

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 614**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08708767 .2**  
96 Fecha de presentación: **07.02.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2115148**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.11.2009**

54 Título: **COMPOSICIONES Y MÉTODOS QUE UTILIZAN INTERFERENCIA DE ARN DE TIPO CDPK PARA EL CONTROL DE NEMÁTODOS.**

30 Prioridad:  
**09.02.2007 US 900466 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.02.2012**

73 Titular/es:  
**BASF Plant Science GmbH  
67056 Ludwigshafen, US**

72 Inventor/es:  
**TALTON, Lawrence Winfield;  
REN, Peifeng y  
ASCENZI, Robert A.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 373 614 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos que utilizan interferencia de ARN de tipo CDPK para el control de nematodos.

El campo de esta invención es el control de nemátodos, en particular con el control de nematodos formadores de quistes de la soja. La invención también se relaciona con la introducción de material genético dentro de plantas que son susceptibles a nemátodos con el propósito de incrementar la resistencia a los nemátodos.

Los nemátodos son lombrices microscópicas que se alimentan sobre las raíces, hojas y tallos de más de 2.000 cultivos en hilera, vegetales, frutas, y plantas ornamentales, provocando una pérdida de cultivos estimada en \$100 mil millones en todo el mundo. Una variedad de especies de nemátodos parásitos, incluidos nemátodos de los nudos de la raíz (RKN), nematodos formadores de quistes y de lesiones. Los nematodos de los nudos de la raíz, que se caracterizan por causar la formación de agallas en la raíz en los sitios de alimentación, tienen una gama de huéspedes relativamente amplia y son por lo tanto patógenos sobre un gran número de especies de cultivo. Las especies de nemátodos formadoras de quistes y de lesiones tienen una gama de huéspedes más limitada, pero aún provocan pérdidas considerables en cultivos susceptibles.

Los nematodos patógenos están presentes a todo lo largo de los Estados Unidos, presentándose las mayores concentraciones en las regiones húmedas y cálidas del Sur y del Oeste y en suelos arenosos. Los nematodos formadores de quistes de la soja (*Heterodera glycines*), la plaga más seria de las plantas de la soja, fue descubierta primero en los Estados Unidos en Carolina del Norte en 1954. Algunas áreas están tan fuertemente infestadas por el nematodo formador de quistes de la soja (SCN) que la producción de soja no es económicamente factible sin medidas de control. Aunque la soja es el principal cultivo económico atacado por el SCN, el SCN parasita algunos cincuenta huéspedes en total, incluidos cultivos de campo, vegetales, ornamentales, y malas hierbas.

Los signos de daño por nemátodos incluyen retraso en el crecimiento y amarillamiento de hoja, y marchitamiento de las plantas durante períodos cálidos. Sin embargo, la infestación por nemátodos puede provocar pérdidas significativas en productividad sin síntomas de enfermedad obvios por encima del suelo. Las causas primarias de reducción en productividad son debidas a daño de las raíces por debajo del suelo. Las raíces infectadas por SCN son enanas o con retraso en el crecimiento. La infestación por nemátodos infestación también puede disminuir el número de nódulos que fijan nitrógeno sobre las raíces, y pueden volver a las raíces más susceptibles a los ataques por otros patógenos de la planta transmitidos por el suelo.

El ciclo de vida de los nemátodos tiene tres etapas principales: embrionaria, juvenil, y adulta. El ciclo de vida varía entre las especies de nemátodos. Por ejemplo, el ciclo de vida del SCN usualmente se puede completar en 24 a 30 días bajo condiciones óptimas mientras que en otras especies puede tomar tanto como un año, o más, para completar el ciclo de vida. Cuando los niveles de temperatura y de humedad se tornan favorables en la primavera, eclosionan gusanos juveniles de los embriones en el suelo. Únicamente nemátodos en etapa de desarrollo juvenil son capaces de infectar raíces de soja.

El ciclo de vida de los SCN ha sido sometido a muchos estudios, y como tales son un ejemplo útil para comprender el ciclo de vida del nemátodo. Después de penetrar las raíces de soja, los SCN juveniles se mueven a través de la raíz hasta que hacen contacto con el tejido vascular, en cuyo momento dejan de migrar y empiezan alimentarse. Con un estilete, el nemátodo inyecta secreciones que modifican ciertas células de la raíz y las transforma en sitios de alimentación especializados. Las células de la raíz son morfológicamente transformadas en grandes sincitios multinucleados (o células gigantes en el caso de RKN), que son utilizados como una fuente de nutrientes para los nemátodos. Los nemátodos que se alimentan activamente roban por lo tanto nutrientes esenciales de la planta lo que resulta en pérdida de productividad. A medida que los nemátodos hembra se alimentan, se hinchan y eventualmente se hacen tan grandes que sus cuerpos atraviesan el tejido de la raíz y quedan expuestos sobre la superficie de la misma.

Después de un período de alimentación, los nematodos SCN, que no están hinchados como los adultos, migran fuera de la raíz hacia el suelo y fertilizan a las hembras adultas agrandadas. Los machos mueren luego, mientras que las hembras permanecen unidas al sistema de la raíz y continúan alimentándose. Los embriones en las hembras hinchadas comienzan a desarrollarse, inicialmente en una masa o saco embrionario por fuera del cuerpo, y posteriormente dentro de la cavidad corporal del nemátodo. Eventualmente la cavidad entera del cuerpo de la hembra adulta se llena con embriones, y el nemátodo muere. Es al cuerpo lleno de embriones de la hembra muerta al que se denomina como el quiste. Los quistes eventualmente son desalojados y se encuentran libres en el suelo. Las paredes del quiste se hacen muy duras, proporcionan una excelente protección para los aproximadamente 200 a 400 embriones contenidos dentro. Los embriones del SCN sobreviven dentro del quiste hasta que se presenten condiciones apropiadas para eclosionar. Aunque muchos de los embriones pueden eclosionar dentro del primer año, muchos sobrevivirán también dentro de los quistes protectores durante varios años.

Un nemátodo puede moverse a través del suelo únicamente unas pocas pulgadas por año por sus propios medios. Sin embargo, la infestación por nemátodos puede recorrer grandes distancias en una variedad de formas. Cualquier cosa que pueda mover el suelo infestado es capaz de esparcir la infestación, incluida la maquinaria agrícola, vehículos y herramientas, viento, agua, animales, y los trabajadores agrícolas. Las partículas del suelo del tamaño de las semillas a menudo contaminan las semillas cosechadas. En consecuencia, se puede esparcir la infestación con nemátodos cuando se planta semilla contaminada de campos infestados en campos no infestados. Existe incluso evidencia de que ciertas especies de nemátodos pueden ser esparcidas por los pájaros. Solamente algunas de estas causas pueden ser impedidas.

Las prácticas tradicionales para manejar la infestación por nemátodos incluyen: el mantenimiento apropiado de los nutrientes del suelo y los niveles de pH del suelo en una tierra infestada de nemátodos; el control de otras enfermedades de las plantas, así como plagas de insectos y de mala hierba; el uso de prácticas sanitarias tales como el arado, la plantación, y el cultivo de campos infestados por nemátodos únicamente después de trabajar los campos no infestados; la limpieza completa del equipo con agua o vapor a alta presión después de trabajar en campos infestados; no utilizar semilla que se desarrolló sobre tierra infestada para la plantación de campos no infestados a menos que la semilla haya sido limpiada adecuadamente; la rotación de campos infestados y la alternación de cultivos huéspedes con cultivos no huéspedes; el uso de nematicidas; y la plantación de variedades de plantas resistentes.

Se han propuesto métodos para la transformación genética de plantas con el propósito de conferir mayor resistencia a los nemátodos que parasitan las plantas. Las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.589.622 y 5.824.876 están dirigidas a la identificación de genes de plantas expresados específicamente en o en forma adyacente al sitio de alimentación de la planta después de fijación por el nemátodo. Los promotores de estos genes objetivo de la planta pueden ser luego utilizados para dirigir la expresión específica de proteínas o enzimas perjudiciales, o la expresión de ARN antisentido al gen objetivo o a los genes celulares en general. Los promotores de la planta pueden ser utilizados también para conferir resistencia a los nemátodos específicamente en el sitio de alimentación transformando la planta con una construcción que contiene al promotor del gen objetivo de la planta enlazado a un gen cuyo producto induce letalidad en el nemátodo después de ingestión.

Recientemente, la interferencia de RNA (ARNi), también denominada como silenciamiento génico, ha sido propuesta como un método para controlar nemátodos. Cuando se introduce ARN bicatenario (ARNds) que corresponde esencialmente a la secuencia de un gen objetivo o ARNm en una célula, se inhibe la expresión del gen objetivo (Ver por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 6.506.559). La patente de los estados Unidos No. 6.506.559 demuestra la efectividad del ARNi contra genes conocidos en *Caenorhabditis elegans*, pero no demuestra la utilidad del ARNi para controlar los nemátodos que parasitan la planta.

Se ha propuesto el uso de ARNi para apuntar a los genes esenciales del nemátodo, por ejemplo, en la Publicación PCT WO 01/96584, WO 01/17654, US 2004/0098761, US 2005/0091713, US 2005/0188438, US 2006/0037101, US 2006/0080749, US 2007/0199100, y US 2007/0250947.

Se han propuesto una cantidad de modelos para la acción del ARNi. En sistemas de mamíferos, los ARNds mayores a 30 nucleótidos activan la inducción de la síntesis de interferón y una suspensión global de la síntesis de proteína, en una forma no específica de la secuencia. Sin embargo, la patente de los Estados Unidos No. 6.506.559 divulga que en los nemátodos, la longitud del ARNds correspondiente a la secuencia del gen objetivo puede tener al menos 25, 50, 100, 200, 300, ó 400 bases, e inclusive que los ARNds mayores fueron también efectivos en la inducción de ARNi en *C. elegans*. Se sabe que cuando las construcciones de horquillas de ARN que contienen regiones bicatenarias en el rango de 98 a 854 nucleótidos fueron transformadas en una cantidad de especies de plantas, se silenciaron eficientemente los genes de la planta objetivo. Existe un acuerdo general de que en muchos organismos, incluidos nemátodos y plantas, se escinden grandes pedazos de ARNds en fragmentos de aproximadamente 19 - 24 nucleótidos (ARNsi) dentro de las células, y que estos ARNsi son los mediadores reales del fenómeno del ARNi.

Las diferentes proteína quinasas que dependen del calcio (CDPK) en las plantas median una variedad de respuestas al medio ambiente. Se demostró que una CDPK específica en *Medicago truncatula* (CDPK1) era necesaria para la formación de interacciones simbióticas entre plantas y *Rhizobia* y hongos micorrícicos (ver Ivashuta et al., (2005) Plant Cell 17: 2911 - 2921). Ivashuta et al. sugiere que la CDPK1 está involucrada en la expansión y/o la síntesis de la pared celular.

Aunque se han hecho numerosos esfuerzos para utilizar ARNi para controlar los nemátodos que parasitan las plantas, hasta la fecha no se ha desregulado en ningún país las plantas transgénicas resistentes a los nemátodos. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de identificar composiciones y métodos efectivos y seguros para el control de los nemátodos que parasitan las plantas utilizando ARNi, y para la producción de plantas que tengan mayor resistencia a los nemátodos que parasitan las plantas.

Los presentes inventores han descubierto que la reducción de la expresión de las proteína quinasas que dependen del calcio (las CDPK o los genes tipo CDPL), ejemplificadas por el ADNc de *G. max* denominado como 49806575, confiere resistencia a los nemátodos que parasitan las plantas. Esta reducción de la expresión se puede lograr utilizando ARNi que apunta a genes tales como CDPK.

5 La invención provee las modalidades caracterizadas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

La presente invención puede ser entendida más fácilmente haciendo referencia a la siguiente descripción detallada de las modalidades preferidas de la invención y los ejemplos incluidos allí. A menos que se determine otra cosa, los términos utilizados aquí deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por parte de aquellos ordinariamente capacitados en la técnica pertinente. Además de las definiciones de términos suministradas más adelante, se pueden encontrar definiciones de términos comunes en biología molecular en Rieger et al., 1991 Glossary of genetics: classical and molecular, 5th Ed., Berlin: Springer-Verlag; y en Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., Eds., Current Protocols, una colaboración empresarial entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (1998 Suplemento). Debe entenderse que como se lo utiliza en la especificación y en las reivindicaciones, "uno" o "una" puede significar uno o más, dependiendo del contexto en el cual se lo utilice. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" puede significar que se puede utilizar al menos una célula. Debe entenderse que la terminología utilizada aquí tiene el propósito de describir modalidades específicas únicamente y no pretende constituirse en limitante.

A través de esta solicitud, se hace referencia a diferentes publicaciones de patente de la literatura. Las divulgaciones de todas estas publicaciones y de aquellas referencias citadas dentro de esas publicaciones son incorporadas aquí en su totalidad como referencia en esta solicitud con el propósito de describir más completamente el estado del arte al cual pertenece esta invención.

Un "gen como el CDPK" de una planta es definido aquí como un gen que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el polinucleótido 49806575 que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1, que es el gen como el CDPK de *G. max*. De acuerdo con la invención, los genes tipo CDPK incluyen a los genes que tienen secuencias tales como aquella expuesta en la SEQ ID NO: 2 que son homólogas del gen como el CDPK de *G. max*. Los genes tipo CDPK definidos aquí codifican polipéptidos que tienen al menos 70% de identidad de secuencia con el polipéptido parcial tipo CDKP de *G. max* que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3. Tales polipéptidos incluyen a los polipéptidos tipo CDPK que tienen las secuencias expuestas en la SEQ ID Nos: 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 y 27.

Se pueden aislar genes adicionales tipo CDPK (homólogos del gen como el CDPK) de plantas diferentes a la soja utilizando la información suministrada aquí y las técnicas conocidas por aquellos capacitados en el arte de la biotecnología. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico de una planta que hibrida bajo condiciones rigurosas al ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 puede ser aislada de bibliotecas de ADNc de tejido vegetal. Alternativamente, se puede aislar ARNm de células vegetales (por ejemplo, por medio del procedimiento de extracción de tiocianato de guanidina de Chirgwin et al., 1979, Biochemistry 18: 5294 - 5299), y se puede preparar ADNc utilizando transcriptasa inversa (por ejemplo, transcriptasa inversa del MLV de Moloney, que puede ser adquirida de Gibco/BRL, Bethesda, MD; o transcriptasa inversa del AMV, que puede ser adquirida de Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Los iniciadores de oligonucleótidos sintéticos para amplificación por reacción en cadena de la polimerasa pueden ser diseñados con base en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Se pueden diseñar iniciadores adicionales de oligonucleótido que se basen en las secuencias de los genes tipo CDPK que tienen secuencias como las expuestas en la SEQ ID NO: 2. Las moléculas de ácido nucleico correspondientes a los genes objetivo tipo CDPK definidos aquí pueden ser amplificados utilizando ADNc o, alternativamente, ADN genómico, como molde e iniciadores de oligonucleótidos apropiados de acuerdo con técnicas estándar de amplificación por PCR. Las moléculas de ácido nucleico así amplificadas pueden ser clonadas en vectores apropiados y caracterizadas por medio de análisis de secuencia de ADN.

Como se lo utiliza aquí, "ARNi" o "interferencia de ARN" se refiere al proceso de silenciamiento génico post-transcripcional específico de la secuencia en plantas, mediado por ARN bicatenario (ARNds). Como se lo utiliza aquí, "ARNds" se refiere a RNA que es parcial o completamente bicatenario. El ARN bicatenario es también denominado como ARN de interferencia corta o pequeña (ARNsi), ácido nucleico de interferencia corta (NAsi), ARN de interferencia corta, micro-ARN (ARNmi), y similares. En el proceso del ARNi, se introducen el ARNds que contiene una primera cadena que es sustancialmente idéntica a una porción de un gen objetivo por ejemplo un gen como el CDPK y una segunda cadena que es complementaria a la primera cadena en una planta. Después de la introducción en la planta, se procesa el ARNds específico del gen objetivo en fragmentos relativamente pequeños (los ARNsi) y pueden posteriormente llegar a ser distribuidos a través de la planta, lo que conduce a una mutación con pérdida de la función que tiene un fenotipo que, durante el período de una generación, puede llegar a asemejarse al fenotipo que surge de una supresión parcial o completa del gen objetivo. Alternativamente, el ARNds específico del gen objetivo está operativamente asociado con un elemento regulador o promotor que resulta en la expresión del ARNds en un tejido, de manera temporal, espacial o inducible y puede además ser procesado en

fragmentos relativamente pequeños por una célula de una planta que contiene la maquinaria de procesamiento del ARNi, y se obtiene el fenotipo de pérdida de la función. También, el elemento regulador o promotor puede dirigir preferencialmente la expresión a las raíces o sincitios o a células gigantes donde los ARNs pueden ser expresados ya sea constitutivamente en esos tejidos o después de inducción por medio de la alimentación del nemátodo o nemátodo juvenil, por ejemplo los nemátodos J2.

Como se lo utiliza aquí, teniendo en cuenta la sustitución de uracilo por timina cuando se comparan las secuencias de ARN y ADN, el término "sustancialmente idéntico" como se lo aplica al ARNs significa que la secuencia de nucleótidos de una cadena de los ARNs es aproximadamente al menos del 80% - 90% idéntica a 20 o más nucleótidos contiguos del gen objetivo, más preferiblemente, aproximadamente al menos 90 - 95% idéntica a 20 o más nucleótidos contiguos del gen objetivo, y lo más preferiblemente aproximadamente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica o absolutamente idéntica a 20 o más nucleótidos contiguos del gen objetivo. 20 o más nucleótidos significa una porción, que tiene aproximadamente al menos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, bases consecutivas o hasta la longitud completa del gen objetivo.

Como se lo utiliza aquí, polinucleótidos "complementarios" son aquellos que son capaces de apareamiento de bases de acuerdo con las reglas estándar de complementariedad de Watson-Crick. Específicamente, las purinas se aparearán con pirimidinas para formar una combinación de guanina apareada con citosina (G:C) y adenina apareada ya sea con timina (A:T) en el caso del ADN, o adenina apareada con uracilo (A:U) en el caso del ARN. Se entiende que dos polinucleótidos pueden hibridar entre sí incluso si no son completamente complementarios entre sí, siempre y cuando cada uno tenga al menos una región que sea sustancialmente complementaria a la otra. Como se lo utiliza aquí, el término "sustancialmente complementaria" significa que dos secuencias de ácido nucleico son complementarias al menos en un 80% de sus nucleótidos. Preferiblemente, las dos secuencias de ácido nucleico son complementarias en al menos un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más o en todos sus nucleótidos. Alternativamente, "sustancialmente complementaria" significa que dos secuencias de ácido nucleico pueden hibridar bajo condiciones altamente restrictivas. Como se lo utiliza aquí, el término "sustancialmente idéntica" o "correspondiente a" significa que dos secuencias de ácido nucleico tienen al menos 80% de identidad de secuencia. Preferiblemente, las dos secuencias de ácido nucleico tienen al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia.

También como se los utiliza aquí, los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se refieren a ARN o ADN que es lineal o ramificado, monocatenario o bicatenario, o un híbrido de los mismos. El término también abarca híbridos de ARN/ADN. Cuando se produce ARNs en forma sintética, las bases menos comunes, tales como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras pueden también ser utilizadas para el apareamiento de ribozima y de ARNs antisentido. Por ejemplo, polinucleótidos que contienen análogos de propino C-5 de uridina y de citidina han demostrado que enlazan ARN con alta afinidad y que son potentes inhibidores antisentido de expresión génica. También pueden hacerse otras modificaciones, tales como la modificación a la columna vertebral fosfodiéster, o al 2'-hidroxi en el grupo de azúcar de la ribosa del ARN.

Como se lo utiliza aquí, el término "control," cuando se lo utiliza en el contexto de una infección, se refiere a la reducción o prevención de una infección. La reducción o prevención de una infección por parte de un nemátodo provocará que una planta tenga mayor resistencia al nemátodo. Sin embargo, tal mayor resistencia no implica que la planta necesariamente tenga 100% de resistencia a la infección. En modalidades preferidas, la resistencia a la infección por parte de un nemátodo en una planta resistente es mayor al 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95% en comparación con una planta de tipo silvestre que no sea resistente a los nemátodos. Preferiblemente la planta de tipo silvestre es una planta de un genotipo similar, más preferiblemente idéntico al de la planta que tiene mayor resistencia al nemátodo, pero no contiene un ARN dirigido al gen objetivo. La resistencia de la planta a la infección por el nemátodo puede ser debida a la muerte, esterilidad, detención del desarrollo, o movilidad reducida del nemátodo después de exposición a la planta que contiene ARNs específicos para un gen esencial para el desarrollo o mantenimiento de un sitio funcional de alimentación, sincitios, o células gigantes. El término "resistente a infección por nemátodo" o "una planta que tiene resistencia a los nemátodos" como se los utiliza aquí se refieren a la capacidad de una planta, comparada con una planta de tipo silvestre, para evitar una infección por nemátodos, para matar nemátodos o para obstaculizar, reducir o detener el desarrollo, crecimiento o multiplicación de nemátodos. Esto se puede lograr por medio de un proceso activo, por ejemplo por medio de la producción de una sustancia perjudicial para el nemátodo, o por medio de un proceso pasivo, como el que tiene un valor nutricional reducido para el nemátodo o estructuras que no se desarrollan inducidas por el sitio de alimentación del nemátodo como sincitios o células gigantes. El nivel de resistencia al nemátodo resistencia de una planta se puede determinar en diferentes formas, por ejemplo por medio del recuento de los nemátodos que son capaces de establecer parasitismo sobre esa planta, o la medición de los tiempos de desarrollo de los nemátodos, la proporción de nemátodos macho y hembra o, por nemátodos formadores de quistes, el recuento del número de quistes o de embriones de nemátodos producidos sobre las raíces de una planta infectada o sistema de ensayo de la planta.

El término "planta" tiene por objeto abarcar plantas en cualquier etapa de maduración o desarrollo, así como cualquier tejido u órgano (partes de la planta) tomado o derivado de cualquiera de tales plantas a menos que se

- 5 especificque otra cosa claramente indicada por el contexto. Las partes de la planta incluyen, pero no se limitan a, tallos, raíces, flores, óvulos, estambres, semillas, hojas, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, cultivos de antera, gametofitos, esporofitos, polen, microesporas, protoplastos, cultivos de raíces vellosas, cultivos de explantes con raíces y similares. La presente invención también incluye semillas producidas por las plantas de la presente invención. En una modalidad, las semillas son líneas genéticamente puras para una mayor resistencia a la infección por nemátodos comparadas con una variedad de tipo silvestre de la semilla de la planta. Como se lo utiliza aquí, una "célula de una planta" incluye, pero no se limita a, un protoplasto, célula productora de gametos, y una célula que se regenera en una planta completa. El cultivo de tejido de diferentes tejidos de plantas y la regeneración de plantas a partir de los mismos es bien conocido en el arte y está ampliamente publicado.
- 10 Como se lo utiliza aquí, el término "transgénico" se refiere a cualquier planta, célula de la planta, callo, tejido de la planta, o parte de la planta que contiene todo o parte de al menos un polinucleótido recombinante. En muchos casos, todo o parte del polinucleótido recombinante integrado en forma estable dentro de un cromosoma o elemento extracromosómico estable, de modo que sea pasado a sucesivas generaciones. Para los propósitos de la invención, el término "polinucleótido recombinante" se refiere a un polinucleótido que ha sido alterado, reordenado, o modificado por medio de ingeniería genética. Los ejemplos incluyen cualquier polinucleótido clonado, o polinucleótidos, que estén enlazados o unidos a secuencias heterólogas. El término "recombinante" no se refiere a alteraciones de polinucleótidos que resulten de eventos de origen natural, tales como mutaciones espontáneas, o de mutagénesis no espontánea seguida por fitomejoramiento selectivo.
- 15 Como se lo utiliza aquí, el término "cantidad suficiente para inhibir la expresión" se refiere a una concentración o cantidad del ARNs que sea suficiente para reducir los niveles o la estabilidad del ARNm o proteína producida a partir de un gen objetivo en una planta. Como se lo utiliza aquí, "inhibición de la expresión" se refiere a la ausencia o disminución observable en el nivel de proteína y/o producto de ARNm de un gen objetivo. La inhibición de la expresión de un gen objetivo puede ser letal para el nematodo parásito ya sea directa o indirectamente a través de la modificación o erradicación del sitio de alimentación, sincitios, o célula gigante, o tal inhibición puede retrasar o evitar la entrada en una etapa particular de desarrollo (por ejemplo, metamorfosis), si el acceso a un sitio de alimentación completamente funcional, sincitios, o célula gigante está asociado con una etapa particular del ciclo de vida del nematodo parásito. Las consecuencias de la inhibición pueden ser confirmadas por medio del examen de la raíz de la planta para la reducción o eliminación de quistes u otras propiedades del nematodo o infestación por nemátodos (como se presenta más adelante en el Ejemplo 2).
- 20 De acuerdo con la invención, una planta se transforma con un ácido nucleico o un ARNs, que específicamente inhibe la expresión de un gen objetivo (gen como el CDPK) en la planta que es esencial para el desarrollo o mantenimiento de un sitio de alimentación, sincitios, o células gigante; afectando finalmente la supervivencia, metamorfosis, o reproducción del nematodo. En una modalidad, el ARNs es codificado por un vector que ha sido transformado en un ancestro de la planta infectada. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico que expresa dicho ARNs está bajo el control transcripcional de un promotor específico de la raíz o un promotor específico de la célula para alimentación del nematodo parásito o un promotor inducible por el nematodo.
- 25 Por lo tanto, el ARNs referido de acuerdo con la invención comprende una primera cadena que es sustancialmente idéntica a una porción de un gen como el CDPK tal como el ADNc 49806575 de soja, y una segunda cadena que es sustancialmente complementaria a la primera cadena. El gen objetivo se selecciona del grupo que consiste de: (a) un polinucleótido que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2; (b) un polinucleótido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, ó 2. La longitud de las secuencias de nucleótidos bicatenarios sustancialmente idénticos pueden ser aproximadamente al menos 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, bases consecutivas o hasta la longitud completa del gen como el CDPK. En una modalidad preferida, la longitud de la secuencia bicatenaria de nucleótidos es de aproximadamente 19 hasta aproximadamente 200 - 500 nucleótidos consecutivos de longitud. En otra modalidad preferida, el ARNs es sustancialmente idéntico o es idéntico a las bases 1 a 320 de la SEQ ID NO: 2.
- 30 Como se discutió anteriormente, los fragmentos de ARNs aproximadamente superiores a 19 - 24 nucleótidos de longitud son escindidos intracelularmente por nemátodos y plantas a los ARNs de aproximadamente 19 - 24 nucleótidos de longitud, y estos ARNs son los reales mediadores del fenómeno del ARNi. La tabla en las Figuras 51 - 5g expone ejemplos de 21 mers de los genes como el CDPK definidos aquí. Esta tabla puede ser utilizada también para calcular los 19, 20, 22, 23 o 24 mers por medio de adición o sustracción del número apropiado de nucleótidos de cada 21 mer. De este modo el ARNs puede estar en el rango de longitud de aproximadamente 19 nucleótidos hasta aproximadamente 320 nucleótidos. Preferiblemente, el ARNs de la invención tiene una longitud e aproximadamente 21 nucleótidos hasta aproximadamente 600 nucleótidos. Más preferiblemente, el ARNs tiene una longitud de aproximadamente 21 nucleótidos hasta aproximadamente 500 nucleótidos, o aproximadamente desde 21 nucleótidos hasta aproximadamente 400 nucleótidos.
- 35 Como se divulga aquí, no se requiere una identidad de secuencia del 100% entre el ARNs y el gen objetivo para practicar la presente invención. Aunque se prefiere para la inhibición un ARNs que comprende una secuencia de

nucleótidos idéntica a una porción del gen como el CDPK, la invención puede tolerar variaciones de secuencia que pueden ser esperadas debido a manipulación génica o síntesis, mutación genética, polimorfismo de cadena, o divergencia evolucionaria. Por lo tanto los ARNds de la invención también abarcan los ARNds que contienen una falta de coincidencia con el gen objetivo de al menos 1, 2, o más nucleótidos. Por ejemplo, se contempla en la presente invención que las secuencias de ARNds de 21 mer ejemplificadas en las Figuras 5a-5g pueden contener una adición, supresión o sustitución de 1, 2, o más nucleótidos, siempre y cuando la secuencia resultante aún interfiera con la función de un gen como el CDPK.

La identidad de secuencia entre los ARNds de la invención y los genes objetivo como el CDPK puede ser optimizada por medio de comparación de secuencias y algoritmos de alineación conocidos en el arte (ver Gribskov y Devereux, Sequence Analysis Primer, Stockton Press, 1991, y las referencias citadas allí) y calculando la diferencia en porcentaje entre las secuencias de nucleótidos, por ejemplo, por medio del algoritmo de Smith-Waterman como el implementado en el programa de software BESTFIT utilizando parámetros predeterminados (por ejemplo, University of Wisconsin Genetic Computing Group). Se prefiere una identidad de secuencia superior al 80%, una identidad de secuencia superior al 90%, o incluso una identidad de secuencia del 100%, entre el ARN inhibitorio y la porción del gen objetivo. Alternativamente, la región dúplex del ARN puede ser definido funcionalmente como una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridar con una porción del transcrito del gen objetivo bajo condiciones rigurosas (por ejemplo, NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, hibridación a 60°C durante 12 - 16 horas; seguido por lavado a 65°C con SDS al 0,1% y SSC al 0,1% aproximadamente durante 15 - 60 minutos).

Cuando el ARNds tiene una longitud aproximadamente mayor a 21 nucleótidos, por ejemplo aproximadamente de 50 nucleótidos hasta aproximadamente 1000 nucleótidos, se escindirá en forma aleatoria hasta los ARNds de aproximadamente 21 nucleótidos dentro de la planta o las células del nemátodo parasitario, los ARNsi. La escisión de un ARNds más largo de la invención producirá una reserva de los ARNds de aproximadamente 21 mer (en el rango aproximadamente desde 19 mers hasta aproximadamente 24 mers), derivada del ARNds más largo. Esta reserva de ARNds de aproximadamente 21 mer está también incluida dentro del alcance de la presente invención, ya sea generada en forma intracelular dentro de la planta o el nemátodo o en forma sintética utilizando métodos conocidos de síntesis de oligonucleótidos.

Los ARNsi aplicados de acuerdo con la invención tienen secuencias correspondientes a fragmentos de aproximadamente 19 - 24 nucleótidos contiguos a través de la secuencia completa de un gen objetivo como el CDPK. Por ejemplo, una reserva de tales ARNsi derivados de un gen como el CDPK como se expone en la SEQ ID NO: 1, ó 2, puede incluir una multiplicidad de moléculas de ARN que se seleccionan del grupo que consiste de oligonucleótidos sustancialmente idénticos a los nucleótidos de 21 mer de la SEQ ID NO: 1, ó 2, encontrados en las Figuras 5a - 5g. Una reserva de ARNsi derivados de un gen objetivo como el CDPK de la SEQ ID NO: 1 puede contener también cualquier combinación de las moléculas específicas de ARN que tienen cualquiera de las 21 secuencias contiguas de nucleótidos derivadas de SEQ ID NO: 1 expuestas en las Figuras 5a - 5g. Además, como se señaló anteriormente, múltiples Dicers especializadas en plantas generan los ARNsi típicamente en un rango de tamaño de 19 nt a 24 nt (Ver Henderson et al., 2006. Nature Genetics 38: 721 - 725.). Los ARNsi pueden estar en el rango aproximadamente desde 19 secuencias contiguas de nucleótidos hasta aproximadamente 24 secuencias contiguas de nucleótidos. En forma similar, una reserva de ARNsi puede incluir una multiplicidad de moléculas de ARN que tienen cualquiera de las aproximadamente 19, 20, 21, 22, 23, ó 24 secuencias contiguas de nucleótidos derivadas de la SEQ ID NO: 1, ó 2. Alternativamente, la reserva de ARNsi puede incluir una multiplicidad de moléculas de ARN que tienen una combinación de cualquiera de las aproximadamente 19, 20, 21, 22, 23, y/o 24 secuencias contiguas de nucleótidos derivadas de la SEQ ID NO: 1.

El ARNds mencionado anteriormente de acuerdo con la invención puede incluir opcionalmente una proyección monocatenaria en uno cualquiera o en ambos extremos. La estructura bicatenaria puede estar formada por una sola cadena de ARN autocomplementaria (es decir, formando un bucle en horquilla) o dos cadenas complementarias de ARN. La formación del dúplex de ARN se puede iniciar ya sea dentro o fuera de la célula. Cuando el ARNds forma un bucle en horquilla, puede incluir opcionalmente un intrón, como se expone en US 2003/0180945A1 o un espaciador nucleotídico, que es un tramo de secuencia entre las cadenas complementarias de ARN para estabilizar al transgén en forma de horquilla en las células. Los métodos para elaborar diferentes moléculas de ARNds están expuestos, por ejemplo, en WO 99/53050 y en la patente de los Estados Unidos No. 6.506,559. El ARN puede ser introducido en una cantidad que permita el suministro de al menos una copia por célula. Dosis mayores de material bicatenario pueden producir una inhibición más efectiva.

También se divulga aquí un vector de expresión recombinante aislado que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula de ARNds como se describió anteriormente, en donde la expresión del vector en una célula de una planta huésped da como resultado una mayor resistencia a un nemátodo parásito comparado con una variedad de tipo silvestre de la célula de la planta huésped. Como se lo utiliza aquí, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", el cual se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario dentro del cual se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos adicionales de ADN

dentro del genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula de una planta huésped dentro de la cual son introducidos. Otros vectores son integrados dentro del genoma de una célula de una planta huésped por medio de la introducción en la célula huésped, y así se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los cuales están operativamente enlazados. Tales vectores son denominados aquí como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en la forma de plásmidos. En la presente especificación, se pueden utilizar indistintamente "plásmido" y "vector" ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, virus X de la patata, virus cascabel del tabaco, y Geminivirus), que cumple funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinante incluyen un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para expresión del ácido nucleico en una célula de la planta huésped, lo que significa que el vector de expresión recombinante incluye una o más secuencias reguladoras, por ejemplo promotores, seleccionados con base en las células de la planta huésped que son utilizadas para expresión, que están operativamente enlazados a la secuencia de ácido nucleico que es expresada. Con respecto a un vector de expresión recombinante, los términos "operativamente enlazado" y "en asociación operativa" son intercambiables y pretenden dar a entender que la secuencia de nucleótidos de interés está enlazada a la(s) secuencia(s) reguladora(s) en una forma que permita la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en una célula de una planta huésped cuando el vector es introducido en la célula de la planta huésped). El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, reforzadores, y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras son descritas, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) y Gruber y Crosby, en: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Eds. Glick y Thompson, Capítulo 7, 89 - 108, CRC Press: Boca Raton, Florida, incluidas las referencias citadas allí. Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos únicamente en ciertas células huésped o bajo ciertas condiciones. Se apreciará por parte de aquellos capacitados en el arte que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la escogencia de la célula huésped que es transformada, el nivel de expresión deseado de ARNs, etc. Los vectores de expresión pueden ser introducidos en células huésped de plantas para producir así moléculas de ARNs mencionadas de acuerdo con la invención, codificadas por ácidos nucleicos como se describe aquí.

El vector de expresión recombinante incluye una secuencia reguladora operativamente enlazada a una secuencia de nucleótidos que es un molde para una o ambas cadenas de las moléculas de ARNs. La molécula de ácido nucleico puede incluir además un promotor que flanquea cualquier extremo de la molécula de ácido nucleico, en donde los promotores dirigen la expresión de cada cadena individual de ADN, generando así dos ARN complementarios que hibridan y forman el ARNs. La molécula de ácido nucleico puede incluir también una secuencia de nucleótidos que es transcrita dentro de ambas cadenas del ARNs sobre una unidad de transcripción, en donde la cadena sentido es transcrita desde el extremo 5' de la unidad de transcripción y la cadena antisentido es transcrita desde el extremo 3', en donde las dos cadenas están separadas por aproximadamente 3 hasta aproximadamente 500 pares de bases o más, y en donde después de la transcripción, el transcripto de ARN se pliega sobre sí mismo para formar una horquilla. La invención, la región espaciadora en el transcripto de la horquilla puede ser cualquier fragmento de ADN.

De acuerdo con la presente invención, el polinucleótido introducido puede ser mantenido en forma estable en la célula de la planta si es incorporado en un replicón autónomo no cromosómico o integrado dentro de los cromosomas de la planta. Alternativamente, el polinucleótido introducido puede estar presente sobre un vector no replicante extracromosómico y ser expresado en forma transitoria o activo transitoriamente. Ya sea que esté presente en un vector no replicante extracromosómico o en un vector que esté integrado dentro de un cromosoma, el polinucleótido reside preferiblemente en un casete de expresión de la planta. Un casete de expresión de una planta contiene preferiblemente secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión génica en células vegetales que están operativamente enlazadas de modo que cada secuencia pueda cumplir su función, por ejemplo, terminación de la transcripción por medio de señales de poliadenilación. Las señales de poliadenilación preferidas son aquellas que se originan a partir del t-ADN de *Agrobacterium tumefaciens* tal como el gen 3 conocido como octopina sintasa del plásmido Ti, pTiACH5 (Gielen et al., 1984, EMBO J. 3: 835) o equivalentes funcionales del mismo, pero también son adecuados todos los otros terminadores funcionalmente activos en plantas. Como la expresión del gen de la planta muy a menudo no está limitada sobre los niveles transcripcionales, un casete de expresión de una planta contiene preferiblemente otras secuencias operativamente enlazadas como potenciadores de la traducción tales como la secuencia de sobreexcitación que contiene la secuencia líder no traducida 5' del virus del mosaico del tabaco que mejora la relación polipéptido por ARN (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15: 8693 - 8711). Los ejemplos de vectores de expresión de la planta incluyen a aquellos detallados en: Becker, D. et al., 1992, New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border, Plant Mol. Biol. 20: 1195 - 1197; Bevan, M. W., 1984, Binary Agrobacterium vectors for plant transformation, Nucl. Acid. Res. 12: 8711 - 8721; y Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; en: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering y Utilization, eds.: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38.

- La expresión del gen de la planta debe estar operativamente enlazada a un promotor apropiado que confiera expresión génica en una forma temporal preferida, espacial preferida, preferida por el tipo de célula, y/o preferida por el tejido. Los promotores útiles en los casetes de expresión de la invención incluyen cualquier promotor que sea capaz de iniciar la transcripción en una célula vegetal presente en las raíces de la planta. Tales promotores incluyen, pero no se limitan a aquellos que pueden ser obtenidos a partir de plantas, virus de la planta y bacterias que contengan genes que se expresen en plantas, tales como *Agrobacterium* y *Rhizobium*. Preferiblemente, el casete de expresión de la invención incluye un promotor específico de la raíz, un promotor inducible por un patógeno, o un promotor inducible por un nemátodo. Más preferiblemente el promotor inducible por un nemátodo es un promotor específico de la célula que alimenta al nemátodo parásito. Un promotor específico del sitio de alimentación del nematodo parásito puede ser específico para células sincitiales o células gigantes o específico para ambas clases de células. Un promotor es inducible, si su actividad, medida sobre la cantidad de ARN producida bajo el control del promotor, es al menos 30%, 40%, 50% preferiblemente al menos 60%, 70%, 80%, 90% más preferible al menos 100%, 200%, 300% superior en su estado inducido, que en su estado no inducido. Un promotor es específico de la célula, tejido u órgano, si su actividad, medida sobre la cantidad de ARN producida bajo el control del promotor, es al menos 30%, 40%, 50% preferiblemente al menos 60%, 70%, 80%, 90% más preferible al menos 100%, 200%, 300% superior en un tipo particular de célula, tejido u órgano, luego en otros tipos de células o tejidos de la misma planta, preferiblemente los otros tipos de células o tejidos son tipos de células o tejidos del mismo órgano de la planta, por ejemplo una raíz. En el caso de promotores específicos del órgano, la actividad del promotor tiene que ser comparada con la actividad del promotor en otros órganos de la planta, por ejemplo hojas, tallos, flores o semillas.
- El promotor puede ser constitutivo, inducible, preferido en etapa de desarrollo, preferido por el tipo de célula, preferido por el tejido o preferido por el órgano. Los promotores constitutivos son activos bajo la mayoría de las condiciones. Los ejemplos no limitantes de promotores constitutivos incluyen a los promotores 19S y 35S del CaMV (Odell et al., 1985, Nature 313: 810 - 812), al promotor 35S del CaMV (Kay et al., 1987, Science 236: 1299 - 1302), al promotor Sep1, al promotor de la actina del arroz (McElroy et al., 1990, Plant Cell 2: 163 - 171), al promotor de la actina de *Arabidopsis*, al promotor de la ubiquitina (Christensen et al., 1989, Plant Molec. Biol. 18: 675 - 689); pEmu (Last et al., 1991, Theor. Appl. Genet. 81: 581 - 588), al promotor 35S del virus del mosaico de la escrofularia, al promotor de Smas (Velten et al., 1984, EMBO J. 3: 2723 - 2730), al promotor de GRP1-8, al promotor de la cinamil alcohol deshidrogenasa (patente de los Estados Unidos No. 5.683.439), promotores del T-ADN de *Agrobacterium*, tales como manopina sintasa, nopalina sintasa, y octopina sintasa, la pequeña subunidad del promotor de ribulosa bifosfato carboxilasa (ssuRUBISCO), y similares. Se prefieren los promotores que expresan al ARNs en una célula que esté en contacto por medio de nemátodos parásitos. Alternativamente, el promotor puede dirigir la expresión del ARNs en un tejido vegetal alejado del sitio de contacto con el nemátodo, y el ARNs puede ser transportado luego por la planta a una célula que sea contactada por el nematodo parásito, en particular células de, o cercanas a los sitios de alimentación del nemátodo, por ejemplo células sincitiales o células gigantes.
- Los promotores inducibles son activos bajo ciertas condiciones ambientales, tales como la presencia o la ausencia de un nutriente o metabolito, calor o frío, luz, ataque de patógenos, condiciones anaeróbicas, y similares. Por ejemplo, se ha demostrado que los promotores de TobRB7, AtRPE, AtPyk10, Gemini19, y AtHMG1 son inducidos por nemátodos (para una revisión de promotores inducibles por nemátodos, ver Ann. Rev. Phytopathol. (2002) 40: 191 - 219; ver también la patente de los Estados Unidos No. 6.593.513). Los métodos para aislamiento de promotores adicionales, que son inducibles por nemátodos están expuestos en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.589.622 y 5.824.876. Otros promotores inducibles incluyen al promotor de hsp80 de *Brassica*, que es inducible por choque térmico; el promotor de PPDk es inducido por luz; el promotor de PR-1 de tabaco, *Arabidopsis*, y maíz es inducible por medio de infección con un patógeno; y el promotor de Adh1 es inducido por hipoxia y estrés por frío. La expresión del gen de la planta puede ser facilitado también a través de un promotor inducible (para revisión, ver Gatz, 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 89 - 108). Los promotores químicamente inducibles son especialmente adecuados si se desea expresión génica específica del tiempo. Los ejemplos no limitantes de tales promotores son un promotor inducible por ácido salicílico (Solicitud PCT No. WO 95/19443), un promotor inducible por tetraciclina (Gatz et al., 1992, Plant J. 2: 397 - 404) y un promotor inducible por etanol (Solicitud PCT No. WO 93/21334).
- Los promotores preferidos de la etapa de desarrollo son preferencialmente expresados en ciertas etapas del desarrollo. Los promotores preferidos de órganos y tejidos incluyen, pero no se limitan a, aquellos que son preferencialmente expresados en ciertos tejidos u órganos, tales como hojas, raíces, semillas, o xilema. Los ejemplos de promotores preferidos de tejidos y preferidos de órganos incluyen, pero no se limitan a preferidos de las frutas, preferidos de los óvulos, preferidos de tejidos de machos, preferidos de la semilla, preferidos del integumento, preferidos de los tubérculos, preferidos del tallo, preferidos del pericarpio, y preferidos de la hoja, preferidos del estigma, preferidos del polen, preferidos de la antera, preferidos el pétalo, preferidos del sépalo, preferidos del pedicelo, preferidos de la silicua, preferidos el tronco, promotores preferidos de la raíz y similares. Los promotores preferidos de la semilla son preferencialmente expresados durante el desarrollo de la semilla y/o la germinación. Por ejemplo, los promotores preferidos de la semilla pueden ser preferidos de los embriones, preferidos del endospermo y preferidos del recubrimiento de la semilla. Ver Thompson et al., 1989, BioEssays 10:108. Los ejemplos de promotores preferidos de la semilla incluyen, pero no se limitan a celulosa sintasa (celA), Cim1, gamma-zeína,

globulina-1, zeína de 19 kD del maíz (cZ19B1) y similares.

Otros promotores adecuados preferidos de los tejidos o preferidos de los órganos incluyen al promotor del gen de la napina de semilla de colza (patente de los Estados Unidos No. 5.608.152), al promotor de USP de *Vicia faba* (Baeumlein et al., 1991, Mol Gen Genet. 225(3): 459 - 67), al promotor de oleosina de *Arabidopsis* (Solicitud PCT No. WO 98/45461), al promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (patente de los Estados Unidos No. 5.504.200), al promotor de Bce4 de *Brassica* (Solicitud PCT No. WO 91/13980), o al promotor de B4 de legúmina (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2(2): 233 - 9), así como promotores que confieren expresión específica a la semilla en plantas monocotiledóneas como el maíz, cebada, trigo, centeno, arroz, etc. Los promotores adecuados a tener en cuenta son el promotor del gen lpt1 o lpt2 de cebada (Solicitud PCT No. WO 95/15389 y Solicitud PCT No. WO 95/23230) o aquellos descritos en la Solicitud PCT No. WO 99/16890 (promotores del gen de la hordeína de la cebada, del gen de la glutelina del arroz, el gen de la orizina del arroz, el gen de la prolamina del arroz, el gen de la gliadina del trigo, el gen de la glutelina del trigo, el gen de la glutelina de la avena, el gen de la kasirina del sorgo, y el gen de la secalina del centeno).

Otros promotores útiles en los casetes de expresión de la invención incluyen, pero no se limitan al, promotor principal de la proteína de enlazamiento de clorofila a/b, promotores de histona, al promotor de Ap3, al promotor de  $\beta$ -conglucina, al promotor de napina, al promotor de lecitina de soja, al promotor de zeína de 15 kD de maíz, al promotor de zeína de 22 kD, al promotor de zeína de 27 kD, al promotor de zeína g, a los promotores de cera, a los promotores de apergamino 1, apergamino 2, y bronceado, al promotor de Zm13 (patente de los Estados Unidos No. 5.086.169), a los promotores de poligalacturonasa de maíz (PG) (patente de los Estados Unidos Nos. 5.412.085 y 5.545.546), y al promotor de SGB6 (patente de los Estados Unidos No. 5.470.359), así como promotores sintéticos u otros naturales.

De acuerdo con la presente invención, el casete de expresión comprende una secuencia de control de la expresión operativamente enlazada a una secuencia de nucleótidos que es un molde para una o ambas cadenas del ARNs. El molde del ARNs incluye (a) una primera cadena que tiene una secuencia sustancialmente idéntica a partir de aproximadamente 19 hasta aproximadamente 500, o hasta la longitud completa, nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, ó 2; y (b) una segunda cadena que tiene una secuencia sustancialmente complementaria a la primera cadena. En modalidades adicionales, un promotor flanquea cualquiera de los extremos de la secuencia de nucleótidos del molde, en donde los promotores dirigen la expresión de cada cadena individual de ADN, generando así dos ARN complementarios que hibridan y forman el ARNs. En modalidades alternativas, la secuencia de nucleótidos es transcrita dentro de ambas cadenas del ARNs sobre una unidad de transcripción, en donde la cadena sentido es transcrita desde el extremo 5' de la unidad de transcripción y la cadena antisentido es transcrita desde el extremo 3', en donde las dos cadenas están separadas por aproximadamente 3 hasta aproximadamente 500 pares de bases, y en donde después de la transcripción, el transcripto de ARN se pliega sobre sí mismo para formar una horquilla.

En otra modalidad, el vector contiene un promotor bidireccional, que dirige la expresión de dos moléculas de ácido nucleico, mediante lo cual una molécula de ácido nucleico codifica para la secuencia sustancialmente idéntica a una porción de un gen como el CDPK y la otra molécula de ácido nucleico codifica para una segunda secuencia que es sustancialmente complementaria a la primera cadena y capaz de formar un ARNs, cuando ambas secuencias son transcritas. Un promotor bidireccional es un promotor capaz de mediar la expresión en dos direcciones.

En otra modalidad, el vector contiene dos promotores, uno que media la transcripción de la secuencia sustancialmente idéntica a una porción de un gen como el CDPK y otro promotor que media la transcripción de una segunda secuencia siendo sustancialmente complementaria a la primera cadena y capaz de formar un ARNs, cuando se transcriben ambas secuencias. El segundo promotor puede ser un promotor diferente. Un promotor diferente significa un promotor que tiene una actividad diferente en relación con la especificidad de la célula o el tejido, o que muestra expresión sobre diferentes inductores por ejemplo, patógenos, estrés abiótico o compuestos químicos. Por ejemplo, un promotor puede ser constitutivo o específico del tejido y otro puede ser específico del tejido o inducible por patógenos. En una modalidad un promotor media la transcripción de una molécula de ácido nucleico adecuada para sobreexpresión de un gen como el CDPK, mientras que otro promotor media la transcripción específica de la célula o del tejido o la expresión inducible por el patógeno del ácido nucleico complementario.

La invención está también incorporada en una planta transgénica capaz de expresar el ARNs de la invención y por lo tanto de inhibir los genes como el CDPK en las raíces, el sitio de alimentación, las células sincitiales y/o gigantes. La planta o la planta transgénica pueden ser cualquier planta, tal como, pero sin limitarse a árboles, flores cortadas, plantas ornamentales, hortalizas o plantas de cultivo. La planta puede ser de un género seleccionado del grupo que consiste de *Medicago*, *Lycopersicon*, *Brassica*, *Cucumis*, *Solanum*, *Juglans*, *Gossypium*, *Malus*, *Vitis*, *Antirrhinum*, *Populus*, *Fragaria*, *Arabidopsis*, *Picea*, *Capsicum*, *Chenopodium*, *Dendranthema*, *Pharbitis*, *Pinus*, *Pisum*, *Oryza*, *Zea*, *Triticum*, *Triticale*, *Secale*, *Lolium*, *Hordeum*, *Glycine*, *Pseudotsuga*, *Kalanchoe*, *Beta*, *Helianthus*, *Nicotiana*, *Cucurbita*, *Rosa*, *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Nicotiana*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*,

5 *Ciahorium, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panieum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Browaalia, Phaseolus, Avena, y Allium*, o la planta puede ser seleccionada de un género seleccionado de entre el grupo que consiste de *Arabidopsis, Medicago, Lycopersicon, Brassica, Cucumis, Solanum, Juglans, Gossypium, Malus, Vitis, Antirrhinum, Brachipodium, Populus, Fragaria, Arabidopsis, Picea, Capsicum, Chenopodium, Dendranthema, Pharbitis, Pinus, Pisum, Oryza, Zea, Triticum, Triticale, Secale, Lolium, Hordeum, Glycine, Pseudotsuga, Kalanchoe, Beta, Helianthus, Nicotiana, Cucurbita, Rosa, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Raphanus, Sinapis, Atropa, Datura, Hyoscyamus, Nicotiana, Petunia, Digitalis, Majorana, Ciahorium, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Browaalia, Phaseolus, Avena, y Allium*. En una modalidad la planta es una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea.

15 Preferiblemente la planta es una planta de cultivo. Las plantas de cultivo son todas plantas, utilizadas en agricultura. Por lo tanto en una modalidad la planta es una planta monocotiledónea, preferiblemente una planta de la familia *Poaceae, Musaceae, Liliaceae o Bromeliaceae*, preferiblemente de la familia *Poaceae*. En consecuencia, en aún otra modalidad la planta es una planta *Poaceae* del género *Zea, Triticum, Oryza, Hordeum, Secale, A vena, Saccharum, Sorghum, Pennisetum, Setaria, Panicum, Eleusine, Miscanthus, Brachypodium, Festuca o Lolium*. Cuando la planta es del género *Zea*, la especie preferida es *Z. mays*. Cuando la planta es del género *Triticum*, la especie preferida es *T. aestivum, T. speltae o T. durum*. Cuando la planta es del género *Oryza*, la especie preferida es *O. sativa*. Cuando la planta es del género *Hordeum*, la especie preferida es *H. vulgare*. Cuando la planta es del género *Secale*, la especie preferida es *S. cereale*. Cuando la planta es del género *Avena*, la especie preferida es *A. sativa*. Cuando la planta es del género *Saccarum*, la especie preferida es *S. officinarum*. Cuando la planta es del género *Sorghum*, la especie preferida es *S. vulgare, S. Bicolor, S. sudanense*. Cuando la planta es del género *Pennisetum*, la especie preferida es *P. glaucum*. Cuando la planta es del género *Setaria*, la especie preferida es *S. italica*. Cuando la planta es del género *Panicum*, la especie preferida es *P. miliaceum o P. virgatum*. Cuando la planta es del género *Eleusine*, la especie preferida es *E. coracana*. Cuando la planta es del género *Miscanthus*, la especie preferida es *M. sinensis*. Cuando la planta es una planta del género *Festuca*, la especie preferida es *F. arundinaria, F. rubra o F. pratensis*. Cuando la planta es del género *Lolium*, la especie preferida es *L. perenne o L. multiflorum*. Alternativamente, la planta puede ser *Triticosecale*. Alternativamente, en una modalidad la planta es una planta dicotiledonea, preferiblemente una planta de la familia *Fabaceae, Solanaceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae, Malvaceae, Linacea, Euphorbiaceae, Convolvulaceae, Rosaceae, Cucurbitaceae, Theaceae, Rubiaceae, Sterculiaceae o Citrus*. En una modalidad la planta es una planta de la familia *Fabaceae, Solanaceae o Brassicaceae*. En consecuencia, en una modalidad la planta es de la familia *Fabaceae*, preferiblemente del género *Glycine, Pisum, Arachis, Cicer, Vicia, Phaseolus, Lupinus, Medicago o Lens*. Las especies preferidas de la familia *Fabaceae* son *M. truncatula, M. sativa, G. max, P. sativum, A. hypogea, C. arietinum, V. faba, P. vulgaris, Lupinus albus, Lupinus luteus, Lupinus angustifolius o Lens culinaris*. Más preferidas son las especies *G. max A. hypogea y M. sativa*. La más preferida es la especie *G. max*. Cuando la planta es de la familia *Solanaceae*, el género preferido es *Solanum, Lycopersicon, Nicotiana o Capsicum*. Las especies preferidas de la familia *Solanaceae* son *S. tuberosum, L. esculentum, N. tabaccum o C. chinense*. La más preferida es *S. tuberosum*. En consecuencia, en una modalidad la planta es de la familia *Brassicaceae*, preferiblemente del género *Brassica o Raphanus*. Las especies preferidas de la familia *Brassicaceae* son las especies *B. napus, B. oleracea, B. juncea o B. rapa*. La más preferida es la especie *B. napus*. Cuando la planta es de la familia *Chenopodiaceae*, el género preferido es *Beta* y la especie preferida es la *B. vulgaris*. Cuando la planta es de la familia *Asteraceae*, el género preferido es *Helianthus* y la especie preferida es *H. annuus*. Cuando la planta es de la familia *Malvaceae*, el género preferido es *Gossypium o Abelmoschus*. Cuando el género es *Gossypium*, la especie preferida es *G. hirsutum o G. barbadense* y la especie más preferida es *G. hirsutum*. Una especie preferida del género *Abelmoschus* es la especie *A. esculentus*. Cuando la planta es de la familia *Linacea*, el género preferido es *Linum* y la especie preferida es *L. usitatissimum*. Cuando la planta es de la familia *Euphorbiaceae*, el género preferido es *Manihot, Jatropha o Rhizinus* y las especies preferidas son *M. esculenta, J. curcas o R. comunis*. Cuando la planta es de la familia *Convolvulaceae*, el género preferido es *Ipomea* y la especie preferida es *I. batatas*. Cuando la planta es de la familia *Rosaceae*, el género preferido es *Rosa, Malus, Pyrus, Prunus, Rubus, Ribes, Vaccinium o Fragaria* y la especie preferida es el híbrido *Fragaria xananassa*. Cuando la planta es de la familia *Cucurbitaceae*, el género preferido es *Cucumis, Citrullus o Cucurbita* y la especie preferida es *Cucumis sativus, Citrullus lanatus o Cucurbita pepo*. Cuando la planta es de la familia *Theaceae*, el género preferido es *Camellia* y la especie preferida es *C. sinensis*. Cuando la planta es de la familia *Rubiaceae*, el género preferido es *Coffea* y la especie preferida es *C. arabica o C. canephora*. Cuando la planta es de la familia *Sterculiaceae*, el género preferido es *Theobroma* y la especie preferida es *T. cacao*. Cuando la planta es del género *Citrus*, la especie preferida es *C. sinensis, C. limon, C. reticulata, C. maxima* e híbridos de la especie *Citrus*, o similares. En una modalidad preferida de la invención, la planta es una planta de soja, una de patata o una de maíz.

55 En una modalidad la planta es una planta *Fabaceae* y el gen objetivo es sustancialmente similar a la SEQ ID NO: 1, ó 2.

60 Los métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped incluidas células de plantas son bien conocidos en el arte de la biotecnología de las plantas. Cualquier método puede ser utilizado para transformar al

vector de expresión recombinante en células de plantas para producir las plantas transgénicas de la invención. Los métodos generales para transformar plantas dicotiledóneas son divulgados, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.940.838; 5.464.763, y similares. Los métodos para transformar plantas dicotiledóneas específicas, por ejemplo, algodón, son expuestos en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.004.863; 5.159.135; y 5.846.797. Los métodos de transformación de soja son expuestos en las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.992.375; 5.416.011; 5.569.834; 5.824.877; 6.384.301 y pueden ser utilizados en EP 0301749B1. Los métodos de transformación pueden incluir métodos directos e indirectos de transformación. Los métodos directos adecuados incluyen la aceptación de ADN inducida por polietilén glicol, transformación mediada por liposomas (patente de los Estados Unidos No. 4.536.475), métodos biolísticos utilizando la pistola de genes (Fromm M. E. et al., Bio/Technology. 8(9): 833 - 9, 1990; Gordon-Kamm et al. Plant Cell 2: 603, 1990), electroporación, incubación de embriones secos de plantas en una solución que contiene ADN, y microinyección. En el caso de estos métodos directos de transformación, los plásmidos utilizados no necesitan reunir ningún requerimiento particular. Se pueden utilizar plásmidos simples, tales como aquellos de la serie pUC, pBR322, de la serie M13mp, pACYC184 y similares. Si se van a regenerar plantas intactas a partir de células transformadas, se localiza preferiblemente un gen marcador seleccionable adicional sobre el plásmido. Las técnicas de transformación directa son igualmente adecuadas para plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas.

La transformación puede ser llevada a cabo también por infección bacteriana por medio de *Agrobacterium* (por ejemplo EP 0 116 718), infección viral por medio de vectores virales (EP 0 067 553; US 4.407.956; WO 95/34668; WO 93/03161) o por medio de polen (EP 0 270 356; WO 85/01856; US 4.684.611). Las técnicas de transformación basadas en *Agrobacterium* (especialmente para plantas dicotiledóneas) son bien conocidas en el arte. La cepa de *Agrobacterium* (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*) incluyen un plásmido (plásmido Ti o Ri) y un elemento de T-ADN que es transferido a la planta después de infección con *Agrobacterium*. El T-ADN (ADN transferido) se integra dentro del genoma de la célula de la planta. El T-ADN puede estar localizado sobre el plásmido Ri o Ti o estar separadamente incluido en el así llamado vector binario. Los métodos para la transformación mediada por *Agrobacterium* están descritos, por ejemplo, en Horsch R. B. et al. (1985) Science 225: 1229. La transformación mediada por *Agrobacterium* es más adecuada para plantas dicotiledóneas pero también ha sido adaptada a plantas monocotiledóneas. La transformación de plantas por medio de *Agrobacterias* es descrita, por ejemplo, en White F. F., Vectors for Gene Transfer in Higher Plants, Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, editada por S. D. Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, páginas 15 - 38; Jenes B et al. Techniques for Gene Transfer, Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, editada por S. D. Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, páginas 128 - 143; Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42: 205 - 225. La transformación puede dar como resultado una transformación y expresión transitoria o estable. Aunque se puede insertar una secuencia de nucleótidos de la presente invención en cualquier planta y célula de planta que caiga dentro de estas amplias clases, es particularmente útil en células de plantas de cultivos.

Las plantas transgénicas de la invención pueden ser cruzadas con plantas transgénicas similares o con plantas transgénicas que carecen de los ácidos nucleicos de la invención o con plantas no transgénicas, utilizando métodos conocidos de fitomejoramiento de planta, para preparar semillas. Además, la planta transgénica de la presente invención puede incluir, y/o ser cruzada con otra planta transgénica que contiene uno o más ácidos nucleicos, creando así un "apilamiento" de transgenes en la planta y/o en su progenie. La semilla es luego plantada para obtener una planta transgénica fértil cruzada que contiene al ácido nucleico de la invención. La planta transgénica fértil cruzada puede tener al casete de expresión particular heredado a través de un progenitor hembra o a través de un progenitor macho. La segunda planta puede ser una planta endogámica. La planta transgénica fértil cruzada puede ser un híbrido. También están incluidas dentro de la presente invención semillas de cualquiera de estas plantas transgénicas fértiles cruzadas. Las semillas de esta invención pueden ser cosechadas a partir de plantas transgénicas fértiles y ser utilizadas para el cultivo de generaciones de la progenie de plantas transformadas de esta invención incluidas líneas de plantas híbridas que contienen al constructo de ADN.

El "apilamiento de genes" puede también ser logrado por transferencia de dos o más genes dentro del núcleo de la célula por medio de transformación de la planta. Se pueden introducir múltiples genes en el núcleo de la célula durante la transformación ya sea en forma secuencial o al unísono. Se puede reducir la expresión en genes múltiples en plantas o especies patógenas objetivo por medio de mecanismos de silenciamiento de genes, específicamente ARNi, utilizando un solo transgén dirigido a secuencias parciales enlazadas en forma múltiple de interés. Los genes múltiples apilados bajo el control de promotores individuales pueden también ser sobreexpresados para lograr un fenotipo único o múltiple deseado. Las construcciones que contienen apilamiento de genes tanto de genes sobreexpresados como objetivos silenciados pueden también ser introducidas en plantas que producen fenotipos agrónomicamente importantes individuales o múltiples. En ciertas modalidades las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden ser apiladas con cualquier combinación de secuencias de polinucleótidos de interés para crear fenotipos deseados. Las combinaciones pueden producir plantas con una variedad de combinaciones de rasgos que incluyen pero no se limitan a resistencia a las enfermedades, tolerancia a los herbicidas, mayor productividad, tolerancia al frío y a la sequía. Estas combinaciones amontonadas pueden ser creadas por cualquier método incluyendo pero sin limitarse al cruzamiento de plantas para fitomejoramiento por medio de métodos convencionales o por medio de transformación genética. Si los rasgos se amontonan por medio

de transformación genética, las secuencias de polinucleótidos de interés se pueden combinar en forma secuencial o en forma simultánea en cualquier orden. Por ejemplo si se van a introducir dos genes, las dos secuencias pueden estar contenidas en casetes de transformación separados o sobre el mismo casete de transformación. La expresión de las secuencias puede ser dirigida por el mismo o por diferentes promotores.

- 5 De acuerdo con esta modalidad, se produce la planta transgénica de la invención por medio de un método que comprende las etapas de proveer un gen objetivo como el CDPK, preparar un casete de expresión que tiene una primera región que es sustancialmente idéntica a una porción del gen seleccionado como el CDPK y una segunda región que es complementaria a la primera región, transformando el casete de expresión en una planta, y seleccionando la progenie de la planta transformada que expresa el constructo de ARNs de la invención.
- 10 Una mayor resistencia a la infección por nemátodos es un rasgo general que se desea que sea heredado en una amplia variedad de plantas. La presente invención puede ser utilizada para reducir la destrucción de cultivos por parte de cualquier nematodo parásito de la planta. Preferiblemente, los nemátodos parásitos pertenecen a familias de nemátodos que inducen células gigantes o sincitiales. Los nemátodos que inducen células gigantes o sincitiales se encuentran en las familias *Longidoridae*, *Trichodoridae*, *Heterodidae*, *Meloidogynidae*, *Pratylenchidae* o *Tylenchulidae*. En particular en las familias *Heterodidae* y *Meloidogynidae*.

En consecuencia, los nemátodos parásitos objetivo de la presente invención pertenecen a uno o más géneros seleccionados de entre el grupo de *Nacobus*, *Cactodera*, *Dolichodera*, *Globodera*, *Heterodera*, *Punctodera*, *Longidorus* o *Meloidogyne*. En una modalidad preferida los nemátodos parásitos pertenecen a uno o más géneros seleccionados de entre el grupo de *Nacobus*, *Cactodera*, *Dolichodera*, *Globodera*, *Heterodera*, *Punctodera* o *Meloidogyne*. En una modalidad más preferida los nemátodos parásitos pertenecen a uno o más géneros seleccionados de entre el grupo de *Globodera*, *Heterodera*, o *Meloidogyne*. En aún una modalidad más preferida los nemátodos parásitos pertenecen a uno o ambos géneros seleccionados de entre el grupo de *Globodera* o *Heterodera*. En otra modalidad los nemátodos parásitos pertenecen al género *Meloidogyne*.

25 Cuando los nemátodos parásitos son del género *Globodera*, las especies son preferiblemente del grupo que consiste de *G. achilleae*, *G. artemisiae*, *G. hypolysi*, *G. mexicana*, *G. millefolii*, *G. mali*, *G. pallida*, *G. rostochiensis*, *G. tabacum*, y *G. virginiae*. En otra modalidad preferida los nemátodos parásitos del género *Globodera* incluyen al menos a uno de la especie *G. pallida*, *G. tabacum*, o *G. rostochiensis*. Cuando los nemátodos parásitos son del género *Heterodera*, la especie puede ser preferiblemente del grupo que consiste de entre *H. avenae*, *H. carotae*, *H. ciceri*, *H. cruciferae*, *H. delvii*, *H. elachista*, *H. filipjevi*, *H. gambiensis*, *H. glycines*, *H. goettingiana*, *H. graduni*, *H. humuli*, *H. hordecalis*, *H. latipons*, *H. major*, *H. medicaginis*, *H. oryzicola*, *H. pakistanensis*, *H. rosii*, *H. sacchari*, *H. schachtii*, *H. sorghi*, *H. trifolii*, *H. urticae*, *H. vigni* y *H. zaeae*. En otra modalidad preferida los nemátodos parásitos del género *Heterodera* incluyen al menos a uno de la especie *H. glycines*, *H. avenae*, *H. cajani*, *H. goettingiana*, *H. trifolii*, *H. zaeae* o *H. schachtii*. En una modalidad más preferida los nemátodos parásitos incluyen al menos uno de entre las especies *H. glycines* o *H. schachtii*. En una modalidad aún más preferida el nematodo parásito es de la especie *H. glycines*.

40 Cuando los nemátodos parásitos son del género *Meloidogyne*, el nematodo parásito puede ser seleccionado de entre el grupo que consiste de *M. acronea*, *M. arabica*, *M. arenaria*, *M. artiellia*, *M. brevicauda*, *M. camelliae*, *M. chitwoodi*, *M. coffeicola*, *M. esigua*, *M. graminicola*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. indica*, *M. inomata*, *M. javanica*, *M. lini*, *M. mali*, *M. microcephala*, *M. microtyla*, *M. naasi*, *M. salasi* y *M. thamesi*. En una modalidad preferida los nemátodos parásitos incluyen al menos una de las especies *M. javanica*, *M. incognita*, *M. hapla*, *M. arenaria* o *M. chitwoodi*.

Los siguientes ejemplos no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones de la invención, sino más bien servir como ejemplos de ciertas modalidades. Cualquier variación en los métodos que sirven como ejemplo que se le presentan a la persona capacitada en el arte está destinada a caer dentro del alcance de la presente invención.

#### Breve descripción de los dibujos

- 45 La Figura 1 muestra la tabla de las SEQ ID Nos asignadas a las correspondientes secuencias. La SEQ ID NO: 1 es la secuencia parcial de ADNc del clon Hygene 49806575 de *Glycine max*, incluido el codón de detención y la región no traducida 3'. La SEQ ID NO: 2 es la secuencia sentido del fragmento de 49806575 (SEQ ID NO: 1) utilizada en el ensayo del explante con raíces del Ejemplo 2. La SEQ ID NO; 3 es la secuencia de aminoácidos codificada por 49806575 (SEQ ID NO: 1). La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de ADNc de *Medicago* con el número de acceso del Gen-bank AY821654, que incluye secuencias de codificadoras y no codificadoras. La primera base de la región de codificación corresponde al nucleótido 147, y la última base del codón de detención corresponde al nucleótido 1829. La SEQ ID NO: 5 es la secuencia sintetizada descrita en el Ejemplo 1., y la SEQ ID NO: 6 es la secuencia de un promotor como el TPP (SEQ ID NO: 6) descrito en la USSN 60/874.375 en trámite junto con la presente y que se incorpora aquí como referencia.

Las Figuras 2a - 2c muestran la alineación de aminoácidos de proteínas como la CDPK: el clon parcial 49806575 de ADNc de *Glycine* (SEQ ID NO: 3), la proteína codificada por AY821654 de *Medicago* (SEQ ID NO: 7), la proteína codificada por AY823957 de *Medicago* (SEQ ID NO: 9), la proteína codificada por AF435451 de *Nicotiana* (SEQ ID NO: 11), la proteína codificada por AY971376 de *Nicotiana* (SEQ ID NO: 13), la proteína codificada por AF030879 de *Solanum* (SEQ ID NO: 15), la proteína codificada por At2g17890 de *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 17), la proteína codificada por At4g36070 de *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 19), la proteína codificada por At5g66210 de *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 21), la proteína codificada por NM\_001052286 de *Oryza* (SEQ ID NO: 23), la proteína codificada por NM\_001065979 de *Oryza* (SEQ ID NO: 25) y el producto amplificado de la PCR RACE de CDPK 5', RKF195-3, de *Glycine* (SEQ ID NO: 27). La alineación se lleva a cabo en la suite del software Vector NTI (penalización por apertura de un intervalo = 10, penalización por extensión del intervalo = 0,05, penalización por separación del intervalo = 8).

La Figura 3 muestra el porcentaje de identidad global de aminoácidos de ejemplos de genes como el CDPK: la proteína codificada por el clon parcial 49806575 de *Glycine* (SEQ ID NO: 3), la proteína codificada por RKF195-3, de *Glycine* (SEQ ID NO: 27), la proteína codificada por AY821654 de *Medicago* (SEQ ID NO: 7), la proteína codificada por AY823957 de *Medicago* (SEQ ID NO: 9), la proteína codificada por AF435451 de *Nicotiana* (SEQ ID NO: 11), la proteína codificada por AY971376 de *Nicotiana* (SEQ ID NO: 13), la proteína codificada por AF030879 de *Solanum* (SEQ ID NO: 15), la proteína codificada por At2g17890 de *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 17), la proteína codificada por At4g36070 de *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 19), la proteína codificada por At5g66210 de *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 21), la proteína codificada por NM\_001052286 de *Oryza* (SEQ ID NO: 23) y la proteína codificada por NM\_001065979 de *Oryza* (SEQ ID NO: 25). Únicamente la región que se superpone con el clon parcial 49806575 de ADNc fue incluida en el análisis. Las alineaciones por parejas y las identidades en porcentaje fueron calculadas utilizando Needle de EMBOSS-4.0.0 (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443 - 453).

La Figura 4 muestra el porcentaje de identidad global de nucleótidos de ejemplos de genes como el CDPK: el clon parcial 49806575 de *Glycine* (SEQ ID NO: 1), RKF195-3, de *Glycine* (SEQ ID NO: 26), AY821654 de *Medicago* (SEQ ID NO: 4), AY823957 de *Medicago* (SEQ ID NO: 8), AF435451 de *Nicotiana* (SEQ ID NO: 10), AY971376 de *Nicotiana* (SEQ ID NO: 12), AF030879 de *Solanum* (SEQ ID NO: 14), At2g17890 de *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 16), At4g36070 de *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 18), At5g66210 de *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 20), NM\_001052286 de *Oryza* (SEQ ID NO: 22), y NM\_001065979 de *Oryza* (SEQ ID NO: 24). Únicamente la región que se superpone con el clon parcial 49806575 de ADNc fue incluida en el análisis. Las alineaciones por parejas y las identidades en porcentaje fueron calculadas utilizando Needle de EMBOSS-4.0.0 (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443 - 453).

Las Figuras 5a - 5g muestran diferentes 21 mers posibles para ejemplos de genes como el CDPK de las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, ó 26 o una polisequencia de nucleótidos que codifica una homología como la de CDPK por medio de la posición de los nucleótidos.

### 35 **Ejemplo 1:** Construcción del vector binario para transformación de soja

Este método ejemplificado emplea un vector binario que contiene al gen objetivo correspondiente al clon 49806575 del ADNc de soja. El clon 49806575 fue identificado por medio de la búsqueda de una base de datos propietaria de secuencias de ADNc utilizando la secuencia pública AY821654 de *Medicago truncatula*. El vector de expresión consiste del fragmento sintetizado (SEQ ID NO: 5), que a su vez consta de una porción antisentido de 320 pb del gen 49806575, un espaciador, un fragmento sentido del gen objetivo (SEQ ID NO: 2) correspondiente a los nucleótidos 50 - 372 de la SEQ ID NO: 1, y una columna vertebral del vector. En este vector, RCB562, se expresó un ARNds para el gen objetivo 49806575 bajo un promotor preferido de la raíz o de sincitios, un promotor como el TPP (SEQ ID NO: 6, ver la solicitud de patente en trámite junto con la presente 60/874.375, incorporada aquí como referencia). Un promotor como el TPP dirige la expresión del transgén preferencialmente en raíces y/o sincitios o células gigantes. El marcador de selección para transformación en este vector era un gen AHAS mutado de *Arabidopsis thaliana* que confiere resistencia al herbicida Arsenal (Imazapyr, BASF Corporation, Mount Olive, NJ). La expresión de AHAS mutado fue dirigida por el promotor de ubiquitina de perejil (Ver Plesch, G. y Ebneith, M., "Method for the stable expression of nucleic acids in transgenic plants, controlled by a parsley ubiquitin promoter", WO 03/102198, incorporado aquí como referencia).

### 50 **Ejemplo 2:** Uso de un sistema de ensayo de la planta de soja para detectar la resistencia a la infección por SCN

Se empleó un ensayo de un explante con raíces para demostrar la expresión de ARNds y la resistencia del nemátodo resultante. Este ensayo puede ser encontrado en la solicitud de patente en trámite junto con la presente USSN 12/001.234, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia.

Las semillas de soja limpias de una variedad cultivada de soja fueron esterilizadas en su superficie y germinadas. Tres días antes de la inoculación, se inició un cultivo líquido durante la noche del cultivo desarmado de

5 *Agrobacterium*, por ejemplo, la cepa K599 desarmada de *A. Rhizogenes* que contiene el vector binario RCB562. Al siguiente día se esparció el cultivo sobre una placa de agar LB que contenía kanamicina como agente de selección. Las placas fueron incubadas a 28°C durante dos días. Se preparó una placa por cada 50 explantes para ser inoculados. Se utilizaron cotiledones que contenían el extremo proximal de su conexión con las plántulas como el explante para transformación. Después de remover los cotiledones se raspó la superficie con un escalpelo alrededor del sitio de corte. El cotiledón cortado y raspado fue el objetivo para inoculación con *Agrobacterium*. Los explantes preparados fueron sumergidos en las colonias densas desarmadas de *A. rhizogenes* preparadas anteriormente de modo que las colonias fueran visibles sobre la superficie cortada y raspada. Se colocaron luego los explantes sobre agar al 1% en cajas de Petri para cocultivo bajo la luz durante 6 - 8 días.

10 Después de la transformación y cocultivo se transfirieron los explantes de soja a un medio para inducción de las raíces con un agente de selección, por ejemplo S-B5-708 para el gen mutado de la aceto-hidroxi ácido sintasa (AHAS) (Sathasivan et al., Plant Phys. 97: 1044 - 50, 1991). Se mantuvieron los cultivos en la misma condición que en la etapa de cocultivo. El medio SB5-708 contiene: sales B5 0,5X, MES 3 mM, sacarosa al 2%, vitaminas B5 1X, 400 µg/ml de Timentin, agar Noble al 0,8%, y 1 µM de Imazapir (agente de selección para el gen de la AHAS) (BASF Corporation, Florham Park, NJ) a pH 5,8.

15 Dos a tres semanas después de la selección e inducción de la raíz se formaron las raíces transformadas sobre los extremos cortados de los explantes. Se transfirieron los explantes al mismo medio de selección (medio S-B5-708) para una selección adicional. Las raíces transgénicas proliferaron bien en el lapso de una semana en el medio y estaban listas para ser subcultivadas.

20 Se cortaron raíces de soja blancas y fuertes de los explantes con raíces y se las cultivó en medio de crecimiento para raíces complementado con 200 mg/l de Timentin (medio S-MS-606) en placas de seis pozos. Se mantuvieron los cultivos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. El medio S-MS-606 contiene: sales MS 0,2X y vitaminas B5, sacarosa al 2%, y 200 mg/l de Timentin a pH 5,8. De uno a cinco días después del subcultivo, se inocularon las raíces con nemátodos juveniles esterilizados en la superficie en placas de múltiples pozos ya sea para el ensayo el gen de interés o del constructo del promotor. Como control, se utilizaron las raíces con el vector de control 82 de Williams de la variedad cultivada de soja y con el vector de control de Jack. Los cultivos de raíz de cada línea que ocuparon al menos la mitad del pozo fueron inoculados con la estirpe 3 descontaminada en la superficie de nemátodos formadores de quistes de soja (SCN) juveniles de segunda etapa (J2) en un nivel de 500 J2/pozo. Se sellaron luego las placas y se las colocó nuevamente en la incubadora a 25°C en la oscuridad. Se generaron diferentes líneas independientes de raíces de cada transformación de vector binario y se utilizaron las líneas para un bioensayo. Cuatro semanas después de la inoculación del nemátodo, se contabilizaron los quistes en cada pozo.

35 Para cada línea transformada, el número promedio de quistes por línea, el índice de hembras en porcentaje y los valores estándar de error fueron determinados a través de diferentes pozos por duplicado (Índice de hembras = número promedio de quistes de SCN que se desarrollan sobre las raíces transgénicas expresadas como porcentaje del número promedio de quistes que se desarrollan sobre las raíces de control susceptibles de tipo silvestre W82). Se llevaron a cabo múltiples experimentos biológicamente replicados independientes para comparar el número de quistes entre los transformantes RCB562 y las líneas susceptibles de Williams 82. Los resultados muestran que las raíces transformadas RCB562 tenían reducciones estadísticamente significativas (valor  $p \leq 0,05$ ) en el recuento de quistes sobre múltiples líneas transgénicas y una tendencia general de recuento reducido de quistes en la mayoría de líneas transgénica ensayadas.

**Ejemplo 3:** RACE para determinar la secuencia transcrita completa

45 Se aisló una secuencia de longitud completa del transcripto con alta homología con el clon parcial de ADNc 49806575 (SEQ ID NO: 1) utilizando el kit GeneRacer (L1502-01) de Invitrogen siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó el ARN total de las raíces de soja cosechadas 6 días después de la infección con SCN de acuerdo con el protocolo del kit GeneRacer de Invitrogen para generar ARN descubierto y desfosforilado ligado al Oligo de ARN de GeneRacer descrito por la SEQ ID NO: 28. Se transcribió en forma inversa el ARN preparado de acuerdo con el protocolo del kit GeneRacer y utilizó como el molde de la biblioteca de RACE para la PCR para aislar los extremos 5' del ADNc utilizando reacciones PCR primarias y secundarias (anidadas) de acuerdo con el protocolo del kit GeneRacer. Los iniciadores utilizados para la reacción PCR primaria son descritos por las SEQ ID Nos. 29 y 31. Los iniciadores secundarios de la reacción PCR anidada son descritos por las SEQ ID Nos. 30 y 32.

55 Los productos de la reacción PCR secundaria fueron separados por medio de electroforesis en gel. Los productos específicos fueron purificados del gel de agarosa y clonados dentro de vectores pCR4-TOPO (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las colonias resultantes fueron minipreparadas y secuenciadas. Uno de los fragmentos de longitud completa descritos como la SEQ ID NO: 26 (RKF195-3\_2) tenía un alto porcentaje de identidad con la SEQ ID NO: 1 (secuencia de ADNc 49806575). La alineación entre proteínas codificadas por la

secuencia parcial 49806575 de *Glycine max*, la RKF195-3\_2 de longitud completa de *Glycine max* y genes como el CDPK de otras especies de plantas es mostrada en las Figuras 2a - 2d.

5 Aquellos capacitados en el arte reconocerán, o serán capaces de comprobar utilizando únicamente experimentación de rutina, muchos equivalentes para las modalidades específicas de la invención descrita aquí. Se pretende que tales equivalentes sean abarcados por las siguientes reivindicaciones.

LISTADOS DE SECUENCIAS

<110> BASF Plant Science GmbH

Ascenzi, Robert

<120> Composiciones y métodos que utilizan interferencia de ARN de tipo CDPK para el control de nemátodos

10 <130> PF 58856-PCT

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 1045

15 <212> ADN

<213> *Glycine max*

<220>

<221> 3'UTR

<222> (663)..(1045)

20 <223> Residuos predichos de nucleótidos de la cola de poli-A 1031 a 1045

<400> 1

ES 2 373 614 T3

aagatcctcg tgcgagatat actgctgctc aggctctttc acatccatgg gttagagaag 60  
 gaggagaggc attagagatt cctattgata tatctgtcct gaacaacatg cgacagtttg 120  
 tgaatatag tcggttgaaa caatttgcac taagggcatt ggctagcaca cttaatgaag 180  
 gagagttgtc tgatctaaaa gatcagtttg atgcaataga tgtggacaaa aatggttcta 240  
 ttagtcttga ggagatgaga caggctcttg ctaaagatca accttggaag ttgaaagaat 300  
 cacgtgtgct agagatattg caagcgatag acagcaacac agatgggcta gtggatttca 360  
 ccgagtttgt ggcagctact ttacatgtac atcaattgga ggaacatgat tctgacaagt 420  
 ggagcaacg gtcacaggct gcttttgaga aatttgactt ggataaggat ggctatatta 480  
 ctccagatga acttagaatg catacggggtt tgagaggctc cattgatcca ttgcttgagg 540  
 aagccgatat tgataaagat gggaaaatca gcttaccaga atttcgtaga cttctaagaa 600  
 ctgcaagcat gggttctcga acagtaatga gcccaagtca ccgtcatcat cgaaagattt 660  
 agattagata tgtttcggag acagggataa ttcaggagat gagagtgatg gatttccttt 720  
 taagatgatg atctcttatg cagattgtgc tgaagccctc cttgtgatat ctattctgct 780  
 gcacattttg cactctgacc atcattatat ggaactctga aactagagtt aatattgact 840  
 atggcatacc acacaggatt gtgtgttaag cttagtctag acgacatgt caagaggaat 900  
 ttaaatagtg tgtggattga cttgaggtat cagagtttca tcggtgtaca tcattggctt 960  
 gtttgtgcca tacatgtaat gtgtaatact gtaactataa ataaaaaact tcttactccc 1020  
 cttcccctgc aaaaaaaaaa aaaaa 1045

<210> 2

<211> 320

5 <212> ADN

<213> Glycine max

<400> 2

ES 2 373 614 T3

gtagagaag gaggagaggc attagagatt cctattgata tatctgtcct gaacaacatg 60  
 cgacagtttg tgaatatag tccggttgaaa caatttgcac taagggcatt ggctagcaca 120  
 cttaatgaag gagagttgtc tgatctaaaa gatcagtttg atgcaataga tgtggacaaa 180  
 aatggttcta ttagtcttga ggagatgaga caggctcttg ctaaagatca accttgggaag 240  
 ttgaaagaat cacgtgtgct agagatattg caagcgatag acagcaacac agatgggcta 300  
 gtggatttca ccgagtttgt 320

<210> 3

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Glycine max

<400> 3

Asp Pro Arg Ala Arg Tyr Thr Ala Ala Gln Ala Leu Ser His Pro Trp  
 1 5 10 15

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

Leu Asn Asn Met Arg Gln Phe Val Lys Tyr Ser Arg Leu Lys Gln Phe  
 35 40 45

Ala Leu Arg Ala Leu Ala Ser Thr Leu Asn Glu Gly Glu Leu Ser Asp  
 50 55 60

Leu Lys Asp Gln Phe Asp Ala Ile Asp Val Asp Lys Asn Gly Ser Ile  
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Glu Met Arg Gln Ala Leu Ala Lys Asp Gln Pro Trp Lys  
 85 90 95

Leu Lys Glu Ser Arg Val Leu Glu Ile Leu Gln Ala Ile Asp Ser Asn  
 100 105 110

Thr Asp Gly Leu Val Asp Phe Thr Glu Phe Val Ala Ala Thr Leu His  
 115 120 125

Val His Gln Leu Glu Glu His Asp Ser Asp Lys Trp Gln Gln Arg Ser

ES 2 373 614 T3

130		135		140											
Gln	Ala	Ala	Phe	Glu	Lys	Phe	Asp	Leu	Asp	Lys	Asp	Gly	Tyr	Ile	Thr
145					150					155					160
Pro	Asp	Glu	Leu	Arg	Met	His	Thr	Gly	Leu	Arg	Gly	Ser	Ile	Asp	Pro
				165					170					175	
Leu	Leu	Glu	Glu	Ala	Asp	Ile	Asp	Lys	Asp	Gly	Lys	Ile	Ser	Leu	Pro
			180					185					190		
Glu	Phe	Arg	Arg	Leu	Leu	Arg	Thr	Ala	Ser	Met	Gly	Ser	Arg	Thr	Val
		195					200					205			
Met	Ser	Pro	Ser	His	Arg	His	His	Arg	Lys	Ile					
210						215									

<210> 4

<211> 2211

5 <212> ADN

<213> Medicago truncatula

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)..(146)

10 <220>

<221> 3'UTR

<222> (1830)..(2211)

<400> 4

# ES 2 373 614 T3

ttctccttct tcccttcttc gtcggtcctg ccacattcct tccttcttct caatctcaat 60  
catctcacac gctttccaat ttctaaatca atgatcattt ttttcaaatt ttottaatta 120  
tcatttttca aacaaaacaa aacatcatgg gtttatggtt ttcttctaca aaggttggtta 180  
gtggttctaa cagcaacacc acaacaatg ataaccgtaa acggaatcag tcaacaacca 240  
cggataccac cgtcacggtta acaacagcaa caacggcggc gcagaaacaa acggcacaga 300  
gacgtaaagg aggggtcaaat gaaacagccc agaagaagaa tcatcatcaa catcataggt 360  
taaaagagaa aacaggttct aaacatggtc cttgtggaaa aagaacggat tttgggtatg 420  
agaaagattt tgataaaaga ttttctcttg ggaaattggt gggatcatgga caatttggtt 480  
atacttatgt tgggtgtgat aaatccaatg gagatcgtgt cgccgttaag cgactcgaga 540  
aagctaagat ggttctccct atagcagttg aggatgtaaa aagagaggtc aagatattga 600  
aagaacttac aggccatgaa aatgtgggtc agttttataa tgcttttgac gatgattcat 660  
atgtgtacat agttatggag ttatgcgaag gtggagaact actagaccgg atactaaaca 720

ES 2 373 614 T3

aaaaggacag ccgttatact gaaaaagatg ccgccgttgt tgtaaggcag atgctgaagg 780  
 ttgcagctca gtgtcattta catggtttgg tacatcgcca catgaagcca gagaattttc 840  
 ttttcaaadc aaacaaagaa gattcagctt tgaaggccac tgattttggt ttgtctgatt 900  
 tcataaaacc tggaaagagg tttcaagata ttgttgggaag tgcttactat gtcgcaccag 960  
 aagtgttgaa acggaagtca ggccctgaat cagatgtatg gagtattggt gtgattacat 1020  
 acatattgct ttgtgggaga cgtccatttt gggacaagac tgaagatggt atcttcaagg 1080  
 aggtcttacg aaacaagcct gatttccggc ggaaccatg gccaaccata agtaatgctg 1140  
 caaaagattt tgtgaagaaa ttgttggtaa aagatcctcg ggcaagatta acggctgctc 1200  
 aggctctatc acatccatgg gttagagaag gaggagaggc atccgagatt ccaattgata 1260  
 tatctgtcct aaacaacatg cggcagtttg tgaagtatag tcgattgaaa caatttgcac 1320  
 tgagggcatt ggctagcaca cttaacgaag gtgagttgtc tgatctaaaa gatcagtttg 1380  
 atgcaataga tgtggacaaa aatggtgcta ttagtcttga agagatgaga caggctcttg 1440  
 ctaaagatct cccgtggaag ttgaaagaat cccgtgtatt ggagatattg caagcgattg 1500  
 acagcaacac ggatggatta gtagatttca ccgagtttgt tgcagctact ttacatgtgc 1560  
 atcaattgga ggaacatgac tccgacaagt ggcagcaacg gtcacagget gcttttgaga 1620  
 aatttgacat agacaaggat ggctatatta ctccagagga actcagaatg cactctggta 1680  
 tgagaggttc catcgatcct ctgctcgagg aagccgatat tgacaaagat gaaagatca 1740  
 gcttaccaga attcaggaga cttttaagaa ctgcaagcat tggttctcga aacgtaacaa 1800  
 gcccaactct acgtcatcga aggatctagc ttagatgtgt ttcagaggcg gagatgattc 1860  
 aatgagagt gttggagttc cttttaaga tgatctoctg tgcaggttgt gttgaagcca 1920  
 ttgtgatata tgctctgcag attttgcaat ctcttgccat tccatggaac tctgaaactt 1980  
 aaattatatt gaatatggcg tcgtcttgca aaggattgtg ttaaaagctt agtctagagg 2040  
 actgtatcaa gaagtgtttc atagagtgtg tagaccctgc ttggattggc ttcaggtatc 2100  
 aaagttgaga gtttccatca gtgtacatca tttttaagtg tcagggtttt ctggatttac 2160  
 ttgtgccata acttgtaatg tgtaactata aataaaaadc ttctattcta c 2211

<210> 5

<211> 740

5 <212> ADN

<213> Desconocido

ES 2 373 614 T3

<220>

<223> Secuencia objetivo sintetizada de horquilla de 49806575

<400> 5

acaaactcgg tgaatccac tagcccatct gtggtgctgt ctatcgcttg caatatctct	60
agcacacgtg attctttcaa cttccaaggt tgatcttttag caagagcctg tctcatctcc	120
tcaagactaa tagaaccatt tttgtccaca tctattgcat caaactgatc ttttagatca	180
gacaactctc cttcattaag tgtgctagcc aatgccctta gtgcaaattg tttcaaccga	240
ctatatttca caaactgtcg catggtgttc aggacagata tatcaatagg aatctcta	300
gcctctctc cttctctaac cgtcgtgaaa gctctctgga agaagaagat tctcatcagg	360
atccccgaga aactcggata agagactcac agagtagcca tgctcggta caacgctaca	420
gtagagaag gaggagaggc attagagatt cctattgata tatctgtcct gaacaacatg	480
cgacagtttg tgaatatag tcggttgaaa caatttgac taagggcatt ggctagcaca	540
ctaatgaag gagagttgct tgatctaaaa gatcagtttg atgcaataga tgtggacaaa	600
aatggttcta ttagtcttga ggagatgaga caggctcttg ctaaagatca accttggag	660
ttgaaagaat cacgtgtgct agagatattg caagcgatag acagcaacac agatgggcta	720
gtggatttca ccgagtttgt	740

5

<210> 6

<211> 1999

<212> ADN

10 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

ES 2 373 614 T3

gtagtgcct	tcatggatac	caaaagagaa	aatttgattt	agtgcataca	tataacaata	60
taacgccgca	taataaact	gtataaaaca	gtcatgtaac	gatatgacag	cagtaataca	120
gttccaagag	acgttataat	cgtatgcaat	catatgcttg	cgtagatfff	ccaacagfff	180
tgtttcgttg	ataggaggaa	ctcaacactc	tagggtagtg	attggtagac	actattagca	240
caaaaaatat	taattttact	ctgatgttta	caaaaaagt	taccaatcaa	atatttaaga	300
gatcgtactc	ttccacggcg	actctaaaaa	caaagatat	aggttagact	cataactact	360
ttataaagaa	aatgtttaac	gataactacc	gagatctaata	aaataaacct	tcattttcaa	420
gtatattata	tttgcttctt	ttgtttatat	atcaaaccac	gttctggfff	ataaaaaatat	480
tagataaaac	tcgtctaaat	aggtaggtgt	aaaataaaat	tttaaatttt	tatcgataat	540
atftaaaatt	tgaaaagtta	ataatgatcc	acacattfff	tctaatafff	aatttagtaa	600
tttttgatt	aaataaaatt	tcaatcatat	acattcgatt	tttctataca	ttttaactat	660
ctatttctgc	ataataaact	gtattttcat	tttatcgct	tcattctatg	gatgatattt	720
aaattttaa	tagtaattca	tacactfff	aatatttaata	ttagtatttt	cttaaatcca	780
aattttaatc	ttacaattta	aatatctact	ttaacataat	acaaatacaa	tttaatttca	840

ES 2 373 614 T3

ttgtattaaa ttcaaatata atttgattat aataaaatac aatttaattc taaaaagtcc 900  
 atcttagatt ttaatthttcc ttttttagttt tgaaaattaa aaatttaaatt ttattagata 960  
 tatatgttac tttttcagtt ttcttattta ttttaagaaaa aaatattttt taacacatgt 1020  
 caacttgtaa acaatagact gaacacgtca ttttatatta tgtttagttt tgaaaattaa 1080  
 agttaattaa atatttatat ttcttttttt tagcttttct aattattttt aaaatagtaa 1140  
 atatttttaa tacaaatcaa tatctgaaca atagatttga tacataacat aatcctataa 1200  
 attattaact tggaaaacga tagtttatat aataaaatta ttttcttaag ttctctaacc 1260  
 ataacaatta aactatattt tagcgaagaa aagaagagaa taccgagaga acgcaacttg 1320  
 cactaaaagc taccactttg gcaaatcact catttatatt attatatact atcacctcaa 1380  
 ttcaatcgaa acctcaaaat aacactaata tatacacaaa gaaacaacag aataacaccg 1440  
 aagaatatag gtttaggaaa atccagaatt tggtgagact aaagagatca aattttcgat 1500  
 acaaggtttt gctcaatttg tattttcata ataaaattct ttatttcacc atagacttac 1560  
 atgattagtt tttcttttaa taaaaaaaa cacgcgacat gaaaattata ttatctcagt 1620  
 gttgtcgaat ttgaatttga attttgagtt aaatactaca catttggtga caacttatta 1680  
 aactttacaa gtctgctaca aatattgtca aatatttact aattaatgga ccaaaatcct 1740  
 ctaacttgca aatttgatc tacatcaact taaaattag gaatatgca ccaaaaaaaaa 1800  
 aaaaaactag gaataataat aaaaaaatgg aatgatgtgg aggaagctct ttactctttg 1860  
 agaggaagtt tataaattga ccacacattt agtctattat catcacatgt attaagactt 1920  
 gacaacttgt ctttctcaca ccaaaccct ctctctgtt tcataacatc tgctctttct 1980  
 tttttttcct aagccccta 1999

<210> 7

<211> 560

5 <212> PRT

<213> *Medicago truncatula*

<400> 7

ES 2 373 614 T3

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

Asn Thr Thr Asn Asn Asp Asn Arg Lys Arg Asn Gln Ser Thr Thr Thr  
20 25 30

Asp Thr Thr Val Thr Val Thr Thr Ala Thr Thr Ala Ala Gln Lys Gln  
35 40 45

Thr Ala Gln Arg Arg Lys Gly Gly Ser Asn Glu Thr Ala Gln Lys Lys

ES 2 373 614 T3

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

ES 2 373 614 T3

Thr Glu Asp Gly Ile Phe Lys Glu Val Leu Arg Asn Lys Pro Asp Phe  
 305 310 315 320

Arg Arg Lys Pro Trp Pro Thr Ile Ser Asn Ala Ala Lys Asp Phe Val  
 325 330 335

Lys Lys Leu Leu Val Lys Asp Pro Arg Ala Arg Leu Thr Ala Ala Gln  
 340 345 350

Ala Leu Ser His Pro Trp Val Arg Glu Gly Gly Glu Ala Ser Glu Ile  
 355 360 365

Pro Ile Asp Ile Ser Val Leu Asn Asn Met Arg Gln Phe Val Lys Tyr  
 370 375 380

Ser Arg Leu Lys Gln Phe Ala Leu Arg Ala Leu Ala Ser Thr Leu Asn  
 385 390 395 400

Glu Gly Glu Leu Ser Asp Leu Lys Asp Gln Phe Asp Ala Ile Asp Val  
 405 410 415

Asp Lys Asn Gly Ala Ile Ser Leu Glu Glu Met Arg Gln Ala Leu Ala  
 420 425 430

Lys Asp Leu Pro Trp Lys Leu Lys Glu Ser Arg Val Leu Glu Ile Leu  
 435 440 445

Gln Ala Ile Asp Ser Asn Thr Asp Gly Leu Val Asp Phe Thr Glu Phe  
 450 455 460

Val Ala Ala Thr Leu His Val His Gln Leu Glu Glu His Asp Ser Asp  
 465 470 475 480

Lys Trp Gln Gln Arg Ser Gln Ala Ala Phe Glu Lys Phe Asp Ile Asp  
 485 490 495

Lys Asp Gly Tyr Ile Thr Pro Glu Glu Leu Arg Met His Thr Gly Met  
 500 505 510

Arg Gly Ser Ile Asp Pro Leu Leu Glu Glu Ala Asp Ile Asp Lys Asp  
 515 520 525

Gly Lys Ile Ser Leu Pro Glu Phe Arg Arg Leu Leu Arg Thr Ala Ser  
 530 535 540



ES 2 373 614 T3

atgggtttat gtttttcttc taaaaagggt gttagtgggt ctaacagcaa caccacaaac 60  
 aatgataacc gtaaacggaa tcagtcaaca accacggata ccaccgtcac ggtaacaaca 120  
 gcaacaacgg cggcgcagaa acaaacggca cagagacgta aaggaggggc aatgaaaca 180  
 gcccagaaga agaatcatca tcaacatcat aggttaaaag agaaaacagg ttctaaacat 240  
 gttccttggt gaaaaagaac ggattttggg tatgagaaag attttgataa aagattttct 300  
 cttgggaaat tgttgggtca tggacaattt gggtataact atgttgggtg tgataaatcc 360  
 aatggagatc gtgtcgccgt taagcgactc gagaaagcta agatggttct ccctatagca 420  
 gttgaggatg taaaaagaga ggtcaagata ttgaaagaac ttacaggcca tgaaaatgtg 480  
 gttcagtttt ataatgcttt tgacgatgat tcatatgtgt acatagttat ggagttatgc 540  
 gaaggtggag aactactaga ccggatacta aacaaaaagg acagccgta tactgaaaaa 600  
 gatgccgccg ttgttgtaag gcagatgctg aaggttgcag ctcaagtgtca tttacatggt 660  
 ttggtacatc gcgacatgaa gccagagaat tttcttttca aatcaaaca agaagattca 720  
 gctttgaagg ccaactgattt tggtttgtct gatttcataa aacctggaaa gaggtttcaa 780  
 gatattgttg gaagtgctta ctatgtcgca ccagaagtgt tgaaacggaa gtcaggccct 840  
 gaatcagatg tatggagtat tgggtgtgatt acatacatat tgctttgtgg gagacgtcca 900  
 ttttgggaca agactgaaga tggatcttc aaggaggtct tacgaaaca gcctgatttc 960  
 cggcggaaac catggccaac cataagtaat gctgcaaaag attttgtgaa gaaattgttg 1020  
 gtaaaagatc ctcgggcaag attaacggct gctcaggctc tatcacatcc atgggttaga 1080  
 gaaggaggag aggcattcca gattccaatt gatatatctg tcctaaaca catgcggcag 1140  
 tttgtgaagt atagtcgatt gaaacaattt gcattgaggg cattggctag cacacttaac 1200  
 gaaggtgagt tgtctgatct aaaagatcag tttgatgcaa tagatgtgga caaaaatggt 1260  
 gctattagtc ttgaagagat gagacaggct cttgctaaag atctcccgtg gaagttgaaa 1320  
 gaatcccgtg tattggagat attgcaagcg attgacagca acacggatgg attagtagat 1380  
 ttcaccgagt ttgttgacgc tactttacat gtgcatcaat tggaggaaca tgactccgac 1440  
 aagtggcagc aacggtcaca ggctgctttt gagaaatttg acatagacaa ggatggctat 1500  
  
 attactccag aggaactcag aatgcacact ggtatgagag gttccatcga tcctctgctc 1560  
 gaggaagccg atattgacaa agatggaaag atcagcttac cagaattcag gagactttta 1620  
 agaactgcaa gcattggttc tcgaaacgta acaagcccaa ctctacgtca tcgaaggatc 1680  
 tag 1683

ES 2 373 614 T3

<210> 9

<211> 560

<212> PRT

<213> Medicago truncatula

5 <400> 9

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

Asn Thr Thr Asn Asn Asp Asn Arg Lys Arg Asn Gln Ser Thr Thr Thr  
20 25 30

Asp Thr Thr Val Thr Val Thr Thr Ala Thr Thr Ala Ala Gln Lys Gln  
35 40 45

Thr Ala Gln Arg Arg Lys Gly Gly Ser Asn Glu Thr Ala Gln Lys Lys  
50 55 60

Asn His His Gln His His Arg Leu Lys Glu Lys Thr Gly Ser Lys His  
65 70 75 80

Val Pro Cys Gly Lys Arg Thr Asp Phe Gly Tyr Glu Lys Asp Phe Asp  
85 90 95

Lys Arg Phe Ser Leu Gly Lys Leu Leu Gly His Gly Gln Phe Gly Tyr  
100 105 110

Thr Tyr Val Gly Val Asp Lys Ser Asn Gly Asp Arg Val Ala Val Lys  
115 120 125

Arg Leu Glu Lys Ala Lys Met Val Leu Pro Ile Ala Val Glu Asp Val  
130 135 140

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

Val Gln Phe Tyr Asn Ala Phe Asp Asp Asp Ser Tyr Val Tyr Ile Val  
165 170 175

Met Glu Leu Cys Glu Gly Gly Glu Leu Leu Asp Arg Ile Leu Asn Lys

ES 2 373 614 T3

			180						185						190
Lys	Asp	Ser	Arg	Tyr	Thr	Glu	Lys	Asp	Ala	Ala	Val	Val	Val	Arg	Gln
		195					200					205			
Met	Leu	Lys	Val	Ala	Ala	Gln	Cys	His	Leu	His	Gly	Leu	Val	His	Arg
	210					215					220				
Asp	Met	Lys	Pro	Glu	Asn	Phe	Leu	Phe	Lys	Ser	Asn	Lys	Glu	Asp	Ser
225					230					235					240
Ala	Leu	Lys	Ala	Thr	Asp	Phe	Gly	Leu	Ser	Asp	Phe	Ile	Lys	Pro	Gly
				245					250						255
Lys	Arg	Phe	Gln	Asp	Ile	Val	Gly	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Val	Ala	Pro	Glu
			260					265					270		
Val	Leu	Lys	Arg	Lys	Ser	Gly	Pro	Glu	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Ile	Gly
		275					280					285			
Val	Ile	Thr	Tyr	Ile	Leu	Leu	Cys	Gly	Arg	Arg	Pro	Phe	Trp	Asp	Lys
	290					295					300				
Thr	Glu	Asp	Gly	Ile	Phe	Lys	Glu	Val	Leu	Arg	Asn	Lys	Pro	Asp	Phe
305					310						315				320
Arg	Arg	Lys	Pro	Trp	Pro	Thr	Ile	Ser	Asn	Ala	Ala	Lys	Asp	Phe	Val
				325						330					335
Lys	Lys	Leu	Leu	Val	Lys	Asp	Pro	Arg	Ala	Arg	Leu	Thr	Ala	Ala	Gln
			340					345						350	
Ala	Leu	Ser	His	Pro	Trp	Val	Arg	Glu	Gly	Gly	Glu	Ala	Ser	Glu	Ile
		355					360					365			
Pro	Ile	Asp	Ile	Ser	Val	Leu	Asn	Asn	Met	Arg	Gln	Phe	Val	Lys	Tyr
	370					375					380				
Ser	Arg	Leu	Lys	Gln	Phe	Ala	Leu	Arg	Ala	Leu	Ala	Ser	Thr	Leu	Asn
385					390					395					400
Glu	Gly	Glu	Leu	Ser	Asp	Leu	Lys	Asp	Gln	Phe	Asp	Ala	Ile	Asp	Val
				405					410					415	
Asp	Lys	Asn	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu	Glu	Glu	Met	Arg	Gln	Ala	Leu	Ala
			420					425					430		

ES 2 373 614 T3

Lys Asp Leu Pro Trp Lys Leu Lys Glu Ser Arg Val Leu Glu Ile Leu  
435 440 445

Gln Ala Ile Asp Ser Asn Thr Asp Gly Leu Val Asp Phe Thr Glu Phe  
450 455 460

Val Ala Ala Thr Leu His Val His Gln Leu Glu Glu His Asp Ser Asp  
465 470 475 480

Lys Trp Gln Gln Arg Ser Gln Ala Ala Phe Glu Lys Phe Asp Ile Asp  
485 490 495

Lys Asp Gly Tyr Ile Thr Pro Glu Glu Leu Arg Met His Thr Gly Met  
500 505 510

Arg Gly Ser Ile Asp Pro Leu Leu Glu Glu Ala Asp Ile Asp Lys Asp  
515 520 525

Gly Lys Ile Ser Leu Pro Glu Phe Arg Arg Leu Leu Arg Thr Ala Ser  
530 535 540

Ile Gly Ser Arg Asn Val Thr Ser Pro Thr Leu Arg His Arg Arg Ile  
545 550 555 560

<210> 10

<211> 1719

5 <212> ADN

<213> Nicotiana tabacum

<400> 10

ES 2 373 614 T3

atgggtaata	actgtttttc	tagctcaaaa	gtagtggtt	ctaacagcaa	caccccctcc	60
accaccgcca	cagccaccac	cgtgaatgtc	cggaggaaca	aagcaaatcc	accttctaca	120
tccacaatta	catcaacaaa	acaagaagg	tctcattgca	ataaacagaa	agttaaagat	180
aaccacaaaa	gccaacacca	aaaacaacaa	cctagaaatt	ctcagcaaaa	tgtaagaag	240
cataataatg	ggaggagaca	gaagagtggg	gttattgctt	gtgggaaaag	aactgatttt	300
gggtatgata	aagatthtga	taagaggttt	accattggga	agttgttggg	tcatggccaa	360
tttggttata	cctacgttgc	caccacaag	tctaattggag	atcgcgtcgc	tgtcaagaga	420
attgagaaga	acaagatggt	tcttccgatt	gcagttgagg	atgtaaaacg	agaagtcaag	480
atattgaagg	ccttatccgg	tcatgagaat	gtggttcaat	tcaataatgc	atthgaggat	540
gataactacg	tctacatagt	aatggagtta	tgtgaggggtg	gagaactctt	ggaccgcatt	600
ttggcaaaaa	aggacagccg	ttatgccgag	aaagatgcag	caatagttgt	acgtcagatg	660

ES 2 373 614 T3

ctaaaagaag ccgctcaatg tcatttacat ggtttggtgc atcgtgatat gaaacctgag 720  
 aattttctct ttaaactctc aaaggaggat tcaccattga aggccacaga ttttggctctt 780  
 tcagacttca taagaccagg gaagaagtcc caagatattg ttggtagtgc atattacgta 840  
 gcgccagagg tattaaagcg tagatcagga cccgaatcag atgagtggag tattggtggtt 900  
 attacataca ttttgctctg tggccgtcgc cgcttctggg ataaaacaga ggatggcata 960  
 ttcaaggagg tactaagaaa caagcctgat tttcgtcgcga agccgtggcc aactatcagc 1020  
 aacagtgcta aagatcttct taagaaatta ttggtgaagg atcctcgtgc tagacttact 1080  
 gctgcccagg ccctatcgc tccatgggtc cgcaaggag gtgatgcac tgagattcca 1140  
 ctggacattt ctgtcttata aaacatgcga caatttgtca agtacagtcg attaaaacag 1200  
 tttgctttac gggcattggc tagcacagtt gatgaggagg agctggcaga tgtgcccggat 1260  
 cagttttctg caattgatgt ggataaaaat ggtgtcatta gccttgaaga aatgagacag 1320  
 gcccttgcta aggatcttcc ctggaagatg aaagagtcac gggttcttga gattcttcaa 1380  
 gcgattgata gtaactctga tgggctactt gatttcccag agtttgcgc agccactcta 1440  
 catgtccatc agttggagga gcataattct ataaaatggc aggaaagatc gcaagctgct 1500  
 tttgaggaat ttgatgttga tagagatgga ttcataactc cagaagaact tagaatgcat 1560  
 actggattaa agggctccat agaccactt ctagaagaag cagatatacg caaagatggg 1620  
 aagataagct tgcoggaatt tcgtaggctt ctaagaactg caagtataag ctgcgggatg 1680  
 gtgactagtc caactgtagg aggctctcgg aaaagttag 1719

<210> 11

<211> 572

5 <212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 11

ES 2 373 614 T3

Met Gly Asn Asn Cys Phe Ser Ser Ser Lys Val Ser Gly Ser Asn Ser  
1 5 10 15

Asn Thr Pro Ser Thr Thr Ala Thr Ala Thr Thr Val Asn Val Arg Arg  
20 25 30

Asn Lys Ala Asn Pro Pro Ser Thr Ser Thr Ile Thr Ser Thr Lys Gln  
35 40 45

Glu Gly Ser His Cys Asn Lys Gln Lys Val Lys Asp Asn His Lys Ser  
50 55 60

ES 2 373 614 T3

Gln His Gln Lys Gln Gln Pro Arg Asn Ser Gln Gln Asn Val Lys Lys  
65 70 75 80

His Asn Asn Gly Arg Arg Gln Lys Ser Gly Val Ile Ala Cys Gly Lys  
85 90 95

Arg Thr Asp Phe Gly Tyr Asp Lys Asp Phe Asp Lys Arg Phe Thr Ile  
100 105 110

Gly Lys Leu Leu Gly His Gly Gln Phe Gly Tyr Thr Tyr Val Ala Thr  
115 120 125

His Lys Ser Asn Gly Asp Arg Val Ala Val Lys Arg Ile Glu Lys Asn  
130 135 140

Lys Met Val Leu Pro Ile Ala Val Glu Asp Val Lys Arg Glu Val Lys  
145 150 155 160

Ile Leu Lys Ala Leu Ser Gly His Glu Asn Val Val Gln Phe Asn Asn  
165 170 175

Ala Phe Glu Asp Asp Asn Tyr Val Tyr Ile Val Met Glu Leu Cys Glu  
180 185 190

Gly Gly Glu Leu Leu Asp Arg Ile Leu Ala Lys Lys Asp Ser Arg Tyr  
195 200 205

Ala Glu Lys Asp Ala Ala Ile Val Val Arg Gln Met Leu Lys Glu Ala  
210 215 220

Ala Gln Cys His Leu His Gly Leu Val His Arg Asp Met Lys Pro Glu  
225 230 235 240

Asn Phe Leu Phe Lys Ser Ser Lys Glu Asp Ser Pro Leu Lys Ala Thr  
245 250 255

Asp Phe Gly Leu Ser Asp Phe Ile Arg Pro Gly Lys Lys Phe Gln Asp  
260 265 270

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

Ser Gly Pro Glu Ser Asp Glu Trp Ser Ile Gly Val Ile Thr Tyr Ile  
290 295 300

Leu Leu Cys Gly Arg Arg Arg Phe Trp Asp Lys Thr Glu Asp Gly Ile



# ES 2 373 614 T3

Val Thr Ser Pro Thr Val Arg Gly Ser Arg Lys Ser  
565 570

<210> 12

<211> 1704

5 <212> ADN

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 12

ES 2 373 614 T3

atgggcagct gtttttctag ctccaaagtt agtggctcaa atagcaatac cccttctaca 60  
 actactacaa atgtaaagt tcatcacaac cgctcttcaa caacaacaac aacaactggt 120  
 acatcaagaa aacaagaggg gtcaaattat aatagagata aaggtaatat taatacaaaa 180  
 aacagccacc aaaaacaaca acctaggagt tctcagcaga atgttggtgt taagccaagt 240  
 tcaagaagac aaagtggagg ggttattcct tgtgggaaaa gaacagattt tgggtatgat 300  
 aaagatthttg ataagaggta tactattggt aaattggttg gtcattggcca atttgggtat 360  
 acatatgtht ctacagatag atcttctgga gatcgtgtht ctgttaagaa aattgagaaa 420  
 aacaagatgg ttcttccaat tgcggttgag gacgtgaaac gagaagtcaa gatattgaag 480  
 gccttagctg gtcacgagaa tgtggttcaa ttctataatt catttgagga tgataattat 540  
 gtctacatcg taatggagtt atgtgagggt ggagaactat tggaccgaat cttgtccaaa 600  
 aaagatagtc gatatactga gaaagatgag gcgatagtht tacgccagat gctaaaagtg 660  
 gctgctgagtht gtcatttaca tgggtctggtg catcgagata tgaaacctga gaattttctc 720  
 ttttaagctct tcaaaggtgg attcgccatt aaaagcacag attttggtht ttcagacttc 780  
 ataagaccag ggaaaaagtt ccaagacatt gttggcagtht catattatgt agccccagag 840  
 gtgttaaagc gtagatcagg acctgaatca gatgthtggg gtataggtgt aattacatac 900  
 attttgctat gcggccgtht ccgcttctg gacaaaactg aggatgtht attcaaggag 960  
 gtctacgaa acaagcctga ttttcgtht aagccatggc caacataag caacagtht 1020  
 aaagatthttg taaagaaatt actggtgaag gatccgtht ctagacttac tgcgctcag 1080  
 gccctatcgc atccatgggt ccgagaagga ggtatcgc atgagatccc actcgacatt 1140  
 tctgthttat ccaacatgtht gcaatttht agatatht gcctaaaaca gthtcttht 1200  
 cgggcttag ctagcagct tgatgaggag gagctctctg atctgaagga tcaatttht 1260  
 gcaattgagtht tggataagaa tgggtgtht agthtcaag aatgagaca ggccttht 1320  
 aaggatctcc catggaaat gaaagagtht cgagtht agthtctca agcgattht 1380  
 agtaacacag acgggcttht tgatttht gagthtgg cgcactct acatgtht 1440  
 cagthtggagtht agcataattc taaaaatgg cagcaaagat cgcaagtht tthtggaaa 1500  
  
 tthtggtht atagagtht attcataacc ccggaagaac taaaatgca cacgggtht 1560  
 aaaggatcga tagaccact tthtggagaa gcggacattg acaaagcgg gaagataagc 1620  
 ctgthtcaaat tccgtaggct tthtgaact gthttagtht gthtccaac gthtggagat 1680  
 tcacggagaa atgthtcttht gtht 1704

ES 2 373 614 T3

<210> 13

<211> 567

<212> PRT

5 <213> Nicotiana tabacum

<400> 13

Met Gly Ser Cys Phe Ser Ser Ser Lys Val Ser Gly Ser Asn Ser Asn  
1 5 10 15

Thr Pro Ser Thr Thr Thr Thr Asn Val Asn Val His His Asn Arg Pro  
20 25 30

Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Val Thr Ser Arg Lys Gln Glu Gly Ser  
35 40 45

Asn Tyr Asn Arg Asp Lys Gly Asn Ile Asn Thr Lys Asn Ser His Gln  
50 55 60

Lys Gln Gln Pro Arg Ser Ser Gln Gln Asn Val Val Val Lys Pro Ser  
65 70 75 80

Ser Arg Arg Gln Ser Gly Gly Val Ile Pro Cys Gly Lys Arg Thr Asp  
85 90 95

Phe Gly Tyr Asp Lys Asp Phe Asp Lys Arg Tyr Thr Ile Gly Lys Leu  
100 105 110

Leu Gly His Gly Gln Phe Gly Tyr Thr Tyr Val Ala Thr Asp Arg Ser  
115 120 125

Ser Gly Asp Arg Val Ala Val Lys Lys Ile Glu Lys Asn Lys Met Val  
130 135 140

Leu Pro Ile Ala Val Glu Asp Val Lys Arg Glu Val Lys Ile Leu Lys  
145 150 155 160

Ala Leu Ala Gly His Glu Asn Val Val Gln Phe Tyr Asn Ser Phe Glu  
165 170 175

ES 2 373 614 T3

Asp Asp Asn Tyr Val Tyr Ile Val Met Glu Leu Cys Glu Gly Gly Glu  
180 185 190

Leu Leu Asp Arg Ile Leu Ser Lys Lys Asp Ser Arg Tyr Thr Glu Lys  
195 200 205

Asp Ala Ala Ile Val Val Arg Gln Met Leu Lys Val Ala Ala Glu Cys  
210 215 220

His Leu His Gly Leu Val His Arg Asp Met Lys Pro Glu Asn Phe Leu  
225 230 235 240

Phe Lys Leu Phe Lys Gly Gly Phe Ala Ile Lys Ser Thr Asp Phe Gly  
245 250 255

Leu Ser Asp Phe Ile Arg Pro Gly Lys Lys Phe Gln Asp Ile Val Gly  
260 265 270

Ser Ala Tyr Tyr Val Ala Pro Glu Val Leu Lys Arg Arg Ser Gly Pro  
275 280 285

Glu Ser Asp Val Trp Ser Ile Gly Val Ile Thr Tyr Ile Leu Leu Cys  
290 295 300

Gly Arg Arg Arg Phe Trp Asp Lys Thr Glu Asp Gly Ile Phe Lys Glu  
305 310 315 320

Val Leu Arg Asn Lys Pro Asp Phe Arg Arg Lys Pro Trp Pro Asn Ile  
325 330 335

Ser Asn Ser Ala Lys Asp Phe Val Lys Lys Leu Leu Val Lys Asp Pro  
340 345 350

Arg Ala Arg Leu Thr Ala Ala Gln Ala Leu Ser His Pro Trp Val Arg  
355 360 365

Glu Gly Gly Ile Ala Ser Glu Ile Pro Leu Asp Ile Ser Val Leu Ser  
370 375 380

Asn Met Arg Gln Phe Val Arg Tyr Ser Arg Leu Lys Gln Phe Ala Leu  
385 390 395 400

Arg Ala Leu Ala Ser Thr Leu Asp Glu Glu Glu Leu Ser Asp Leu Lys  
405 410 415

Asp Gln Phe Ser Ala Ile Asp Val Asp Lys Asn Gly Val Ile Ser Leu



ES 2 373 614 T3

atgggtagtt gtttttcaag ctccaaagtt agtggctcaa atagcaatac cccttcaacc 60  
 aacaataccg ccacaaacac aaacacaacg gtaaagtgtc atccaaaccg cagggaaacc 120  
 tcaaaagcac cttcaacaac gtttgtaaat tcaagaaatc aagaagggtc gaattataat 180  
 cgaggtaaag gtaatattaa ccagaaaaac caacaaaaac aacctaggaa ttcacagcag 240  
 aatgttaagc caagttcaag aagacaaggt ggggttattc cttgtgggaa aagaacagat 300  
 tttgggtatg ataaagattt tgaaaagaga tatacaattg ggaaattgtt gggctatggt 360  
 caatttggtt atacatatgt tgctacagat aaatcttcag gagatcgtgt ggctgtcaaa 420  
 agaattgaga aaaacaagat ggttcttccc attgcggttg aggatgtgaa acgagaagtc 480  
  
 aagatattga aggccttagg tcgtcatgag aatgtggttc aattctataa ttcattcgag 540  
 gatcataatt atgtctacat cgtaatggag ttatgtgaag gtggagaact attggacgat 600  
 tgtcaaaaga cagtcggtat acgagaagat gcagcaatag tcgtaccca gatgctaaaa 660  
 gtggcagctg agtgtcattt acatggtttg gtgcatcgtg atatgaaacc tgagaatttt 720  
 ctctttaagt ctacaaagga ggattcacca ttaaaagcca cagattttgg atcttcagac 780  
 ttcattcagac caggaaaagt ccaagacatt gtcggtagtg catattatgt agctccagag 840  
 gtattaaagc gtagatcagg acctgaatca gatgtgtgga gtattggcgt aattacatac 900  
 attttgctat gtggtcgtcg gcctttctgg gacaaaactg aggatggtat attcaaggag 960  
 gtcctacgga acaaacctga ttttcgtcgc aagccatggt ctaacataag caacagtgct 1020  
 aaagattttg taagaaatt actggtgaag gatcctcgcg ctagacttac tgctgctcag 1080  
 gccctatcac atccttgggt ccgagagggga ggggatgcat ctgagattcc actggacatt 1140  
 tctgttttat ccaacatgcg gcaatttgtc agatacagtc atctaaaaca gtttgcttta 1200  
 cgggcgttac gtagcacact tgatgaggag gagatcgtg atctgcgga tcaattttct 1260  
 gcaattgatg tggataagaa tgggtgcac agtctcgaag aatgagaca ggcccttgcg 1320  
 aaggatctcc catggaaaat gaaagaatca cgagttcttg agattcttca agcgattgac 1380  
 agtaacacag atgggcttgt tgattttccg gagtttgtgg ctgccactct acatgtccat 1440  
 cagttggagg agcataattc tgcaaagtgg cagcaaagat cacaagctgc ttttgagaaa 1500  
 tttgatgttg atagagatgg attcattact ccagaagaac ttaaaatgca cacgggcttg 1560  
 agaggctcca tagatccact tctagaggaa gcagatattg acaagacgg aaagataagc 1620  
 atatcagaat ttcgtagact ttaagaact gctagtatga cttaccaac ggtgagagat 1680  
 tcacggggta tgtag 1695

ES 2 373 614 T3

<210> 15

<211> 564

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

5 <400> 15

Met Gly Ser Cys Phe Ser Ser Ser Lys Val Ser Gly Ser Asn Ser Asn  
1 5 10 15

Thr Pro Ser Thr Asn Asn Thr Ala Thr Asn Thr Asn Thr Thr Val Asn  
20 25 30

Val His Pro Asn Arg Arg Glu Thr Ser Lys Ala Pro Ser Thr Thr Val  
35 40 45

ES 2 373 614 T3

Val Asn Ser Arg Asn Gln Glu Gly Ser Asn Tyr Asn Arg Gly Lys Gly  
50 55 60

Asn Ile Asn Gln Lys Asn Gln Gln Lys Gln Pro Arg Asn Ser Gln Gln  
65 70 75 80

Asn Val Lys Pro Ser Ser Arg Arg Gln Gly Gly Val Ile Pro Cys Gly  
85 90 95

Lys Arg Thr Asp Phe Gly Tyr Asp Lys Asp Phe Glu Lys Arg Tyr Thr  
100 105 110

Ile Gly Lys Leu Leu Gly His Gly Gln Phe Gly Tyr Thr Tyr Val Ala  
115 120 125

Thr Asp Lys Ser Ser Gly Asp Arg Val Ala Val Lys Arg Ile Glu Lys  
130 135 140

Asn Lys Met Val Leu Pro Ile Ala Val Glu Asp Val Lys Arg Glu Val  
145 150 155 160

Lys Ile Leu Lys Ala Leu Gly Arg His Glu Asn Val Val Gln Phe Tyr  
165 170 175

Asn Ser Phe Glu Asp His Asn Tyr Val Tyr Ile Val Met Glu Leu Cys  
180 185 190

Glu Gly Gly Glu Leu Leu Asp Asp Cys Gln Lys Thr Val Gly Ile Arg  
195 200 205

Glu Asp Ala Ala Ile Val Val Pro Gln Met Leu Lys Val Ala Ala Glu  
210 215 220

Cys His Leu His Gly Leu Val His Arg Asp Met Lys Pro Glu Asn Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Lys Ser Thr Lys Glu Asp Ser Pro Leu Lys Ala Thr Asp Phe  
245 250 255

Gly Ser Ser Asp Phe Ile Arg Pro Gly Lys Val Gln Asp Ile Val Gly  
260 265 270

Ser Ala Tyr Tyr Val Ala Pro Glu Val Leu Lys Arg Arg Ser Gly Pro  
275 280 285

ES 2 373 614 T3

Glu Ser Asp Val Trp Ser Ile Gly Val Ile Thr Tyr Ile Leu Leu Cys  
 290 295 300

Gly Arg Arg Pro Phe Trp Asp Lys Thr Glu Asp Gly Ile Phe Lys Glu  
 305 310 315 320

Val Leu Arg Asn Lys Pro Asp Phe Arg Arg Lys Pro Trp Ser Asn Ile  
 325 330 335

Ser Asn Ser Ala Lys Asp Phe Val Lys Lys Leu Leu Val Lys Asp Pro  
 340 345 350

Arg Ala Arg Leu Thr Ala Ala Gln Ala Leu Ser His Pro Trp Val Arg  
 355 360 365

Glu Gly Gly Asp Ala Ser Glu Ile Pro Leu Asp Ile Ser Val Leu Ser  
 370 375 380

Asn Met Arg Gln Phe Val Arg Tyr Ser His Leu Lys Gln Phe Ala Leu  
 385 390 395 400

Arg Ala Leu Arg Ser Thr Leu Asp Glu Glu Glu Ile Ala Asp Leu Arg  
 405 410 415

Asp Gln Phe Ser Ala Ile Asp Val Asp Lys Asn Gly Val Ile Ser Leu  
 420 425 430

Glu Glu Met Arg Gln Ala Leu Ala Lys Asp Leu Pro Trp Lys Met Lys  
 435 440 445

Glu Ser Arg Val Leu Glu Ile Leu Gln Ala Ile Asp Ser Asn Thr Asp  
 450 455 460

Gly Leu Val Asp Phe Pro Glu Phe Val Ala Ala Thr Leu His Val His  
 465 470 475 480

Gln Leu Glu Glu His Asn Ser Ala Lys Trp Gln Gln Arg Ser Gln Ala  
 485 490 495

Ala Phe Glu Lys Phe Asp Val Asp Arg Asp Gly Phe Ile Thr Pro Glu  
 500 505 510

Glu Leu Lys Met His Thr Gly Leu Arg Gly Ser Ile Asp Pro Leu Leu  
 515 520 525

Glu Glu Ala Asp Ile Asp Lys Asp Gly Lys Ile Ser Ile Ser Glu Phe

ES 2 373 614 T3

530

535

540

Arg Arg Leu Leu Arg Thr Ala Ser Met Thr Ser Pro Thr Val Arg Asp  
545 550 555 560

Ser Arg Gly Met

<210> 16

<211> 1716

5 <212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 16

ES 2 373 614 T3

atgggtctct gtttctctc cgccgcaaa tcctccggcc acaaccgcag tagccggaat 60  
 ccccaaccac atcctctctc cacggttggt aatccagac caccgcgatc tccatgttcc 120  
 ttcattggccg ttacgatcca aaaggatcat agaacgcaac cgcgacgcaa tgcaacggct 180  
 aagaaaacgc cgacgcggca tacgccaccg cacgggaaag tgagagagaa agttataagc 240  
 aataacggta ggagacatgg agaaacgatc ccctacggta agcgtgtaga ttttgggtac 300  
 gctaaagatt ttgatcaccg ttacaccatt ggaaaattgc ttggacatgg tcaatttggg 360  
 tatacatatg tcgctaccga taaaaaac ggtgatcgtg tcgccgtcaa gaagatcgat 420  
 aaggccaaga tgacaattcc gatagctgtg gaagatgtaa agagagaggt gaagatatta 480  
 caagctttaa ctggtcatga aatgtgggt cggttttata atgccttca ggacaagaac 540  
 tctgtttata tagttatgga gttatgcgag ggtgggtaat tacttgatcg tatttttagcc 600  
 aggaaggata gccgttatag cgagagagac gcggccgtgg tggtgagaca aatgctgaaa 660  
 gttgcggctg agtgtcattt acgcggtttg gttcaccgag atatgaaacc agagaatttt 720  
 ctgttcaaat caaccgaaga agattcgcct ctaaaagcta ctgatttcgg tttatctgac 780  
 ttcataaagc caggcaaaaa gtttcatgat attgttggga gtgcatacta tgtagcacct 840  
 gaagtgttaa aacgtaggtc gggacctgaa tcagatgtgt ggagtattgg tgtaatcagt 900  
 tacattcttc tctgcgggag acgaccattc tgggataaga ctgaagacgg tatcttcaag 960  
 gaggttttga agaacaaacc tgatttcaga agaaaaccgt ggccaacat tagcaacagc 1020  
 gccaaagatt ttgtcaagaa gttgttagta aaagaccga gagcgcgatt aacagctgca 1080  
 caagcactat cacatccatg ggttagagaa ggaggagatg catctgagat tcccatagac 1140  
 atatctgttc tgaacaacat gcgtcagttt gtgaaattta gccgcctta gcaattcgct 1200  
 ttaagggctc ttgcaacgac acttgatgag gaagagttgg ctgatcttcg agaccagttt 1260  
 gatgcgattg atgttgacaa gaatggtgct attagccttg aagagatgag gcaggctcta 1320  
  
 gcgaaagatc atccttgga gcttaaggat gcaagagttg ccgagattct tcaagcgatt 1380  
 gatagcaaca cagatggatt cgtggacttt ggcgagtttg tcgccgctgc gctacacgta 1440  
 aaccaattag aggaacacga ttccgagaag tggcaacaga gatcaagagc agcatttgaa 1500  
 aaattcgaca tagatggaga tggatttata acagcagagg aacttcgaat gcatactggc 1560  
 ttgaaagggc ccattgagcc acttcttgaa gaagcagaca ttgacaatga tggtaaaatc 1620  
 agtctccaag agtttcgtag acttttgaga actgcaagta tcaaatcaag aatgtttaga 1680  
 agccctcctg gttatcttat ttctcgcaag gtctaa 1716

ES 2 373 614 T3

<210> 17

<211> 571

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

5 <400> 17

Met Gly Leu Cys Phe Ser Ser Ala Ala Lys Ser Ser Gly His Asn Arg  
1 5 10 15

Ser Ser Arg Asn Pro His Pro His Pro Pro Leu Thr Val Val Lys Ser  
20 25 30

Arg Pro Pro Arg Ser Pro Cys Ser Phe Met Ala Val Thr Ile Gln Lys  
35 40 45

Asp His Arg Thr Gln Pro Arg Arg Asn Ala Thr Ala Lys Lys Thr Pro  
50 55 60

Thr Arg His Thr Pro Pro His Gly Lys Val Arg Glu Lys Val Ile Ser  
65 70 75 80

Asn Asn Gly Arg Arg His Gly Glu Thr Ile Pro Tyr Gly Lys Arg Val  
85 90 95

Asp Phe Gly Tyr Ala Lys Asp Phe Asp His Arg Tyr Thr Ile Gly Lys  
100 105 110

Leu Leu Gly His Gly Gln Phe Gly Tyr Thr Tyr Val Ala Thr Asp Lys  
115 120 125

Lys Thr Gly Asp Arg Val Ala Val Lys Lys Ile Asp Lys Ala Lys Met  
130 135 140

Thr Ile Pro Ile Ala Val Glu Asp Val Lys Arg Glu Val Lys Ile Leu  
145 150 155 160

ES 2 373 614 T3

Gln Ala Leu Thr Gly His Glu Asn Val Val Arg Phe Tyr Asn Ala Phe  
165 170 175

Glu Asp Lys Asn Ser Val Tyr Ile Val Met Glu Leu Cys Glu Gly Gly  
180 185 190

Glu Leu Leu Asp Arg Ile Leu Ala Arg Lys Asp Ser Arg Tyr Ser Glu  
195 200 205

Arg Asp Ala Ala Val Val Val Arg Gln Met Leu Lys Val Ala Ala Glu  
210 215 220

Cys His Leu Arg Gly Leu Val His Arg Asp Met Lys Pro Glu Asn Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Lys Ser Thr Glu Glu Asp Ser Pro Leu Lys Ala Thr Asp Phe  
245 250 255

Gly Leu Ser Asp Phe Ile Lys Pro Gly Lys Lys Phe His Asp Ile Val  
260 265 270

Gly Ser Ala Tyr Tyr Val Ala Pro Glu Val Leu Lys Arg Arg Ser Gly  
275 280 285

Pro Glu Ser Asp Val Trp Ser Ile Gly Val Ile Ser Tyr Ile Leu Leu  
290 295 300

Cys Gly Arg Arg Pro Phe Trp Asp Lys Thr Glu Asp Gly Ile Phe Lys  
305 310 315 320

Glu Val Leu Lys Asn Lys Pro Asp Phe Arg Arg Lys Pro Trp Pro Thr  
325 330 335

Ile Ser Asn Ser Ala Lys Asp Phe Val Lys Lys Leu Leu Val Lys Asp  
340 345 350

Pro Arg Ala Arg Leu Thr Ala Ala Gln Ala Leu Ser His Pro Trp Val  
355 360 365

Arg Glu Gly Gly Asp Ala Ser Glu Ile Pro Ile Asp Ile Ser Val Leu  
370 375 380

Asn Asn Met Arg Gln Phe Val Lys Phe Ser Arg Leu Lys Gln Phe Ala  
385 390 395 400

ES 2 373 614 T3

Leu Arg Ala Leu Ala Thr Thr Leu Asp Glu Glu Glu Leu Ala Asp Leu  
 405 410 415

Arg Asp Gln Phe Asp Ala Ile Asp Val Asp Lys Asn Gly Val Ile Ser  
 420 425 430

Leu Glu Glu Met Arg Gln Ala Leu Ala Lys Asp His Pro Trp Lys Leu  
 435 440 445

Lys Asp Ala Arg Val Ala Glu Ile Leu Gln Ala Ile Asp Ser Asn Thr  
 450 455 460

Asp Gly Phe Val Asp Phe Gly Glu Phe Val Ala Ala Ala Leu His Val  
 465 470 475 480

Asn Gln Leu Glu Glu His Asp Ser Glu Lys Trp Gln Gln Arg Ser Arg  
 485 490 495

Ala Ala Phe Glu Lys Phe Asp Ile Asp Gly Asp Gly Phe Ile Thr Ala  
 500 505 510

Glu Glu Leu Arg Met His Thr Gly Leu Lys Gly Ser Ile Glu Pro Leu  
 515 520 525

Leu Glu Glu Ala Asp Ile Asp Asn Asp Gly Lys Ile Ser Leu Gln Glu  
 530 535 540

Phe Arg Arg Leu Leu Arg Thr Ala Ser Ile Lys Ser Arg Asn Val Arg  
 545 550 555 560

Ser Pro Pro Gly Tyr Leu Ile Ser Arg Lys Val  
 565 570

<210> 18

<211> 1605

5 <212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 18

ES 2 373 614 T3

atgggtctct gtttctcgtc tcctaaagcc accagacgtg gcaccggtag tcggaacct 60  
 aatcctgatt ctccgacgca ggggaaggcg agtgagaagg ttagtaataa aaacaagaag 120  
 aatacgaaga agatccaatt gaggcaccaa ggaggatcc cgtacggtaa acgcatcgat 180  
 tttgggtacg ctaaggattt cgataaccga tacaccattg ggaaattgct cggacatggc 240  
 cagtttggtt ttacctacgt cgccaccgat aacaacaatg gcaatcgcgt tgcagtcaag 300  
 agaatcgaca aggccaagat gactcaaccg attgaagtgg aagatgtgaa gcgagaggtt 360  
  
 aagatactac aagctttagg tgggcatgag aatgtggtag gctttcacia tgcatttgag 420  
 gacaagacct atatttacat tgtcatggag ttatgtgacg gtggtgaatt gctagatcga 480  
 atactagcta agaaagatag ccgttacacc gagaaagatg cagcggttgt ggtgagacaa 540  
 atgctgaaag ttgcagctga atgtcattta cgaggtctag ttcaccgca catgaagcca 600  
 gagaattttc tgttcaaatac aaccgaagaa ggttcatctc taaaggctac agattttggt 660  
 ctgtcggact tcataaagcc aggagtgaag tttcaggata tagtaggaag cgcatactac 720  
 gttgcacctg aagtgttgaa acgtaggtca ggacctgaat cagacgtttg gagtattggt 780  
 gtcactactt acattctgct ctgcgggaga agaccttct gggataagac tcaagacgga 840  
 atattcaatg aggtcatgag gaaaaaacct gatttcagag aagtcccatg gccaacatt 900  
 agcaacggtg ccaaagattt cgtgaagaag ttgttagtta aggagcctcg ggcacggtta 960  
 acagcagctc aagcgctatc acattcatgg gtgaaagaag gaggtgaggc ctgagaggtt 1020  
 ccaatagaca tatctgttct taacaatatg cgtcagtttg tgaaattcag ccgtctgaag 1080  
 cagattgcac ttagggctct ggcgaaaaca attaatgagg atgagctgga tgatctcaga 1140  
 gaccagtttg atgcgattga cattgacaag aacggttcta taagccttga ggaaatgagg 1200  
 caggctcttg cgaaagatgt tccttgaaa ctcaaagatg caagagttgc agagattctc 1260  
 caagcgaatg atagcaacac tgatggtttg gtggatttca ctgagtttggt ggtggctgct 1320  
 ttgcacgtga accaattgga ggagcatgac tctgagaagt ggcaacagag gtcaagagca 1380  
 gcatttgaca agtttgacat agacggagat gggtttataa ctcccgaaga acttagattg 1440  
 caaacgggtt taaaaggctc catcgaacca cttcttgaag aggccgacgt agatgaagat 1500  
 gggagaatca gcatcaatga gtttcgcaga cttttgagaa gtgcaagcct caagtcaaaa 1560  
 aatgttaaaa gccctcctgg ttaccagctt tcacaaaaga tgtaa 1605

ES 2 373 614 T3

<211> 534

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 19

Met Gly Leu Cys Phe Ser Ser Pro Lys Ala Thr Arg Arg Gly Thr Gly  
1 5 10 15

Ser Arg Asn Pro Asn Pro Asp Ser Pro Thr Gln Gly Lys Ala Ser Glu  
20 25 30

Lys Val Ser Asn Lys Asn Lys Lys Asn Thr Lys Lys Ile Gln Leu Arg  
35 40 45

5

ES 2 373 614 T3

His Gln Gly Gly Ile Pro Tyr Gly Lys Arg Ile Asp Phe Gly Tyr Ala  
 50 55 60

Lys Asp Phe Asp Asn Arg Tyr Thr Ile Gly Lys Leu Leu Gly His Gly  
 65 70 75 80

Gln Phe Gly Phe Thr Tyr Val Ala Thr Asp Asn Asn Asn Gly Asn Arg  
 85 90 95

Val Ala Val Lys Arg Ile Asp Lys Ala Lys Met Thr Gln Pro Ile Glu  
 100 105 110

Val Glu Asp Val Lys Arg Glu Val Lys Ile Leu Gln Ala Leu Gly Gly  
 115 120 125

His Glu Asn Val Val Gly Phe His Asn Ala Phe Glu Asp Lys Thr Tyr  
 130 135 140

Ile Tyr Ile Val Met Glu Leu Cys Asp Gly Gly Glu Leu Leu Asp Arg  
 145 150 155 160

Ile Leu Ala Lys Lys Asp Ser Arg Tyr Thr Glu Lys Asp Ala Ala Val  
 165 170 175

Val Val Arg Gln Met Leu Lys Val Ala Ala Glu Cys His Leu Arg Gly  
 180 185 190

Leu Val His Arg Asp Met Lys Pro Glu Asn Phe Leu Phe Lys Ser Thr  
 195 200 205

Glu Glu Gly Ser Ser Leu Lys Ala Thr Asp Phe Gly Leu Ser Asp Phe  
 210 215 220

Ile Lys Pro Gly Val Lys Phe Gln Asp Ile Val Gly Ser Ala Tyr Tyr  
 225 230 235 240

Val Ala Pro Glu Val Leu Lys Arg Arg Ser Gly Pro Glu Ser Asp Val  
 245 250 255

Trp Ser Ile Gly Val Ile Thr Tyr Ile Leu Leu Cys Gly Arg Arg Pro  
 260 265 270

Phe Trp Asp Lys Thr Gln Asp Gly Ile Phe Asn Glu Val Met Arg Lys  
 275 280 285

ES 2 373 614 T3

Lys Pro Asp Phe Arg Glu Val Pro Trp Pro Thr Ile Ser Asn Gly Ala  
 290 295 300

Lys Asp Phe Val Lys Lys Leu Leu Val Lys Glu Pro Arg Ala Arg Leu  
 305 310 315 320

Thr Ala Ala Gln Ala Leu Ser His Ser Trp Val Lys Glu Gly Gly Glu  
 325 330 335

Ala Ser Glu Val Pro Ile Asp Ile Ser Val Leu Asn Asn Met Arg Gln  
 340 345 350

Phe Val Lys Phe Ser Arg Leu Lys Gln Ile Ala Leu Arg Ala Leu Ala  
 355 360 365

Lys Thr Ile Asn Glu Asp Glu Leu Asp Asp Leu Arg Asp Gln Phe Asp  
 370 375 380

Ala Ile Asp Ile Asp Lys Asn Gly Ser Ile Ser Leu Glu Glu Met Arg  
 385 390 395 400

Gln Ala Leu Ala Lys Asp Val Pro Trp Lys Leu Lys Asp Ala Arg Val  
 405 410 415

Ala Glu Ile Leu Gln Ala Asn Asp Ser Asn Thr Asp Gly Leu Val Asp  
 420 425 430

Phe Thr Glu Phe Val Val Ala Ala Leu His Val Asn Gln Leu Glu Glu  
 435 440 445

His Asp Ser Glu Lys Trp Gln Gln Arg Ser Arg Ala Ala Phe Asp Lys  
 450 455 460

Phe Asp Ile Asp Gly Asp Gly Phe Ile Thr Pro Glu Glu Leu Arg Leu  
 465 470 475 480

Gln Thr Gly Leu Lys Gly Ser Ile Glu Pro Leu Leu Glu Glu Ala Asp  
 485 490 495

Val Asp Glu Asp Gly Arg Ile Ser Ile Asn Glu Phe Arg Arg Leu Leu  
 500 505 510

Arg Ser Ala Ser Leu Lys Ser Lys Asn Val Lys Ser Pro Pro Gly Tyr  
 515 520 525

Gln Leu Ser Gln Lys Met  
530

<210> 20

<211> 1572

5 <212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 20

ES 2 373 614 T3

atgggtgtct gtttctccgc cattagagtc actggtgcta gcagcagtag acgaagcagt 60  
 cagaccaa at ccaaggctgc tctactccc atcgatacca aggcctctac caaacgccga 120  
 accggctcca tcccctgctg caagcgtacc gattttggct actccaaaga cttccacgat 180  
 cactacacca tcggcaagtt gctcggccat ggtcaattcg gctacaccta cgtcgccatc 240  
 cacagacca atggagatcg cgtcgccgtc aaaagactcg ataagtctaa gatggttctt 300  
 cctattgctg ttgaggatgt caagcgtgag gttcagattc ttattgctct ctctggccac 360  
 gagaatggtg ttcagtttca caatgccttt gaggatgacg attacgtcta tattggtatg 420  
 gagttgtgcg aaggaggcga attgctggat aggatattat ccaagaaagg taatcggtac 480  
 tccgagaaag atgcagccgt tgctgtagg cagatgctca aagttgcagg agaatgtcat 540  
 ctacacggtc ttgtacatag agatatgaaa ccagagaact ttttgttcaa atcagctcaa 600  
 ctagattcgc ctctaaaggc tacggatttt ggtttatcgg attttatcaa accagggaaa 660  
 aggttccatg acattggttg tagcgcctat tatgtggctc ctgaggtatt aaagcgcaga 720  
 tcagggcctg aatcagatgt atggagcatt ggtgtgatta cgtatatatt actttgtggg 780  
 aggcggcctt tttgggatag aactgaagat ggtatattta aagaggtttt aagaaataaa 840  
 cctgacttca gccgtaaacc ttgggcaact ataagtgaca gcgccaaaga ttttgtgaaa 900  
 aagttacttg taaaagacc acgagcacgg ctaactgctg cacaagcact atcacatgcg 960  
 tgggttagag aaggcgggaa tgctactgat atccctgctg acatttcagt tctgaacaac 1020  
 ttaagacaat ttgtgagata cagccgtcta aagcaatttg ctttaagggc gcttgctagc 1080  
 acacttgacg aggcagagat ctctgacctc agagatcaat ttgatgcat tgatgtggat 1140  
 aaaaatggcg tcattagtct tgaagagatg agacaggcac ttgccaaaga tcttccttgg 1200  
 aaactgaaag actcacgagt tgctgagatc cttgaagcga ttgatagcaa cactgatggg 1260  
 ttagtggact tcacagagtt tgtagcagca gctctacatg ttcacaaact agaagaacat 1320  
 gattcagaga aatggcagct aaggtcaaga gcagcttttg agaaattcga cctagacaaa 1380  
 gacgggtaca taacgcctga ggaacttcga atgcacacgg ggttaagagg atcaatagat 1440  
 ccaactgctg atgaagcaga catagacaga gatgggaaaa taagcctgca tgagttcagg 1500  
 agacttctaa gaacagcgag cataagttca cagagagcac caagccctgc aggtcacagg 1560  
  
 aatcttcgat ag 1572

<210> 21

5 <211> 523

ES 2 373 614 T3

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 21

Met Gly Val Cys Phe Ser Ala Ile Arg Val Thr Gly Ala Ser Ser Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ser Ser Gln Thr Lys Ser Lys Ala Ala Pro Thr Pro Ile Asp  
20 25 30

Thr Lys Ala Ser Thr Lys Arg Arg Thr Gly Ser Ile Pro Cys Gly Lys  
35 40 45

Arg Thr Asp Phe Gly Tyr Ser Lys Asp Phe His Asp His Tyr Thr Ile  
50 55 60

Gly Lys Leu Leu Gly His Gly Gln Phe Gly Tyr Thr Tyr Val Ala Ile  
65 70 75 80

His Arg Pro Asn Gly Asp Arg Val Ala Val Lys Arg Leu Asp Lys Ser  
85 90 95

Lys Met Val Leu Pro Ile Ala Val Glu Asp Val Lys Arg Glu Val Gln  
100 105 110

Ile Leu Ile Ala Leu Ser Gly His Glu Asn Val Val Gln Phe His Asn  
115 120 125

Ala Phe Glu Asp Asp Asp Tyr Val Tyr Ile Val Met Glu Leu Cys Glu  
130 135 140

Gly Gly Glu Leu Leu Asp Arg Ile Leu Ser Lys Lys Gly Asn Arg Tyr  
145 150 155 160

Ser Glu Lys Asp Ala Ala Val Val Val Arg Gln Met Leu Lys Val Ala  
165 170 175

Gly Glu Cys His Leu His Gly Leu Val His Arg Asp Met Lys Pro Glu  
180 185 190

Asn Phe Leu Phe Lys Ser Ala Gln Leu Asp Ser Pro Leu Lys Ala Thr  
195 200 205

ES 2 373 614 T3

Asp Phe Gly Leu Ser Asp Phe Ile Lys Pro Gly Lys Arg Phe His Asp  
 210 215 220  
 Ile Val Gly Ser Ala Tyr Tyr Val Ala Pro Glu Val Leu Lys Arg Arg  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Pro Glu Ser Asp Val Trp Ser Ile Gly Val Ile Thr Tyr Ile  
 245 250 255  
 Leu Leu Cys Gly Arg Arg Pro Phe Trp Asp Arg Thr Glu Asp Gly Ile  
 260 265 270  
 Phe Lys Glu Val Leu Arg Asn Lys Pro Asp Phe Ser Arg Lys Pro Trp  
 275 280 285  
 Ala Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Asp Phe Val Lys Lys Leu Leu Val  
 290 295 300  
 Lys Asp Pro Arg Ala Arg Leu Thr Ala Ala Gln Ala Leu Ser His Ala  
 305 310 315 320  
 Trp Val Arg Glu Gly Gly Asn Ala Thr Asp Ile Pro Val Asp Ile Ser  
 325 330 335  
 Val Leu Asn Asn Leu Arg Gln Phe Val Arg Tyr Ser Arg Leu Lys Gln  
 340 345 350  
 Phe Ala Leu Arg Ala Leu Ala Ser Thr Leu Asp Glu Ala Glu Ile Ser  
 355 360 365  
 Asp Leu Arg Asp Gln Phe Asp Ala Ile Asp Val Asp Lys Asn Gly Val  
 370 375 380  
 Ile Ser Leu Glu Glu Met Arg Gln Ala Leu Ala Lys Asp Leu Pro Trp  
 385 390 395 400  
 Lys Leu Lys Asp Ser Arg Val Ala Glu Ile Leu Glu Ala Ile Asp Ser  
 405 410 415  
 Asn Thr Asp Gly Leu Val Asp Phe Thr Glu Phe Val Ala Ala Ala Leu  
 420 425 430  
 His Val His Gln Leu Glu Glu His Asp Ser Glu Lys Trp Gln Leu Arg  
 435 440 445

ES 2 373 614 T3

Ser Arg Ala Ala Phe Glu Lys Phe Asp Leu Asp Lys Asp Gly Tyr Ile  
450 455 460

Thr Pro Glu Glu Leu Arg Met His Thr Gly Leu Arg Gly Ser Ile Asp  
465 470 475 480

Pro Leu Leu Asp Glu Ala Asp Ile Asp Arg Asp Gly Lys Ile Ser Leu  
485 490 495

His Glu Phe Arg Arg Leu Leu Arg Thr Ala Ser Ile Ser Ser Gln Arg  
500 505 510

Ala Pro Ser Pro Ala Gly His Arg Asn Leu Arg  
515 520

<210> 22

<211> 1569

5 <212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 22

ES 2 373 614 T3

atgggcgcgt gcttctcatc ccacactgcg accgccgccg ccgatggcgg gagcgggaag	60
cggcagcagc ggaaggggga tcacaagggg aagctccccg atggcggcgg cggcgagaag	120
gagaaggagg cggcgcggtt ggagttcggg tacgagaggg acttcgaggg gaggtaccag	180
gtcgggaggc tgctcggcca cggccagttc ggctacacct tcgccgccac cgaccgggcc	240
tccggtgacc gcgtcgccgt caagcgcata gacaaggcca agatggttcg cctgtttgct	300
gtggaggatg taaagagaga agtgaagatt cttaaagaac ttaaaggcca tgagaatatt	360
gttcacttct acaatgcgtt tgaagatgac tcatatgtat atattgtgat ggaactatgt	420
gagggtggtg aactattgga cggatTTTTG gcaaaaaaga acagccgtta tagtgagaaa	480
gatgctgcag tggTGGTgcg gcagatgctc aaagtggcag ctgagtgcca tctgcatggg	540
ctagttcacc gagatatgaa gcccgagaac ttccttttca aatcaaccaa ggaggactca	600
cctttaaagg caacagattt tggTctgtca gacttcataa aaccaggga aaagtttcac	660
gatatagttg gcagTgccta ttatgtagca ccagaagttt taaaacgacg gtctggcct	720
gagtcagatg tttggagcat aggagtcata acttatattt tgctctgtgg gagacgcct	780
ttttggaata agacagagga tggcatattc agagaggtac taagaaacaa gcctgatttt	840
cgtaagaagc cttggccagg catcagttca ggtgctaaag atttcgtaa aaagtactt	900
gtaaagaacc caagggcaag attaaccgct gctcaagctc tctcgcatcc atgggtaaga	960
gaaggaggag aagcatctga gatccctggt gatatatctg tattgtccaa catgcgtcag	1020
tttgtcaagt acagccgttt taagcaattt gctctgaggg cttagcaag taaactaaaa	1080
gaggaagaac tagcagatct gaaggaccag ttcgatgcaa ttgatgttga taaaagtgga	1140
tcaattagta ttgaggaaat gcggcatgcc cttgcaaagg atcttccttg gagattgaag	1200
ggccccctg ttctcgagat tatccaagca atcgacagca aactgatgg tcttTgtggac	1260
tttgaagagt ttgtagcagc aaccctccat atacatcaaa tggctgagct tgactctgaa	1320
aggtggggcc tacgctgcca ggctgctttc agcaaatttg atctggatgg tgacggatac	1380
atcactccag atgaactcag aatggtgcag cacactggct tgaagggttc catcgagcca	1440
ttgctggagg aggccgacat cgacaaagac gggagaataa gcttTgcgga gttccgcaag	1500
ctcctgcgga cagcgagcat gagcaacctt cccagtccaa gaggacctcc aaatccacaa	1560
cccctgtga	1569

ES 2 373 614 T3

<211> 522

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 23

5

Met Gly Ala Cys Phe Ser Ser His Thr Ala Thr Ala Ala Ala Asp Gly  
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Lys Arg Gln Gln Arg Lys Gly Asp His Lys Gly Lys Leu  
 20 25 30

Pro Asp Gly Gly Gly Gly Glu Lys Glu Lys Glu Ala Ala Arg Val Glu  
 35 40 45

Phe Gly Tyr Glu Arg Asp Phe Glu Gly Arg Tyr Gln Val Gly Arg Leu  
 50 55 60

Leu Gly His Gly Gln Phe Gly Tyr Thr Phe Ala Ala Thr Asp Arg Ala  
 65 70 75 80

Ser Gly Asp Arg Val Ala Val Lys Arg Ile Asp Lys Ala Lys Met Val  
 85 90 95

Arg Pro Val Ala Val Glu Asp Val Lys Arg Glu Val Lys Ile Leu Lys  
 100 105 110

Glu Leu Lys Gly His Glu Asn Ile Val His Phe Tyr Asn Ala Phe Glu  
 115 120 125

Asp Asp Ser Tyr Val Tyr Ile Val Met Glu Leu Cys Glu Gly Gly Glu



ES 2 373 614 T3

Glu Glu Met Arg His Ala Leu Ala Lys Asp Leu Pro Trp Arg Leu Lys  
385 390 395 400

Gly Pro Arg Val Leu Glu Ile Ile Gln Ala Ile Asp Ser Asn Thr Asp  
405 410 415

Gly Leu Val Asp Phe Glu Glu Phe Val Ala Ala Thr Leu His Ile His  
420 425 430

Gln Met Ala Glu Leu Asp Ser Glu Arg Trp Gly Leu Arg Cys Gln Ala  
435 440 445

Ala Phe Ser Lys Phe Asp Leu Asp Gly Asp Gly Tyr Ile Thr Pro Asp  
450 455 460

Glu Leu Arg Met Val Gln His Thr Gly Leu Lys Gly Ser Ile Glu Pro  
465 470 475 480

Leu Leu Glu Glu Ala Asp Ile Asp Lys Asp Gly Arg Ile Ser Leu Ser  
485 490 495

Glu Phe Arg Lys Leu Leu Arg Thr Ala Ser Met Ser Asn Leu Pro Ser  
500 505 510

Pro Arg Gly Pro Pro Asn Pro Gln Pro Leu  
515 520

<210> 24

<211> 1539

5 <212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 24

ES 2 373 614 T3

atgggactct gctcctcctc cagcgcccgc cgggacgccg gcacaccgcg cggcggtaac 60  
 ggcgcgggga acaaggataa cgcggggagg aaggggatcg tggcgtgcgg gaagcggacg 120  
 gacttcgggt acgacaagga cttcgaggcg cggtacgcgc tcgggaagct gctgggccac 180  
 ggccagttcg gctacacctt cgccgccgtc gaccgccgct ccagcgagcg cgtcgccgtc 240  
 aagcgcacatc acaagaacaa gatggttctt cctgttgccg ttgaagacgt aaagcgagaa 300  
 gttaaaatac tgaaggcctt acaaggccat gaaaatgttg tacatthtta caatgcattt 360  
 gaagatgata attatgtgta tattgttatg gaattatgtg aaggcgggga gttacttgac 420  
 cggatactag ccaagaaaga tagccgttat agcgagaaag atgctgcagt agttgtgcgg 480  
 caaatgctca aggttgctgc tgagtgccat ttgcatggtt tggttcatcg ggacatgaag 540  
  
 cctgagaact tcctcttcaa atcaacccaaa gaggactcat ccctcaaggc tacagattht 600  
 ggtctthtcag atthttataag accagggaaa cactthtcgtg acattgttg aagtcctac 660  
 tatgtagcac cagaagtgct taagcgtaag tcaggcccag aatctgacgt ttggagtatt 720  
 ggcgtaataa cctatattct actgtgtgga agacgacctt tctgggaaa aactgaagat 780  
 ggaatattta aagaggtgth gaaaaacaag ccagatthtc gtcgcaagcc ctggccaaat 840  
 atcactcctt gtgctaaaga cthtgtacaa aagthtcttg ttaaggatcc ccgtgcaaga 900  
 ttaactgctg ctcaggcatt atcacatgaa tgggtgagag aaggaggaca ggcatctgat 960  
 atacctctag atatatctgt attacataat atgcgtcagt thgtaaaata cagtcgtht 1020  
 aagcaatttg cthtacgggc gthtagcttct aactaaatg cagaagagth gtctgatctt 1080  
 cgtgaccagt tcaatgccat tgatgthgac aagaatggaa caattagtht ggaagaactg 1140  
 aagcaggctc thgcaaagga thttccatgg agattaaagg thccacgtht thtagagatt 1200  
 gthgaggcaa thgacagtha cacagatgga thtagthgatt thgaagagth thtthgctgca 1260  
 acattacatg thcatcagct agthgaacat gatactgaga agthggaaatc attgthtcaa 1320  
 gctgcatthg ataaattthg thtthgacgga gatggctata thcatctgga thgaactgaga 1380  
 atgcaaacag gactgaaagg thctattgat cccctcctgg aggaggctga cattgacaga 1440  
 gatggaaaaa taagcctaga thaatthtcg agthctctga aaactgcaag catgagthtca 1500  
 cgcaatgtac aaactccgag gagtthtcac agatcgtag 1539

<210> 25

5 <211> 512

<212> PRT

ES 2 373 614 T3

<213> Oryza sativa

<400> 25

Met Gly Leu Cys Ser Ser Ser Ser Ala Arg Arg Asp Ala Gly Thr Pro  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Asn Gly Ala Gly Asn Lys Asp Asn Ala Gly Arg Lys Gly  
20 25 30

Ile Val Ala Cys Gly Lys Arg Thr Asp Phe Gly Tyr Asp Lys Asp Phe  
35 40 45

Glu Ala Arg Tyr Ala Leu Gly Lys Leu Leu Gly His Gly Gln Phe Gly  
50 55 60

Tyr Thr Phe Ala Ala Val Asp Arg Arg Ser Ser Glu Arg Val Ala Val  
65 70 75 80

ES 2 373 614 T3

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

ES 2 373 614 T3

Ile Pro Leu Asp Ile Ser Val Leu His Asn Met Arg Gln Phe Val Lys  
 325 330 335

Tyr Ser Arg Phe Lys Gln Phe Ala Leu Arg Ala Leu Ala Ser Thr Leu  
 340 345 350

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

Val Asp Lys Asn Gly Thr Ile Ser Leu Glu Glu Leu Lys Gln Ala Leu  
 370 375 380

Ala Lys Asp Val Pro Trp Arg Leu Lys Gly Pro Arg Val Leu Glu Ile  
 385 390 395 400

Val Glu Ala Ile Asp Ser Asn Thr Asp Gly Leu Val Asp Phe Glu Glu  
 405 410 415

Phe Val Ala Ala Thr Leu His Val His Gln Leu Val Glu His Asp Thr  
 420 425 430

Glu Lys Trp Lys Ser Leu Ser Gln Ala Ala Phe Asp Lys Phe Asp Val  
 435 440 445

Asp Gly Asp Gly Tyr Ile Thr Ser Asp Glu Leu Arg Met Gln Thr Gly  
 450 455 460

Leu Lys Gly Ser Ile Asp Pro Leu Leu Glu Glu Ala Asp Ile Asp Arg  
 465 470 475 480

Asp Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Phe Arg Arg Leu Leu Lys Thr Ala  
 485 490 495

Ser Met Ser Ser Arg Asn Val Gln Thr Pro Arg Ser Val His Arg Ser  
 500 505 510

<210> 26

<211> 1689

5 <212> ADN

<213> Glycine max

# ES 2 373 614 T3

<400> 26

```
atgggcctct gtttctctc caccaaggtc agcggctcca gcagcaaaa caacaacaac    60
aacaacgctt catccaaccg taaccgaaa tgttcggccg cgccggcggc tgcagcgccg    120
ccggagccgg tgacgcccga gaagaaaaa ccgtcgcagg ctcaacggcg gcgagtcca    180
```

ES 2 373 614 T3

gaggagtcgc ggaagaaccc acgcgccaaa gacaaagcgg gtgcgcgtcg gcaagggaca 240  
cgtgttccgt gcggaaagcg aacggatttc gggtagcaga aagacttcga gaatagattc 300  
tcgctcggga aattgttggg acatggacaa ttcggttaca cctacgttgg aattgacaaa 360  
aaaaatgggg accgtgtcgc ggttaagaga ctagagaaga gcaagatggt tctccccatt 420  
gcggttgagg atgttaagcg agaagtcaag atattgaaag aacttacagg ccatgaaaat 480  
gtggttcagt tctttaatgc ttttgaggat gattcatatg tgtacatagt tatggagtta 540  
tgtgagggtg gagaactgct agatcggata ttggccaaga aggacagtcg ttatactgaa 600  
aaagatgcag ctgtggttgt aaggcagatg ctaaaggttg cggctgagtg tcatttacat 660  
gggttggtac accgggacat gaaaccagag aattttcttt tcaagtcaac caaagaagat 720  
tcaccttaa aggctaccga ttttggtttg tctgatttca taaaacctgg aaagaggttt 780  
caagatattg ttggcagtcg ttactatggt gcaccagaag tgttaaacg taagtcaggt 840  
cccagtcgg atgtatggag tattggtgtg attacataca tattgctttg tgggagacgc 900  
ccattttggg ataagacaga ggatggtatc ttcaaggagg tcttacggaa caagccggat 960  
ttccggcgga aaccatggcc tactataagc aatgctgcaa aagattttat gaagaaattg 1020  
ttggtaaaag atcctcgtgc gagatatgct gctgctcagg ctctttcaca tccatgggtt 1080  
agagaaggag gagaggcatt agagattcct attgatatat ctgtcctgaa caacatgcga 1140  
cagtttgtga aatatagtcg gttgaaacaa tttgcactaa gggcattggc tagcacactt 1200  
aatgaaggag agttgtctga tctaaaagat cagtttgatg caatagatgt ggacaaaaat 1260  
ggttctatta gtcttgagga gatgagacag gctcttgcta aagatcaacc ttggaagttg 1320  
aaagaatcac gtgtgctaga gatattgcaa gcgatagaca gcaacacaga tgggctagtg 1380  
gatttcaccg agtttgtggc agctacttta catgtacatc aattggagga acatgattct 1440  
gacaagtggc agcaacggtc acaggctgct tttgagaaat ttgacttga taaggatggc 1500  
tatattactc cagatgaact tagaatgcat acgggtttga gaggctccat tgatccattg 1560  
cttgaggaag ccgatactga taaagatggg aaaatcagct taccagaatt tcgtagactt 1620  
ctaagaactg caagcatggg ttctcgaaca gtaatgagcc caagtcaccg tcatcatcga 1680  
aagatttag 1689

<210> 27

<211> 562

5 <212> PRT

ES 2 373 614 T3

<213> Glycine max

<400> 27

Met Gly Leu Cys Phe Ser Ser Thr Lys Val Ser Gly Ser Ser Ser Asn



ES 2 373 614 T3

Gly Lys Arg Phe Gln Asp Ile Val Gly Ser Ala Tyr Tyr Val Ala Pro  
 260 265 270

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

Gly Val Ile Thr Tyr Ile Leu Leu Cys Gly Arg Arg Pro Phe Trp Asp  
 290 295 300

Lys Thr Glu Asp Gly Ile Phe Lys Glu Val Leu Arg Asn Lys Pro Asp  
 305 310 315 320

Phe Arg Arg Lys Pro Trp Pro Thr Ile Ser Asn Ala Ala Lys Asp Phe  
 325 330 335

Met Lys Lys Leu Leu Val Lys Asp Pro Arg Ala Arg Tyr Ala Ala Ala  
 340 345 350

Gln Ala Leu Ser His Pro Trp Val Arg Glu Gly Gly Glu Ala Leu Glu  
 355 360 365

Ile Pro Ile Asp Ile Ser Val Leu Asn Asn Met Arg Gln Phe Val Lys  
 370 375 380

Tyr Ser Arg Leu Lys Gln Phe Ala Leu Arg Ala Leu Ala Ser Thr Leu  
 385 390 395 400

Asn Glu Gly Glu Leu Ser Asp Leu Lys Asp Gln Phe Asp Ala Ile Asp  
 405 410 415

Val Asp Lys Asn Gly Ser Ile Ser Leu Glu Glu Met Arg Gln Ala Leu  
 420 425 430

Ala Lys Asp Gln Pro Trp Lys Leu Lys Glu Ser Arg Val Leu Glu Ile  
 435 440 445

Leu Gln Ala Ile Asp Ser Asn Thr Asp Gly Leu Val Asp Phe Thr Glu  
 450 455 460

Phe Val Ala Ala Thr Leu His Val His Gln Leu Glu Glu His Asp Ser  
 465 470 475 480

Asp Lys Trp Gln Gln Arg Ser Gln Ala Ala Phe Glu Lys Phe Asp Leu  
 485 490 495

ES 2 373 614 T3

Asp Lys Asp Gly Tyr Ile Thr Pro Asp Glu Leu Arg Met His Thr Gly  
500 505 510

Leu Arg Gly Ser Ile Asp Pro Leu Leu Glu Glu Ala Asp Thr Asp Lys  
515 520 525

Asp Gly Lys Ile Ser Leu Pro Glu Phe Arg Arg Leu Leu Arg Thr Ala  
530 535 540

Ser Met Gly Ser Arg Thr Val Met Ser Pro Ser His Arg His His Arg  
545 550 555 560

Lys Ile

<210> 28

<211> 44

5 <212> ARN

<213> Desconocido

<220>

<223> Iniciador

<400> 28

10 cgacuggagc acgaggacac ugacauggac ugaaggagua gaaa 44

<210> 29

<211> 23

<212> ADN

<213> Desconocido

15 <220>

<223> Iniciador

<400> 29

cgactggagc acgaggacac tga 23

<210> 30

20 <211> 26

<212> ADN

<213> Desconocido  
<220>  
<223> Iniciador  
<400> 30  
5 ggacactgac atggactgaa ggagta 26  
<210> 31  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Desconocido  
10 <220>  
<223> Iniciador  
<400> 31  
tagcaagagc ctgtctcatc toctcaag 28  
<210> 32  
15 <211> 28  
<212> ADN  
<213> Desconocido  
<220>  
<223> Iniciador  
20 <400> 32  
tgctagccaa tgccttagt gcaaattg 28

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para conferir resistencia a los nematodos a una planta, comprendiendo dicho método las etapas de:
- a) preparar un ácido nucleico que codifica una molécula de ARNs que tiene una región que es absolutamente idéntica a una porción de un gen como el CDPK, en donde el ácido nucleico es capaz de formar un transcrito bicatenario de una porción de un gen como el CDPK una vez expresado en la planta;
  - b) transformar una planta receptora con dicho ácido nucleico;
  - c) producir uno o más descendientes transgénicos de dicha planta receptora; y
  - d) seleccionar la descendencia para resistencia a los nemátodos;
- en donde la porción de un gen como el CDPK es de un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste de:
- a) un polinucleótido que comprende una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2;
  - b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3;
  - c) un polinucleótido que tiene 70% de identidad de secuencia con un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2;
  - d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene 70% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3;
  - e) un polinucleótido que comprende un fragmento de al menos 200 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2.
2. El uso de una molécula de ARNs que comprende i) una primera cadena que contiene una secuencia absolutamente idéntica a una porción de un gen como el CDPK, y ii) una segunda cadena que contiene una secuencia complementaria sobre todos sus nucleótidos con la primera cadena, en donde la porción de un gen como el CDPK es de un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste de:
- a) un polinucleótido que comprende una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2;
  - b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3;
  - c) un polinucleótido que tiene 70% de identidad de secuencia con un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2;
  - d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene 70% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3;
  - e) un polinucleótido que comprende un fragmento de al menos 200 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2
- para conferir resistencia a los nemátodos parásitos de la planta.
3. El uso de un reservorio de moléculas de ARNs que comprende una multiplicidad de moléculas de ARN cada una conteniendo una región bicatenaria que tiene una longitud de 19 a 24 nucleótidos, en donde dichas moléculas de ARNs se derivan de un polinucleótido seleccionado el grupo que consiste de:
- a) un polinucleótido que comprende una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2;
  - b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3;
  - c) un polinucleótido que tiene 90% de identidad de secuencia con un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2; y

- d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene 90% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3;
- para conferir resistencia a los nemátodos parásitos de la planta.
- 5 4. Una planta transgénica resistente a nemátodos parásitos capaz de expresar una ARNs que sea absolutamente idéntica a una porción de un gen como el CDPK, en donde la porción de un gen como el CDPK es de un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste de:
- a) un polinucleótido que comprende una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2;
- b) un polinucleótido que tiene 95% de identidad de secuencia con un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2;
- 10 c) un polinucleótido que comprende un fragmento de al menos 200 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2.
5. La planta de la reivindicación 4, en donde la ARNs comprende una multiplicidad de moléculas de ARN cada una conteniendo una región bicatenaria que tiene una longitud de 19 a 24 nucleótidos, en donde dichas moléculas de ARN se derivan de una porción de un polinucleótido seleccionado el grupo que consiste de:
- 15 a) un polinucleótido que comprende una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2;
- b) un polinucleótido que tiene 95% de identidad de secuencia con un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2.
6. Un método para elaborar una planta transgénica resistente a los nemátodos capaz de expresar un ARNs que inhibe la expresión de un gen como el CDPK en la planta, dicho método comprendiendo las etapas de i) preparar un ácido nucleico que tiene una región que es absolutamente idéntica a una porción de un gen como el CDPK, en donde el ácido nucleico es capaz de formar un transcripto bicatenario una vez expresado en la planta; ii) transformar una planta receptora con dicho ácido nucleico; iii) producir uno o más descendientes transgénicos de dicha planta receptora, y iv) seleccionar la descendencia para expresión de dicho transcripto, en donde la porción de un gen como el CDPK es de un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste de:
- 20 a) un polinucleótido que comprende una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2;
- b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3;
- c) un polinucleótido que tiene 70% de identidad de secuencia con un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2;
- 25 d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene 70% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3;
- e) un polinucleótido que comprende un fragmento de al menos 200 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el ARNs comprende una multiplicidad de moléculas de ARN cada una conteniendo una región bicatenaria que tiene una longitud de 19 a 24 nucleótidos, en donde dichas moléculas de ARN se derivan de un polinucleótido seleccionado el grupo que consiste de:
- 30 a) un polinucleótido que comprende una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2;
- b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3;
- c) un polinucleótido que tiene 90% de identidad de secuencia con un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2; y
- 35 d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene 90% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3.
- 40

8. La planta de cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, en donde la planta se selecciona d entre el grupo que consiste de soja, patata, tomate, cacahuete, algodón, mandioca, café, coco, piña, árboles de cítricos, plátano, maíz, colza, remolacha, girasol, sorgo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, judías verdes, habas, guisantes y tabaco.
- 5 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, en donde el ARNs se expresa en las raíces o sincitios de la planta.
- 10 10. Un método para controlar la infección de una planta por un nemátodo parásito, que comprende las etapas de transformar la planta con un ácido nucleico que codifica una molécula de ARNs operativamente enlazada a un promotor preferido del sitio de alimentación del nemátodo o inducible por nemátodo, preferido de la raíz, mediante el cual al ARNs que contiene una cadena que es absolutamente idéntica a una porción de un ácido nucleico objetivo esencial para la formación, desarrollo o soporte del sitio de alimentación, en particular la formación, desarrollo o soporte de sincitios o células gigantes, controlando así la infección de la planta por el nemátodo por medio de la remoción o incapacitando funcionalmente el sitio de alimentación, los sincitios o células gigantes, en donde el ácido nucleico objetivo es un gen como el CDPK, en donde la porción de un gen como el CDPK es de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste de:
- 15 a) un polinucleótido que comprende una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2;
- b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3;
- c) un polinucleótido que tiene 70% de identidad de secuencia con un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, ó 2;
- 20 d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene 70% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3.

Figura 1

<u>Nombre del gen</u>	<u>Especie</u>	<u>SEQ ID NO:</u>
Secuencia parcial de ADNc 49806575	Glycine max	1
Secuencia sentido del fragmento 49806575	Glycine max	2
Traducción del EST parcial 49806575	Glycine max	3
ADN para AY821654	Medicago truncatula	4
Secuencia sintetizada descrita en el Ejemplo 1	Glycine max	5
Promotor de TPP	Arabidopsis thaliana	6
Proteína AY821654	Medicago truncatula	7
ADN para AY823957	Medicago truncatula	8
Proteína AY823957	Medicago truncatula	9
ADN para AF435451	Nicotiana tabacum	10
Proteína AF435451	Nicotiana tabacum	11
ADN para AY971376	Nicotiana tabacum	12
Proteína AY971376	Nicotiana tabacum	13
ADN para AF030879	Solanum tuberosum	14
Proteína AF030879	Solanum tuberosum	15
ADN para At2g17890	Arabidopsis thaliana	16
Proteína At2g17890	Arabidopsis thaliana	17
ADN para At4g36070	Arabidopsis thaliana	18
Proteína At4g36070	Arabidopsis thaliana	19
ADN para At5g66210	Arabidopsis thaliana	20
Proteína At5g66210	Arabidopsis thaliana	21
ADN para NM_001052286	Oryza sativa	22
Proteína NM_001052286	Oryza sativa	23
ADN para NM_001065979	Oryza sativa	24
Proteína NM_001065979	Oryza sativa	25
ADN para RKF 195-3	Glycine max	26

Figura 1

(continuación)

<u>Nombre del gen</u>	<u>Especie</u>	<u>SEQ ID NO:</u>
<i>Proteína RKF 195-3</i>	<i>Glycine max</i>	27
Oligo de ARN GeneRacer	desconocida	28
Iniciador 5' GeneRacer	desconocida	29
Iniciador Anidado 5' GeneRacer	desconocida	30
Iniciador RACE 5' 49806575	desconocida	31
Iniciador Anidado RACE 5' 49806575	desconocida	32

5

10

15

20

25

FIGURA 2a

```

Hygene_49806575 (1) -----
Gm_RKF195-3 (1) -MGLCFSSSTKVVSGSSSSNNNNN-----NNASSNRNR-----KCSAA
St_AF030879 (1) -MGSCFSSSKVSGSNSNTPSTNNTATNTNTTNNVHVPNRRETSKAPSTTVV
Nt_AF435451 (1) MGNNCFSSSKVSGSNSNTPST----TATATTVNVRRNK---ANPPSTSTI
Mt_AY821654 (1) -MGLCFSSSTKVVSGSNSNTTNNDRKRNRQSTTTDTTVT-----
Mt_AY823957 (1) -MGLCFSSSTKVVSGS-NSNTT-----NNDNRKRNRQ-----STTTD
Nt_AY971376 (1) -MGSCFSSSKVSGSNSNTPST-----TTTNVNVHNR---PSTTTTTTV
At4g36070 (1) -MGLCFSSPK-ATRRGTGSRNPNPDSPTQKASEKVS-----
At2g17890 (1) -MGLCFSSAAKSSGHNRRSRNPHPHPLTVVKSRPPRSP-----CS-F
At5g66210 (1) -MGVCFSAIRVTGASSRRSS-----
Os_NM_001065979 (1) -MGLCSSSARRDAGTPGGG-----
Os_NM_001052286 (1) -MGACFSSHTATAAADGGSGK-----

Hygene_49806575 (1) -----
Gm_RKF195-3 (35) PAAAAPPEPVTPOKKQPSQAQRRRVPEESRKNPRAKDKAGARRQ-GTRVP
St_AF030879 (50) NSRNQEGSNYNRGKGNINQKNQK--QPRNSQQ--NVKPSRRQ-GGVIP
Nt_AF435451 (44) TSTKQEGSHCNKQKVKDNHKSQHQQQPRNSQQNVKHNNGRRQKSGVIA
Mt_AY821654 (38) -----VTTATTAAQKQTAQRRKGGSNETAQKKNHHQHHLKEKTGSKHVP
Mt_AY823957 (34) TTVTVTTATTAAQKQTAQRRKGGSNETAQKKNHHQHHLKEKTG-SKHVP
Nt_AY971376 (41) TSRKQEGSNYNRDKGNINTKNSHQKQPPRSSQQNVVVKPSRRQSGGVI P
At4g36070 (37) -----KNKKNTKKIQLRHQGGI P
At2g17890 (42) MAVTIQKDHRTQPRRNATAKKTPTRHTPPHGKVVREKVISNNGRRRHGETIP
At5g66210 (21) -----Q--TKSKAAPTPI DTKASTKRRTGSIP
Os_NM_001065979 (20) -----NGAGNKDNAGRKG---IVA
Os_NM_001052286 (21) -----R--QQRKGDHKGKLPDGGGGE---KEK

Hygene_49806575 (1) -----
Gm_RKF195-3 (84) CGKRTDFGYEKDFENRFSLGKLLGHGQFGYTYVGI DKKNGDRVAVKRLEK
St_AF030879 (95) CGKRTDFGYDKDFEKRYTIGKLLGHGQFGYTYVATDKSSGDRVAVKRLEK
Nt_AF435451 (94) CGKRTDFGYDKDFDKRFTIGKLLGHGQFGYTYVATHKSNDRVAVKRLEK
Mt_AY821654 (83) CGKRTDFGYEKDFDKRFSLGKLLGHGQFGYTYVGV DKSNGDRVAVKRLEK
Mt_AY823957 (83) CGKRTDFGYEKDFDKRFSLGKLLGHGQFGYTYVGV DKSNGDRVAVKRLEK
Nt_AY971376 (91) CGKRTDFGYDKDFDKRYTIGKLLGHGQFGYTYVATDRSSGDRVAVKKIEK
At4g36070 (55) YGKRIDFGYAKDFDNRYTIGKLLGHGQFGFTYVATDNNNGNRVAVKRIDK
At2g17890 (92) YGKRVDGKYAKDFDHRYTIGKLLGHGQFGYTYVATDKKTGDRVAVKKIDK
At5g66210 (46) CGKRTDFGYSKDFHDHYTIGKLLGHGQFGYTYVAI HRPNGDRVAVKRLDK
Os_NM_001065979 (36) CGKRTDFGYDKDFEARYALGKLLGHGQFGYTFAAVDRRSERVAVKRIDK
Os_NM_001052286 (43) EAARVEFGYERDFEGRYQVGRLLGHGQFGYTFAATDRASGDRVAVKRIDK

Hygene_49806575 (1) -----
Gm_RKF195-3 (134) SKMVLPIAVEDVKREVKILKELTGHENVVQFFNAFEDDSYVYIVMELCEG
St_AF030879 (145) NKMVLPIAVEDVKREVKILKALGRHENVVQFYNSFEDHNYVYIVMELCEG
Nt_AF435451 (144) NKMVLPIAVEDVKREVKILKALSGHENVVQFNNAFEDDNYVYIVMELCEG
Mt_AY821654 (133) AKMVLPIAVEDVKREVKILKELTGHENVVQFYNAFDDDSYVYIVMELCEG
Mt_AY823957 (133) AKMVLPIAVEDVKREVKILKELTGHENVVQFYNAFDDDSYVYIVMELCEG
Nt_AY971376 (141) NKMVLPIAVEDVKREVKILKALAGHENVVQFYNSFEDDNYVYIVMELCEG
At4g36070 (105) AKMTQPIEVEDVKREVKILQALGGHENVVGFHNAFEDKTYI YIVMELCDG
At2g17890 (142) AKMTIPIAVEDVKREVKILQALTGHENVVRFYNAFEDKNSVYIVMELCEG
At5g66210 (96) SKMVLPIAVEDVKREVQILIALSGHENVVQFHNAFEDDDYVYIVMELCEG
Os_NM_001065979 (86) NKMVLPAVEDVKREVKILKALQGHENVVHFYNAFEDDNYVYIVMELCEG
Os_NM_001052286 (93) AKMVRPVAVEDVKREVKILKELKGHENIVHFYNAFEDDSYVYIVMELCEG

```

FIGURA 2b

```

Hygiene_49806575 (1) -----
Gm_RKF195-3 (184) GELLDRI LAKKDSRYTEKDAAVVVRQMLKVA AECHLHGLVHRDMKPENFL
St_AF030879 (195) GELLDDCQKTVG--- IREDAAIVVPQMLKVA AECHLHGLVHRDMKPENFL
Nt_AF435451 (194) GELLDRI LAKKDSRYAEKDAAIVVRQMLKEAAQCHLHGLVHRDMKPENFL
Mt_AY821654 (183) GELLDRI LNKKDSRYTEKDAAVVVRQMLKVA AQCHLHGLVHRDMKPENFL
Mt_AY823957 (183) GELLDRI LNKKDSRYTEKDAAVVVRQMLKVA AQCHLHGLVHRDMKPENFL
Nt_AY971376 (191) GELLDRI LSKKDSRYTEKDAAI VVRQMLKVA AECHLHGLVHRDMKPENFL
At4g36070 (155) GELLDRI LAKKDSRYTEKDAAVVVRQMLKVA AECHLRGLVHRDMKPENFL
At2g17890 (192) GELLDRI LARKDSRYSERDAAV VVRQMLKVA AECHLRGLVHRDMKPENFL
At5g66210 (146) GELLDRI LSKKGNRYSEKDAAV VVRQMLKV AGECHLHGLVHRDMKPENFL
Os_NM_001065979 (136) GELLDRI LAKKDSRYSEKDAAV VVRQMLKVA AECHLHGLVHRDMKPENFL
Os_NM_001052286 (143) GELLDRI LAKKNSRYSEKDAAV VVRQMLKVA AECHLHGLVHRDMKPENFL

Hygiene_49806575 (1) -----
Gm_RKF195-3 (234) FKSTKEDSPLKATDFGLSDFIKPGKRFQDIVGSAYYVAPEVLKRKSGPES
St_AF030879 (242) FKSTKEDSPLKATDFGSSDFIRPGK-VQDIVGSAYYVAPEVLKRKSGPES
Nt_AF435451 (244) FKSSKEDSPLKATDFGLSDFIRPGKFKFQDIVGSAYYVAPEVLKRKSGPES
Mt_AY821654 (233) FKSNKEDSALKATDFGLSDFIKPGKRFQDIVGSAYYVAPEVLKRKSGPES
Mt_AY823957 (233) FKSNKEDSALKATDFGLSDFIKPGKRFQDIVGSAYYVAPEVLKRKSGPES
Nt_AY971376 (241) FKLFKGGFAIKSTDFGLSDFIRPGKFKFQDIVGSAYYVAPEVLKRKSGPES
At4g36070 (205) FKSTEEGSSLKATDFGLSDFIKPGVKFQDIVGSAYYVAPEVLKRKSGPES
At2g17890 (242) FKSTEEDSPLKATDFGLSDFIKPGKFKH DIVGSAYYVAPEVLKRKSGPES
At5g66210 (196) FKSAQLDSPLKATDFGLSDFIKPGKRFH DIVGSAYYVAPEVLKRKSGPES
Os_NM_001065979 (186) FKSTKEDS SLKATDFGLSDFIRPGKHFR DIVGSAYYVAPEVLKRKSGPES
Os_NM_001052286 (193) FKSTKEDSPLKATDFGLSDFIKPGKFKH DIVGSAYYVAPEVLKRKSGPES

Hygiene_49806575 (1) -----
Gm_RKF195-3 (284) DVWSIGVITYIILLCGRRPFWDKTEDGIFKEVLRNKPDFRRKPWPTISNAA
St_AF030879 (291) DVWSIGVITYIILLCGRRPFWDKTEDGIFKEVLRNKPDFRRKPWSNISNSA
Nt_AF435451 (294) DEWSIGVITYIILLCGRRRFWDKTEDGIFKEVLRNKPDFRRKPWPTISNSA
Mt_AY821654 (283) DVWSIGVITYIILLCGRRPFWDKTEDGIFKEVLRNKPDFRRKPWPTISNAA
Mt_AY823957 (283) DVWSIGVITYIILLCGRRPFWDKTEDGIFKEVLRNKPDFRRKPWPTISNAA
Nt_AY971376 (291) DVWSIGVITYIILLCGRRRFWDKTEDGIFKEVLRNKPDFRRKPWPNISNSA
At4g36070 (255) DVWSIGVITYIILLCGRRPFWDKTQDGI FNEVMRKKPDFREVPWPTISNGA
At2g17890 (292) DVWSIGVISYIILLCGRRPFWDKTEDGIFKEVLK NKPDFRRKPWPTISNSA
At5g66210 (246) DVWSIGVITYIILLCGRRPFWDRTEDGIFKEVLRNKPDFSRKPWATISDSA
Os_NM_001065979 (236) DVWSIGVITYIILLCGRRPFWDKTEDGIFKEVLK NKPDFRRKPWPNIITPCA
Os_NM_001052286 (243) DVWSIGVITYIILLCGRRPFWNKTEDGIFREVL RNKPDFRKKPWPGISSGA

Hygiene_49806575 (1) -----DPRARYTAAQALSHPWVREGGEALEIPIDISVLNNMRQFV
Gm_RKF195-3 (334) KDFVKLLLVKDPRARYAAAQALSHPWVREGGEALEIPIDISVLNNMRQFV
St_AF030879 (341) KDFVKLLLVKDPRARLTAAQALSHPWVREGGDASEIPLDISVLSNMQRQFV
Nt_AF435451 (344) KDFVKLLLVKDPRARLTAAQALSHPWVREGGDASEIPLDISVLSNMQRQFV
Mt_AY821654 (333) KDFVKLLLVKDPRARLTAAQALSHPWVREGGEASEIPIDISVLNNMRQFV
Mt_AY823957 (333) KDFVKLLLVKDPRARLTAAQALSHPWVREGGEASEIPIDISVLNNMRQFV
Nt_AY971376 (341) KDFVKLLLVKDPRARLTAAQALSHPWVREGGIASEIPLDISVLSNMQRQFV
At4g36070 (305) KDFVKLLLVKEPRARLTAAQALSHSWVKEGGEASEVPIDISVLNNMRQFV
At2g17890 (342) KDFVKLLLVKDPRARLTAAQALSHPWVREGGDASEIPIDISVLNNMRQFV
At5g66210 (296) KDFVKLLLVKDPRARLTAAQALSHAWVREGGNATDIPVDISVLNNLRQFV
Os_NM_001065979 (286) KDFVQKLLLVKDPRARLTAAQALSHWVREGGQASDIPLDISVLHNMQRQFV
Os_NM_001052286 (293) KDFVKLLLVKNPRARLTAAQALSHPWVREGGEASEIPVDISVLSNMQRQFV

```

FIGURA 2c

Hygene_49806575	(41)	KYSRLKQFALRALASTLNEGELSDLKDQFDAIDVDKNGSISLEEMRQALA
Gm_RKF195-3	(384)	KYSRLKQFALRALASTLNEGELSDLKDQFDAIDVDKNGSISLEEMRQALA
St_AF030879	(391)	RYSHLKQFALRALRSTLDEEEIADLRDQFSAIDVDKNGVISLEEMRQALA
Nt_AF435451	(394)	KYSRLKQFALRALASTVDEEELADVRDQFSAIDVDKNGVISLEEMRQALA
Mt_AY821654	(383)	KYSRLKQFALRALASTLNEGELSDLKDQFDAIDVDKNGAISLEEMRQALA
Mt_AY823957	(383)	KYSRLKQFALRALASTLNEGELSDLKDQFDAIDVDKNGAISLEEMRQALA
Nt_AY971376	(391)	RYSRLKQFALRALASTLDEEEELSDLKDQFSAIDVDKNGVISLEEMRQALA
At4g36070	(355)	KFSRLKQIALRALAKTINEDELDDLDRDQFDAIDIDKNGSISLEEMRQALA
At2g17890	(392)	KFSRLKQFALRALATTLDEEELADLRDQFDAIDVDKNGVISLEEMRQALA
At5g66210	(346)	RYSRLKQFALRALASTLDEAEISDLDRDQFDAIDVDKNGVISLEEMRQALA
Os_NM_001065979	(336)	KYSRFKQFALRALASTLNAEELSDLDRDQFNAIDVDKNGTISLEELKQALA
Os_NM_001052286	(343)	KYSRFKQFALRALASTLKEEELADLDKQFDAIDVDKSGSISIEEMRHALA
Hygene_49806575	(91)	KDQPWKLKESRVLEILQAIDSNTDGLVDFTEFVAATLHVHQLEEHSDKW
Gm_RKF195-3	(434)	KDQPWKLKESRVLEILQAIDSNTDGLVDFTEFVAATLHVHQLEEHSDKW
St_AF030879	(441)	KDLPWKMKESRVLEILQAIDSNTDGLVDFPEFVAATLHVHQLEEHNSAKW
Nt_AF435451	(444)	KDLPWKMKESRVLEILQAIDSNSDGLLDFPEFVAATLHVHQLEEHNSIKW
Mt_AY821654	(433)	KDLPWKLKESRVLEILQAIDSNTDGLVDFTEFVAATLHVHQLEEHSDKW
Mt_AY823957	(433)	KDLPWKLKESRVLEILQAIDSNTDGLVDFTEFVAATLHVHQLEEHSDKW
Nt_AY971376	(441)	KDLPWKMKESRVLEILQAIDSNTDGLVDFPEFVAATLHVHQLEEHNSTKW
At4g36070	(405)	KDVPWKLKDARVAEILQANDSNTDGLVDFTEFVVAALHVNQLEEHSDSEKW
At2g17890	(442)	KDHPWKLKDARVAEILQAIDSNTDGFVDFGEFVAAALHVNQLEEHSDSEKW
At5g66210	(396)	KDLPWKLKDSRVAEILEAIDSNTDGLVDFTEFVAAALHVNQLEEHSDSEKW
Os_NM_001065979	(386)	KDVPWRLKGPVLEIVEAIDSNTDGLVDFEEFVAATLHVHQLVEHDTEKW
Os_NM_001052286	(393)	KDLPWRLKGPVLEIIQAIDSNTDGLVDFEEFVAATLHIHQMAELDSERW
Hygene_49806575	(141)	QQRSQAAFEKFDLDKDG YITPDEL RMH--TGLRGSIDPLLEEADIDKDGK
Gm_RKF195-3	(484)	QQRSQAAFEKFDLDKDG YITPDEL RMH--TGLRGSIDPLLEEADIDKDGK
St_AF030879	(491)	QQRSQAAFEKFDVDRDGFITPEELKMH--TGLRGSIDPLLEEADIDKDGK
Nt_AF435451	(494)	QERSQAAFEKFDVDRDGFITPEELRMH--TGLKGSIDPLLEEADIDKDGK
Mt_AY821654	(483)	QQRSQAAFEKFDIDKDG YITPEELRMH--TGMRGSIDPLLEEADIDKDGK
Mt_AY823957	(483)	QQRSQAAFEKFDVDRDGFITPEELKMH--TGLRGSIDPLLEEADIDKDGK
Nt_AY971376	(491)	QQRSQAAFEKFDVDRDGFITPEELKMH--TGLKGSIDPLLEEADIDKDGK
At4g36070	(455)	QQRSRAAFDKFDIDGDGFITPEELRLQ--TGLKGSIEPLLEEADVDEGR
At2g17890	(492)	QQRSRAAFDKFDIDGDGFITAEELRMH--TGLKGSIEPLLEEADIDNDGK
At5g66210	(446)	QLRSRAAFDKFDLDKDG YITPEELRMH--TGLRGSIDPLLEEADIDRDGK
Os_NM_001065979	(436)	KLSLSQAAFDKFDVGDG YITSDELRMQ--TGLKGSIDPLLEEADIDRDGK
Os_NM_001052286	(443)	GLRCQAAFSKFDLDG DG YITPDEL RMVQHTGLKGSIEPLLEEADIDKDGK
Hygene_49806575	(189)	ISLPEFRLLRTASMGSRVTVMSPSHRHRKI---
Gm_RKF195-3	(532)	ISLPEFRLLRTASMGSRVTVMSPSHRHRKI---
St_AF030879	(539)	ISISEFRLLRTASMTS-----PTVRDSRGM---
Nt_AF435451	(542)	ISLSEFRLLRTASISSRMVTSPTVRGSRKS---
Mt_AY821654	(531)	ISLPEFRLLRTASIGSRNVTSPTLRHRI----
Mt_AY823957	(531)	ISLPEFRLLRTASIGSRNVTSPTLRHRI----
Nt_AY971376	(539)	ISLSEFRLLRTASMSS-----PTVRDSRRNVAL
At4g36070	(503)	ISINEFRLLRSASLKSKNVKSPPGYQLSQKM--
At2g17890	(540)	ISLQEFRLLRTASIKSRNVRSPPGYLISRKV--
At5g66210	(494)	ISLHEFRLLRTASISSQRAPSPAGHRNLR----
Os_NM_001065979	(484)	ISLDEFRLLKTASMSSRNVTQTPRSVHRS-----
Os_NM_001052286	(493)	ISLSEFRKLLRTASMS--NLPSPRGPPNPQPL--

FIGURA 3

Porcentaje de identidad (aminoácidos)

5

	49806575	Gm_ RKF195-3	Mt_ AY821654	Mt_ AY823957	Nt_ AF435451	Nt_ AY971376	St_ AF030879	At2g17890	At4g36070	At5g66210	Os_NM_ 00105228 6	Os_NM_ 00106597 9
49806575	100	99	94	94	83	86	84	81	76	82	78	79
Gm_RKF195-3			93	93	82	86	83	80	76	82	77	78
Mt_AY821654				100	86	88	86	84	78	83	78	79
Mt_AY823957					86	88	86	84	78	83	78	79
Nt_AF435451						92	91	82	73	79	76	76
Nt_AY971376							94	83	74	83	78	79
St_AF030879								81	73	82	76	76
At2g17890									84	82	75	76
At4g36070										75	72	72
At5g66210											75	76
Os_NM_001052286												78
Os_NM_001065979												

10

15

20

FIGURA 4

5

Porcentaje de identidad (ácido nucleótido)

	49806575	Gm_ RKF195-3	M_ AY823957	M_ AY821654	Ni_ AF435451	Ni_ AY971376	St_ AF030879	Ai2g17890	Ai4g36070	Ai5g66210	Os_NM_ 00105228 6	Os_NM_ 00106597 9
49806575	100	100	90	90	76	75	78	76	74	76	72	73
Gm_RKF195-3		100	90	90	76	74	77	76	74	76	72	73
Mt_AY823957			100	100	75	74	76	75	74	76	72	74
Mt_AY821654				100	75	74	76	75	74	76	72	74
Ni_AF435451					100	85	86	72	70	73	71	71
Ni_AY971376						100	92	72	68	74	69	71
St_AF030879							100	74	70	75	70	72
Ai2g17890								100	81	77	69	72
Ai4g36070									100	73	68	70
Ai5g66210										100	69	70
Os_NM_00105228											100	73
Os_NM_00106597												100

10

15

20

Figura 5a

posiciones de los nucleótidos de 21 mers de genes como el CDPK									
por ejemplo SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, ó 26									
nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido	
1	21	37	57	73	93	109	129	145	165
2	22	38	58	74	94	110	130	146	166
3	23	39	59	75	95	111	131	147	167
4	24	40	60	76	96	112	132	148	168
5	25	41	61	77	97	113	133	149	169
6	26	42	62	78	98	114	134	150	170
7	27	43	63	79	99	115	135	151	171
8	28	44	64	80	100	116	136	152	172
9	29	45	65	81	101	117	137	153	173
10	30	46	66	82	102	118	138	154	174
11	31	47	67	83	103	119	139	155	175
12	32	48	68	84	104	120	140	156	176
13	33	49	69	85	105	121	141	157	177
14	34	50	70	86	106	122	142	158	178
15	35	51	71	87	107	123	143	159	179
16	36	52	72	88	108	124	144	160	180
17	37	53	73	89	109	125	145	161	181
18	38	54	74	90	110	126	146	162	182
19	39	55	75	91	111	127	147	163	183
20	40	56	76	92	112	128	148	164	184
21	41	57	77	93	113	129	149	165	185
22	42	58	78	94	114	130	150	166	186
23	43	59	79	95	115	131	151	167	187
24	44	60	80	96	116	132	152	168	188
25	45	61	81	97	117	133	153	169	189
26	46	62	82	98	118	134	154	170	190
27	47	63	83	99	119	135	155	171	191
28	48	64	84	100	120	136	156	172	192
29	49	65	85	101	121	137	157	173	193
30	50	66	86	102	122	138	158	174	194
31	51	67	87	103	123	139	159	175	195
32	52	68	88	104	124	140	160	176	196
33	53	69	89	105	125	141	161	177	197
34	54	70	90	106	126	142	162	178	198
35	55	71	91	107	127	143	163	179	199
36	56	72	92	108	128	144	164	180	200

Figura 5b

posiciones de los nucleótidos de 21 mer de genes como el CDPK									
por ejemplo SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, ó 26									
nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido	
181	201	217	237	253	273	289	309	325	345
182	202	218	238	254	274	290	310	326	346
183	203	219	239	255	275	291	311	327	347
184	204	220	240	256	276	292	312	328	348
185	205	221	241	257	277	293	313	329	349
186	206	222	242	258	278	294	314	330	350
187	207	223	243	259	279	295	315	331	351
188	208	224	244	260	280	296	316	332	352
189	209	225	245	261	281	297	317	333	353
190	210	226	246	262	282	298	318	334	354
191	211	227	247	263	283	299	319	335	355
192	212	228	248	264	284	300	320	336	356
193	213	229	249	265	285	301	321	337	357
194	214	230	250	266	286	302	322	338	358
195	215	231	251	267	287	303	323	339	359
196	216	232	252	268	288	304	324	340	360
197	217	233	253	269	289	305	325	341	361
198	218	234	254	270	290	306	326	342	362
199	219	235	255	271	291	307	327	343	363
200	220	236	256	272	292	308	328	344	364
201	221	237	257	273	293	309	329	345	365
202	222	238	258	274	294	310	330	346	366
203	223	239	259	275	295	311	331	347	367
204	224	240	260	276	296	312	332	348	368
205	225	241	261	277	297	313	333	349	369
206	226	242	262	278	298	314	334	350	370
207	227	243	263	279	299	315	335	351	371
208	228	244	264	280	300	316	336	352	372
209	229	245	265	281	301	317	337	353	373
210	230	246	266	282	302	318	338	354	374
211	231	247	267	283	303	319	339	355	375
212	232	248	268	284	304	320	340	356	376
213	233	249	269	285	305	321	341	357	377
214	234	250	270	286	306	322	342	358	378
215	235	251	271	287	307	323	343	359	379
216	236	252	272	288	308	324	344	360	380

Figura 5c

posiciones de los nucleótidos de 21 mers de genes como el CDPK									
por ejemplo SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, ó 26									
nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido	
361	381	397	417	433	453	469	489	505	525
362	382	398	418	434	454	470	490	506	526
363	383	399	419	435	455	471	491	507	527
364	384	400	420	436	456	472	492	508	528
365	385	401	421	437	457	473	493	509	529
366	386	402	422	438	458	474	494	510	530
367	387	403	423	439	459	475	495	511	531
368	388	404	424	440	460	476	496	512	532
369	389	405	425	441	461	477	497	513	533
370	390	406	426	442	462	478	498	514	534
371	391	407	427	443	463	479	499	515	535
372	392	408	428	444	464	480	500	516	536
373	393	409	429	445	465	481	501	517	537
374	394	410	430	446	466	482	502	518	538
375	395	411	431	447	467	483	503	519	539
376	396	412	432	448	468	484	504	520	540
377	397	413	433	449	469	485	505	521	541
378	398	414	434	450	470	486	506	522	542
379	399	415	435	451	471	487	507	523	543
380	400	416	436	452	472	488	508	524	544
381	401	417	437	453	473	489	509	525	545
382	402	418	438	454	474	490	510	526	546
383	403	419	439	455	475	491	511	527	547
384	404	420	440	456	476	492	512	528	548
385	405	421	441	457	477	493	513	529	549
386	406	422	442	458	478	494	514	530	550
387	407	423	443	459	479	495	515	531	551
388	408	424	444	460	480	496	516	532	552
389	409	425	445	461	481	497	517	533	553
390	410	426	446	462	482	498	518	534	554
391	411	427	447	463	483	499	519	535	555
392	412	428	448	464	484	500	520	536	556
393	413	429	449	465	485	501	521	537	557
394	414	430	450	466	486	502	522	538	558
395	415	431	451	467	487	503	523	539	559
396	416	432	452	468	488	504	524	540	560

Figura 5d

posiciones de los nucleótidos de 21 mers de genes como el CDPK									
por ejemplo SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, ó 26									
nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido	
541	561	577	597	613	633	649	669	685	705
542	562	578	598	614	634	650	670	686	706
543	563	579	599	615	635	651	671	687	707
544	564	580	600	616	636	652	672	688	708
545	565	581	601	617	637	653	673	689	709
546	566	582	602	618	638	654	674	690	710
547	567	583	603	619	639	655	675	691	711
548	568	584	604	620	640	656	676	692	712
549	569	585	605	621	641	657	677	693	713
550	570	586	606	622	642	658	678	694	714
551	571	587	607	623	643	659	679	695	715
552	572	588	608	624	644	660	680	696	716
553	573	589	609	625	645	661	681	697	717
554	574	590	610	626	646	662	682	698	718
555	575	591	611	627	647	663	683	699	719
556	576	592	612	628	648	664	684	700	720
557	577	593	613	629	649	665	685	701	721
558	578	594	614	630	650	666	686	702	722
559	579	595	615	631	651	667	687	703	723
560	580	596	616	632	652	668	688	704	724
561	581	597	617	633	653	669	689	705	725
562	582	598	618	634	654	670	690	706	726
563	583	599	619	635	655	671	691	707	727
564	584	600	620	636	656	672	692	708	728
565	585	601	621	637	657	673	693	709	729
566	586	602	622	638	658	674	694	710	730
567	587	603	623	639	659	675	695	711	731
568	588	604	624	640	660	676	696	712	732
569	589	605	625	641	661	677	697	713	733
570	590	606	626	642	662	678	698	714	734
571	591	607	627	643	663	679	699	715	735
572	592	608	628	644	664	680	700	716	736
573	593	609	629	645	665	681	701	717	737
574	594	610	630	646	666	682	702	718	738
575	595	611	631	647	667	683	703	719	739
576	596	612	632	648	668	684	704	720	740

Figura 5e

posiciones de los nucleótidos de 21 mers de genes como el CDPK									
por ejemplo SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, ó 26									
nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido	
721	741	757	777	793	813	829	849	865	885
722	742	758	778	794	814	830	850	866	886
723	743	759	779	795	815	831	851	867	887
724	744	760	780	796	816	832	852	868	888
725	745	761	781	797	817	833	853	869	889
726	746	762	782	798	818	834	854	870	890
727	747	763	783	799	819	835	855	871	891
728	748	764	784	800	820	836	856	872	892
729	749	765	785	801	821	837	857	873	893
730	750	766	786	802	822	838	858	874	894
731	751	767	787	803	823	839	859	875	895
732	752	768	788	804	824	840	860	876	896
733	753	769	789	805	825	841	861	877	897
734	754	770	790	806	826	842	862	878	898
735	755	771	791	807	827	843	863	879	899
736	756	772	792	808	828	844	864	880	900
737	757	773	793	809	829	845	865	881	901
738	758	774	794	810	830	846	866	882	902
739	759	775	795	811	831	847	867	883	903
740	760	776	796	812	832	848	868	884	904
741	761	777	797	813	833	849	869	885	905
742	762	778	798	814	834	850	870	886	906
743	763	779	799	815	835	851	871	887	907
744	764	780	800	816	836	852	872	888	908
745	765	781	801	817	837	853	873	889	909
746	766	782	802	818	838	854	874	890	910
747	767	783	803	819	839	855	875	891	911
748	768	784	804	820	840	856	876	892	912
749	769	785	805	821	841	857	877	893	913
750	770	786	806	822	842	858	878	894	914
751	771	787	807	823	843	859	879	895	915
752	772	788	808	824	844	860	880	896	916
753	773	789	809	825	845	861	881	897	917
754	774	790	810	826	846	862	882	898	918
755	775	791	811	827	847	863	883	899	919
756	776	792	812	828	848	864	884	900	920

Figura 5f

posiciones de los nucleótidos de 21 mers de genes como el CDPK									
por ejemplo SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, ó 26									
nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido		nucleótido hasta nucleótido	
901	921	937	957	973	993	109	129		
902	922	938	958	974	994	110	130		
903	923	939	959	975	995	111	131		
904	924	940	960	976	996	112	132		
905	925	941	961	977	997	113	133		
906	926	942	962	978	998	114	134		
907	927	943	963	979	999	115	135		
908	928	944	964	980	1000	116	136		
909	929	945	965	981	1001	117	137		
910	930	946	966	982	1002	118	138		
911	931	947	967	983	1003	119	139		
912	932	948	968	984	1004	120	140		
913	933	949	969	985	1005	121	141		
914	934	950	970	986	1006	122	142		
915	935	951	971	987	1007	123	143		
916	936	952	972	988	1008	124	144		
917	937	953	973	989	1009	125	145		
918	938	954	974	990	1010				
919	939	955	975	991	1011				
920	940	956	976	992	1012				
921	941	957	977	993	1013	.....	.....		
922	942	958	978	994	1014	.....	.....		
923	943	959	979	995	1015	n-5	n+15		
924	944	960	980	996	1016	n-4	n+16		
925	945	961	981	997	1017	n-3	n+17		
926	946	962	982	998	1018	n-2	n+18		
927	947	963	983	999	1019	n-1	n+19		
928	948	964	984	1000	1020	n	n+20		
929	949	965	985	1001	1021				
930	950	966	986	1002	1022				
931	951	967	987	1003	1023				
932	952	968	988	1004	1024				
933	953	969	989	1005	1025				
934	954	970	990	1006	1026				
935	955	971	991	1007	1027				
936	956	972	992	1008	1028				

**Figura 5g**

**n = número total de nucleótidos de longitud completa de un polinucleótido que codifica como el CDPK – 20**

5

**Por ejemplo:**

**n = 1025 (= 1045 - 20) para la SEQ ID NO: 1;**

**n = 300 (= 320 - 20) para la SEQ ID NO: 2;**

**n = 1991 (= 2211 - 20) para la SEQ ID NO: 4;**

10 **n = 720 (= 740 - 20) para la SEQ ID NO: 5;**

**n = 1663 (= 1683 - 20) para la SEQ ID NO: 8;**

**n = 1699 (= 1719 - 20) para la SEQ ID NO: 10;**

**n = 1684 (= 1704 - 20) para la SEQ ID NO: 12;**

**n = 1675 (= 1695 - 20) para la SEQ ID NO: 14;**

15 **n = 1696 (= 1716 - 20) para la SEQ ID NO: 16;**

**n = 1585 (= 1605 - 20) para la SEQ ID NO: 18;**

**n = 1552 (= 1572 - 20) para la SEQ ID NO: 20;**

**n = 1549 (= 1569 - 20) para la SEQ ID NO: 22;**

**n = 1519 (= 1539 - 20) para la SEQ ID NO: 24;**

20 **n = 1669 (= 1689 - 20) para la SEQ ID NO: 26;**