en tubos 2 mL Eppendorf estériles que contienen 200 µL de líquido medio ½ MS y 50 µL de LPMP modificados con lípidos catiónicos o ionizables que contienen entre 19-27 µg de ARNg y LPMP no modificados que contienen 0.6 µg de ARNg. Los tratamientos fueron (1) LPMP-ARNg, (2) DC-Col-LPMP-ARNg, (3) DC-CollLPMP-tracrARN, y (4) ARNg solamente (27 µg). Se tomaron los recaudos para sumergir las raíces en el medio y dejar los cotiledones flotando en la superficie. Ocho plantulas fueron usadas para tratamiento. Tubos sellados fueron ubicados en una incubadora de crecimiento de plantas durante 24 o 48 horas para darle tiempo a los PMP para ser tomados de las raíces de las plantas, emigrar a través de las plantas, y entregar las cargas ARNg en células vegetales, y para las ARNg ser incorporados en la dCas9-SunTag-VP64 compleja y activar la expresión del FWA gen, el cual no se expresa en plántulas (Fujimoto et al., PLoS Genet., 4: e1000048, 2008). Siguiendo el tiempo de incubación prescripto, las plantulas fueron sacadas de la solución contenedora de PMP, enjuadas una vez en agua UltraPure (Thermo Fisher), secadas con toalla, y congeladas en líquidos nitrógeno. Para determinar la activación del gen de expresión FWA, niveles ARNm transcriptos fueron ensayados usando transcripciones cuantitativas de reversa RAP (RT-RAPq). Las plántulas congeladas fueron molidas en tubos usando morteros plásticos, y el ARN total fue extraído usando el mini Kit de planta RNeasy® (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ARN purificados fueron eluidos de las columnas usando 40 µL agua libre RNasa (Qiagen). El AND genómico

fue eliminado de las preparaciones ARN usando la DNasa I, Kit de grado de Amplificación (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis ADNc fue realizada usando la Invitrogen SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Thermo Fisher) y el manual Oligo(dT) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para detectar la expresión del gen FWA (At4g25530), el RAP cuantitativo fue realizado usando la Luna® Universal qPCR Master Mix (NEB) siguiendo las instrucciones del fabricante sobre un sistema RAP Applied Biosystems™ QuantStudio™ 7 Flex Real-Time (Thermo Fisher). Los manuals fueron usados para el experimento RAPq previamente publicado (Cabanillas et al., Plant Cell, 30: 2594-2615, 2018; Papikian et al., Nat Commun, 10: Número de artículo 729, 2019): FWA_F 5'-TTAGATCCAAAGGAGTATCAAAG-3' (SEQ ID NO: 55), FWA_R 5'-CTTTGGTACCAGCGGAGA-3' (SEQ ID NO: 56), IPP2_F 5'-GTATGAGTTGCTTCTCCAGCAAAG-3' (SEQ ID NO: 57), IPP2_R 5'-GAGGATGGCTGCAACAAGTGT-3' (SEQ ID NO: 58), Ubiquitin_F 5'-CCTACCTTTGAGGGGCTTCT-3' (SEQ ID NO: 59), Ubiquitina_R 5'-GAAGTCGTGAGACAGCGTTG-3' (SEQ ID NO: 60). RAPq fue realizado usando el siguiente programa: (a) 95°C durante 60 segundos; (b) 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos. Un gen ubiquitina (At2g36060) fue usado para normalizar los resultados. ATISOPENTENYL DIPHOSPHATE ISOMERASE 2 (IPP2) (At3g02780) fue usada como un control interno. Activación de la expresión del gen FWA en diferentes tratamientos fue determinada al calcular los valores normales $\Delta\Delta Ct$ (Figuras 10A-10C).

Las plantas expuestas durante 48 horas a colesterol DC LPMP modificado fueran cargadas con equimolar cantidades de ARNg 4 y 17 demostradas en el aumento de 3 pliegues en la expresión del gen FWA en comparación con el control ARNg (Fig. 10B). DC-Col LPMP con control tracrARN no indujo a la expresión FWA (Figuras. 10A y 10B). Una diferencia no significativa en la expresión de IPP2 (gen doméstico) fue encontrado entre DC-Col y el control tracrARN (Figura

10C)

Otras Realizaciones

Algunas realizaciones de la invención se encuentran dentro de los siguientes números de párrafos.

1. Una composición modificadora de plantas que comprende una pluralidad de paquetes mensajeros (PMP), donde los PMP comprenden un agente modificador de plantas.

2. La composición modificadora de plantas del párrafo 1, donde los PMP en la composición se encuentran en una concentración efectiva para modificar rasgos de la planta, en donde la modificación aumenta la aptitud de la planta.

3. Una composición modificadora de plantas comprende una pluralidad de paquetes mensajeros de plantas (PMP), donde los PMP comprenden un agente modificador de plantas y los PMP en la composición se encuentran efectiva para modificar rasgos de la planta donde la modificación aumenta la aptitud de la planta.

4. La composición modificadora de plantas del párrafo 2 o 3, donde el aumento en la efectividad es un incremento en el desarrollo, crecimiento, rendimiento, resistencia a estresores abióticos, o resistencia a estresores bióticos.

5. La composición modificadora de plantas del párrafo 2 o 3, donde el aumento de la efectividad de las plantas es un aumento a la resistencia a las enfermedades, tolerancia a las sequías, tolerancia al calor, tolerancia al frío, tolerancia a las sales, tolerancia metálica, tolerancia a los herbicidas, tolerancia a químicos, rendimiento del uso del agua, utilización del nitrógeno, resistencia a la tensión del nitrógeno, fijación de nitrógeno, resistencia a las plagas, resistencia herbívora, resistencia patógena, rendimiento, rendimiento en condiciones limitadas de agua, fuerza, crecimiento, capacidad de fotosíntesis, nutrición, contenido de las proteínas, contenido de carbohidratos, contenido de aceite, biomasa, longitud de los brotes, longitud de las raíces, longitud de la estructura, peso

de la semilla, o cantidad de la cosecha producida.

6. La composición modificadora de plantas de párrafo 2 o 3, donde el aumento de la efectividad de las plantas es un incremento en la calidad de los productos cosechados de la planta.

7. La composición modificadora de plantas de párrafo 6, donde el aumento de la efectividad de la planta es una mejora en el sabor, apariencia, o vida útil de un producto cosechado de la planta.

8. La composición modificadora de plantas de párrafo 2 o 3, donde el aumento de la efectividad es una disminución de la producción de alérgenos que estimulan una respuesta inmune en un animal.

9. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-8, donde el agente modificador de plantas es un ácido nucleico heterólogo.

10. Una composición modificadora comprende una pluralidad de paquetes mensajeros de plantas (PMP), donde los PMP comprenden un ácido nucleico heterólogo y los PMP en la composición se encuentra en una concentración efectiva para aumentar la aptitud en plantas.

11. La composición modificadora de plantas del párrafo 9 o 10, donde el ácido nucleico heterólogo es un ADN, un ARN, un ANP, o una molécula híbrida ADN-ARN.

12. La composición modificadora de plantas del párrafo 11, donde el ARN es un mensajero ARN (ARNm), una guía ARN (ARNg), o un ARN inhibidor.

13. La composición modificadora de plantas del párrafo 12, donde el inhibidor ARN es ARNi, ARNsh, o ARNmi.

14. La composición modificadora de plantas del párrafo 12 o 13, donde el inhibidor ARN inhibe la expresión de un gen en una planta.

15. La composición modificadora de plantas del párrafo 9 o 10, donde el ácido nucleico es un ARNm, un ARNm modificado, o una molécula ADN que, en la planta, aumenta la expresión de una enzima,

una proteína formadora de poros, una señalización ligando, un péptido penetrante de células, un factor de transcripción, un receptor, un anticuerpo, un nanocuerpo, una proteína de edición genética, una riboproteína, un aptámero de proteína o una chaperona.

16. La composición modificadora de plantas del párrafo 9 o 10, donde el ácido nucleico es un ARN antisentido, un ARNip, un ARNsh, un ARNmi, un ARNi, un ANP, un morfolino, un ARNip, una ribozima, una ADNzima, un aptámero, un ARNcirc, un ARNg, o una molécula de ADN que, en la planta, disminuye la expresión de una enzima, un factor de transcripción, una proteína secretora, un factor estructural, una riboproteína, un aptámero de proteína, una chaperona, un receptor, un ligando de señalización o un transportador.

17. La composición modificadora de plantas del párrafo 9 o 10, donde el ácido nucleico heterólogo es una construcción que no se integra que expresa un ácido nucleico en la planta.

18. La composición modificadora de plantas del párrafo 9 o 10, donde el ácido nucleico es un ácido nucleico heterólogo es una construcción que se integra que expresa un ácido nucleico en la planta.

19. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-8, donde el agente modificador de plantas es un péptido heterólogo.

20. Una composición modificadora de plantas es una composición que comprende una pluralidad de paquetes mensajeros de plantas (PMP), donde los PMP comprenden un péptido heterólogo y los PMP en la composición se encuentran en una concentración efectiva para aumentar aptitud de la planta.

21. La composición modificadora de plantas del párrafo 19 o 20, donde el péptido es una enzima, proteína formadora de poros, una señalización ligando, un péptido penetrante de células, un factor de transcripción, un receptor, un anticuerpo, un nanocuerpo, una proteína de edición genética, una riboproteína, un aptámero de

proteína o una chaperona.

22. La composición modificadora de plantas del párrafo 19 o 20, donde el péptido disminuye la expresión de un gen en la planta.

23. La composición modificadora de plantas del párrafo 19 o 20, donde el péptido aumenta la expresión de un gen en la planta.

24. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-23, donde los PMP comprenden dos o más agentes modificadores de plantas diferentes.

25. La composición modificadora de plantas del párrafo 24, donde dos o más agentes modificadores de plantas diferentes comprenden un ácido nucleico heterólogo y un péptido heterólogo.

26. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-25, donde el agente modificador de plantas es encapsulado por los PMP.

27. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-25, donde el agente modificador de plantas es integrado en la superficie de los PMP.

28. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-25, donde el agente modificador de plantas es conjugado en la superficie de los PMP.

29. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-28, donde el agente modificador de plantas no es un plaguicida.

30. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-29, donde la composición está estable durante al menos un día a temperatura ambiente y/o estable durante al menos una semana a 4°C.

31. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-29, donde los PMP están estables durante al menos 24 horas, 48 horas, siete días, o 30 días.

32. La composición modificadora de plantas del párrafo 31, donde los PMP están estables a una temperatura de al menos 4°C, 20°C,

24°C, o 37°C.

33. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-32, donde los PMP en la composición se encuentran a una concentración de al menos 1, 10, 50, 100, o 250 µg de proteína PMP/ml.

34. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-33, donde los PMP comprenden una vesícula extracelular (EV) de planta purificada, o un segmento o extracto de la misma.

35. La composición modificadora de plantas del párrafo 34, donde el EV de la planta es una vesícula extracelular (EV) de planta purificada.

36. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-35, donde la planta es una planta agrícola u hortícola.

37. La composición modificadora de plantas del párrafo 36, donde la planta agrícola es una planta de soja, una planta de trigo, o una planta de maíz.

38. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-37, donde la composición se formula para la entrega a una planta.

39. La composición modificadora de plantas del párrafo 38, donde la composición se formula para la entrega a una hoja, semilla, raíz, fruto, brote, o flor de la planta.

40. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-39, donde la composición incluye un vehículo agrícolasmente aceptable.

41. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-40, donde la composición se formula para estabilizar los PMP.

42. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-41, donde la composición se formula como líquido, un sólido, un aerosol, una pasta, un gel, o un gas.

43. Una composición modificadora de plantas comprende una

pluralidad de los PMP, donde los PMP se producen mediante un proceso que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una muestra inicial de una planta, o parte de la misma, donde la planta o parte de la misma comprende EVs;

(b) aislar una fracción PMP en bruto de la muestra inicial, donde la fracción PMP en bruto tiene un nivel decreciente de al menos un contaminante o componente indeseado de la planta o parte de la misma en relación con el nivel de la muestra inicial;

(c) purificar la fracción PMP en bruto, así produciendo una pluralidad de PMP puros, donde la pluralidad de los PMP puros tiene un nivel decreciente de al menos un contaminante o componente indeseado de la planta o parte de la misma en relación con el nivel en la fracción EV en bruto;

(d) cargar la pluralidad de PMP puros con un agente modificador de plantas; y

(e) formular los pasos de los PMP (d) para la entrega a una planta.

44. Una planta que comprende una composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-43.

45. Un método de entrega de una composición modificadora de una planta a una planta que comprende contactar la planta con la composición de cualquiera de los párrafos 1-43.

46. Un método para aumentar la aptitud de una planta, el método comprende entregar a una planta una cantidad efectiva de la composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-43, donde el método aumenta la aptitud de la planta en relación con la planta no tratada.

47. El método del párrafo 45 o 46, donde la composición modificadora de plantas se entrega a una hoja, semilla, raíz, fruto, brote, o flor de la planta.

48. Un método para aumentar la aptitud de una planta, el método comprende contactar una semilla de la planta con una cantidad

efectiva de la composición modificadora de planta de cualquiera de los párrafos 1-43, donde el método aumenta la aptitud de la planta en relación con una planta no tratada.

49. Un método para aumentar la aptitud de una planta, el método comprende contactar el tejido meristemático de la planta con una cantidad efectiva de la composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-43, donde el método aumenta la aptitud de la planta en relación con la planta no tratada.

50. Un método para aumentar la aptitud de la planta, el método comprende contactar un embrión de la planta con una cantidad efectiva de la composición modificadora de planta de cualquiera de los párrafos 1-43, donde el método aumenta la aptitud de la planta en relación con una planta no tratada.

51. Un método para aumentar aptitud de una planta, el método comprende contactar un protoplasto de la planta con una cantidad efectiva de la composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-43, donde el método aumenta la aptitud de la planta en relación con una planta no tratada.

52. Un método para aumentar aptitud de una planta, el método comprende contactar una célula vegetal de la planta con una cantidad efectiva de la composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-43, donde el método aumenta la aptitud de las plantas en relación con una planta no tratada.

53. El método de cualquiera de los párrafos 46-52, donde el aumento en aptitud es un aumento en el desarrollo, crecimiento, producción, resistencia a los estresores abióticos, o resistencia a los estresores bióticos.

54. El método del párrafo 46-52, donde el aumento en la aptitud de la planta es una aumento de la tolerancia a las enfermedades, tolerancia a las sequías, tolerancia al calor, tolerancia al frío, tolerancia a las sales, tolerancia metálica , tolerancia a los herbicidas, tolerancia a químicos, rendimiento del uso del agua,

utilización del nitrógeno, resistencia a la tensión del nitrógeno, fijación de nitrógeno, resistencia a las plagas, resistencia herbívora, resistencia patógena, rendimiento, rendimiento bajo condiciones limitadas de agua, fuerza, crecimiento, capacidad de fotosíntesis, nutrición, contenido de las proteínas, contenido de carbohidratos, contenido de aceite, biomasa, longitud de los brotes, longitud de las raíces, longitud de la estructura, peso de la semilla, o cantidad de la cosecha producida.

55. El método del párrafo 46-52, donde el aumento en la aptitud de planta es un aumento en la calidad de los productos cosechados de la planta.

56. El método del párrafo 55, donde el aumento en la calidad es una mejora en el sabor, apariencia, o vida útil de un producto cosechado de la planta.

57. El método del párrafo 46-52, donde el aumento en la aptitud es una disminución en la producción de un alérgeno que estimula una respuesta inmune en un animal.

58. El método de cualquiera de los párrafos 45-57, donde la planta es una planta agrícola u hortícola.

59. El método del párrafo 58, donde la planta es una planta de soja, una planta de trigo, o una planta de maíz.

60. El método de cualquiera de los párrafos 45-59, donde la composición modificadora de plantas se entrega como un líquido, un sólido, un aerosol, una pasta, un gel, o un gas.

61. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 1-43, donde los PMP son PMP con lípidos reconstituidos (LPMP).

62. La composición modificadora de plantas del párrafo 61, donde los LPMP comprenden un lípido catiónico exógeno.

63. La composición modificadora de plantas del párrafo 61 o 62, donde cada PMP modificado comprende al menos 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más del 90% de lípidos catiónicos.

64. La composición modificadora de plantas de cualquiera de los párrafos 61-63, donde los lípidos catiónicos son colesterol DC o DOTAP.

65. Un método de administración de un ARN heterólogo a una planta, el método comprende entregar a la planta una composición que comprende una pluralidad de paquetes mensajeros de plantas (PMP), cada pluralidad comprende el ARN heterólogo, donde la composición se entrega a una concentración efectiva para aumentar la aptitud de la planta.

66. El método del párrafo 65, donde el ARN heterólogo es una guía ARN (ARNg).

67. El método del párrafo 66, donde el ARNg es un componente de una ribonucleoproteína compleja (RNP), y donde cada pluralidad de los PMP comprende los RNP.

68. El método del párrafo 65, donde los PMP son PMP con lípidos reconstituidos (LPMP).

69. El método del párrafo 65, donde ARN heterólogo es encapsulado por los PMP.

70. El método del párrafo 65, donde cada uno de los PMP comprende una vesícula extracelular (EV) de planta purificada.

71. El método del párrafo 65, donde los PMP en la composición están a una concentración efectiva para modificar los rasgos de una planta, donde la modificación aumenta la aptitud de la planta.

72. El método del párrafo 65, donde el aumento de la aptitud de la planta es un aumento en el desarrollo, crecimiento, rendimiento, resistencia a los estresores abióticos, o resistencia a los estresores bióticos.

73. El método del párrafo 65, donde el aumento en la aptitud de la planta es una modificación en la época de floración.

74. El método del párrafo 65, donde el aumento de la aptitud de la planta es un aumento en la calidad de los productos cosechados de la planta.

75. El método del párrafo 65, donde el aumento de la aptitud de la planta es una mejora en el sabor, apariencia, o vida útil de un producto cosechado de una planta.

76. El método del párrafo 65, donde el aumento de la aptitud de la planta es una disminución en la producción de un alérgeno que estimula una respuesta inmune en un animal.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Las divulgaciones de toda la literatura científica y de patentes citadas en este documento se incorporan expresamente en su totalidad por referencia.

Otras realizaciones están dentro de las reivindicaciones.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

Anexo ITabla 1: Marcadores de Planta EV

Especies Ejemplo	No. Ingreso	Nombre Proteína
<i>Arabidopsis thaliana</i>	C0LGG8	Probable LRR receptor serina / proteína treonina quinasa Atlg53430 (EC 2.7.11.1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	F4HQT8	Proteína no caracterizada
<i>Arabidopsis thaliana</i>	F4HWU0	Proteína Quinasa Proteína de Superfamilia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	F4I082	Inhibidor bifuncional / proteína de transferencia de lípidos / almacenamiento de semillas 2S proteína de superfamilia de albúmina
<i>Arabidopsis thaliana</i>	F4I3M3	Quinasa con proteína que contiene dominio de repetición de tetratricopeptido
<i>Arabidopsis thaliana</i>	F4IB62	Proteína de la familia de proteína quinasa repetida rica en leucina
<i>Arabidopsis thaliana</i>	O03042	Ribulosa bifosfato carboxilasa cadena grande (subunidad grande RuBisCO) (EC 4.1.1.39)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	O03986	Proteína de choque térmico 90-4 (AtHSP90.4) (AtHsp90-4) (Proteína de choque térmico 81-4) (Hsp81-4)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	O04023	Protein homóloga SRC2 (AtSRC2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	O04309	Lectina 35 relacionada con jacalina (proteína 1 sensible a JA) (similar a la proteína de unión a mirosinasa At3g16470)

<i>Arabidopsis thaliana</i>	004314	Proteína de unión a PYK10 1 (lectina 30 relacionada con jacalina) (proteína inducida por ácido jasmónico)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	004922	Probable glutatión peroxidasa 2 (EC 1.11.1.9)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	022126	Proteína 8 de arabinogalactano de tipo fasciclina (AtAGP8)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	023179	Proteína 1 similar a la patatina (AtPLP1) (EC 3.1.1.-) (fosfolipasa A IIgamma relacionada con la patatina) (pPLAIIg) (fosfolipasa A IVA) (AtPLAIVA)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	023207	Probable NAD (P) H deshidrogenasa (quinona) FQR1-like 2 (EC 1.6.5.2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	023255	Adenosilhomocisteinasa 1 (AdoHciase 1) (EC 3.3.1.1) (Proteína EMBRIO DEFECTUOSA 1395) (SILENCIAMIENTO GENÉTICO DEPENDIENTE DE HOMOLOGÍA Proteína 1) (S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa 1) (SAH hidrolasa 1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	023482	Transportador de oligopéptidos 3 (AtOPT3)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	023654	Subunidad catalítica ATPasa protón tipo V A (subunidad V-ATPasa A) (EC 3.6.3.14) (subunidad V-ATPasa 69 kDa) (Vacuolar H (+) - subunidad A ATPasa A) (subunidad alfa de la bomba de protones al vacío)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	048788	Probable receptor inactivo quinasa At2g26730
<i>Arabidopsis thaliana</i>	048963	Phototropin-1 (EC 2.7.11.1) (hipocotiloproteína no fototrópica 1)

		(proteína de fototropismo de raíz 1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	049195	Proteína de almacenamiento vegetativo 1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	050008	5-metiltetrahidropteroiltriglutamato - homocisteína metiltransferasa 1 (EC 2.1.1.14) (metionina sintasa 1 independiente de cobalamina) (AtMS1) (metionina sintasa 1 independiente de vitamina B12)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	064696	Proteína Putativa no caracterizada At2g34510
<i>Arabidopsis thaliana</i>	065572	Carotenoide 9,10 (9', 10') - escisión dioxigenasa 1 (EC 1.14.99.n4) (AtCCD1) (enzima de escisión de neoxantina NC1) (AtNCED1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	065660	PLAT domain-containing protein 1 (AtPLAT1) (PLAT domain protein 1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	065719	Choque térmico 70 kDa proteína 3 (choque térmico cognado proteína 70 kDa 3) (choque térmico proteína coagnada 70-3) (AtHsc70-3) (proteína choque térmico 70-3) (AtHsp70-3)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	080517	Uclacianina-2 (proteína de unión a cobre azul II) (BCB II) (Fitocianina 2) (Uclacianina-II)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	080576	At2g44060 (proteína abundante en embriogénesis tardía, grupo 2) (Similar a proteínas abundantes en embriogénesis tardía)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	080725	ABC transporter B, miembro de la familia 4 (ABC transporter ABCB.4) (AtABCB4) (Multidrug resistance protein

		4) (P-glycoprotein 4)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	O80837	Remorin (proteína de unión al ADN)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	O80852	Glutación S-transferasa F9 (AtGSTF9) (EC 2.5.1.18) (AtGSTF7) (miembro 9 de la clase de phi de GST)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	O80858	Proteína expresada (proteína putativa no caracterizada At2g30930) (proteína putativa no caracterizada At2g30930; F7F1.14)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	O80939	Receptor quinasa IV.1 que contiene dominio lectina de tipo L (Arabidopsis thaliana lectin-receptor quinasa e) (AthlecRK-e) (LecRK-IV.1) (EC 2.7.11.1) (Receptor de quinasa 1 de lectina)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	O80948	Lectina 23 relacionada con la jacalina (similar a la proteína de unión a mirosinasa At2g39330)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	O82628	Subunidad ATPasa de protones tipo V G1 (subunidad V-ATPasa G1) (Vacuolar H (+) - Subunidad ATPasa G isoforma 1) (Subunidad de bomba de protones Vacuolar G1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P10795	Ribulosa bifosfato carboxilasa cadena pequeña 1A, cloroplástica (RuBisCO subunidad pequeña 1A) (EC 4.1.1.39)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P10896	Ribulosa bifosfato carboxilasa / oxigenasa activasa, cloroplástica (RA) (RuBisCO activasa)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P17094	60S proteína ribosómica L3-1 (Proteína EMBRIO DEFECTUOSA 2207)
<i>Arabidopsis</i>	P19456	ATPasa 2, tipo membrana de plasma (EC

<i>thaliana</i>		3.6.3.6) (bomba de protones 2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P20649	ATPasa 1, tipo membrana de plasma (EC 3.6.3.6) (bomba de protones 1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P22953	Probable mediador de la subunidad de transcripción de la ARN polimerasa II 37e (proteína de choque térmico 70 kDa 1) (proteína asociada de choque térmico 70 kDa 1) (proteína asociada de choque térmico 70-1) (AtHsc70-1) (proteína de choque térmico 70-1) (AtHsp70 -1) (Proteína que responde temprano a la deshidratación 2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P23586	Proteína de transporte de azúcar 1 (transportador de glucosa) (transportador de hexosa 1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P24636	Cadena tubulina beta-4 (Beta-4-tubulina)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P25696	Enolasa bifuncional 2 / activador transcripcional (EC 4.2.1.11) (2-fosfo-D-glucurato hidrolasa 2) (2-fosfoglicerato deshidratasa 2) (BAJA EXPRESIÓN DE GENES OSMOTICAMENTE RESPONSIVOS 1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P25856	Deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa GAPa1, cloroplástico (EC 1.2.1.13) (subunidad 1 de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa A dependiente de NADP)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P28186	Proteína relacionada con Ras RABE1c (AtRABE1c) (proteína relacionada con Ras Ara-3) (proteína relacionada con Ras Rab8A) (AtRab8A)

<i>Arabidopsis thaliana</i>	P30302	Aquaporin PIP2-3 (proteína intrínseca de membrana plasmática 2-3) (AtPIP2; 3) (proteína intrínseca de membrana plasmática 2c) (PIP2c) (RD28-PIP) (TMP2C) (proteína intrínseca de tonoplasto inducida por estrés hídrico) (WSI-TIP) [Cortado en: Aquaporin PIP2-3, procesado en N-terminal]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P31414	Bomba de protones de membrana vacuolar energizada con pirofosfato 1 (EC 3.6.1.1) (Pirofosfatasa inorgánica energizada con pirofosfato 1) (H (+) - PPasa 1) (Pirofosfatasa de protones al vacío 1) (Pirofosfatasa al protón al vacío 3)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P32961	Nitrilasa 1 (EC 3.5.5.1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P38666	Proteína ribosómica 60S L24-2 (VÁLVULA CORTA Proteína 1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P39207	Nucleósido difosfato quinasa 1 (EC 2.7.4.6) (Nucleósido difosfato quinasa I) (NDK I) (NDP quinasa I) (NDPK I)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P42643	Proteína 14-3-3 GF14 chi (Factor regulador general 1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P42737	Anhidrasa betacarbónica 2, cloroplástica (AtbCA2) (AtbetaCA2) (EC 4.2.1.1) (Betacarbonato deshidratasa 2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P42759	Dehidrina ERD10 (proteína LTI45 inducida a baja temperatura)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P42761	Glutati6n S-transferasa F10 (AtGSTF10) (EC 2.5.1.18) (AtGSTF4) (GST clase-phi miembro 10) (Proteína RESPUESTA

		TEMPRANA A LA DESHIDRATACIÓN 13)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P42763	Dehidrina ERD14
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P42791	60S proteína ribosomal L18-2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P43286	Aquaporin PIP2-1 (proteína intrínseca de membrana plasmática 2-1) (AtPIP2; 1) (proteína intrínseca de membrana plasmática 2a) (PIP2a) [Cortado en: Aquaporin PIP2-1, procesado en N-terminal]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P46286	60S proteína ribosomal L8-1 (60S proteína ribosomal L2) (Proteína EMBRIÓN DEFECTUOSA 2296)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P46422	Glutación S-transferasa F2 (AtGSTF2) (EC 2.5.1.18) (proteína de unión a auxina de 24 kDa) (AtPM24) (miembro 2 de clase phi de GST)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P47998	Cisteína sintasa 1 (EC 2.5.1.47) (At.OAS.5-8) (Ala sintasa sustituida con beta 1; 1) (ARath-Bsas1; 1) (CSase A) (AtCS-A) (Cys-3A) (O-acetilserina (tiol)-liasa 1) (OAS-TL A) (O-acetilserina sulfhidrilasa) (Proteína INICIO DE LA MUERTE DE LA HOJA 3)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P48347	Proteína 14-3-3 GF14 epsilon (Factor regulador general 10)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P48491	Triosefosfato isomerasa, citosolic (TIM) (Triose-fosfato isomerasa) (EC 5.3.1.1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P50318	Fosfoglicerato quinasa 2, cloroplástico (EC 2.7.2.3)

<i>Arabidopsis thaliana</i>	P53492	Actin-7 (Actin-2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P54144	Transportador de amonio 1 miembro 1 (AtAMT1;1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P92963	Proteína relacionada con Ras RABB1c (AtRABB1c) (proteína relacionada con Ras Rab2A) (AtRab2A)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P93004	Aquaporin PIP2-7 (proteína intrínseca de la membrana plasmática 2-7) (AtPIP2; 7) (proteína intrínseca de la membrana plasmática 3) (proteína intrínseca principal inducida por el estrés salino) [Cortado en: Aquaporin PIP2-7, procesado en N-terminal]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P93025	Fototropin-2 (EC 2.7.11.1) (Defectuoso en la proteína 1 de evitación del cloroplasto) (hipocotil 1 no fototrópico, proteína 1) (AtKin7) (proteína 1 similar a NPH1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P93819	Malato deshidrogenasa 1, citoplasmática (EC 1.1.1.37) (Malato deshidrogenasa 1 dependiente de NAD citosólica) (cNAD-MDH1) (Malato deshidrogenasa citosólica 1) (MDH1 citosólico)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q03250	Proteína 7 de unión a ARN rica en glicina (AtGR-RBP7) (AtRBG7) (Proteína 7 rica en glicina) (AtGRP7) (proteína FRÍA, RITMO CIRCADIANO Y UNIÓN A ARN 2) (Proteína CCR2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q05431	L-ascorbato peroxidasa 1, citosolic (AP) (AtAPx01) (EC 1.11.1.11)
<i>Arabidopsis</i>	Q06611	Aquaporin PIP1-2 (AtPIP1; 2) (proteína

<i>thaliana</i>		intrínseca de membrana plasmática 1b) (PIP1b) (proteína transmembrana A) (AthH2) (TMP-A)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q07488	Proteína de cobre azul (proteína de unión a cobre azul) (AtBCB) (fitocianina 1) (estelacianina)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q0WLB5	Cadena pesada de clatrina 2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q0WNJ6	Cadena pesada de clatrina 1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q1ECE0	Proteína asociada a las vesículas 4-1 (homólogo de VAP de la planta 4-1) (AtPVA41) (INDICADA POR MANNITOL ASOCIADA A MEMBRANA) (AtMAMI) (proteína asociada a VAMP 4-1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q38882	Fosfolipasa D alfa 1 (AtPLDalfa1) (PLD alfa 1) (EC 3.1.4.4) (Colina fosfatasa 1) (PLDalfa) (Fosfatidilcolina-hidrolizante fosfolipasa D 1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q38900	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa CYP19-1 (PPIase CYP19-1) (EC 5.2.1.8) (Ciclofilina de 19 kDa 1) (Rotamasa ciclofilina-3)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q39033	Fosfoinositida fosfolipasa C 2 (EC 3.1.4.11) (Fosfoinositida fosfolipasa PLC2) (AtPLC2) (PI-PLC2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q39085	Delta (24) -esterol reductasa (EC 1.3.1.72) (proteína de alargamiento celular DIMINUTO) (proteína de alargamiento celular Dwarf1) (proteína CABBAGE1) (proteína MEJORADA RESPUESTA DE FLUENCIA MUY BAJA 1)

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q39228	Proteína de transporte de azúcar 4 (transportador de hexosa 4)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q39241	Tioredoxina H5 (AtTrxh5) (proteína LOCUS DE INSENSIBILIDAD A LA VICTORINA 1) (Tioredoxina 5) (AtTRX5)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q39258	Subunidad ATPasa de protones de tipo V E1 (subunidad V-ATPasa E1) (subunidad ATPasa de protones de tipo V E1 (subunidad V-ATPasa E1) (proteína EMBRIO DEFECTIVA 2448) (Vacuolar H (+) - subunidad ATPasa E isoforma 1) (Vacuolar subunidad de bomba de protones E1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q42112	60S proteína ácida ribosomal P0-2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q42403	Tioredoxina H3 (AtTrxh3) (Tioredoxina 3) (AtTRX3)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q42479	Proteína quinasa 3 dependiente de calcio (EC 2.7.11.1) (Isoforma de proteína quinasa dependiente de calcio CDPK6) (AtCDPK6)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q42547	Catalasa-3 (EC 1.11.1.6)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q56WH1	Cadena tubulina alfa-3
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q56WK6	Patellin-1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q56X75	Proteína CASP 4D2 (AtCASPL4D2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q56ZI2	Patellin-2
<i>Arabidopsis</i>	Q7Y208	Glicerofosfodiester fosfodiesterasa

<i>thaliana</i>		GDPDL1 (EC 3.1.4.46) (Glicerofosfodiester fosfodiesterasa- (ATGDPDL1) (Glicerofosfodiesterasa- tipo 3) (Proteína SHV3-TIPO 2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q84VZ5	Proteína anclada a GPI no caracterizada At5g19240
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q84WU7	Proteína de la familia de la aspartil proteasa eucariota (proteína putativa no caracterizada At3g51330)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8GUL8	Proteína anclada a GPI no caracterizada At5g19230
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8GYA4	Proteína quinasa tipo receptor rica en cisteína 10 (RLK10 rica en cisteína) (EC 2.7.11.-) (proteína quinasa tipo receptor 4)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8GYN5	Proteína 4 que interactúa con RPM1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8GZ99	At5g49760 (proteína de la familia de la proteína quinasa repetida rica en leucina) (proteína quinasa similar al receptor de repetición rica en leucina) (proteína quinasa receptora putativa)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8L636	Intercambiador de sodio / calcio NCL (Na ⁽⁺⁾ /Ca ⁽²⁺⁾ -proteína de intercambio NCL) (tipo proteína NCX) (AtNCL)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8L7S1	At1g45200 (At1g45200/At1g45200) (Triacilglicerol lipasa-tipo 1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8LAA6	Probable aquaporina PIP1-5 (AtPIP1; 5) (proteína intrínseca de membrana plasmática 1d) (PIP1d)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8LCP6	Endoglucanasa 10 (EC 3.2.1.4) (Endo- 1,4-beta glucanasa 10)

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8RWV0	Transquetolasa-1, cloroplástica (TK) (EC 2.2.1.1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8S8Q6	Tetraspanin-8
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8VZG8	Receptor que interactúa con MDIS1 como la quinasa 2 (AtMIK2) (serina / treonina-proteína quinasa similar al receptor LRR probable At4g08850) (EC 2.7.11.1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8VZU2	Sintaxina-132 (AtSYP132)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8W4E2	Subunidad B3 de protones de tipo V B3 (subunidad B-V de ATPasas) (Vacuolar H (+) - subunidad B de la subunidad B de ATPasas 3) (subunidad B3 de bomba de protones de vacío)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8W4S4	Subunidad de protones ATPasa tipo V a3 (subunidad V-ATPasas a3) (subunidad ATPasa protones tipo V 95 kDa una isoforma 3) (isoforma V-ATPasa 95 kDa a3) (Vacuolar H (+) - subunidad ATPasa a isoforma 3) (Subunidad a3 de la bomba de protones al vacío) (Subunidad ATPasa de transposición de protones al vacío de 95 kDa en una isoforma 3)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q93VG5	40S proteína ribosomal S8-1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q93XY5	Tetraspanin-18 (TOM2A proteína homóloga 2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q93YS4	Transportador ABC miembro 22 familia G (ABC transportador ABCG.22) (AtABCG22) (proteína homóloga del complejo blanco-

		marrón 23) (AtWBC23)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q93Z08	Glucano endo-1,3-beta-glucosidasa 6 (EC 3.2.1.39) ((1-> 3) -beta-glucan endohidrolasa 6) ((1->3)-beta-glucanasa 6) (Beta-1,3-endoglucanasa 6) (Beta-1,3-glucanasa 6)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q940M8	3-oxo-5-alfa-esteroide 4-deshidrogenasa (DUF1295) (At1g73650/F25P22_7)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q944A7	Probable serina / treonina-proteína Quinasa At4g35230 (EC 2.7.11.1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q944G5	Proteína NRT1/ FAMILIA PTR 2.10 (AtNPF2.10) (TRANSPORTADOR DE GLUCOSINOLATO Proteico-1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q94AZ2	Proteína de transporte de azúcar 13 (transportador de hexosa 13) (supresor multicopia de la proteína 1 de deficiencia de snf4)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q94BT2	Auxina inducida en cultivos de raíces proteína 12
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q94CE4	Anhidrasa Beta Carbónica 4 (AtbCA4) (AtbetaCA4) (EC 4.2.1.1) (Anhidrasa Beta Carbonato 4)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q94KI8	Proteína 1 de canal de calcio de dos poros (proteína 1 de canal de calcio) (AtCCH1) (proteína 2 regulada por oxigenación de ácido graso) (proteína de canal de calcio dependiente de voltaje TPC1) (AtTPC1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q96262	Proteína 1 de unión a cationes asociada a la membrana plasmática (AtPCAP1) (proteína desestabilizadora de microtúbulos 25)

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9C5Y0	Fosfolipasa D delta (AtPLDdelta) (PLD delta) (EC 3.1.4.4)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9C7F7	Proteína de transferencia de lípidos no específica anclada a GPI 1 (AtLTPG-1) (Proteína LTP-GPI-ANCLAJE 1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9C821	Proteína quinasa similar a receptor rica en prolina PERK15 (EC 2.7.11.1) (Quinasa 15 similar a receptor de extensina rica en prolina) (AtPERK15)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9C8G5	Proteína ERD4 similar a CSC1 (Proteína que responde TEMPRANO AL ESTRÉS DE DESHIDRATACIÓN 4)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9C9C5	60S proteína ribosomal L6-3
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9CAR7	Proteína 2 de respuesta inducida por hipersensibilidad (AtHIR2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9FFH6	Proteína 13 de arabinogalactano similar a la fasciclina
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9FGT8	Lipocalina-1 inducida por temperatura (AtTIL1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9FJ62	Glicerofosfodiester fosfodiesterasa GDPDL4 (EC 3.1.4.46) (Glicerofosfodiester fosfodiesterasa - tipo 4) (ATGDPDL4) (Glicerofosfodiester fosfodiesterasa-tipo 1) (Proteína SHV3-TIPO 1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9FK68	Proteína relacionada con Ras RABA1c (AtRABA1c)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9FKS8	Transportador de lisidina histidina 1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9FM65	Proteína de arabinogalactano tipo fasciclina 1

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9FNH6	Proteína NDR1/HIN1-tipo 3
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9FRL3	Transportador de azúcar ERD6-tipo 6
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9FWR4	Glutación S-transferasa DHAR1, mitocondrial (EC 2.5.1.18) (Cloruro de canal intracelular de cloruro 1) (CLIC homólogo 1) (Deshidroascorbato reductasa 1 dependiente de glutación) (AtDHAR1) (Deshidroascorbato reductasa 1 dependiente de GSH) (mtDHAR)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9FX54	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa GAPC2, citosólico (EC 1.2.1.12) (subunidad 2 de gliceraldehído fosfato deshidrogenasa C dependiente de NAD)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LE22	Probable proteína de unión al calcio CML27 (proteína similar a la calmodulina 27)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LEX1	At3g61050 (proteína CaLB) (proteína de la familia de unión a lípidos dependiente de calcio (dominio CaLB))
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LF79	ATPasa 8 transportadora de calcio, tipo membrana plasmática (EC 3.6.3.8) (Ca (2+) - ATPasa isoforma 8)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LJG3	GDSL esterasa / lipasa ESM1 (EC 3.1.1.) (lipasa extracelular ESM1) (MODIFICADOR DE EPITHIOSPECIFIER de proteína 1) (AtESM1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LJI5	Subunidad de ATPasa de protones tipo V d1 (subunidad de V-ATPasa d1) (Vacuolar H (+) - Subunidad de ATPasa d isoforma 1) (Subunidad de bomba de protones

		Vacuolar d1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LME4	Probable proteína fosfatasa 2C 9 (AtPP2C09) (EC 3.1.3.16) (proteína fosfatasa 2C asociada a fitocromo) (PAPP2C)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LNP3	At1g17620 / F11A6_23 (F1L3.32) (Familia de glucoproteínas ricas en hidroxiprolina abundante en embriogénesis tardía (LEA)) (Proteína no caracterizada atutada At1g17620)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LNW1	Proteína relacionada con Ras RABA2b (AtRABA2b)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LQU2	RESISTENCIA AL CADMIO DE LA PLANTA DE PROTEÍNAS 1 (AtPCR1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LQU4	RESISTENCIA AL CADMIO DE LA PLANTA DE PROTEÍNAS 2 (AtPCR2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LR30	Glutamato - glioxilato aminotransferasa 1 (AtGGT2) (EC 2.6.1.4) (Alanina aminotransferasa GGT1) (EC 2.6.1.2) (Alanina - glioxilato aminotransferasa GGT1) (EC 2.6.1.44) (Alanina-2-oxoglutarato aminotransferasa 1) (EC 2.6.1.-)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LSI9	Serina / treonina-proteína quinasa BIR2 tipo receptor inactivo LRR (proteína quinasa similar al receptor 2 que interactúa con la proteína BAK1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LSQ5	NAD (P) H deshidrogenasa (quinona) FQR1 (EC 1.6.5.2) (quinona reductasa tipo flavodoxina)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LUT0	Proteína quinasa Superfamilia Proteína (proteína putativa no caracterizada

		At3g17410) (proteína serina / treonina proteína tipo quinasa)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LV48	Proteína quinasa similar a un receptor rico en prolina PERK1 (EC 2.7.11.1) (receptor quinasa similar a la extensina rica en prolina 1) (AtPERK1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LX65	Subunidad H de ATPasa de protones tipo V (subunidad H de V-ATPasa) (Vacuolar H (+) - Subunidad H de ATPasa) (Subunidad de bomba de protones Vacuolar H)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LYG3	Enzima málica dependiente de NADP 2 (AtNADP-ME2) (NADP-enzima málica 2) (EC 1.1.1.40)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9M088	Glucano endo-1,3-beta-glucosidasa 5 (EC 3.2.1.39) ((1->3) -beta-glucan endohidrolasa 5) ((1->3) -beta-glucanasa 5) (Beta-1,3-endoglucanasa 5) (Beta-1,3-glucanasa 5)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9M2D8	Proteína no caracterizada At3g61260
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9M386	Familia de glucoproteínas ricas en hidroxiprolina abundante en embriogénesis tardía (LEA) (Proteína no caracterizada At3g54200) (Proteína no caracterizada F24B22.160)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9M390	Proteína NRT1 / PTR FAMILIA 8.1 (AtNPF8.1) (Transportador de péptidos PTR1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9M5P2	Proteína de membrana asociada a portador secretora 3 (AtSC3) (Proteína de membrana transportadora secretoria 3)

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9M8T0	Probable receptor inactivo quinasa At3g02880
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SDS7	Subunidad C de ATPasa de protones de tipo V (subunidad C de ATPasa de V) (Vacuolar H (+) - Subunidad C de ATPasa) (Subunidad de bomba de protones de Vacuolar C)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SEL6	Transporte de vesículas v-SNARE 11 (AtVTI11) (GRAVITROPISMO DISPARO de proteínas 4) (Receptor de proteína de unión a NSF soluble en vesículas VTI1a) (AtVTI1a) (Transporte de vesículas de proteína v-SNARE VTI1a)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SF29	Sintaxina-71 (AtSYP71)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SF85	Adenosina quinasa 1 (AK 1) (EC 2.7.1.20) (Adenosina 5'-fosfotransferasa 1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SIE7	PLAT dominio que contiene la proteína 2 (AtPLAT2) (PLAT dominio de la proteína 2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SIM4	60S proteína ribosomal L14-1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SIU8	Probable proteína fosfatasa 2C 20 (AtPP2C20) (EC 3.1.3.16) (AtPPC3; 1.2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SJ81	Proteína 7 de arabinogalactano de tipo fasciclina
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SKB2	Serina / treonina / tirosina-proteína quinasa similar a receptor rica en leucina SOBIR1 (EC 2.7.10.1) (EC 2.7.11.1) (Proteína EVERSLED) (SUPRESOR DE PROTEÍNA DE BIR1-1)

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SKR2	Sinaptotagmina-1 (NTMC2T1.1) (Sinaptotagmina A)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SLF7	60S proteína ácida ribosomal P2-2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SPE6	Proteína de unión NSF soluble alfa 2 (Alfa-SNAP2) (proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida alfa 2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SRH6	Respuesta inducida por hipersensibilidad a la proteína 3 (AtHIR3)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SRY5	Glutación S-transferasa F7 (EC 2.5.1.18) (AtGSTF8) (miembro 7 de la clase GI de GST) (Glutación S- transferasa 11)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SRZ6	Isocitrato deshidrogenasa citosólica [NADP] (EC 1.1.1.42)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SSK5	Proteína similar a MLP 43
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SU13	Proteína 2 de arabinogalactano de tipo fasciclina
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SU40	Proteína tipo monocobre oxidasa SKU5 (raíces sesgadas)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SUR6	Cistina liasa CORI3 (EC 4.4.1.35) (Proteína CORONATINA INDUCIDA 3) (Proteína JASMONIC ACID RESPONSIVE 2) (Tirosina aminotransferasa CORI3)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SVC2	Sintaxina-122 (AtSYP122) (Synt4)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SVF0	Proteína putativa no caracterizada AT4g38350 (Proteína putativa no caracterizada F22I13.120)

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SW40	Proteína facilitadora principal de la superfamilia (Proteína Putativa no caracterizada AT4g34950) (Proteína Putativa no caracterizada T11I11.190)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SYT0	Anexina D1 (AnnAt1) (Anexina A1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SZ11	Glicerofosfodiester fosfodiesterasa GDPDL3 (EC 3.1.4.46) (Glicerofosfodiester fosfodiesterasa-tipo 3) (ATGDPDL3) (Glicerofosfodiesterasa-tipo 2) (Proteína de RAIZ DE CABELLO MUTANTE 5) (Proteína SHAVEN 3)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SZN1	Subunidad de protones ATPasa tipo V B2 (subunidad V-ATPasas B2) (Vacuolar H (+) - Subunidad ATPasa B isoforma 2) (Subunidad de bomba de protones vacíos B2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SZP6	AT4g38690 / F20M13_250 (proteína de la superfamilia de fosfodiesterasas tipo PLC) (Proteína putativa no caracterizada AT4g38690) (Proteína putativa no caracterizada F20M13.250)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SZR1	ATPasa 10 transportadora de calcio, tipo membrana plasmática (EC 3.6.3.8) (Ca (2 +) - ATPasa isoforma 10)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9T053	Fosfolipasa D gamma 1 (AtPLDgamma1) (PLD gamma 1) (EC 3.1.4.4) (Colina fosfatasa) (Lecitinasas D) (Lipofosfodiesterasa II)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9T076	Proteína 2 similar a nodulina temprana (proteína similar a fitocianina)

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9T0A0	Cadena larga acil-CoA sintetasa 4 (EC 6.2.1.3)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9T0G4	Proteína putativa no caracterizada AT4g10060 (Proteína putativa no caracterizada T5L19.190)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9XEE2	Anexina D2 (AnnAt2)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9XGM1	Subunidad D de ATPasa de protón tipo V (subunidad D de V-ATPasa) (Vacuolar H (+) - Subunidad D de ATPasa) (Subunidad de bomba de protones Vacuolar D)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9XI93	At1g13930 / F16A14.27 (F16A14.14) (proteína F7A19.2) (proteína tipo oleosina-B3)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9XIE2	ABC transporter G, miembro de la familia 36 (ABC transporter ABCG.36) (AtABCG36) (Proteína de resistencia a fármacos pleiotrópicos 8) (PENETRACIÓN de proteínas 3)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9ZPZ4	Proteína putativa no caracterizada (Proteína putativa no caracterizada At1g09310) (proteína T31J12.3)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9ZQX4	Subunidad F de ATPasa de protones de tipo V (subunidad V-ATPasa de F) (subunidad V-ATPasa de 14 kDa) (Vacuolar H (+) - Subunidad F de ATPasa) (Subunidad de bomba de protones de Vacuolar F)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9ZSA2	Proteína quinasa 21 dependiente de calcio (EC 2.7.11.1)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9ZSD4	Sintaxina-121 (AtSYP121) (proteína relacionada con la Sintaxina At-Syr1)

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9ZV07	Probable aquaporina PIP2-6 (proteína intrínseca de membrana plasmática 2-6) (AtPIP2; 6) (proteína intrínseca de membrana plasmática 2e) (PIP2e) [Cortado en: Probable aquaporina PIP2-6, procesado en N-terminal]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9ZVF3	Proteína similar a MLP 328
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9ZWA8	Proteína 9 de arabinogalactano de tipo fasciclina
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9ZSD4	SYR1, proteína relacionada con la sintaxina 1, también conocida como SYP121, PENETRATION1 / PEN1 (PENETRACIÓN de proteína 1)
<i>Limón cítrico</i>	A1ECK0	Glutaredoxina putativa
<i>Limón cítrico</i>	A9YVC9	Pirofosfato - subunidad beta de fructosa 6-fosfato 1-fosfotransferasa (PFP) (EC 2.7.1.90) (6-fosfofructoquinasa, dependiente de pirofosfato) (PPi-PFK) (6-fosfofructosa-1-quinasa dependiente de pirofosfato)
<i>Limón cítrico</i>	B2YGY1	Glicosiltransferasa (EC 2.4.1.-)
<i>Limón cítrico</i>	B6DZD3	Glutathión S-transferasa Tau2 (Glutathión transferasa Tau2)
<i>Limón cítrico</i>	C3VIC2	Factor de elongación de traducción
<i>Limón cítrico</i>	C8CPS0	Importina subunidad alfa
<i>Limón cítrico</i>	D3JWB5	Flavanona 3-hidroxilasa
<i>Limón cítrico</i>	E0ADY2	Ácido cafeico putativo O-metiltransferasa
<i>Limón cítrico</i>	E5DK62	Subunidad alfa de la ATP sintasa (Fragmento)

<i>Limón cítrico</i>	E9M5S3	Fosfatasa putativa L-galactosa-1-fosfato
<i>Limón cítrico</i>	F1CGQ9	Proteína de choque térmico 90
<i>Limón cítrico</i>	F8WL79	Aminopeptidasa (EC 3.4.11.-)
<i>Limón cítrico</i>	F8WL86	Proteína de choque térmico
<i>Limón cítrico</i>	K9JG59	Proteína relacionada con la maduración del estrés por ácido abscísico
<i>Limón cítrico</i>	Q000W4	Fe(III)- quelato reductasa
<i>Limón cítrico</i>	Q39538	Proteína de choque térmico (Fragmento)
<i>Limón cítrico</i>	Q5UEN6	Proteína de partículas de reconocimiento de señal putativa
<i>Limón cítrico</i>	Q8GV08	Dehidrina
<i>Limón cítrico</i>	Q8L893	Fosfoglucomutasa citosólica (fragmento)
<i>Limón cítrico</i>	Q8S990	Proteína inhibidora de poligalacturonasa
<i>Limón cítrico</i>	Q8W3U6	Proteína inhibidora de poligalacturonasa
<i>Limón cítrico</i>	Q93XL8	Dehidrina COR15
<i>Limón cítrico</i>	Q941Q1	Hemoglobina no simbiótica clase 1
<i>Limón cítrico</i>	Q9MBF3	Proteína de unión a ARN rica en glicina
<i>Limón cítrico</i>	Q9SP55	Subunidad G de ATPasa de protones de tipo V (subunidad G de V-ATPasa) (subunidad de bomba de protones al vacío G)
<i>Limón cítrico</i>	Q9THJ8	Ribulosa bifosfato carboxilasa cadena grande (EC 4.1.1.39) (Fragmento)
<i>Limón cítrico</i>	Q9ZST2	Pirofosfato - fructosa 6-fosfato 1-fosfotransferasa subunidad alfa (PFP) (6-fosfofructoquinasa, dependiente de pirofosfato) (PPi-PFK) (6-fosfofructosa-1-quinasa dependiente de pirofosfato)

<i>Limón cítrico</i>	Q9ZWH6	Inhibidor de poligalacturonasa
<i>Limón cítrico</i>	S5DXI9	Proteína Nucleocápside
<i>Limón cítrico</i>	S5NFC6	Ciclohidrolasa GTP
<i>Limón cítrico</i>	V4RG42	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RGP4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RHN8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RJ07	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RJK9	Adenosilhomocisteinasa (EC 3.3.1.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4RJM1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RJX1	40S proteína ribosomal S6
<i>Limón cítrico</i>	V4RLB2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RMX8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RNA5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RP81	Glicosiltransferasa (EC 2.4.1.-)
<i>Limón cítrico</i>	V4RPZ5	Proteína asociada a adenilil ciclase
<i>Limón cítrico</i>	V4RTN9	Histona H4
<i>Limón cítrico</i>	V4RUZ4	Fosfoserina aminotransferasa (EC 2.6.1.52)
<i>Limón cítrico</i>	V4RVF6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RXD4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RXG2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RYA0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RYE3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RYH3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RYX8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RZ12	Subunidad Coatómero beta'
<i>Limón cítrico</i>	V4RZ89	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RZE3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RZF3	1,2-dihidroxi-3-ceto-5-metiltiopenteno dioxigenasa (EC 1.13.11.54) (Acireductona dioxigenasa (Fe(2+)-

		requerido)) (ARD) (Fe-ARD)
<i>Limón cítrico</i>	V4RZM7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4RZX6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S1V0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S2B6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S2N1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S2S5	Proteína no caracterizada (Fragmento)
<i>Limón cítrico</i>	V4S346	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S3T8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S409	Cianato hidratasa (cianasa) (EC 4.2.1.104) (cianato hidrolasa) (cianato liasa)
<i>Limón cítrico</i>	V4S4E4	Histona H2B
<i>Limón cítrico</i>	V4S4F6	Monooxigenasa que contiene flavina (EC 1.-.-.-)
<i>Limón cítrico</i>	V4S4J1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S4K9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S535	Subunidad de proteasoma tipo alfa (EC 3.4.25.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4S5A8	Isocitrato deshidrogenasa [NADP] (EC 1.1.1.42)
<i>Limón cítrico</i>	V4S5G8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S5I6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S5N4	Proteína no caracterizada (Fragmento)
<i>Limón cítrico</i>	V4S5Q3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S5X8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S5Y1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S6P4	ATPasa transportadora de calcio (EC 3.6.3.8)
<i>Limón cítrico</i>	V4S6W0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S6W7	Proteína no caracterizada (Fragmento)

<i>Limón cítrico</i>	V4S6Y4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S773	Proteína ribosomal L19
<i>Limón cítrico</i>	V4S7U0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S7U5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S7W4	Piruvato quinasa (EC 2.7.1.40)
<i>Limón cítrico</i>	V4S885	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S8T3	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPIasa) (EC 5.2.1.8)
<i>Limón cítrico</i>	V4S920	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S999	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4S9G5	Fosfoglicerato quinasa (EC 2.7.2.3)
<i>Limón cítrico</i>	V4S9Q6	Beta-amilasa (EC 3.2.1.2)
<i>Limón cítrico</i>	V4SA44	Serina / treonina-proteína fosfatasa (EC 3.1.3.16)
<i>Limón cítrico</i>	V4SAE0	Alfa-1,4 glucano fosforilasa (EC 2.4.1.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4SAF6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SAI9	Factor 3 de iniciación de la traducción eucariota subunidad M (eIF3m)
<i>Limón cítrico</i>	V4SAJ5	Proteína ribosomal
<i>Limón cítrico</i>	V4SAR3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SB37	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SBI0	Factor de alargamiento 1-alfa
<i>Limón cítrico</i>	V4SBI8	D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (EC 1.1.1.95)
<i>Limón cítrico</i>	V4SBL9	Proteína de unión a poliadenilato (PABP)
<i>Limón cítrico</i>	V4SBR1	S-formilglutación hidrolasa (EC 3.1.2.12)
<i>Limón cítrico</i>	V4SBR6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SCG7	Proteína no caracterizada

<i>Limón cítrico</i>	V4SCJ2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SCQ6	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPIasa) (EC 5.2.1.8)
<i>Limón cítrico</i>	V4SDJ8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SE41	Desintoxicación de proteínas (proteína de extrusión de compuestos tóxicos y multidroga)
<i>Limón cítrico</i>	V4SE90	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SED1	Subunidad de flavoproteína de la deshidrogenasa [ubiquinona] succinato, mitocondrial (EC 1.3.5.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4SEI1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SEN9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SEX8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SF31	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SF69	40S proteína ribosomal S24
<i>Limón cítrico</i>	V4SF76	Cisteína sintasa (EC 2.5.1.47)
<i>Limón cítrico</i>	V4SFK3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SFL4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SFW2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SGC9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SGJ4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SGN4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SGV6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SGV7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SHH1	ATPasa de membrana plasmática (EC 3.6.3.6) (Fragmento)
<i>Limón cítrico</i>	V4SHI2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SHJ3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SI86	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SI88	Proteína no caracterizada

<i>Limón cítrico</i>	V4SIA2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SIC1	Fosfolipasa D (EC 3.1.4.4)
<i>Limón cítrico</i>	V4SJ14	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SJ48	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SJ69	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SJD9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SJS7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SJT5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SKA2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SKG4	Glucosa-6-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.9)
<i>Limón cítrico</i>	V4SKJ1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SL90	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SLC6	Subunidad de proteasoma tipo beta (EC 3.4.25.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4SLI7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SLQ6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SMD8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SMN7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SMV5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SN00	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SNA9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SNC1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SNC4	Aconitato hidratasa (Aconitasa) (EC 4.2.1.3)
<i>Limón cítrico</i>	V4SNZ3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SP86	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SPM1	40S proteína ribosomal S12
<i>Limón cítrico</i>	V4SPW4	40S proteína ribosomal S4
<i>Limón cítrico</i>	V4SQ71	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SQ89	Proteína no caracterizada

<i>Limón cítrico</i>	V4SQ92	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SQC7	Peroxidasa (EC 1.11.1.7)
<i>Limón cítrico</i>	V4SQG3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SR15	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SRN3	Transmembrana 9 miembro superfamilia
<i>Limón cítrico</i>	V4SS09	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SS11	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SS50	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SSB6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SSB8	Subunidad de proteasoma tipo alfa (EC 3.4.25.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4SSL7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SSQ1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SST6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SSW9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SSX5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SU82	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SUD3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SUL7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SUP3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SUT4	UDP-glucosa 6-dehidrogenasa (EC 1.1.1.22)
<i>Limón cítrico</i>	V4SUY5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SV60	Serina/proteína treonina-fosfatasa (EC 3.1.3.16)
<i>Limón cítrico</i>	V4SV61	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SVI5	Subunidad de proteasoma tipo alfa (EC 3.4.25.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4SVI6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SW04	Proteína no caracterizada (Fragmento)
<i>Limón cítrico</i>	V4SWD9	Proteína no caracterizada

<i>Limón cítrico</i>	V4SWJ0	40S proteína ribosomal S3a
<i>Limón cítrico</i>	V4SWQ9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SWR9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SWU9	Fructosa-bisfosfato aldolasa (EC 4.1.2.13)
<i>Limón cítrico</i>	V4SX11	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SX99	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SXC7	Subunidad de proteasoma tipo alfa (EC 3.4.25.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4SXQ5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SXW1	Proteína tipo beta-adaptina
<i>Limón cítrico</i>	V4SXY9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SY74	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SY90	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SY93	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SYH9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SYK6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SZ03	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SZ73	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SZI9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4SZX7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T057	Proteína ribosomal L15
<i>Limón cítrico</i>	V4T0V5	Factor de iniciación de la traducción eucariótica 3 subunidad A (eIF3a) (Factor de iniciación de la traducción eucariótica 3 subunidad 10)
<i>Limón cítrico</i>	V4T0Y1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T1Q6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T1U7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T2D9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T2M6	Cadena beta de tubulina

<i>Limón cítrico</i>	V4T3G2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T3P3	6-fosfogluconato deshidrogenasa, descarboxilando (EC 1.1.1.44)
<i>Limón cítrico</i>	V4T3V9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T3Y6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T4H3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T4I7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T4M7	Superóxido dismutasa [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4T539	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T541	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T576	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T5E1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T5I3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T5W7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T6T5	60S proteína ácida ribosomal P0
<i>Limón cítrico</i>	V4T722	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T785	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T7E2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T7I7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T7N0	Subunidad de proteasoma tipo beta (EC 3.4.25.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4T7N4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T7T2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T7W5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T825	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T846	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T8E9	S-aciltransferasa (EC 2.3.1.225) (Palmitoiltransferasa)
<i>Limón cítrico</i>	V4T8G2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T8G9	Corismato sintasa (EC 4.2.3.5)

<i>Limón cítrico</i>	V4T8Y6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T8Y8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T939	Carboxipeptidasa (EC 3.4.16.-)
<i>Limón cítrico</i>	V4T957	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T998	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T9B9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4T9Y7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TA70	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TAF6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TB09	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TB32	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TB89	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TBN7	Fosfoinositida fosfolipasa C (EC 3.1.4.11)
<i>Limón cítrico</i>	V4TBQ3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TBS4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TBU3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TCA6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TCL3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TCS5	Pectato liasa (EC 4.2.2.2)
<i>Limón cítrico</i>	V4TD99	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TDB5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TDI2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TDY3	Serina/treonina-proteína quinasa (EC 2.7.11.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4TE72	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TE95	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TEC0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TED8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TES4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TEY9	Proteína no caracterizada

<i>Limón cítrico</i>	V4TF24	Subunidad de proteasoma tipo alfa (EC 3.4.25.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4TF52	Uricasa (EC 1.7.3.3) (Urato oxidasa)
<i>Limón cítrico</i>	V4TFV8	Catalasa (EC 1.11.1.6)
<i>Limón cítrico</i>	V4TGU1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TH28	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TH78	Proteína tipo reticulón
<i>Limón cítrico</i>	V4THM9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TIU2	Ribulosa-fosfato 3-epimerasa (EC 5.1.3.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4TIW6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TIY6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TIZ5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TJ75	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TJC3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TJQ9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TK29	NEDD8- subunidad reguladora de la enzima activadora E1
<i>Limón cítrico</i>	V4TL04	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TLL5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TLP6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TM00	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TM19	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TMB7	Proteína no caracterizada (Fragmento)
<i>Limón cítrico</i>	V4TMD1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TMD6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TMV4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TN30	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TN38	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TNY8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TP87	Anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1)

		(carbonato deshidratasa)
<i>Limón cítrico</i>	V4TPM1	Homoserina deshidrogenasa (HDH) (EC 1.1.1.3)
<i>Limón cítrico</i>	V4TQB6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TQM7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TQR2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TQV9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TS21	Subunidad de proteasoma tipo beta (EC 3.4.25.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4TS28	Anexina
<i>Limón cítrico</i>	V4TSD8	Proteína no caracterizada (Fragmento)
<i>Limón cítrico</i>	V4TSF8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TSI9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TT89	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TTA0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TTR8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TTV4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TTZ7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TU54	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TVB6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TVG1	Factor de iniciación de la traducción eucariota 5A (eIF-5A)
<i>Limón cítrico</i>	V4TVJ4	Profilina
<i>Limón cítrico</i>	V4TVM6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TVM9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TVP7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TVT8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TW14	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TWG9	Complejo T de la proteína 1 subunidad delta
<i>Limón cítrico</i>	V4TWU1	Probable bifuncional metiltioribulosa-

		1-fosfato deshidratasa / enolasa-fosfatasa E1 [Incluye: Enolasa-fosfatasa E1 (EC 3.1.3.77) (2,3-diceto-5-metiltio-1-fosfopentano fosfatasa); Metiltioribulosa-1-fosfato deshidratasa (MTRu-1-P deshidratasa) (EC 4.2.1.109)]
<i>Limón cítrico</i>	V4TWX8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TXH0	Glutamato descarboxilasa (EC 4.1.1.15)
<i>Limón cítrico</i>	V4TXK9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TXU9	Tiamina tiazol sintasa, cloroplástica (enzima biosintética de tiazol)
<i>Limón cítrico</i>	V4TY40	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TYJ6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TYP5	60S proteína ribosomal L13
<i>Limón cítrico</i>	V4TYP6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TYR6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TYZ8	Cadena alfa de tubulinaa
<i>Limón cítrico</i>	V4TZ91	Inhibidor de disociación de nucleótido de guanosina difosfato
<i>Limón cítrico</i>	V4TZA8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TZJ1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TZK5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TZP2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TZT8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4TZU3	Proteína quinasa activada por mitógeno (EC 2.7.11.24)
<i>Limón cítrico</i>	V4TZU5	Dihidrolipoil deshidrogenasa (EC 1.8.1.4)
<i>Limón cítrico</i>	V4TZZ0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U003	Factor 3 de iniciación de la traducción eucariota subunidad K (eIF3k) (eIF-3

		p25)
<i>Limón cítrico</i>	V4U068	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U088	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U0J7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U133	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U1A8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U1K1	Isomerasa xilosa (EC 5.3.1.5)
<i>Limón cítrico</i>	V4U1M1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U1V0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U1X7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U1X9	Subunidad de proteasoma tipo beta (EC 3.4.25.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4U251	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U283	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U2E4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U2F7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U2H8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U2L0	Malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37)
<i>Limón cítrico</i>	V4U2L2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U2W4	V-type proton ATPase subunit C
<i>Limón cítrico</i>	V4U3L2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U3W8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U412	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U4K2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U4M4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U4N5	Factor 6 de iniciación de la traducción eucariota (eIF-6)
<i>Limón cítrico</i>	V4U4S9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U4X3	Serina hidroximetiltransferasa (EC 2.1.2.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4U4Z9	Proteína no caracterizada

<i>Limón cítrico</i>	V4U500	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U5B0	Factor de iniciación de la traducción eucariota 3 subunidad E (eIF3e) (Factor de iniciación de la traducción eucariota 3 subunidad 6)
<i>Limón cítrico</i>	V4U5B8	Glutación peroxidasa
<i>Limón cítrico</i>	V4U5R5	Citrato sintasa
<i>Limón cítrico</i>	V4U5Y8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U6I5	ATP sintasa subunidad beta (EC 3.6.3.14)
<i>Limón cítrico</i>	V4U6Q8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U706	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U717	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U726	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U729	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U734	Serina / treonina-proteína fosfatasa (EC 3.1.3.16)
<i>Limón cítrico</i>	V4U7G7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U7H5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U7R1	Transportador de Potasio
<i>Limón cítrico</i>	V4U7R7	Mitogen-activated protein quinasa (EC 2.7.11.24)
<i>Limón cítrico</i>	V4U833	Enzima málica
<i>Limón cítrico</i>	V4U840	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U8C3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U8J1	3-fosfosiquimato 1-carboxiviniltransferasa (EC 2.5.1.19)
<i>Limón cítrico</i>	V4U8J8	Complejo T de la proteína 1 subunidad gamma
<i>Limón cítrico</i>	V4U995	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U999	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4U9C7	Factor 3 de iniciación de la traducción

		eucariótica subunidad D (eIF3d) (Factor 3 de iniciación de la traducción eucariótica subunidad 7) (eIF-3-zeta)
<i>Limón cítrico</i>	V4U9G8	Prolina iminopeptidasa (EC 3.4.11.5)
<i>Limón cítrico</i>	V4U9L1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UA63	Fitocromo
<i>Limón cítrico</i>	V4UAC8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UAR4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UB30	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UBK8	Subunidad de ATPasa de protones de tipo V a
<i>Limón cítrico</i>	V4UBL3	Coatómero subunidad alfa
<i>Limón cítrico</i>	V4UBL5	Proteína no caracterizada (Fragment)
<i>Limón cítrico</i>	V4UBM0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UBZ8	Aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4UC72	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UC97	Beta-glucosidasa (EC 3.2.1.21)
<i>Limón cítrico</i>	V4UCE2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UCT9	Acetil-coenzima A sintetasa (EC 6.2.1.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4UCZ1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UE34	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UE78	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UER3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UET6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UEZ6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UFD0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UFG8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UFK1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UG68	Factor 3 de iniciación de la traducción eucariota subunidad I (eIF3i)

<i>Limón cítrico</i>	V4UGB0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UGH4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UGL9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UGQ0	Ubiquitinaila hidrolasa 1 (EC 3.4.19.12)
<i>Limón cítrico</i>	V4UH00	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UH48	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UH77	Subunidad de proteasoma tipo alfa (EC 3.4.25.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4UHD8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UHD9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UHF1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UHZ5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UI07	40S proteína ribosomal S8
<i>Limón cítrico</i>	V4UI34	Subunidad del factor 3 de iniciación de la traducción eucariota L (eIF31)
<i>Limón cítrico</i>	V4UIF1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UIN5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UIX8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UJ12	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UJ42	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UJ63	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UJB7	Proteína no caracterizada (Fragmento)
<i>Limón cítrico</i>	V4UJC4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UJX0	Fosfotransferasa (EC 2.7.1.-)
<i>Limón cítrico</i>	V4UJY5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UK18	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UK52	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UKM9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UKS4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UKV6	40S proteína ribosomal SA

<i>Limón cítrico</i>	V4UL30	Pirofosfato - subunidad beta de fructosa 6-fosfato 1-fosfotransferasa (PFP) (EC 2.7.1.90) (6-fosfofructoquinasa, dependiente de pirofosfato) (PPi-PFK) (6-fosfofructosa-1-quinasa dependiente de pirofosfato)
<i>Limón cítrico</i>	V4UL39	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4ULH9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4ULL2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4ULS0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UMU7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UN36	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UNT5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UNW1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UP89	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UPE4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UPF7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UPK0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UPX5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UQ58	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UQF6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UR21	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UR80	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4URK3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4URT3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4US96	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4USQ8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UT16	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UTC6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UTC8	Proteína no caracterizada

<i>Limón cítrico</i>	V4UTP6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UTY0	Subunidad de proteasoma tipo alfa (EC 3.4.25.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4UU96	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UUB6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UUJ9	Aminopeptidasa (EC 3.4.11.-)
<i>Limón cítrico</i>	V4UUK6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UV09	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UV83	Lisina - ARNt ligasa (EC 6.1.1.6) (Lisil-ARNt sintetasa)
<i>Limón cítrico</i>	V4UVJ5	Diacilglicerol quinasa (DAG quinasa) (EC 2.7.1.107)
<i>Limón cítrico</i>	V4UW03	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UW04	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UWR1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UWV8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4UX36	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4V003	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4V0J0	40S proteína ribosomal S26
<i>Limón cítrico</i>	V4V1P8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4V4V0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4V5T8	Modificador de plegado de ubiquitina 1
<i>Limón cítrico</i>	V4V600	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4V622	Aldehído dehidrogenasa
<i>Limón cítrico</i>	V4V6W1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4V6Z2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4V738	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4V8H5	Proteína asociada a la clasificación de proteínas al vacío 35
<i>Limón cítrico</i>	V4V9P6	Subunidad del factor 3 de iniciación de la traducción eucariota F (eIF3f) (eIF-

		3-epsilon)
<i>Limón cítrico</i>	V4V9V7	Cadena pesada de clatrina
<i>Limón cítrico</i>	V4V9X3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VAA3	Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4VAF3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VBQ0	Proteína no caracterizada (Fragmento)
<i>Limón cítrico</i>	V4VCL1	Subunidad de proteasoma tipo beta (EC 3.4.25.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4VCZ9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VDK1	Peptidilprolil isomerasa (EC 5.2.1.8)
<i>Limón cítrico</i>	V4VEA1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VEB3	Alanina - ARNt ligasa (EC 6.1.1.7) (Alanil-ARNt sintetasa) (AlaRS)
<i>Limón cítrico</i>	V4VEE3	Glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2)
<i>Limón cítrico</i>	V4VFM3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VFN5	Subunidad de proteasoma tipo beta (EC 3.4.25.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4VG D6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VGL9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VHI6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VIP4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VJT4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VK14	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VKI5	Proteína-L-isoaspartato O-metiltransferasa (EC 2.1.1.77)
<i>Limón cítrico</i>	V4VKP2	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.2.1.-)
<i>Limón cítrico</i>	V4VL73	Acil-coenzima A oxidasa
<i>Limón cítrico</i>	V4VLL7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VN43	Proteína no caracterizada (Fragmento)
<i>Limón cítrico</i>	V4VQH3	Metilenetetrahidrofolato reductasa (EC

		1.5.1.20)
<i>Limón cítrico</i>	V4VTC9	Proteína no caracterizada (Fragmento)
<i>Limón cítrico</i>	V4VTT4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VTY7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VU14	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VU32	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VUK6	S- (hidroximetil) glutatión deshidrogenasa (EC 1.1.1.284)
<i>Limón cítrico</i>	V4VVR8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VXE2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VY37	Fosfomanomutasa (EC 5.4.2.8)
<i>Limón cítrico</i>	V4VYC0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VYV1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VZ80	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4VZJ7	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4W2P2	Alfa-manosidasa (EC 3.2.1.-)
<i>Limón cítrico</i>	V4W2Z9	Proteína del canal de cloruro
<i>Limón cítrico</i>	V4W378	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4W4G3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4W5F1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4W5N8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4W5U2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4W6G1	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4W730	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4W7J4	ATPasa tipo Obg 1
<i>Limón cítrico</i>	V4W7L5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4W8C5	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4W8C9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4W8D3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4W951	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4W9F6	60S proteína ribosomal L18a

<i>Limón cítrico</i>	V4W9G2	Proteína no caracterizada (Fragmento)
<i>Limón cítrico</i>	V4W9L3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4W9Y8	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4WAP9	Coatómero subunidad beta (proteína beta coatómero)
<i>Limón cítrico</i>	V4WBK6	Subunidad compleja del citocromo b-c1 7
<i>Limón cítrico</i>	V4WC15	Enzima málica
<i>Limón cítrico</i>	V4WC19	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4WC74	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4WC86	Serina / treonina-proteína fosfatasa2A 55 kDa regulatory subunit B
<i>Limón cítrico</i>	V4WCS4	Proteína nuclear de unión a GTP
<i>Limón cítrico</i>	V4WD80	Aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1)
<i>Limón cítrico</i>	V4WDK0	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4WDK3	6-fosfofructoquinasa dependiente de ATP (ATP-PFK) (fosfofructoquinasa) (EC 2.7.1.11) (fosfohexoquinasa)
<i>Limón cítrico</i>	V4WE00	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4WEE3	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4WEN2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4WG97	Proteína relacionada con la autofagia
<i>Limón cítrico</i>	V4WGV2	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4WGW5	Uridina quinasa (EC 2.7.1.48)
<i>Limón cítrico</i>	V4WHD4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4WHF8	Sucrosa sintasa (EC 2.4.1.13)
<i>Limón cítrico</i>	V4WHK2	Pectinesterasa (EC 3.1.1.11)
<i>Limón cítrico</i>	V4WHQ4	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4WHT6	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4WJ93	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4WJA9	Proteína no caracterizada
<i>Limón cítrico</i>	V4WJB1	Proteína no caracterizada

<i>Limón cítrico</i>	V9HXG3	Proteína Disulfido-isomerasa (EC 5.3.4.1)
<i>Limón cítrico</i>	W8Q8K1	Pirofosfatasa inorgánica putativa
<i>Limón cítrico</i>	W8QJL0	Isomerasa putativa isopentenil pirofosfato
<i>Toronja</i>	Númeo de Ingreso	Proteínas Identificadas
<i>Toronja</i>	A5C5K3 (+2)	Adenosilhomocisteinasa
<i>Toronja</i>	Q9M6B5	Alcohol dehidrogenass 6
<i>Toronja</i>	A3FA65 (+1)	Aquaporin PIP1;3
<i>Toronja</i>	Q0MX13 (+2)	Aquaporin PIP2;2
<i>Toronja</i>	A3FA69 (+4)	Aquaporin PIP2;4
<i>Toronja</i>	A5AFS1 (+2)	Factor de Enlogación 1-alfa
<i>Toronja</i>	UPI0001985702	Factor de Enlogación 2
<i>Toronja</i>	D7T227	Enolasa
<i>Toronja</i>	D7TJ12	Enolasa
<i>Toronja</i>	A5B118 (+1)	Fructosa-bisfosfato aldolasa
<i>Toronja</i>	E0CQ39	Glucosa-6-fosphato isomerasa
<i>Toronja</i>	D7TW04	Glutati3n peroxidasa
<i>Toronja</i>	A1YW90 (+3)	Glutati3n S-transferasa
<i>Toronja</i>	A5BEW0	Histona H4
<i>Toronja</i>	UPI00015C9A6A	HSC70-1 (choque térmico asociado a la prote3na 1 de 70 kDa); ATP vinculante

		isoforma 1
<i>Toronja</i>	D7FBC0 (+1)	Malato deshidrogenasa
<i>Toronja</i>	D7TBH4	Enzima málica
<i>Toronja</i>	A5ATB7 (+1)	Metilenetetrahidrofolato reductasa
<i>Toronja</i>	A5JPK7 (+1)	Monodehidroascorbato reductasa
<i>Toronja</i>	A5AKD8	Isomerasa de peptidil-prolil cis-trans
<i>Toronja</i>	A5BQN6	Isomerasa de peptidil-prolil cis-trans
<i>Toronja</i>	A5CAF6	Quinasa de fosfoglicerato
<i>Toronja</i>	Q09VU3 (+1)	Fosfolipasa D
<i>Toronja</i>	D7SK33	Fosforilasa
<i>Toronja</i>	A5AQ89	Profilina
<i>Toronja</i>	C5DB50 (+2)	Mutasa putativa 2,3-bisfosfoglicerato- independiente de fosfoglicerato
<i>Toronja</i>	D7TIZ5	Piruvato quinasa
<i>Toronja</i>	A5BV65	Triosefosfato isomerasa
<i>Toronja</i>	G8Z362 (+1)	(E)-beta-farneseno sintasa
<i>Toronja</i>	Q5CD81	(E) -beta-ocimeno sintasa
<i>Toronja</i>	D0UZK1 (+2)	1,2 ramnosiltransferasa
<i>Toronja</i>	A7ISD3	1,6- ramnosiltransferasa
<i>Toronja</i>	Q80H98	Proteína 280 kDa
<i>Toronja</i>	Q15GA4 (+2)	Poliproteína 286 kDa
<i>Toronja</i>	D7NHW9	2-fosfo-D-glicerato hidrolasa
<i>Toronja</i>	D0EAL9	Poliproteína 349 kDa
<i>Toronja</i>	Q9DTG5	Poliproteína 349-kDa

<i>Toronja</i>	O22297	Celulasa ácida
<i>Toronja</i>	Q8H986	Quitinasa ácida clase I
<i>Toronja</i>	D3GQL0	Aconitato hidratasa 1
<i>Toronja</i>	K7N8A0	Actina
<i>Toronja</i>	A8W8Y0	Alcohol acil transferasa
<i>Toronja</i>	Q84V85	Allene óxido sintasa
<i>Toronja</i>	F8WL79	Aminopeptidasa
<i>Toronja</i>	Q09MG5	Apocitocromo f
<i>Toronja</i>	J7EIR8	Ascorbato peroxidasa
<i>Toronja</i>	B9VRH6	Ascorbato peroxidasa
<i>Toronja</i>	G9I820	Factor de respuesta de auxina
<i>Toronja</i>	J7ICW8	Beta-amilasa
<i>Toronja</i>	Q8L5Q9	Beta-galactosidasa
<i>Toronja</i>	A7BG60	Beta-pineno sintasa
<i>Toronja</i>	C0KLD1	Beta-tubulina
<i>Toronja</i>	Q91QZ1	Proteína de la cápside
<i>Toronja</i>	Q3SAK9	Proteína de la cápside
<i>Toronja</i>	D2U833	Cotransportador de cloruro de cationes
<i>Toronja</i>	C3VPJ0 (+3)	Calcona sintasa
<i>Toronja</i>	D5LM39	Proteína del canal de cloruro
<i>Toronja</i>	Q9M4U0	Cinamato 4-hidroxilasa CYP73
<i>Toronja</i>	Q39627	Citrina
<i>Toronja</i>	G2XKD3	Proteína de recubrimiento
<i>Toronja</i>	Q3L2I6	Proteína de recubrimiento
<i>Toronja</i>	D5FV16	Factor de unión a CRT / DRE
<i>Toronja</i>	Q8H6S5	CTV.2
<i>Toronja</i>	Q8H6Q8	CTV.20
<i>Toronja</i>	Q8H6Q7	CTV.22
<i>Toronja</i>	Q1I1D7	Citocromo P450
<i>Toronja</i>	Q7Y045	Dehidrina

<i>Toronja</i>	F8WLD2	Proteína de reparación por escisión de ADN
<i>Toronja</i>	Q09MI8	Subunidad beta de ARN polimerasa dirigida por ADN''
<i>Toronja</i>	D2WKC9	Respuesta de etileno 1
<i>Toronja</i>	D2WKD2	Sensor de Respuesta de etileno 1
<i>Toronja</i>	D7PVG7	Proteína 1 similar a 3 de etileno insensible
<i>Toronja</i>	G3CHK8	Subunidad del factor 3 de iniciación de la traducción eucariota E
<i>Toronja</i>	A9NJG4 (+3)	Hidroperóxido liasa de ácido graso
<i>Toronja</i>	B8Y9B5	Proteína de la familia F-box
<i>Toronja</i>	Q000W4	Fe(III)- quelato reductasa
<i>Toronja</i>	Q6Q3H4	Fructoquinasa
<i>Toronja</i>	F8WL95	Gag-Poliproteína Pol
<i>Toronja</i>	Q8L5K4	Gamma-terpineno sintasa, cloroplástica
<i>Toronja</i>	Q9SP43	Glucosa-1-fosfato adenililtransferasa
<i>Toronja</i>	Q3HM93	Glutación S-transferasa
<i>Toronja</i>	D0VEW6	Factor de transcripción de la familia GRAS
<i>Toronja</i>	F8WL87	Proteína de choque térmico
<i>Toronja</i>	H9NHK0	Hsp90
<i>Toronja</i>	Q8H6R4	Jp18
<i>Toronja</i>	G3CHK6	Proteína de repetición rica en leucina
<i>Toronja</i>	B2YGX9 (+1)	UDP-glucosiltransferasa limonoide
<i>Toronja</i>	Q05KK0	Proteína de MADS-box
<i>Toronja</i>	F8WLB4	Proteína que contiene el dominio del canal iónico mecanosensible
<i>Toronja</i>	Q5CD82	Monoterpeno sintasa

<i>Toronja</i>	F8WLC4	Factor de transcripción MYB
<i>Toronja</i>	A5YWA9	Proteína de dominio NAC
<i>Toronja</i>	Q09MC9	NAD (P) H-quinona oxidoreductasa subunidad 5, cloroplástica
<i>Toronja</i>	Q8H6R9	Proteína de resistencia a la enfermedad de tipo NBS-LRR
<i>Toronja</i>	Q8H6S0	Proteína de resistencia a la enfermedad de tipo NBS-LRR
<i>Toronja</i>	Q8H6R6	Proteína de resistencia a la enfermedad de tipo NBS-LRR
<i>Toronja</i>	J9WR93	p1a
<i>Toronja</i>	Q1X8V8	P23
<i>Toronja</i>	E7DSS0 (+4)	P23
<i>Toronja</i>	G0Z9I6	p27
<i>Toronja</i>	I3XHN0	p33
<i>Toronja</i>	B8YDL3	Proteína p33
<i>Toronja</i>	B9VB22	Proteína p33
<i>Toronja</i>	P87587	P346
<i>Toronja</i>	B9VB56	Proteína p349
<i>Toronja</i>	I3RWW7	Proteína p349
<i>Toronja</i>	B9VB20	Proteína p349
<i>Toronja</i>	Q9WID7	Proteína p349
<i>Toronja</i>	Q2XP16	P353
<i>Toronja</i>	O04886 (+1)	Pectinesterasa 1
<i>Toronja</i>	F8WL74	Isomerasa de peptidil-prolil cis-trans
<i>Toronja</i>	Q0ZA67	Peroxidasa
<i>Toronja</i>	F1CT41	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
<i>Toronja</i>	B1PBV7 (+2)	Fitoeno sintasa

<i>Toronja</i>	Q9ZWQ8	Proteína asociada a lípidos y plastidios, cloroplástica
<i>Toronja</i>	Q94FM1	Poliproteína Pol
<i>Toronja</i>	Q94FM0	Poliproteína Pol
<i>Toronja</i>	G9I825	Proteína de unión a poli C
<i>Toronja</i>	O64460 (+7)	Inhibidor de poligalacturonasa
<i>Toronja</i>	I3XHM8	Poliproteína
<i>Toronja</i>	C0STR9	Poliproteína
<i>Toronja</i>	H6U1F0	Poliproteína
<i>Toronja</i>	B8QHP8	Poliproteína
<i>Toronja</i>	I3V6C0	Poliproteína
<i>Toronja</i>	C0STS0	Poliproteína
<i>Toronja</i>	K0FGH5	Poliproteína
<i>Toronja</i>	Q3HWZ1	Poliproteína
<i>Toronja</i>	F8WLA5	PPR que contiene proteína
<i>Toronja</i>	Q06652 (+1)	Probable hidroperóxido de fosfolípido glutatión peroxidasa
<i>Toronja</i>	P84177	Profilina
<i>Toronja</i>	Q09MB4	Proteína ycf2
<i>Toronja</i>	A8C183	PSI subunidad del centro de reacción II
<i>Toronja</i>	A5JVP6	Proteína 2b putativa
<i>Toronja</i>	D0EFM2	Factor de iniciación de la traducción eucariota putativa 1
<i>Toronja</i>	Q18L98	Putativa poliproteína gag-pol
<i>Toronja</i>	B5AMI9	Proteína de movimiento putativo
<i>Toronja</i>	A1ECK5	Proteína de dedo de zinc putativa sensible al estrés múltiple
<i>Toronja</i>	B5AMJ0	Poliproteína Putativa Replicasa
<i>Toronja</i>	I7CYN5	ARN putativo polimerasa dependiente de

		ARN
<i>Toronja</i>	Q8RVR2	Terpeno sintasa putativa
<i>Toronja</i>	B5TE89	Proteína Putativa no caracterizada
<i>Toronja</i>	Q8JVF3	Proteína Putativa no caracterizada
<i>Toronja</i>	F8WLB0	Proteína Putativa no caracterizada ORF43
<i>Toronja</i>	A5JVP4	Replicasa putativa viral
<i>Toronja</i>	M1JAW3	Replicasa
<i>Toronja</i>	H6VXK8	Replicasa poliproteína
<i>Toronja</i>	J9UF50 (+1)	Proteína Replicasa 1a
<i>Toronja</i>	J9RV45	Proteína Replicasa 2a
<i>Toronja</i>	Q5EGG5	Poliproteína asociada a la replicasa
<i>Toronja</i>	G9I823	Proteína con motivo de reconocimiento de ARN 1
<i>Toronja</i>	J7EPC0	ARN polimerasa dependiente de ARN
<i>Toronja</i>	Q6DN67	ARN polimerasa dirigida por ARN L
<i>Toronja</i>	A9CQM4	Homólogo SEPALLATA1
<i>Toronja</i>	Q9SLS2	Sacarosa sintasa
<i>Toronja</i>	Q9SLV8 (+1)	Sacarosa sintasa
<i>Toronja</i>	Q38JC1	Lipocalina inducida por temperatura
<i>Toronja</i>	D0ELH6	Tioredoxina que contiene dominio tetrapéptido
<i>Toronja</i>	D2KU75	Proteína tipo taumatina
<i>Toronja</i>	C3VIC2	Traducción Factor de Enlogación
<i>Toronja</i>	D5LY07	Ubiquitina / proteína de fusión ribosómica
<i>Toronja</i>	C6KI43	UDP-glucosiltransferasa familia 1 proteína
<i>Toronja</i>	A0FKR1	Citrato vacuolar / Symporter H +

<i>Toronja</i>	Q944C8	Invertasa Vacuolar
<i>Toronja</i>	Q9MB46	Subunidad E de ATPasa de protones de tipo V
<i>Toronja</i>	F8WL82	WD-40 repite la proteína familiar
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 3g0080391	Hsp90
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 3g0408351	Hsp90
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 3g0408441	Hsp90
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 4g0462551	Hsp90
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 2g0044471	Hsp70
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 2g0044481	Hsp70
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 5g0132631	Hsp70
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 5g0134631	Hsp70
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 5g0134801	Hsp70
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 0g0299441	glutación S-transferasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 6g0516291	glutación S-transferasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 3g0091431	lactato / malato deshidrogenasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 3g0421951	lactato / malato deshidrogenasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 0g0304821	lactato / malato deshidrogenasa

<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 2g0373491	lactato / malato deshidrogenasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 1g0031071	pequeña superfamilia GTPasa, tipo Rab
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 1g0031091	pequeña superfamilia GTPasa, tipo Rab
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 2g0050791	pequeña superfamilia GTPase, tipo Rab
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 1g0353711	pequeña superfamilia GTPase, tipo Rab
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 3g0402771	pequeña superfamilia GTPase, tipo Rab
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 7g0190171	isocitrato / isopropilmalato deshidrogenasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 6g0532251	isocitrato / isopropilmalato deshidrogenasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 3g0079131	fosfoenolpiruvato carboxilasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 5g0495261	fosfoenolpiruvato carboxilasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 3g0388931	fosfoenolpiruvato carboxilasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 4g0442731	fosfoenolpiruvato carboxilasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 5g0482381	UTP - glucosa-1-fosfato uridililtransferasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 6g0532261	UTP - glucosa-1-fosfato uridililtransferasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 5g0135591	tubulina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 6g0178921	tubulina

<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 8g0237071	tubulina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 1g0337991	tubulina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 3g0407921	tubulina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 5g0145191	tubulina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 7g0187021	tubulina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 7g0189811	tubulina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 9g0253681	tubulina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 0g0288911	tubulina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 1g0322631	tubulina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 2g0367231	tubulina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 3g0386681	tubulina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 3g0393261	tubulina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 2g0371591	ubiquitina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 2g0383641	ubiquitina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 7g0569881	ubiquitina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 6g0171511	fotosistema II HCF136, factor de estabilidad / montaje

<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 7g0544921	fotosistema II HCF136, factor de estabilidad / montaje
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 6g0526461	subunidad proteasoma tipo B
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 7g0565551	subunidad proteasoma tipo B
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 5g0149801	subunidad proteasoma tipo B
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 9g0241421	subunidad proteasoma tipo B
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 1g0353161	subunidad proteasoma tipo B
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 6g0506311	familia de inhibidores de proteinasa I3 (Kunitz)
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 6g0506331	familia de inhibidores de proteinasa I3 (Kunitz)
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 9g0265401	metalopectidasa (familia M10)
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 9g0265411	metalopectidasa (familia M10)
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 5g0154561	ATPasa, tipo AAA
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 8g0235061	ATPasa, tipo AAA
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 9g0273921	ATPasa, tipo AAA
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 6g0498881	ATPasa, tipo AAA
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 2g0058711	oxoácido deshidrogenasa aciltransferasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 8g0214191	oxoácido deshidrogenasa aciltransferasa

<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 8g0208631	pequeña superfamilia de GTPasa, tipo SAR1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 1g0331441	pequeña superfamilia de GTPasa, tipo SAR1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 2g0371571	pequeña superfamilia de GTPasa, tipo SAR1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 2g0383571	pequeña superfamilia de GTPasa, tipo SAR1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 4g0446771	pequeña superfamilia de GTPasa, tipo SAR1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 7g0539461	pequeña superfamilia de GTPasa, tipo SAR1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 7g0548271	pequeña superfamilia de GTPasa, tipo SAR1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 7g0569871	pequeña superfamilia de GTPasa, tipo SAR1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 0g0311201	ATPasa, complejo V1, subunidad A
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 2g0359711	ATPasa, complejo V1, subunidad A
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 4g0124671	fructosa-1,6-bisfosfatasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 6g0176631	fructosa-1,6-bisfosfatasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQCPg0 579861	fotosistema II PsbD/D2, centro de reacción
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 0c0439g057 4731	fotosistema II PsbD/D2, centro de reacción
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 4g0099321	fotosistema II PsbD/D2, centro de reacción
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0	fotosistema II PsbD/D2, centro de

<i>annuus</i>	8g0210231	reacción
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 1g0326671	fotosistema II PsbD/D2, centro de reacción
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 7g0549121	fotosistema II PsbD/D2, centro de reacción
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQCPg0 579731	fotosistema II proteína D1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 0c0126g057 1821	fotosistema II proteína D1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 0c0165g057 2191	fotosistema II proteína D1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 0c0368g057 4171	fotosistema II proteína D1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 0c0454g057 4931	fotosistema II proteína D1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 0c0524g057 5441	fotosistema II proteína D1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 0c0572g057 5941	fotosistema II proteína D1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 9g0257281	fotosistema II proteína D1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 1g0326571	fotosistema II proteína D1
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 1g0327051	fotosistema II proteína D1
<i>Helianthus</i>	HanXRQChr1	fotosistema II proteína D1

<i>annuus</i>	6g0503941	
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQCPg0 580061	fotosistema II citocromo b559
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 1g0020331	fotosistema II citocromo b559
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 0g0283581	fotosistema II citocromo b559
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 0g0284271	fotosistema II citocromo b559
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 0g0289291	fotosistema II citocromo b559
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 0g0318171	fotosistema II citocromo b559
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 1g0326851	fotosistema II citocromo b559
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 6g0529011	fotosistema II citocromo b559
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 8g0219051	proteína de unión a clorofila A-B
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 2g0370841	proteína de unión a clorofila A-B
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 2g0053151	proteína de unión a clorofila A-B
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 2g0053161	proteína de unión a clorofila A-B
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQCPg0 580051	citocromo f
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 1g0020341	citocromo f
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 0g0283571	citocromo f
<i>Helianthus</i>	HanXRQChr1	citocromo f

<i>annuus</i>	0g0284261	
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 0g0289281	citocromo f
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 0g0318181	citocromo f
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 1g0326841	citocromo f
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 5g0497521	citocromo f
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 6g0163851	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 9g0252071	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 2g0374041	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 4g0128141	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 5g0163131	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 3g0076971	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 5g0159851	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 5g0159971	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 1g0324631	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 3g0408051	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 3g0089331	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i>	HanXRQChr1	proteína ribosomal

<i>annuus</i>	3g0419951	
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 5g0497041	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 6g0499761	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 4g0106961	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 6g0175811	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 4g0122771	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 9g0245691	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 6g0520021	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 3g0060471	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 4g0429531	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 6g0171911	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 5g0479091	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 5g0479101	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 7g0543641	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 7g0543661	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 4g0105831	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i>	HanXRQChr0	proteína ribosomal

<i>annuus</i>	9g0258341	
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 0g0287141	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 5g0463911	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 3g0076171	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 5g0159291	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 3g0407551	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 2g0380701	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 5g0477271	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 7g0545211	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 7g0570741	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 7g0570761	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 2g0044021	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 5g0152871	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 1g0012781	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 8g0230861	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 3g0391831	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i>	HanXRQChr1	inhibidor bifuncional de tripsina /

<i>annuus</i>	1g0337791	alfa-amilasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 0g0312371	2-oxoácido deshidrogenasa aciltransferasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 9g0276191	Fosfatasa ácida (clase B)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 5g0142271	aldosa-1-epimerasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 4g0439791	fosfohexomutasa alfa-D
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 9g0251071	Fucosidasa alfa-L
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 5g0147371	anexina
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 9g0247561	Asp proteasa (Familia peptidasa A1)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 3g0409681	beta-hidroxiacil- (acil-portador- proteína) deshidratasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 0g0295971	beta-hidroxiacil- (acil-portador- proteína) deshidratasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 3g0412571	carbohidrato esterasa familia 13 - CE13 (pectina acilesterasa - PAE)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 2g0360101	carbohidrato esterasa familia 8 - CE8 (pectina metilesterasa - PME)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 1g0019231	anhídrido carbónico
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 2g0036611	unión de retinaldehído celular / transporte de alfa-tocoferol
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 0g0313581	chaperonin Cpn60
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 9g0251791	clatrina
<i>Helianthus</i>	HanXRQChr1	proteína de unión a clorofila A-B

<i>annuus</i>	1g0329811	
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 3g0398861	Cobalamina independiente de metionina sintasa (vitamina B12)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 0g0298981	ciclofilina
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 4g0103281	Proteasa Cys (familia papaína)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 9g0268361	ciocromo P450
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 7g0535591	proteína dirigente
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 3g0065901	expansin
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 1g0336761	proteína expresada (dominio de cupina, dominio de proteína de almacenamiento de semillas)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 0g0280931	proteína expresada (dominio de cupina, dominio de proteína de almacenamiento de semillas)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 0g0288971	proteína expresada (dominio de cupina, dominio de proteína de almacenamiento de semillas)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 2g0380361	proteína expresada (dominio de cupina, dominio de proteína de almacenamiento de semillas)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 9g0254381	proteína expresada (dominio de cupina, dominio de proteína de almacenamiento de semillas)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 4g0112711	proteína expresada (dominio de cupina, dominio de proteína de almacenamiento de semillas)
<i>Helianthus</i>	HanXRQChr0	proteína expresada (dominio de cupina,

<i>annuus</i>	7g0196131	dominio de proteína de almacenamiento de semillas)
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 0g0301281	proteína expresada (dominio de cupina, dominio de proteína de almacenamiento de semillas)
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 0g0301931	proteína expresada (dominio de cupina, dominio de proteína de almacenamiento de semillas)
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 3g0404461	proteína expresada (dominio de cupina)
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 1g0015821	proteína expresada (DUF642)
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 3g0065301	proteína expresada (dominio homólogo de Gnk2, proteína antifúngica de semillas de Ginkgo)
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 3g0068311	proteína expresada (dominios LRR)
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 0g0291371	proteína expresada (dominios LRR)
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 3g0075061	proteína arabinogalactana similar a la fasciclina (FLA)
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 8g0221961	ferritina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 9g0257521	Deshidrogenasa dependiente de FMN
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 4g0441641	fructosa-bisfosfato aldolasa
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr1 0g0312621	germina
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQChr0 9g0244271	glucosa-metanol-colina oxidorreductasa
<i>Helianthus</i>	HanXRQChr0	glutamato sintasa

<i>annuus</i>	3g0061571	
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 5g0144801	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 7g0550211	diéster de glicerofosforilo fosfodiesterasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 6g0175391	familia de la glucósido hidrolasa 16 - GH16 (endoxiloglucano transferasa)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 1g0351571	familia 17 de la glucósido hidrolasa - GH17 (beta-1,3-glucosidasa)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 5g0141461	familia de la glucósido hidrolasa 18 - GH18
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 9g0276721	familia de la glucósido hidrolasa 19 - GH19
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 2g0046191	familia 2 de glucósido hidrolasa - GH2
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 6g0524981	familia 20 de glucósido hidrolasa - GH20 (N-acetil-beta-glucosaminidasa)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 1g0322851	familia de la glucósido hidrolasa 27 - GH27 (alfa-galactosidasa / melibiasa)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 0g0293191	familia 3 de glucósido hidrolasa - GH3
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 6g0511881	familia 31 de glucósido hidrolasa - GH31 (alfa-xilosidasa)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 4g0461441	familia 32 de glucósido hidrolasa - GH32 (invertasa vacuolar)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 3g0423671	familia de la glucósido hidrolasa 35 - GH35 (beta-galactosidasa)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 0g0319301	familia de la glucósido hidrolasa 35 - GH35 (beta-galactosidasa)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 9g0256531	familia de la glucósido hidrolasa 38 - GH38 (alfa-manosidasa)
<i>Helianthus</i>	HanXRQChr1	familia 5 de glucósido hidrolasa - GH5

<i>annuus</i>	1g0320901	(glucan-1,3-beta glucosidasa)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 5g0130491	familia de la glucósido hidrolasa 51 - GH51 (alfa-arabinofuranosidasa)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 0g0314191	familia 79 de glucósido hidrolasa - GH79 (endo-beta-glucuronidasa / heparanasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 3g0397411	homólogo a A. thaliana PMR5 (resistente al moho polvoriento) (acilación de carbohidratos)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 4g0444681	familia de inhibidores I3 (familia Kunitz-P)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 4g0445181	lactato/malato dehidrogenasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 7g0564111	lectina (D-manosa)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 7g0558861	lectina (dominio PAN-2)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 2g0039251	lipasa acilhidrolasa (familia GDSE)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 1g0000161	proteína de transferencia de lípidos / inhibidor de la tripsina-alfa amilasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 2g0047121	Lectina de unión a manosa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 0g0303361	Proteína transportadora mitocondrial
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 5g0489551	Oxidasa multicobre
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 5g0135581	Nolisosomal neutral/alcalina ceramidasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 1g0017621	nucleosida difosfato quinasa
<i>Helianthus</i>	HanXRQChr1	peroxidasa

<i>annuus</i>	0g0295991	
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 3g0398251	peroxiredoxin
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 1g0333171	Proteína 1 inducida por fosfato (phi)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 3g0060421	fosfodiesterasa/nucleotido pirofosfatasa/fosfato transferasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 3g0078011	fosfofructoquinasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 3g0408831	fosfoglicerato quinasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 0g0286701	fosfoglicerato mutasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 6g0171591	fotosistema II PsbP, complejo evolutivo de oxígeno
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 4g0434951	Proteína plastídica asociada a lípido /dominio fibrillin conservado
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 5g0146621	plastocianin (proteína de union cobre azul)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 1g0330251	polifenol oxidasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 4g0094541	Subunidad proteasoma tipo A
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 3g0081271	Subunidad proteasoma tipo B
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 2g0356851	Fosfatasa ácido púrpura
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 5g0485781	Transferasa piridoxal dependiente de fosfato
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 1g0336791	proteína ribosomal
<i>Helianthus</i>	HanXRQChr1	proteína ribosomal

<i>annuus</i>	1g0330521	
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 1g0326801	ribulosa bisfosfato carboxilasa, Subunidad grande
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 6g0523951	ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa Subunidad pequeña
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 1g0022151	S- adenosil-L-homocisteína hidrolasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 4g0454811	S-adenosilmetionina sintetasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 4g0109991	Proteína extracelular similar a SCP (PR-1)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 3g0072241	Ser carboxipeptidasa (Familia peptidasa S10)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 2g0377221	Ser proteasa (subtilisin) (Familia peptidasa S8)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 2g0055581	superoxide dismutasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 5g0493261	taumatina (PR5)
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr1 6g0532531	transquetolasa
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 7g0197421	Traducción Factor de Enlogación EFTu/EF1A
<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	HanXRQChr0 6g0173951	proteína tumoral controlada translacionalmente