

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 845**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07701477 .7**
96 Fecha de presentación: **13.02.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1989306**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2008**

54 Título: **Secuencias de control transcripcional de la oosfera vegetal**

30 Prioridad:
13.02.2006 AU 2006900681

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2012

73 Titular/es:
**ADELAIDE RESEARCH & INNOVATION PTY LTD.
LEVEL 7 118 GRENFELL STREET
ADELAIDE, SA 5064, AU y
GRAINS RESEARCH AND DEVELOPMENT
CORPORATION**

72 Inventor/es:
**SPRUNCK, Stefanie;
BELLMAN, Birgit y
DRESSSELHAUS, Thomas**

74 Agente/Representante:
Pérez Barquín, Eliana

ES 2 381 845 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

Secuencias de control transcripcional de la oosfera vegetal

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a secuencias de control transcripcional. Generalmente, la presente invención se refiere a secuencias control transcripcionales que específicamente o preferencialmente dirigen la expresión de una secuencia de nucleótidos de interés en una oosfera vegetal.

10

Antecedentes de la invención

El principal énfasis en la modificación genética se ha dirigido a células procariotas y a células de mamíferos. Por una diversidad de razones, las plantas han demostrado ser más intransigentes que otras células eucariotas a manipularse genéticamente. Sin embargo, en muchos casos, es deseable efectuar una transcripción de una secuencia de nucleótidos de interés bien específicamente o bien preferencialmente en una parte de planta particular o en una fase de desarrollo particular de la planta. De acuerdo con ello, hay un interés sustancial en identificar secuencias de control transcripcional, tales como promotores o potenciadores, que específicamente o preferencialmente dirigen transcripción directa en órganos, tejidos o tipos celulares vegetales particulares, o en fases de desarrollo particular de la planta.

15

20

La expresión de secuencias de ADN heterólogo en una planta es dependiente de la presencia de una secuencia de control transcripcional unida operativamente, tal como un promotor o potenciador, que sea funcional dentro de la planta. La elección de la secuencia de control transcripcional determinará cuándo y dónde en del organismo se expresa la secuencia de ADN heterólogo. Por ejemplo, donde se desea expresión continua por todas las células de una planta, se utilizan promotores constitutivos. Por el contrario, donde se desea la expresión génica en respuesta a un estímulo, se puede usar un promotor inducible. Donde se desea la expresión en tejidos u órganos específicos, se puede usar un promotor específico de tejido.

25

30

Frecuentemente, es deseable efectuar expresión de una secuencia de ADN en células, tejidos u órganos particulares de una planta. Por ejemplo, la esterilidad masculina y/o femenina en una planta puede llevarse a cabo por manipulación genética del genoma de la planta con un promotor específico de gametos masculinos o femeninos unido operativamente a una proteína tóxica.

35

Alternativamente, puede ser deseable inhibir la expresión de una secuencia de ADN nativa en tejidos vegetales particulares para lograr un fenotipo deseado. En este caso, tal inhibición podría lograrse por transformación de la planta con un promotor específico de tejido unido operativamente a una secuencia de nucleótidos antisentido o a una secuencia de nucleótidos de ARNi, de tal forma que la expresión de estas secuencias produce un transcrito de ARN que interfiere con la traducción del ARNm de la secuencia de ADN nativa.

40

El documento CA 2 383 375 A1 describe las secuencias de ADN de los promotores de tres genes específicos de pistilos en petunia.

45

Las secuencias promotoras que pueden usarse para dirigir la expresión específica de oosferas de interés en plantas superiores no están disponibles actualmente. Esto puede al menos en parte atribuirse a la dificultad en aislar gametos femeninos a partir de plantas de semilla. Como una consecuencia de esta dificultad, los transcritos de oosferas vegetales están pobremente representados en las bases de datos actuales de marcas de secuencias expresadas (EST), que se han generado principalmente por secuenciación a partir de bibliotecas de ADNc producidas a partir de tejidos complejos, por ejemplo órganos florales enteros. Sin embargo, más de 1,5 millones de EST de poáceas estaban presentes en la base de datos de EST pública (hasta marzo de 2004) el uso de tejidos complejos dio como resultado subrepresentación de genes expresados a niveles bajos y en sólo uno o unos pocos tipos celulares.

50

Sin embargo, el aislamiento y la caracterización de secuencias de control transcripcional de oosferas específicas sería deseable para usar en la manipulación genética de plantas.

55

Sumario de la invención

La presente invención se fundamenta, en parte, en la identificación de las secuencias de control transcripcional derivadas de genes de EC1 que, en realizaciones preferidas, dirigen la expresión preferencial en una oosfera de al menos un taxón vegetal.

60

La presente invención se caracteriza por las reivindicaciones independientes. En particular, la presente invención proporciona una construcción de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de control transcripcional de gametos femeninos de plantas, en la que la secuencia de control transcripcional comprende SEC ID N.º 24, conectada operativamente a una secuencia de nucleótidos de interés que es heteróloga con respecto a la secuencia

65

de control transcripcional.

De acuerdo con ello, en un primer aspecto, la presente invención está basada en un ácido nucleico aislado que comprende:

5

i) una secuencia de nucleótidos que define una secuencia de control transcripcional, en la que dicha secuencia de control transcripcional se deriva de un gen que codifica un polipéptido EC1.

Se ha determinado una secuencia consenso para polipéptidos EC1. De acuerdo con ello, el ácido nucleico aislado del primer aspecto de la invención comprende una secuencia de control transcripcional derivada de un gen que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

10

[X_N] CWXXXXX [LI] X [SH] C [TS] X [DE] [IL] [ILV] XFF [LIV] [X_N] [LI] XXXCCX [AS]
[ILV XXXXXXCW [X_N] [ILV] G [FL] TXEXXXLXXXC [X_N] SEQ ID N° 1

15

en la que X es cualquier residuo de aminoácido; [X_N] es uno o más residuos de aminoácidos de cualquier tipo; [LI] o [IL] es un residuo de leucina o isoleucina; [SH] es un residuo de serina o de histidina; [TS] es un residuo de treonina o serina; [DE] es un residuo de ácido aspártico o ácido glutámico; [ILV] o [LIV] es un residuo de leucina, isoleucina o valina; [AS] es un residuo de alanina o serina; y [FL] es un residuo de fenilalanina o leucina.

20

En realizaciones preferidas adicionales el ácido nucleico aislado usado comprende uno o más restos de secuencia que comprenden la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N.º: 33 y/o en SEC ID N.º: 69.

En una forma preferida, las secuencias de control transcripcional de la presente invención son secuencias de control transcripcional específicas de oosferas vegetales o secuencias de control transcripcional preferenciales de oosferas vegetales.

25

En un segundo aspecto, la presente invención se basa en un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N.º: 24.

30

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una construcción de ácidos nucleicos que comprende el ácido nucleico aislado de los aspectos primero y/o segundo de la invención.

En una realización preferida, el ácido nucleico aislado usado comprende una secuencia de nucleótidos que define una secuencia de control transcripcional que comprende SEC ID N.º 24 y comprende adicionalmente una secuencia de nucleótidos de interés conectada operativamente a la secuencia de control transcripcional. Más preferentemente, la secuencia de nucleótidos de interés es heteróloga con respecto a dicha secuencia de control transcripcional.

35

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una célula que comprende:

40

- (i) la construcción de ácidos nucleicos del tercer aspecto de la invención; y/o
- (ii) una forma genómicamente integrada de la construcción mencionada en (i).

En una realización particularmente preferida, la célula es una oosfera vegetal. Incluso más preferentemente, el nivel, la velocidad y/o el patrón de expresión de al menos una secuencia de nucleótidos está alterado en dicha oosfera vegetal en relación a una forma de tipo silvestre de dicha oosfera vegetal.

45

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una estructura pluricelular que comprende una o más células del cuarto aspecto de la invención. Preferentemente, las estructuras pluricelulares comprenden una planta o una parte, órgano o tejido de la misma.

50

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para expresar específicamente o preferencialmente una secuencia de nucleótidos de interés en una oosfera vegetal, comprendiendo el procedimiento efectuar transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés en una planta sometida al control transcripcional de una secuencia de control transcripcional que comprende SEC ID N.º: 24.

55

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para fomentar esterilidad femenina en una planta, comprendiendo el procedimiento expresar una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína citotóxica o citostática o un ARN no traducido citotóxico o citostático, específicamente o preferencialmente en una oosfera de la planta; en el que dicha secuencia de nucleótidos está operativamente conectada a una secuencia de control transcripcional que comprende SEC ID N.º: 24.

60

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para modular el desarrollo de embriones y/o el tamaño de embriones en una planta, comprendiendo el procedimiento expresar una secuencia de nucleótidos que codifica un regulador transcripcional que actúa durante el desarrollo de los embriones, específicamente o preferencialmente en una oosfera de la planta; en el que dicha secuencia de nucleótidos que codifica un regulador

65

transcripcional está conectada operativamente a una secuencia de control transcripcional que comprende SEC ID N.º: 24.

5 En un noveno aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para fomentar apomixia en una planta, comprendiendo el procedimiento expresar una secuencia de nucleótidos que promueve apomixia específicamente o preferencialmente en una oosfera de la planta, en el que dicha secuencia de nucleótidos que promueve apomixia está conectada operativamente a una secuencia de control transcripcional que comprende SEC ID N.º: 24.

10 Por toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra “comprende” o variaciones tales como “comprenden” o “comprendiendo” deberá entenderse que implican la inclusión de un elemento o un número entero o un grupo de elementos establecido pero no la exclusión de cualquier otro elemento o grupo de elementos o números enteros.

15 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se refieren en el presente documento por un número identificador de secuencia (SEC ID N.º:). Un resumen de los identificadores de secuencia se proporciona en la Tabla 1. Un listado de secuencias se proporciona al final de la memoria descriptiva.

TABLA 1 - Resumen de los identificadores de secuencias

Identificador de secuencia	Secuencia
SEC ID N.º: 1	Secuencia de aminoácidos consenso del polipéptido EC1
SEC ID N.º: 2	Secuencia de aminoácidos del polipéptido AtEC1.1
SEC ID N.º: 3	Secuencia de aminoácidos del polipéptido AtEC1.2a
SEC ID N.º: 4	Secuencia de aminoácidos del polipéptido AtEC1.2b
SEC ID N.º: 5	Secuencia de aminoácidos del polipéptido Ate1.4
SEC ID N.º: 6	Secuencia de aminoácidos del polipéptido Ate1.5
SEC ID N.º: 7	Secuencia de aminoácidos del polipéptido MteEC1.1
SEC ID N.º: 8	Secuencia de aminoácidos del polipéptido OsEC1.1
SEC ID N.º: 9	Secuencia de aminoácidos del polipéptido OsEC1.2
SEC ID N.º: 10	Secuencia de aminoácidos del polipéptido OsEC1.3
SEC ID N.º: 11	Secuencia de aminoácidos del polipéptido TaEC1
SEC ID N.º: 12	Secuencia de aminoácidos del polipéptido HveCA1
SEC ID N.º: 13	Secuencia de nucleótidos de fase de lectura abierta de <i>AtEC1.1</i>
SEC ID N.º: 14	Secuencia de nucleótidos de fase de lectura abierta de <i>AtEC1.2a</i>
SEC ID N.º: 15	Secuencia de nucleótidos de fase de lectura abierta de <i>AtEC1.2b</i>
SEC ID N.º: 16	Secuencia de nucleótidos de fase de lectura abierta de <i>AtEC1.4</i>
SEC ID N.º: 17	Secuencia de nucleótidos de fase de lectura abierta de <i>AtEC1.5</i>
SEC ID N.º: 18	Secuencia de nucleótidos de fase de lectura abierta de <i>MteEC1.1</i>
SEC ID N.º: 19	Secuencia de nucleótidos de fase de lectura abierta de <i>OsEC1.1</i>
SEC ID N.º: 20	Secuencia de nucleótidos de fase de lectura abierta de <i>OsEC1.2</i>
SEC ID N.º: 21	Secuencia de nucleótidos de fase de lectura abierta de <i>OsEC1.3</i>
SEC ID N.º: 22	Secuencia de nucleótidos de ADNc de <i>TaEC1</i>
SEC ID N.º: 23	Secuencia de nucleótidos de fase de lectura abierta de <i>HveCA1</i>
SEC ID N.º: 24	Secuencia de nucleótidos de <i>pAtEC1.1</i>
SEC ID N.º: 25	Secuencia de nucleótidos de <i>pAtEC1.2a</i>
SEC ID N.º: 26	Secuencia de nucleótidos de <i>pAtEC1.2b</i>
SEC ID N.º: 27	Secuencia de nucleótidos de <i>pAtEC1.4</i>
SEC ID N.º: 28	Secuencia de nucleótidos de <i>pAtEC1.5</i>
SEC ID N.º: 29	Secuencia de nucleótidos de <i>pMteEC1.1</i>
SEC ID N.º: 30	Secuencia de nucleótidos de <i>pOsEC1.1</i>
SEC ID N.º: 31	Secuencia de nucleótidos de <i>pOsEC1.2</i>
SEC ID N.º: 32	Secuencia de nucleótidos de <i>pOsEC1.3</i>
SEC ID N.º: 33	Resto n.º 1 de la secuencia de nucleótidos del promotor de EC1
SEC ID N.º: 34	Cebador de <i>TaGAP1</i>
SEC ID N.º: 35	Cebador de <i>TaGAP2</i>
SEC ID N.º: 36	Cebador de <i>TaEC1fw2</i>
SEC ID N.º: 37	Cebador de <i>TaEC1 rev2</i>
SEC ID N.º: 38	Cebador de <i>Act3fw</i>
SEC ID N.º: 39	Cebador de <i>Act3rev</i>
SEC ID N.º: 40	Cebador de <i>AtEC1.1fw</i>
SEC ID N.º: 41	Cebador de <i>AtEC1.1rev</i>
SEC ID N.º: 42	Cebador de <i>AtEC1.2a/bfw</i>
SEC ID N.º: 43	Cebador de <i>AtEC1.2a/brev</i>
SEC ID N.º: 44	Cebador de <i>AtEC1.4fw</i>
SEC ID N.º: 45	Cebador de <i>AtEC1.4rev</i>

SEC ID N.º: 46	Cebador de AtEC1.5fw
SEC ID N.º: 47	Cebador de AtEC1.5rev
SEC ID N.º: 48	Cebador de pAtEC1.1
SEC ID N.º: 49	Cebador de AtEC1.1rev1
SEC ID N.º: 50	Cebador de pAtEC1.2a
SEC ID N.º: 51	Cebador de tAtEC1.2a
SEC ID N.º: 52	Cebador de AtEC1.1-PstI
SEC ID N.º: 53	Cebador de AtEC1.2a-BglII
SEC ID N.º: 54	Cebador de GUS start rev
SEC ID N.º: 55	Cebador de E1F
SEC ID N.º: 56	Cebador de E1R
SEC ID N.º: 57	Cebador de EC1-PF2
SEC ID N.º: 58	Cebador de EC1-R
SEC ID N.º: 59	Cebador de GFP-seq
SEC ID N.º: 60	Cebador de LH1
SEC ID N.º: 61	Cebador de GUS3
SEC ID N.º: 62	Cebador de GUS4
SEC ID N.º: 63	Cebador de bar-fw
SEC ID N.º: 64	Cebador de bar-rev
SEC ID N.º: 65	Cebador de 1-1fwXbal
SEC ID N.º: 66	Cebador de 1-1revXbal
SEC ID N.º: 67	Cebador de At2a-BglIIfw
SEC ID N.º: 68	Cebador de At2a-Salrev
SEC ID N.º: 69	Resto n.º 2 de la secuencia de nucleótidos del promotor de EC1

Descripción de realizaciones preferidas

5 Se entenderá que la siguiente descripción es sólo para el propósito de describir realizaciones particulares y no se desea que sea limitante con respecto a la descripción anterior.

10 Como se expone anteriormente, la presente invención se fundamenta, en parte, en la identificación de secuencias de control transcripcional que se derivan de genes de EC1 que se expresan preferentemente en las oosferas de al menos algunas plantas.

15 Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de control transcripcional" debería entenderse como cualquier secuencia de nucleótidos que modula al menos la transcripción de una secuencia de nucleótidos conectada operativamente. Además, la secuencia de control transcripcional de la presente invención puede comprender una cualquiera o más de, por ejemplo, una secuencia líder, promotora, potenciadora o activadora anterior en la cadena.

Como se refiere en el presente documento, el término "secuencia de control transcripcional" incluye preferentemente al menos un promotor.

20 Un "promotor" como se refiere en el presente documento, comprende cualquier ácido nucleico que confiere, activa o potencia expresión de una secuencia de nucleótidos conectada operativamente en una célula.

25 Como se usa en el presente documento, el término "conectada operativamente" se refiere a la conexión de una secuencia de control transcripcional, tal como un promotor y una secuencia de nucleótidos de interés en un modo tal como para llevar la secuencia nucleotídica de interés a someterse al control transcripcional de la secuencia de control transcripcional. Por ejemplo, los promotores se posicionan generalmente 5' (anteriormente en la cadena) con respecto a una secuencia de nucleótidos conectada operativamente al promotor. En la construcción de la secuencia de control transcripcional heteróloga/secuencia de nucleótidos de combinaciones de interés, se prefiere generalmente posicionar el promotor a una distancia desde el sitio de inicio de transcripción que es aproximadamente la misma que la distancia entre el promotor y el gen que él controla en su posición natural, es decir, el gen del que se deriva el promotor. Como se conoce en la técnica, se puede conseguir alguna variación en esta distancia sin perder la función del promotor.

35 De acuerdo con ello, en un primer aspecto, la presente invención está basada en un ácido nucleico aislado que comprende:

(i) una secuencia de nucleótidos que define una secuencia de control transcripcional, en la que dicha secuencia de control transcripcional se deriva de un gen que codifica un polipéptido EC1.

40 En la presente invención, "aislado" se refiere a material extraído de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se da en la naturaleza) y así está alterado "por la mano del hombre" a partir de su estado natural. Por

ejemplo, un polinucleótido aislado podría ser parte de un vector o una composición de materia, o podría estar contenido dentro de una célula y aún estar aislado debido a que el vector, la composición de materia, o la célula particular no es el entorno original del polinucleótido. Debería entenderse también que una molécula de ácido nucleico "aislada" incluye una molécula de ácido nucleico sintética, incluyendo aquellas producidas por síntesis química usando procedimientos conocidos en la técnica o por amplificación *in vitro* (por ejemplo reacción en cadena de la polimerasa y similares).

El ácido nucleico aislado usado en la presente invención puede comprender cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, los ácidos nucleicos aislados de la invención pueden comprender ADN de cadena doble y de cadena simple, ADN que es una mezcla de regiones de cadena simple y de cadena doble, ARN de cadena simple y de cadena doble y ARN que es una mezcla de regiones de cadena simple y de cadena doble, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser de cadena simple o, más típicamente, de cadena doble o una mezcla de regiones de cadena simple y de cadena doble. Además, los ácidos nucleicos aislados pueden comprender regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las moléculas de ácido nucleico aisladas también pueden contener una o más bases modificadas o armazones de ADN o de ARN modificados para estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Se puede hacer una diversidad de modificaciones a ADN y ARN; así, "polinucleótido" abarca formas modificadas químicamente, enzimáticamente, o metabólicamente.

Como se expone anteriormente, la presente invención contempla, entre otras cosas, una secuencia de nucleótidos que define una secuencia de control transcripcional, en la que dicha secuencia de control transcripcional se deriva de un gen que codifica un polipéptido EC1. Como se refiere en el presente documento, un "polipéptido EC1" se refiere a un polipéptido que se expresa sustancialmente específicamente en una oosfera de una planta. Generalmente, los polipéptidos EC1 son pequeños (generalmente menos de aproximadamente 200 residuos de aminoácidos) y teóricamente se secretan. En algunas realizaciones, los polipéptidos EC1 contemplados en el presente documento comprenden adicionalmente aproximadamente seis residuos de cisteína conservados y pueden comprender adicionalmente un péptido señal para localización extracelular.

Los ácidos nucleicos usados en la presente invención comprenden la secuencia de nucleótidos que se "deriva de un gen que codifica un polipéptido EC1". El término "derivado de", tal como se usa en el presente documento, hace referencia a una fuente u origen para la secuencia de control transcripcional. Como tal, una secuencia de control transcripcional "derivada de un gen que codifica un polipéptido EC1" se refiere a una secuencia de control transcripcional que, en su estado nativo, ejerce al menos algún control transcripcional sobre un gen que codifica un polipéptido EC1 en un organismo, preferentemente una planta.

Se ha determinado una secuencia polipeptídica de EC1 consenso. De acuerdo con ello, el ácido nucleico aislado del primer aspecto de la invención comprende una secuencia de control transcripcional derivada de un gen que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

[X_n] CWXXXXX [LI] X [SH] C [TS] X [DE] [IL] [ILV] XFF [LIV] [X_N] [LI] XXXCCX [AS]
[ILV] XXXXXXCW [X_N] [ILV] G [FL] TXXEXXXLXXXC [X_N] SEQ ID N° 1

en la que X es cualquier residuo de aminoácidos; [X_N] es uno o más residuos de aminoácido de cualquier tipo; [LI] o [IL] es un residuo de leucina o isoleucina; [SH] es un residuo de serina o de histidina; [TS] es un residuo de treonina o serina; [DE] es un residuo de ácido aspártico o ácido glutámico; [ILV] o [LIV] es un residuo de leucina, isoleucina o valina; [AS] es un residuo de alanina o serina; y [FL] es un residuo de fenilalanina o leucina.

De acuerdo con ello, en una realización, la presente invención se basa en un ácido nucleico aislado que comprende:

(i) una secuencia de nucleótidos que define una secuencia de control transcripcional, en la que dicha secuencia de control transcripcional se deriva de un gen que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N.º: 1.

La secuencia de control transcripcional de la presente invención se deriva de un gen que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N.º: 2.

La secuencia de control transcripcional de la presente invención se deriva de un gen que comprende una fase de lectura abierta que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N.º: 13.

En realizaciones específicas, la presente invención usa un nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que definen una secuencia de control transcripcional, en la que la secuencia de control transcripcional comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N.º: 24.

En aún realizaciones adicionales el ácido nucleico aislado usado comprende uno o más restos de secuencia que comprenden la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N.º: 33 y/o la SEC ID N.º: 69.

Se describe en el presente documento un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que define un fragmento funcionalmente activo o variante de la secuencia de control transcripcional que comprende la SEC ID N.º: 24.

5 Como se refiere en el presente documento, un "fragmento o variante funcionalmente activo" se refiere a un fragmento o variante que conserva la actividad de una secuencia de control transcripcional, funcional.

10 Los "fragmentos funcionalmente activos", como se contemplan en el presente documento, pueden ser de cualquier longitud en la que el control transcripcional conserve la capacidad de afectar expresión de una secuencia de nucleótidos conectados operativamente. El fragmento puede comprender, por ejemplo, al menos 50 nucleótidos (nt), al menos 100 nt o al menos 200 nt. Por ejemplo, en realizaciones específicas, un fragmento de al menos 50 nt de longitud comprende fragmentos que incluyen 50 o más bases contiguas de, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 24.

15 "Variantes funcionalmente activas" de la secuencia de control transcripcional de la invención incluyen ortólogos, mutantes, variantes sintéticas, análogos y similares que conservan la capacidad para afectar expresión de una secuencia de nucleótidos conectada operativamente. Por ejemplo, el término "variante" debería considerarse que incluye específicamente, por ejemplo, secuencias de control transcripcional ortólogas de otros organismos; mutantes de la secuencia de control transcripcional; variantes de secuencia de control transcripcional en las que uno o más de los nucleótidos dentro de la secuencia se han sustituido, añadido o eliminado; y análogos que contienen una o más bases modificadas o armazones de ADN o ARN modificados para estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina.

20 El fragmento o variante funcionalmente activo puede comprender, por ejemplo, al menos el 50 % de identidad de secuencia, al menos el 65 % de identidad de secuencia, al menos el 80 % de identidad de secuencia o al menos el 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N.º: 24.

30 Cuando se comparan las secuencias de nucleótidos para calcular el porcentaje de identidad, las secuencias de nucleótidos comparadas deberían compararse sobre una ventana de comparación de al menos 50 residuos de nucleótidos, al menos 100 residuos de nucleótidos, al menos 200 residuos de nucleótidos, al menos 500 residuos de nucleótidos o sobre la longitud total de SEC ID N.º: 24. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) de aproximadamente el 20 % o menos según se compara con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede llevarse a cabo por implementaciones computerizadas de algoritmos tales como la familia de programas de BLAST como, por ejemplo, se describe por Altschul y cols. (Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402, 1997). Se puede encontrar una discusión detallada de análisis de secuencia en la Unidad 19.3 de Ausubel y cols. ("Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15, 1998).

40 En algunas realizaciones específicas, las secuencias de control transcripcional usadas por la presente invención comprenden secuencias de control transcripcional específicas de oosferas vegetales o preferenciales de oosferas vegetales.

45 Como se usa en el presente documento, una secuencia de control transcripcional "específica de oosferas vegetales" se refiere a una secuencia de control transcripcional que dirige la expresión de una secuencia de nucleótidos conectada operativamente de interés sustancialmente sólo en una oosfera de una planta. Una secuencia de control transcripcional "preferencial de oosferas vegetales" se refiere a una secuencia de control transcripcional que dirige la expresión de una secuencia de nucleótidos conectada operativamente a un nivel más alto en una oosfera vegetal que en uno o más tejidos de la planta, por ejemplo, el tejido foliar o el tejido radicular. Generalmente, la expresión preferencial en una oosfera incluye la expresión de una secuencia de nucleótidos de interés en una oosfera vegetal a un nivel de al menos dos veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces el nivel de expresión visto en al menos un tejido distinto de una planta, por ejemplo, el tejido foliar o el tejido radicular.

55 Como se refiere en el presente documento, el término "oosfera vegetal" debería entenderse para incluir una célula que es un componente del gametofito femenino en una planta. Por ejemplo, en plantas angiospermas, el término "oosfera vegetal" puede incluir un gameto femenino, un sinérgido, una célula central o una célula antipodal del gametofito femenino (saco embrionario). En una realización específica, el término "oosfera vegetal" debería entenderse para hacer referencia a un gameto femenino de una planta.

60 En un segundo aspecto, la presente invención se basa en un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N.º: 24.

65 En otra realización, el ácido nucleico aislado usado en la invención comprende una secuencia de nucleótidos que define una secuencia de control transcripcional o un complemento, complemento inverso o fragmento del mismo. En aún otra realización, el ácido nucleico aislado del segundo aspecto de la invención comprende una secuencia de

nucleótidos que define una secuencia de control transcripcional específica de oosferas o una secuencia de control transcripcional preferencial de oosferas o un complemento, complemento inverso o fragmento de las mismas.

5 En el presente documento se describen ácidos nucleicos aislados que hibridan con cualquiera de los ácidos nucleicos mencionados anteriormente. Como se usa en el presente documento, condiciones de hibridación "restrictivas" serán aquellas en las que la concentración de sales es menos de aproximadamente concentración de ión Na 1,5 M, típicamente concentración de ión Na de aproximadamente 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a pH 7 a 8,3 y la temperatura es al menos 30°C. Las condiciones restrictivas pueden lograrse también con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Las condiciones de hibridación restrictivas pueden ser condiciones de
10 restrictividad baja, condiciones de restrictividad media o condiciones de restrictividad alta. Condiciones de restrictividad baja ejemplares incluyen hibridación con una solución tampón de formamida al 30 % al 35 %, NaCl 1 M, SDS (dodecilsulfato de sodio) al 1 % a 37 °C y un lavado en SSC 1x a 2x (20 x SSC = TaCl 3,0 M/citrato trisódico 0,3 M) a 50 a 55 °C. Condiciones de restrictividad moderadas ejemplares incluyen hibridación en formamida al 40 % al 45 %, NaCl 1,0 M, SDS al 1 % a 37 °C y un lavado en SSC 0,5x a 1x a 55 a 60 °C. Las condiciones de
15 restrictividad alta ejemplares incluyen hibridación en formamida al 50 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 °C y un lavado en SSC 0,1x a 60 a 65 °C. Opcionalmente, los tampones de lavado pueden comprender SDS aproximadamente al 0,1 % a SDS aproximadamente al 1 %. La duración de la hibridación es generalmente menos de aproximadamente 24 horas, usualmente aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas.

20 La especificidad de hibridación está afectada también por lavados tras la hibridación, con parámetros que influyen incluyendo la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para híbridos ADN-ADN, T_m puede aproximarse a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (Anal. Biochem. 138: 267-284, 1984), es decir $T_m = 81,5 ^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\text{GC en } \%) - 0,61 (\text{forma en } \%) - 500/L$; donde M es la molaridad de cationes monovalentes, GC en % es el porcentaje de los nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, forma en % es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (a fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50 % de una secuencia objetivo complementaria hibrida con una sonda apareada perfectamente. T_m se reduce en aproximadamente 1 °C por cada 1 % de error en apareamiento; así, T_m , hibridación y/o condiciones de lavado pueden ajustarse para hibridar a secuencias de diferentes grados de complementariedad. Por ejemplo, secuencias con identidad > 90 % pueden hibridarse disminuyendo la T_m en
25 aproximadamente 10 °C. Generalmente, las condiciones restrictivas se seleccionan para ser aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones de restrictividad altas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a, por ejemplo, 1, 2, 3, o 4 °C más bajos que el punto de fusión térmico (T_m); las condiciones de restrictividad media pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10 °C más bajos que el punto de fusión
30 térmico (T_m); las condiciones de restrictividad baja pueden utilizar una hibridación y/o lavado a, por ejemplo, 11, 12, 13, 14, 15 ó 20 °C más bajos que el punto de fusión térmico (T_m). Usando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado y el T_m deseado, aquellos de habilidad ordinaria entenderán que las variaciones en la restrictividad de hibridación y/o las soluciones de lavado se describen inherentemente. Si el grado deseado de apareamiento erróneo da como resultado un T_m de menos de 45 °C (solución acuosa) o de 32 °C (solución de formamida), se prefiere incrementar la concentración de SSC de tal modo que pueda usarse una temperatura superior. Una guía extensiva para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2, Elsevier, Nueva York, 1993); Ausubel y cols., eds. (Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, 1995) y Sambrook y cols. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y., 1989).
35 40 45

En el presente documento se describen también fragmentos de ácidos nucleicos.

50 Los "fragmentos" de una secuencia de nucleótidos pueden ser, por ejemplo, al menos de 5 nucleótidos (nt), al menos de 10 nt, al menos de 20 nt, al menos de 50, al menos de 100, al menos de 150, al menos de 200, al menos de 250, al menos de 300, al menos de 350, al menos de 400, al menos de 450 o al menos de 500 nt en longitud. Estos fragmentos tienen numerosos usos que serían evidentes para alguien de habilidad en la técnica e incluyen, por ejemplo, sondas de diagnóstico y cebadores. Por supuesto, los fragmentos más grandes, pueden ser útiles también, ya que son fragmentos que corresponden a la mayoría, si no a todas, de las secuencias de nucleótidos
55 expuestas en SEC ID N.º: 24. Por ejemplo, un fragmento de al menos 5 nt en longitud puede referirse a un fragmento que incluye 5 o más bases contiguas de, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 24.

60 Los ácidos nucleicos aislados (o fragmentos o variantes de los mismos) pueden derivarse de cualquier fuente. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden derivarse de un organismo, tal como una planta. Plantas adecuadas incluyen, por ejemplo, angiospermas monocotiledóneas (monocots), angiospermas dicotiledóneas (dicots), gimnospermas y similares.

65 Las dicots ejemplares incluyen, por ejemplo, *Arabidopsis* spp., *Medicago* spp., *Nicotiana* spp., soja, canola, colza de semilla aceitosa, remolacha azucarera, mostaza, girasol, patata, alazor, mandioca, ñame, patata dulce, otras brasicáceas tales como *Thellungiella halophila*, entre otras.

En una realización, los ácidos nucleicos aislados usados en la presente invención pueden comprender una secuencia de control transcripcional derivada de un gen que codifica un polipéptido EC1 en una planta de *Arabidopsis* sp. Por ejemplo la secuencia de control transcripcional definida en el presente documento como *pAtEC1.1* (SEC ID N.º: 24) es derivable a partir de un gen que comprende la secuencia de nucleótidos de fase de lectura abierta de *AtEC1.1* (SEC ID N.º: 13) de *Arabidopsis thaliana*.

Se describe en el presente documento una secuencia de control transcripcional derivada de un gen que codifica un polipéptido EC1 en una planta *Medicago* sp.

Se describe adicionalmente más un ácido nucleico que comprende una secuencia de control transcripcional derivada de un gen que codifica un polipéptido de EC1 en una planta de *Oryza* sp.

En realizaciones adicionales, la presente invención también contempla ácidos nucleicos sintéticos.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de control transcripcional específica de gametos femeninos vegetales, en la que la secuencia de control transcripcional comprende SEC ID N.º: 24 conectada operativamente a una secuencia de nucleótidos de interés que es heteróloga con respecto a la secuencia de control transcripcional.

La construcción de ácido nucleico de la presente invención puede comprender cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, la construcción de ácido nucleico de la invención pueden comprender ADN de cadena doble y/o de cadena simple, ADN que es una mezcla de regiones de cadena simple y de cadena doble, ARN de cadena simple y de cadena doble y ARN que es una mezcla de regiones de cadena simple y de cadena doble, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser de cadena simple o, más típicamente, de cadena doble o una mezcla de regiones de cadena simple y de cadena doble. Además, la construcción de ácido nucleico puede comprender regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. La construcción de ácido nucleico también puede comprender una o más bases modificadas o armazones de ADN o ARN modificados para estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Se puede hacer una diversidad de modificaciones a ADN y ARN; así el término "polinucleótido" abarca formas modificadas químicamente, enzimáticamente, o metabólicamente.

En una realización, la construcción de ácido nucleico comprende ADN. De acuerdo con ello, la construcción de ácido nucleico de la presente invención puede comprender, por ejemplo, una molécula de ADN lineal, un plásmido, un transposón, un cósmido, un cromosoma artificial y similares. Además, la construcción de ácido nucleico de la presente invención puede ser una molécula de ácido nucleico separada o puede ser una parte de una molécula de ácido nucleico más grande.

En otra realización, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia de nucleótidos que define una secuencia de control transcripcional que comprende la SEC ID N.º: 24 y comprende adicionalmente una secuencia de nucleótidos de interés conectada operativamente a la secuencia de control transcripcional.

La secuencia de nucleótidos de interés es heteróloga con respecto a la secuencia de control transcripcional.

Como se usa en el presente documento, el término "heterólogo con respecto a la secuencia de control transcripcional" hace referencia a la secuencia de nucleótidos de interés que es una secuencia de nucleótidos distinta de aquella a la que la secuencia de control transcripcional está operativamente conectada en su estado natural.

Por ejemplo, en su estado natural, *pAtEC1.1* (SEC ID N.º: 24) está operativamente conectada a un gen que comprende la fase de lectura abierta de *AtEC1.1* (SEC ID N.º: 13). De acuerdo con ello, en este ejemplo, cualquier secuencia de nucleótidos distinta de una secuencia de nucleótidos que comprenda una fase de lectura abierta que consista en la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N.º: 13 debe considerarse heteróloga con respecto a la SEC ID N.º: 24.

De acuerdo con ello, una secuencia que es heteróloga con respecto a la secuencia de control transcripcional puede incluir por lo tanto, por ejemplo, secuencias de EC1 ortólogas, genes indicadores, genes marcadores seleccionables, secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas heterólogas; secuencias de ácidos nucleicos que codifican ARN no traducido heterólogo y similares.

En una realización adicional, la construcción de ácido nucleico puede comprender adicionalmente una secuencia de nucleótidos que define un terminador de la transcripción.

El término "terminador de transcripción" o "terminador" se refiere a una secuencia de ADN al final de una unidad transcripcional que señala la terminación de transcripción. Los terminadores son secuencias de ADN no traducidas 3' que contienen generalmente una señal de poliadenilación, que facilita la adición de secuencias poliadenilato al

extremo 3' de un transcrito primario. Como con las secuencias promotoras, el terminador puede ser cualquier secuencia que sea operativa en las células, tejidos u órganos en los que se desea que se use. Ejemplos de secuencias terminadoras adecuadas que pueden ser útiles en células de plantas incluyen: el terminador de la nopalina sintasa (*nos*), el terminador de CaMV 35S, el terminador de la octopina sintasa (*ocs*), los terminadores del gen inhibidor de la proteinasa de patata (*pin*), tales como los terminadores de *pinII* y *pinIII* y similares.

En una realización específica, la construcción de ácido nucleico del tercer aspecto de la invención comprende una casete de expresión que comprende la estructura:

10 $([N]_w - TCS - [N]_x - Sol - [N]_y - TT - [N]_z$

en la que:

15 $[N]_w$ comprende uno o más residuos nucleotídicos, o está ausente;

TCS comprende el ácido nucleico de la SEC ID N.º: 24, en la que el ácido nucleico define una secuencia de control transcripcional; $[N]_x$ comprende uno o más residuos nucleotídicos, o está ausente;

20 Sol comprende una secuencia de nucleótidos de interés que codifica un ARNm o un ARN no traducido, en el que la secuencia de nucleótidos, Sol, está operativamente conectada a TCS;

$[N]_y$ comprende uno o más residuos nucleotídicos, o está ausente;

25 TT comprende una secuencia de nucleótidos que define un terminador de transcripción;

$[N]_z$ comprende uno o más residuos nucleotídicos, o está ausente.

30 Las construcciones de ácido nucleico de la presente invención pueden comprender adicionalmente secuencias de nucleótidos tales como, un origen de replicación para uno o más huéspedes; un gen marcador seleccionable que está activo en uno o varios huéspedes y similares.

35 Como se usa en el presente documento, el término "gen marcador seleccionable" incluye cualquier gen que confiere un fenotipo en una célula, en la que se expresa, para facilitar la identificación y/o la selección de células que están transfectadas o transformadas con una construcción genética de la invención.

"Genes marcadores seleccionables" incluyen cualesquiera de las secuencias de nucleótidos que, cuando se expresan por una célula, confieren un fenotipo en la célula que facilita la identificación y/o la selección de células transformadas. Se conoce en la técnica un intervalo de secuencias de nucleótidos que codifican los marcadores seleccionables adecuados. Secuencias de nucleótidos ejemplares que codifican marcadores seleccionables incluyen: genes de resistencia a antibióticos tales como genes de resistencia a la ampicilina, genes de resistencia a la tetraciclina, genes de resistencia a la kanamicina, el gen AURI-C que confiere resistencia al antibiótico aureobasidina A, genes de neomicina fosfotransferasa (por ejemplo *nptI* y *nptII*) y genes de higromicina fosfotransferasa (por ejemplo *hpt*); genes de resistencia a herbicida incluyendo genes de resistencia a glufosinato, fosfotricina o bialafos tales como genes que codifican fosfotricina acetiltransferasa (por ejemplo *bar*), genes de resistencia a glifosato incluyendo genes que codifican shikimato 3-enoilpiruvil-5-fosfato sintasa (por ejemplo *aroA*), genes de resistencia a bromoxinilo incluyendo genes que codifican nitrilasa de bromoxinilo, genes de resistencia a sulfonamida incluyendo genes que codifican dihidropterato sintasa (por ejemplo *sul*) y genes de resistencia a sulfonilurea incluyendo genes que codifican acetolactato sintasa, genes comunicadores que codifican enzimas tales como genes que codifican GUS y cloranfenicol acetil-transferasa (CAT); genes indicadores fluorescentes tales como el gen que codifica la proteína fluorescente verde; y genes indicadores basados en luminiscencia tales como el gen de luciferasa, entre otros.

55 Las construcciones genéticas de la presente invención pueden incluir secuencias de nucleótidos adicionales deseadas para el mantenimiento y/o replicación de la construcción genética en procariontes o eucariontes y/o para la integración de la construcción genética o de una parte de la misma en el genoma de una célula procarionte o eucariota.

60 En una realización, la construcción de la invención está adaptada para transferirse al menos parcialmente dentro de una célula vegetal por medio de transformación mediada por *Agrobacterium*. De acuerdo con ello, en una realización adicional, la construcción de ácido nucleico de la presente invención comprende secuencias limítrofes de T-ADN a la izquierda y/o a la derecha.

65 Las secuencias limítrofes de T-ADN adecuadas se determinarían fácilmente por alguien experto en la técnica. Sin embargo, el término "secuencias limítrofes de T-ADN" se entendería para abarcar cualesquiera secuencias de nucleótidos sustancialmente homólogas y sustancialmente directamente repetidas que delimitan una molécula de ácido nucleico que se transfiere desde una célula de *Agrobacterium* sp. dentro de una célula vegetal susceptible de

transformación mediada por *Agrobacterium*. A modo de ejemplo, se hace referencia al papel de Peralta y Ream (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 82 (15): 5112-5116, 1985) y a la revisión de Gelvin (Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67 (1): 16-37, 2003).

- 5 La presente invención también contempla cualesquiera modificaciones adecuadas a la construcción genética que facilitan inserción mediada por bacterias dentro de una célula vegetal por medio de bacterias distintas de *Agrobacterium* sp., por ejemplo, según se describe en Broothaerts y cols. (Nature 433: 629-633, 2005).

10 Aquellos expertos en la técnica serán conscientes de como producir las construcciones descritas en el presente documento y de los requerimientos para obtener la expresión de las mismas, cuando así se desee, en una célula específica o en un tipo celular específico según las condiciones deseadas. En particular, se conocerá por aquellos expertos en la técnica que las manipulaciones genéticas requeridas para llevar a cabo la presente invención pueden requerir la propagación de la construcción genética descrita en el presente documento o de un derivado de la misma en una célula procariota tal como una célula de *E. coli* o en una célula vegetal o en una célula animal.

15 Procedimientos ejemplares para clonar moléculas de ácidos nucleicos se describen en Sambrook y cols. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2000).

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una célula que comprende:

- 20 (i) la construcción de ácidos nucleicos del tercer aspecto de la invención; y/o
(ii) una forma integrada genómicamente de la construcción mencionada en (i).

La construcción de ácidos nucleicos se puede mantener en la célula como una molécula de ácido nucleico, como un elemento genético de replicación autónoma (por ejemplo, un plásmido, cósmido, cromosoma artificial o similar) o puede estar integrada en el ADN genómico de la célula.

25

Como se usa en el presente documento, el término "ADN genómico" debería entenderse en el contexto más amplio para incluir todos y cada uno de los ADN que constituyen el complemento genético de una célula. Como tal, el ADN genómico de una célula debería entenderse que incluye cromosomas, ADN mitocondrial, ADN plastídico, ADN de cloroplastos, ADN de plásmidos endógenos y similares. Como tal, el término "genómicamente integrado" contempla la integración de los cromosomas, la integración del ADN mitocondrial, la integración del ADN plastídico, la integración del ADN de cloroplastos, la integración de plásmido endógeno y similares.

30

Las células contempladas por el cuarto aspecto de la invención incluyen cualquier célula procariota o eucariota, con la condición de que la célula no sea una célula madre embrionaria o una célula germinal humana.

35

En una realización, la célula es una célula vegetal. Como se usa en el presente documento, el término "planta" incluye cualquier planta que comprenda una oosfera, incluyendo, por ejemplo, angiospermas dicotiledóneas o monocotiledóneas y gimnospermas.

40

En otra realización, la célula vegetal es una célula vegetal dicotiledónea, por ejemplo, una célula *Arabidopsis* sp. En aún otra realización la célula es una planta de monocotiledóneas y/o una célula de las plantas de cultivo cereales.

En una realización específica, la célula es una oosfera vegetal. En una realización adicional, el nivel, la velocidad y/o el patrón de expresión de al menos una secuencia de nucleótidos está alterado en la oosfera vegetal en relación a una forma de tipo silvestre de dicha oosfera vegetal.

45

En aún otra realización, la célula también puede comprender una célula procariota. Por ejemplo la célula procariota puede incluir una célula de *Agrobacterium* sp. que lleva la construcción de ácidos nucleicos y que puede, por ejemplo, usarse para transformar una planta. En aún otra realización, la célula procariota puede incluir una célula de *E. coli*, que puede, por ejemplo, usarse en la construcción o clonación de una construcción de ácido nucleico.

50

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una estructura pluricelular que comprende una o más células del cuarto aspecto de la invención.

55

En una realización, la estructura pluricelular comprende una planta o una parte, órgano o tejido de la misma.

Tal como se contempla en el presente documento, "una planta o una parte, órgano o tejido de la misma" debería entenderse que incluye específicamente una planta completa; un tejido vegetal; un órgano vegetal; una parte de planta; material de reproducción de plantas (que incluye, por ejemplo plantones, semillas, flores, polen y similares); y el tejido vegetal de cultivo tal como los callos o cultivo en suspensión.

60

La estructura pluricelular puede comprender una o más oosferas vegetales. Por ejemplo, la estructura pluricelular puede comprender una planta, una flor, un carpelo o pistilo, un ovario vegetal, un óvulo o un gametofito femenino (saco embrionario). En una realización, el nivel, la velocidad y/o el patrón de expresión de al menos una secuencia de nucleótidos está alterado en dichas una o más oosferas vegetales de la estructura pluricelular relativa a la forma

65

de dicho tipo silvestre de dichas oosferas.

Tal como se expone anteriormente, la presente invención se fundamenta, en parte, en llevar a cabo transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés sometida al control transcripcional de una secuencia de control transcripcional que comprende SEC ID N.º: 24.

De acuerdo con ello, en un sexto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para expresar específicamente o preferencialmente una secuencia de nucleótidos de interés en una oosfera vegetal, comprendiendo el procedimiento efectuar transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés en una planta sometida al control transcripcional de una secuencia de control transcripcional que comprende SEC ID N.º: 24.

Generalmente, la expresión específica o preferente de una secuencia de nucleótidos de interés se lleva a cabo introduciendo dicho ácido nucleico dentro de una célula vegetal de tal forma que la secuencia de nucleótidos de interés esté conectada operativamente a una secuencia de control transcripcional de la presente invención.

La presente invención contempla cualquier procedimiento para llevar a cabo conexión operativa de una secuencia de nucleótidos de interés a la secuencia de control transcripcional de la invención. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de interés se puede incorporar dentro de la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de control transcripcional y se puede conectar operativamente a ella. De este modo, la secuencia de nucleótidos de interés y la secuencia de control transcripcional se introducen ambas en la planta. Alternativamente, la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención se pueden insertar en el genoma vegetal de tal modo que se sitúa en conexión operativa con una secuencia de control transcripcional de EC1 endógena. Como se reconocería por alguien de habilidad en la técnica, la inserción de la secuencia de control transcripcional dentro del genoma de la planta puede ser bien por inserción no específica de sitio o bien por inserción específica de sitio (para un ejemplo de inserción específica de sitio véase Terada y cols., Nat Biotechnol 20: 1030-1034, 2002).

El ácido nucleico se puede introducir dentro de una planta por medio de cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, un explante o tejido vegetal cultivado puede transformarse con una molécula de ácido nucleico y el explante o tejido vegetal cultivado transformado puede regenerarse posteriormente en una planta madura que produce semilla que incluye la molécula de ácido nucleico; un ácido nucleico puede transformarse dentro de una planta directamente, bien de forma estable o bien de forma transitoria; un ácido nucleico se puede introducir dentro de una planta por medio de cultivo usando una planta parental que lleva la molécula de ácido nucleico; y similares.

En una realización, la molécula de ácido nucleico se introduce dentro de una célula vegetal por medio de transformación. Las células de plantas pueden transformarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica que sea apropiado para las especies vegetales particulares. Procedimientos comunes incluyen transformación mediada por *Agrobacterium*, procedimientos de transformación basados en bombardeo con microproyectiles y procedimientos basados en captación de ADN dirigida. Roa-Rodríguez y cols. (Agrobacterium-mediated transformation of plants, 3ª ed. CAMBIA Intellectual Property Resource, Canberra, Australia, 2003) revisa una amplia colección de procedimientos de transformación de plantas mediados por *Agrobacterium* adecuados para un amplio intervalo de especies de plantas. El bombardeo con microproyectiles también se puede usar para transformar tejido vegetal y para procedimientos para la transformación de plantas, en particular plantas cereales y tales procedimientos se revisan por Casas y cols. (Plant Breeding Rev. 13: 235-264, 1995). Los protocolos de transformación de captación de ADN directa tales como transformación de protoplastos y electroporación se describen en detalle en Galbraith y cols. (eds.), Methods in Cell Biology vol. 50, Academic Press, San Diego, 1995). Además de los procedimientos anteriormente mencionados, también se puede usar una gama de otros protocolos de transformación. Éstos incluyen infiltración, electroporación de células y tejidos, electroporación de embriones, microinyección, ruta del tubo polínico, transformación mediada por carburo de silicio y transformación mediada por liposomas. Procedimientos tales como éstos se revisan por Rakoczy-Trojanowska (Cell. Mol. Biol. Lett. 7: 849-858, 2002). Un intervalo de otros procedimientos de transformación de plantas puede ser también evidente para aquellos de habilidad en la técnica y de acuerdo con ello, la presente invención no debería considerarse en modo alguno limitada a los procedimientos de transformación de plantas particulares ejemplificados anteriormente.

La secuencia de nucleótidos de interés, que está sometida al control regulador de la secuencia de control transcripcional de la presente invención, puede incluir cualquier secuencia de nucleótidos de interés. Las categorías generales de secuencias de nucleótidos de interés pueden incluir, por ejemplo:

- (i) genes de citotoxina como una barnasa, ARNasa o toxina diftérica que se pueden usar para inducir esterilidad femenina y/o frutas sin embriones en una planta;
- (ii) genes que codifican los reguladores transcripcionales actuando durante las últimas fases del desarrollo del embrión tales como BBM o LEC1/LEC2, factores de transcripción AP2 que pueden usarse para modificar el desarrollo del embrión y/o el aumento de tamaño de los embriones;
- (iii) genes que codifican reguladores del ciclo celular tales como RB o E2F, reguladores transcripcionales que actúan durante las últimas fases del desarrollo embrionario tales como BBM, LEC1/LEC2 o factores de remodelación de cromatina tales como ADN metiltransferasas, enzimas de modificación de histonas y similares, que se pueden usar para llevar a cabo desarrollo del embrión apomítico (por ejemplo partenogénesis, embriogénesis autónomas);

- (iv) genes indicadores, tales como aquellos que codifican GUS, GFP y similares;
- (v) genes implicados en metabolismo celular tales como proteínas de dedos de cinc, cinasas, proteínas de choque térmico y similares;
- (vi) genes implicados en rasgos agronómicos tales como resistencia a enfermedad o plaga o resistencia a herbicida;
- (vii) genes implicados en características de granos tales como biomasa de granos, valor nutricional, características tras cosechar y similares;
- (viii) genes que codifican proteínas heterólogas, tales como proteínas que codifican enzimas heterólogas o proteínas estructurales o proteínas implicadas en rutas heterólogas para productos heterólogos;
- (ix) secuencias de nucleótidos que codifican ARN no traducidos, por ejemplo un ARNip, miARN, ARN antisentido y similares.

Generalmente, la secuencia de nucleótidos de interés es heteróloga con respecto a la secuencia de control transcripcional.

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para fomentar esterilidad femenina en una planta, comprendiendo el procedimiento expresar una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína citotóxica o citostática o un ARN no traducido citotóxico o citostático, específicamente o preferencialmente en una oosfera de la planta; en la que dicha secuencia de nucleótidos está operativamente conectada a una secuencia de control transcripcional que comprende SEC ID N.º: 24.

Tal como se refiere en el presente documento, "proteína citotóxica o citostática" o "ARN no traducidos citotóxicos o citostáticos" se refieren a cualquier proteína o ARN no traducido que inhibe o impide el crecimiento, la división, la función metabólica o la fertilización de la oosfera. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica codifica una proteína citotóxica seleccionada de la lista constituida por una barnasa, una ARNasa o una toxina diftérica.

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para modular el desarrollo de embriones y/o el tamaño de embriones en una planta, comprendiendo el procedimiento expresar una secuencia de nucleótidos que codifica un regulador transcripcional que actúa durante el desarrollo de los embriones, específicamente o preferencialmente en una oosfera de la planta; en el que dicha secuencia de nucleótidos que codifica un regulador transcripcional está conectada operativamente a una secuencia de control transcripcional que comprende la SEC ID N.º: 24.

En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica un regulador transcripcional comprende un regulador transcripcional que actúa durante las últimas fases del desarrollo del embrión, más preferentemente el regulador transcripcional comprende un BBM, LEC1/LEC2, AP2 u otro factor de transcripción.

En un noveno aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para fomentar apomixia en una planta, comprendiendo el procedimiento expresar una secuencia de nucleótidos que promueve apomixia específicamente o preferencialmente en una oosfera de la planta, en el que dicha secuencia de nucleótidos que promueve apomixia está conectada operativamente a una secuencia de control transcripcional que comprende SEC ID N.º: 24.

Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de nucleótidos que promueve apomixia" incluye cualquier secuencia de nucleótidos que promueve apomixia cuando se expresa en una planta y más particularmente, cuando se expresa en una oosfera vegetal. La secuencia de nucleótidos que promueve la apomixia puede incluir, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de:

- (i) un regulador del ciclo celular, tal como RB o E2F;
- (ii) un regulador transcripcional que actúa durante las últimas fases del desarrollo del embrión, tal como BBM, LEC1/LEC2;
- (iii) un factor de remodelación de cromatina tal como ADN metiltransferasa; o
- (iv) una enzima que modifica las histonas.

Los procedimientos de los aspectos sexto, séptimo, octavo y noveno de la presente invención se pueden llevar a cabo usando cualquier planta adecuada. Sin embargo, en una realización preferida, la planta es una de las plantas dicotiledóneas y, en otra realización, una planta de *Arabidopsis* sp. En realizaciones adicionales, la planta puede ser una planta monocotiledónea y/o una planta de cultivo cereal.

Finalmente, se hace referencia a libros de texto estándar de biología molecular que contienen los procedimientos para llevar a cabo técnicas básicas abarcadas por la presente invención, incluyendo la restricción y ligación de ADN para la generación de las diversas construcciones genéticas descritas en el presente documento. Véanse, por ejemplo, Maniatis y cols., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1982) y Sambrook y cols. (2000, *supra*).

La presente invención se describe adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes:

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un perfil de expresión de los transcritos C06_3 (*TaEC1*) derivados originalmente de la biblioteca de ADNc de oosferas del trigo. La expresión de *TaEC1* se examinó mediante RT-PCR con ARN totales tratados con ADNasa a partir de diferentes tejidos de trigo y cebadores específicos de genes C06_3. Como controles, se han usado ADNc de oosferas, células centrales y pro-embriones de 2 células. La calidad y cantidad de ADNc generado se verificó usando cebadores para la GAP-DH expresada ubicuamente. Carril 1: oosfera, 2: pro-embriones, 3: célula central, 4: coleóptilo, 5: hoja primaria, 6: hoja madura, 7: tallo, 8: raíz sin punta, 9: punta de raíz, 10: antera, 11: pistilo, 12: grano 12 dap (días después de la polinización) 13: control negativo.

La figura 2 muestra un perfil de expresión de genes similares a *AtEC1* en *Arabidopsis*. Se examinó la expresión por RT-PCR usando ARNm tratado con ADNasa a partir de diferentes tejidos de *Arabidopsis* y de cebadores específicos de genes *AtEC1.1*, *AtEC1.2alb*, *AtEC1.4* y *AtEC1.5*. Todos los cinco genes de *Arabidopsis* se expresan exclusivamente en tejidos que contienen el gametofito femenino. La calidad y cantidad de ADNc generado se verificó usando cebador para el gen de *Actina 3* expresado ubicuamente. Carril 1: hoja, 2: tallo, 3: raíz, 4: capullo floral, 5: flor madura, 6: flor 1-3 dap, 7: pistilo, 8: antera, 9: control negativo.

La figura 3 muestra la localización de transcritos de genes similares a *AtEC1* en óvulos de *Arabidopsis*. Se realizó hibridación *in situ* usando secciones incrustadas de pistilos maduros hibridados con una sonda antisentido de *AtEC1.2a* (A) y con una sonda antisentido de *AtEC1.1* (B). Como control, se usaron sondas en sentido correcto de *AtEC1.1* (C) y de *AtEC1.2a*. Las flechas apuntan hacia oosfera, mostrando señales específicas de oosferas en (A) y (B). Las transcripciones de genes similares a *AtEC1* no pudieron detectarse en otras células del saco embrionario no fertilizado o en embriones jóvenes, poco después de la fertilización (no mostrado).

La figura 4 muestra la actividad promotora de genes similares a *AtEC1* en *Arabidopsis*. Se clonaron promotores *pAtEc1.1* de la presente invención y *pAtEc1.2* como fusiones traduccionales anteriormente en la cadena 5' del gen β -glucuronidasa. Las construcciones clonadas se usaron para la transformación estable de *Arabidopsis*. Las flechas apuntan a las oosferas que muestran tinción de GUS en óvulos *pAtEc1.1::GUS* (A) y óvulos *pAtEc1.2a::GUS* antes de fertilización (B) y en un cigoto después de fertilización (C). La actividad de GUS sólo se observó en oosferas de óvulos no fertilizados. Después de la fertilización, la actividad de GUS todavía era visible en el cigoto (C); sin embargo, esto se debió a la estabilidad alta de β glucuronidasa. Una representación esquemática de un óvulo de *Arabidopsis* no fertilizado se muestra en (D) (Drews y Yadegari, Annu. Rev. Genet. 36: 99-124, 2002). Abreviaturas: (ac) células antipodales; (cc) célula central; (ch) calaza, (ec) oosfera; (emb) embrión; (f) funículo; (mp) micropilo; (sc) sinérgido; (sn) núcleo secundario; (zyg) cigoto.

La figura 5 muestra la expresión de EGFP (proteína fluorescente verde potenciada) como una condensación en posición C-terminal con respecto a la fase de lectura abierta de *pAtEC1.1*, sometida al control del promotor de *pAtEC1.1* de la presente invención. La construcción se usa para la transformación de *Arabidopsis thaliana*. Se analizaron óvulos de plantas transgénicas microscópicamente por fluorescencia verde usando DIC (A, C) y luz ultravioleta (B, D) así como luz ultravioleta por CLSM (microscopía confocal de barrido láser) (E-G). La fluorescencia verde fue visible en el polo calazal de oosferas en óvulos no fertilizados (flecha en B) antes de la fertilización. Después de la fertilización, la proteína fluorescente segregada es visible entre el cigoto (zyg; flecha) y el endospermo vecino (C y D). La proteína CLSM muestra la proteína dentro de vesículas de las oosferas no fertilizadas. (F) es una ampliación de (E) y (G) muestra fluorescencia de EGFP de la oosfera. La fluorescencia roja se eliminó.

La figura 6 muestra una alineación de ADNc de *EC1* y las secuencias genómicas predichas codifican fases de lectura abiertas (ORF) derivadas de trigo (*TaEC1*), cebada (*HvECA1*), arroz (*OsEC1*) y *Arabidopsis* (*AtEC1*).

La figura 7 muestra una alineación de ORF de *EC1* derivada de ADNc de cereales y de secuencias genómicas predichas.

La figura 8 muestra una alineación de ORF predichas de *EC1* derivadas de las secuencias genómicas de *Arabidopsis thaliana*.

La figura 9 muestra una alineación de proteínas de proteínas *EC1* de trigo (*TaEC1*), cebada (*HvECA1*), arroz (*OsEC1*), *Arabidopsis* (*AtEC1*) y *Medicago truncatula* (*MtEC1.1*).

La figura 10 es una representación gráfica que muestra restos sobrerrepresentados novedosos en la región anterior en la cadena de genes expresados específicos de oosferas identificados por MotifSampler. El algoritmo de hallazgo de restos usa muestreo de Gibbs para hallar la matriz de probabilidad de posición que representa el resto.

Ejemplo 1

65 Identificación de genes expresados explícitamente en oosferas vegetales

Con el fin de identificar genes que se expresan específicamente en la oosfera, se microdisecionaron inicialmente gametofitos femeninos de trigo aislando oosferas. Usando el ARN mensajero de 12 oosferas, se construyó una biblioteca de ADNc y se llevó a cabo una secuenciación parcial de funcionamiento único de 960 clones de ADNc seleccionados al azar. Después de que los datos de rastros de secuenciador de ADN se hicieron pasar por un

5 conducto de limpieza automatizado, se usaron para análisis bioinformático un total de 735 EST. Las 735 EST formaron 404 agrupaciones independientes que incluyen 310 singletones.

Las secuencias consenso de las agrupaciones se usaron para búsquedas de BLASTN y BLASTX en la base de datos no redundante (nr) de NCBI, en la base de datos de dbEST y en la base de datos SwissProt. Algunas de las

10 secuencias de ADNc dieron como resultado información de secuencia limitada de regiones no codificantes. Por lo tanto, se llevaron a cabo búsquedas en el Índice de Genes de Trigo TIGR versión 8.0, usando el algoritmo BLASTN. Si se encontró un apareamiento con identidad de secuencia de > 95 % por encima de la longitud total de la secuencia de consulta, la secuencia de apareamiento se recuperó y se usó en las subsiguientes búsquedas de BLASTX en lugar de la EST original. Las búsquedas de BLASTN de la categoría de base de datos NCBI de EST no

15 de ratones y no de seres humanos dieron como resultado 629 EST de oosferas (333 agrupaciones) apareándose significativamente con las EST comentadas generadas principalmente a partir de diferentes tejidos vegetativos de trigo, cebada o arroz (dbEST de NCBI en poáceas). 106 EST de oosferas (71 agrupaciones) no se aparearon con las EST comentadas y así se consideran como transcritos "novedosos".

Se seleccionaron transcritos que no satisficieron a cualquier EST generada a partir de tejidos vegetales vegetativos y que se aparearon con las así llamadas proteínas "hipotéticas" (fases de lectura abiertas predecidas por computadora de las secuencias del genoma de *Arabidopsis* y/o del genoma del arroz). Se consideró que los genes correspondientes de algunos de estos transcritos podían expresarse específicamente en oosferas de plantas de semilla.

20 Se identificaron similitudes significativas a proteínas "hipotéticas" de *Arabidopsis* y/o arroz para 98 agrupaciones de oosferas. De éstos, 11 grupos no fueron similares a cualquier EST publicada, sino sólo a genes "hipotéticos" anotados detectados en genomas de *Arabidopsis* y/o de arroz y se concluyó que éstos podrían ser genes candidatos que se expresan específica o preferencialmente en los gametos femeninos o en el gametofito de *Arabidopsis* y/o de

30 arroz. Usando esta estrategia se identificó una agrupación muy grande de transcritos de la oosfera de trigo (*TaEC1*), que no se aparearon con EST de cualesquiera tejidos vegetativos, pero que presentan similitud significativa con proteínas hipotéticas de *Arabidopsis*, *Medicago truncatula* y arroz. En total, hay cinco genes hipotéticos similares a *TaEC1* en *Arabidopsis*, que se localizan en cromosomas 1, 2, 4 y 5. Éstos se designaron como *AtEC1.1* (SEC ID N.º: 13), *AtEC1.2a* (SEC ID N.º: 14), *AtEC1.2b* (SEC ID N.º: 15), *AtEC1.4* (SEC ID N.º: 16) y *AtEC1.5* (SEC ID N.º: 17). Un gen similar a *TaEC1* hipotético en *Medicago truncatula* se designó como *MtEC1.1* (SEC ID N.º: 18) y tres genes hipotéticos similares a *TaEC1* en arroz se localizan en cromosomas 3, 11 y 12 y se designaron como *OsEC1.1* (SEC ID N.º: 19), *OsEC1.2* (SEC ID N.º: 20) y *OsEC1.3* (SEC ID N.º: 21).

40 La expresión específica de *TaEC1* se investigó por RT-PCR ARN total tratado con ADNasa a partir de tejidos diferentes de trigo y cebadores específicos de genes para la agrupación de ADNc de oosferas C06_3 (*TaEC1*: SEC ID N.º: 22). La expresión de *TaEC1* no se detectó en tejido vegetativo alguno de trigo, en anteras de trigo o en cariopsis de desarrollo de 12 días de edad de trigo. Los transcritos se encontraron sólo en el tejido que contiene la oosfera no fertilizada (pistilo) y en oosferas aisladas. Después de la fertilización, *TaEC-1* se reguló hacia abajo (véase Figura 1). Se observó un perfil de expresión similar para los genes similares a *AtEC1* en *Arabidopsis*. Se examinó expresión por RT-PCR usando ARNm tratado con ADNasa a partir de diferentes tejidos de *Arabidopsis* y cebadores específicos de genes para *AtEC1.1*, *AtEC1.2a/b*, *AtEC1.4* y *AtEC1.5*. Todos los cinco genes de *Arabidopsis* se expresan exclusivamente en tejidos que contienen el gametofito femenino (véase Figura 2).

50

Ejemplo 2

Confirmación de expresión específica de óvulo para transcripciones similares a *AtEC1*

55 Se confirmó especificidad para oosferas de transcritos similares a *AtEC1* por hibridación *in situ* usando las secciones incrustadas de pistilos de *Arabidopsis* maduros hibridadas con una sonda antisentido de *AtEC1.2a* y de *AtEC1.1*, respectivamente. Como se muestra en la figura 3, no se pudo detectar nada de ARNm de genes similares a *AtEC1* en otras células del saco embrionario no fertilizado o en embriones jóvenes después de fertilización.

Ejemplo 3

Especificidad de promotores derivados de *EC1*

65 La especificidad del promotor de genes similares a *AtEC1* se analizó clonando una región anteriormente en la cadena 5' con respecto a *AtEC1.1* definida (p*AtEC1.1*: SEC ID N.º: 24 secuencia de control transcripcional de acuerdo con la presente invención) y una región anteriormente en la cadena 5' con respecto a *AtEC1.2* definida

(*pAtEC1.2*: SEC ID N.º: 25) anteriormente en la cadena con respecto al gen de β -glucuronidasa (GUS). Las construcciones clonadas se usaron para la transformación estable de *Arabidopsis*. Se detectó actividad de GUS en oosferas de óvulos no fertilizados. Después de la fertilización, sin embargo, la actividad GUS fue aún visible en el cigoto, debido a la alta estabilidad de β -glucuronidasa (véase figura 4).

Además, EGFP (proteína de fluorescencia verde potenciada) se condensa en posición C-terminal con respecto a la fase de lectura abierta de *AtEC1.1* (SEC ID N.º: 13), sometida al control del promotor de *AtEC1.1* (SEC ID N.º: 24 de la secuencia de control transcripcional de acuerdo con la presente invención). La construcción se usó para la transformación de *Arabidopsis*. Los óvulos de plantas transgénicas se analizaron microscópicamente por fluorescencia verde sometidos a DIC y a luz ultravioleta. Además, se observaron señales de EGFP por Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM). Como se muestra en la figura 5, la fluorescencia verde fue visible exclusivamente en oosferas de óvulos no fertilizados. Poco después de la fertilización, algo de proteína fluorescente era aún visible en el cigoto así como secretada entre el cigoto y el endospermo vecino. No se pudo detectar nada de EGFP en otras células del saco embrionario o en las últimas fases del desarrollo del embrión.

Ejemplo 4

Materiales y procedimientos - Aislamiento de células del saco embrionario de trigo antes y después de fertilización

Se emascularon espigas de *Triticum aestivum* variedad 'Florida' 2-4 días antes de la antesis y se cubrieron con bolsas evitando la fertilización. Se aislaron oosferas mecánicamente a partir de óvulos microdisecionados en manitol estéril de 0,55 M usando agujas de vidrio de punta fina y un microscopio invertido, según se define por Kumlehn y cols. (Protoplasma 208: 156-162, 1999). Se transfirieron las células individuales a tubos de reacción de 0,5 ml usando un capilar de vidrio que forma interfase con un sistema hidráulico a una microbomba. Las células recogidas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido.

Ejemplo 5

Materiales y procedimientos - aislamiento de ARNm y síntesis de ADNc

Se aisló ARNm de 12 oosferas usando el kit Dynabeads® mRNA DIRECT® Micro kit (Dyna) siguiendo las directrices del fabricante, pero reducida la escala a 50 μ l. Se aisló ARNm fusionado usando un dispositivo de transferencia de partículas magnéticas (PickPen®, Bio-Nobile). Subsiguientemente, el kit de síntesis de ADNc SMART® PCR (BD Biosciences) se usó para síntesis de ADNc. Se llevó a cabo PCR de larga distancia de ADNc de primera hebra y determinación de números de ciclo óptimo generando una población de ADNc representativos de acuerdo con las directrices del fabricante, pero usando un fragmento marcado con digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) de *GAPDH* de trigo como una sonda.

Ejemplo 6

Materiales y procedimientos - Construcción de bibliotecas y secuenciación

Se usaron 150 μ l de ADNc puliendo, de acuerdo con las instrucciones del kit de síntesis de ADNc SMART® PCR (BD Biosciences). Subsiguientemente, se ligaron 3 μ g de adaptadores EcoRI (NotI) a ADNc de extremos romos, usando ligasa de T4 (New England Biolabs). Se eliminaron los adaptadores y fragmentos que quedaban por debajo de 0,3 kb por electroforesis en agarosa de punto de fusión bajo al 0,8 % (Seaplaque GTG). Después, se extrajo ADNc usando β -agarasa I (New England Biolabs). Después de la fosforilación de extremos cohesivos de EcoRI (10 U/ μ l de cinasa de polinucleótido T4, New England Biolabs), se llevó a cabo una segunda etapa de purificación usando columnas Chromaspin® (BD Biosciences). El ADNc se ligó después en vector ZAP® II/EcoRI/CIAP (Stratagene) predigerido. La valoración de la biblioteca no amplificada fue $1,43 \times 10^6$ ufp/ml. Después de la amplificación y la excisión *in vivo*, los clones se eligieron al azar y se usaron generando EST. Los tamaños de insertos variaron desde 300 hasta 3000 pb, con un promedio de 900 pb. La longitud de secuencia legible promedio de EST fue de aproximadamente 500 pb. Los datos de rastros de secuenciador de ADN se hicieron pasar por un conducto de limpieza automatizado que incluye PHRED llamando bases y asignando valores de calidad, seguidos por APAREAMIENTO_CRUZADO alineando secuencias y eliminando las secuencias de vector.

Ejemplo 7

Materiales y procedimientos - Sistemas bioinformáticos

Las secuencias se agruparon usando el programa blastclust (NCBI) y se ensamblaron en contigios usando vector NTI 8 (paquete de software de Invitrogen). La secuencia consenso de contigío o la más representativa se usó para búsquedas en BLASTN en base de datos no redundante (nr) de NCBI y en la base de datos de la EST y para búsquedas de BLASTX en base de datos no redundante (nr) de NCBI y en SWISSPROT (marzo de 2004). Un número de ADNc dieron como resultado información de secuencia limitada (100 - 250 pb) a partir de las regiones no

codificantes. Por lo tanto, se llevaron a cabo las búsquedas de BLASTN en el Índice de Genes de Trigo TIGR versión 8.0 (Quackenbush y cols., Nucleic Acids Res 29: 159-164, 2001), usando el algoritmo BLASTN. Si se encontró un apareamiento con identidad de secuencia > 95 % a lo largo de la longitud total de la secuencia de consulta, la secuencia de apareamiento se recuperó y usó en búsquedas de BLASTX subsiguientes en lugar de la EST original. Una secuencia fue considerada novedosa si no mostraba un apareamiento significativo con una secuencia de las bases de datos de NCBI (nr, EST) o a las secuencias consenso de trigo ensambladas de TIGR usando el algoritmo BLASTN (Altschul y cols., 1997, *supra*). El umbral de significancia usado para búsquedas de BLASTN fue: Registro > 115, Valor esperado < e⁻²⁵.

Para búsquedas de BLASTX, el límite para un apareamiento significativo para todas las secuencias menos las cortas fue un e-valor de < e⁻¹⁵ Puntuación >= 80. Los apareamientos para secuencias de consulta cortas (por debajo de 260 pb) se inspeccionaron y categorizaron manualmente. Las agrupaciones que codifican proteínas de función conocida se categorizaron manualmente en grupos funcionales amplios usando la clasificación de MIPS (Centro de Información de Múnich para Secuencias de Proteínas) como directriz.

Ejemplo 8

Materiales y procedimientos - Análisis de expresión por RT-PCR

El ARN de trigo se aisló a partir de tejidos vegetativos y generativos usando reactivo TRIzol® (Invitrogen), siguiendo esencialmente el protocolo del fabricante. Los tejidos que contienen almidón tales como cariopsis se extrajeron dos veces, usando 3 ml de reactivo de TRIzol® por 100 mg de tejido. La calidad de la preparación de ARN total se analizó por electroforesis en gel de agarosa desnaturizante. Antes de la RT-PCR, 1 µg de ARN total se digirió con ADNasa (libre de ARNasa; Invitrogen) y subsiguientemente se usó para síntesis de ADNc de primera hebra usando Oligo (dT)₂₃ (Sigma) y transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante, pero añadiendo RNaseOUT® (Invitrogen). La calidad y cantidad de los ADNc generados se analizó por PCR con los siguientes cebadores de amplificación de los intrones dirigidos contra *GAPDH* de trigo:

TaGAP1 5'-AGGGTGGTGCCAAGAAGGTCA-3' (SEC ID N.º: 34)

5' TaGAP2 -TATCCCCACTCGTTGTCGTA-3' (SEC ID N.º: 35)

La expresión de *TaEC1* se analizó usando el par de cebadores:

TaEC1fw2 5'-CCGAGCGGCTGCAGGGAGTGG-3' (SEC ID N.º: 36)

TaEC1rev2 5'-GCGTCGGAGTAGCCCTTGAGCA-3' (SEC ID N.º: 37)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo durante 30 ciclos (*GAPDH*) y 38 ciclos (*TaEC1*) respectivamente, usando 2,5 µl de ADNc como plantilla.

Se aisló ARNm de *Arabidopsis* a partir de hasta 5 mg de tejido usando el kit Dynabeads® mRNA DIRECT® Micro kit (Dyna) siguiendo las directrices del fabricante. Se aisló ARNm fusionado usando un dispositivo de transferencia de partículas magnéticas (PickPen®, Bio-Nobile). Antes de la RT-PCR, el ARNm fusionado se trató con ADNasa (exenta de ARNasa; Invitrogen) en un volumen de 10 µl. La síntesis de ADNc de primera hebra se llevó a cabo usando Oligo (dT)₂₀ (Invitrogen) y transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante pero añadiendo RNaseOUT® (Invitrogen). La calidad y cantidad de ADNc generado se analizó por PCR con los siguientes cebadores de amplificación de los intrones dirigidos contra actina de *Arabidopsis* (At2g37620):

Act3fw 5'-GATTTGGCATCACACTTTCTACAATG-3' (SEC ID N.º: 38)

Act3rev 5'-GTTCCACCACTGAGCACAATG-3' (SEC ID N.º: 39)

Los ADNc similares a *AtEC1* se amplificaron usando los siguientes pares de cebadores específicos de los genes siguientes para cada uno de *AtEC1.1*, *AtEC1.2alb*, *AtEC1.4* y *AtEC1.5*:

AtEC1.1fw 5'-ACAGTGACAGCTCGCCCTCTC-3' (SEC ID N.º: 40)

AtEC1.1rev 5'-AGTCATTGCCATCATAGTAACCTT-3' (SEC ID N.º: 41)

AtEC1.2a/bfw 5'-AGTTTCCTCTTTGCCACCATC-3' (SEC ID N.º: 42)

AtEC1.2a/brev 5'-CACCGTTGAGGAAGAAGAGAA-3' (SEC ID N.º: 43)

AtEC1.4fw 5'-CCAGCGGAGTCATCAACCAACATA-3' (SEC ID N.º: 44)

AtEC1.4rev 5'-GGAGACGGAGCCGGAGAAGAGT-3' (SEC ID N.º: 45)

AtEC1.5fw 5'-GCGCCGAAACTTGATGGACT-3' (SEC ID N.º: 46)

AtEC1.5rev 5'-GGCGCCGGTGAAGGAGATAAT-3' (SEC ID N.º: 47).

2 µl de cDNA se usaron como plantilla para cada reacción de PCR.

Ejemplo 9**Materiales y Procedimientos - Clonación de construcciones de condensación de promotor-GUS**

5 El ADN genómico de *A. thaliana* (ecotipo Columbia-0) se aisló de acuerdo con Li y Chory, en *Methods in Molecular Biology* (Vol. 82) eds. Martínez-Zapater y Salinas, páginas 55-60, 1997). Los fragmentos genómicos de AtEC1.1 y AtEC1.2a se amplificaron a partir de ADN genómico por PCR, usando ADN polimerasa Taq "correctora" (MBI Fermentas). El cebador de promotor para la secuencia de control transcripcional de acuerdo con la presente invención:

10 pAtEC1.1 5'-TGCCTTATGATTTCTTCGGTTTC-3' (SEC ID N.º: 48) y el cebador específico de gen:

AtEC1.1rev1 5'-TCAGAGTCATTGCCATCACAGTAACCTT-3' (SEC ID N.º: 49) se usaron para amplificación de la región promotora y de parte del gen AtEC1.1 (837 pb). Cebador de promotor:

15 pAtEC1.2a 5'-AAGCATTGCGTTTGGTTTATC-3' (SEC ID N.º: 50) y cebador de terminador:

tAtEC1.2a 5'-AATGCGTTTTAGTCACACG-3' (SEC ID N.º: 51) se usaron para amplificación de AtEC1.2a (1371 pb). Los productos de amplificación genómica se clonaron en pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen), después de añadir adeninas 3' (TOPO-gAtEC1.1 y TOPO-gAtEC1.2a). Se llevaron a cabo adición de adeninas 3', ligación y transformación de células TOP10F' competentes de acuerdo con las directrices del fabricante.

25 Cebadores específicos de genes que contienen los sitios de restricción se diseñaron clonando los promotores delante del gen de la P-glucuronidasa (*uidA*; Jefferson y col. EMBO J 6: 3901-3907, 1987). 457 pb 5' anteriormente en la cadena del codon de iniciación de *AtEC1.1* se amplificaron a partir de TOPO-gAtEC1.1. usando los cebadores M13rev (cebador de vector) y:

AtEC1.1-PstI 5'-CCATTTCTCTGCAGATTGATAA-3' (SEC ID N.º: 52)
893 pb anteriormente en la cadena del codon de iniciación de *AtEC1.2a* se amplificó a partir de TOPO-gAtEC1.2a usando los cebadores M13rev (cebador de vector) y:

AtEC1.2a-BglII 5'-CCATAGATCTTTCTTTTGGGG-3' (SEC ID N.º: 53)
Después de la precipitación de reacciones de PCR (1/10 vol. de NaAc 3 M, pH 5,2/1 vol. de isopropanol), los fragmentos purificados se sometieron a digestión de restricción con *PstI* (promotor de AtEC1.1) y *BamHI/BglII* (promotor de AtEC1.2a), respectivamente. Se usaron las mismas enzimas para restricción del vector pMG2002 que contiene GUS (Manfred Gahrtz, no publicado), retirando de este modo el promotor de ubiquitina de maíz delante del gen GUS. Los fragmentos y vectores sometidos a digestión de restricción se purificaron usando el kit de purificación de ADN "Easy Pure" (Biozym). Antes de la ligación, plásmidos digeridos con *PstI* y *BamHI/BglII* se defosforilaron usando CIAP (Fosfatasa Alcalina del Intestino de Ternera; MBI Fermentas), siguiendo las directrices del fabricante.
40 Los promotores se ligaron en vectores digeridos y defosforilados usando ligasa T4 (1 U/μl, Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. Las reacciones fueron de ligación transformando células Top10F' competentes (Invitrogen). Los clones positivos se seleccionaron por PCR de colonias, usando cebadores específicos de genes:

GUS start rev 5'-ATCCAGACTGAATGCCACA-3' (SEC ID N.º: 54),
45 pAtEC1.1 de acuerdo con la presente invención (SEC ID N.º: 48) y pAtEC1.2a (SEC ID N.º: 50).

Todas las preparaciones de plásmidos se llevaron a cabo bien usando el Kit de Miniprep. de Plásmidos de E.Z.N.A. (Pqqlab), o el Kit 100 de Midi de plásmido de QIAGEN (Qiagen). Todos los fragmentos y construcciones clonados se verificaron por secuenciación, usando bien cebadores flanqueantes M13fw y M13rev (TOPO-gAtEC1.1 y TOPO-gAtEC1.2a), o bien los cebadores específicos de gen GUS Start rev (SEC ID N.º: 54), pAtEC1.1 (SEC ID N.º: 48) y pAtEC1.2a (SEC ID N.º: 50).

Ejemplo 10**55 Materiales y procedimientos - Clonación de proteína de fusión GFP**

EGFP (proteína de fluorescencia de verde potenciada; Pang y col. *Plant Physiol* 112: 893-900, 1996) se condensó en el extremo C-terminal de la fase de lectura abierta de *AtEC1.1*, sometida al control del promotor de *AtEC1.1* de acuerdo con la invención actual. El promotor y el marco de lectura abierta de *AtEC1.1* se amplificaron a partir de ADN genómico usando ADN polimerasa Taq "correctora" (MBI Fermentas) y los cebadores:

E1F 5'-GCCTTATGATTTCTTCGGTT-3' (SEC ID N.º: 55)
E1R 5'-GCAGGAGTGTAAGATGAAT-3' (SEC ID N.º: 56)

65 Una segunda amplificación de *AtEC1.1* se llevó a cabo usando los cebadores modificados:

EC1-PF2 5'-CCCCGAATTCCTTATGATTTCTTCGGT-3' (SEC ID N.º: 57)

EC1-R 5'-CTCGGATCCGGTTAGAAAGGAGAA-3' (SEC ID N.º: 58).

Después de restricción con EcoRI y BamHI, el fragmento se clonó dentro de los sitios EcoRI-BamHI del vector p7U-GFP (DNA Cloning Service). La fusión C-terminal de EGFP y la secuencia del fragmento clonado se verificó por

5 secuenciación usando los cebadores:

GFP-seq 5'-CCAGTTCCACCAGGATTG-3' (SEC ID N.º: 59)

LH1 5'-CCCAAGATCTGGCCCTT-3' (SEC ID N.º: 60).

Ejemplo 11

10

Materiales y procedimientos - Transformación estable de *Arabidopsis*

Para la transformación de plantas, se transfirieron vectores en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* (Koncz y Schell, Mol Gral Genet 204: 383-396, 1986). Las transformaciones se llevaron a cabo en el ecotipo Columbia-0 por un procedimiento de "inmersión floral" de acuerdo con Clough y Bent (Plant J 16: 735-743, 1998). Las semillas obtenidas de los transformantes T0 se hicieron germinar en suelo después de un tratamiento de frío de 2 días a 2° C. Tres días después de la germinación, los transgénicos se seleccionaron pulverizando BASTA® a 200 mg/l (Bayer Crop Science) suplementado con Tween al 0,1 %. El tratamiento con BASTA® se repitió dos veces después de tres días, cada vez. Las plántulas supervivientes se transfirieron a macetas individuales. Las plantas resistentes a BASTA® de la generación T1 y T2 se analizaron detectando la presencia del T-ADN por PCR usando cebadores de GUS:

GUS3 5'-GCGTGGTGATGTGGAGTATTG-3' (SEC ID N.º: 61)

GUS4 5'-TCACCGAAGTTCATGCCAGTC-3' (SEC ID N.º: 62) o cebadores:

25 bar-fw 5'-CCGTACCGAGCCGCAGGAAC-3' (SEC ID N.º: 63)

bar-rev 5'-CAGATCTCGGTGACGGGCAGGAC-3' (SEC ID N.º: 64)

Ejemplo 12

30 Materiales y procedimientos - Tinción de GUS

La actividad de D-glucuronidasa (GUS; Jefferson y cols., 1987, *supra*) se llevó a cabo de acuerdo con un protocolo de Vielle-Calzada y cols. (Nature 404: 91-94, 2000). Inflorescencias, silículas, hojas y tallos de plantas que crecen en el suelo se transfirieron a pocillos de microvaloración que contienen ~~100~~ tampón de tinción de GUS. Se abrieron silículas y pistilos a lo largo con una aguja hipodérmica (0,4 x 20 mm, Braun) antes de transferir en tampón de tinción de GUS. Las placas de microvaloración se situaron a vacío durante 5 minutos. Después de la liberación de vacío, las placas se recubrieron con una tapa y se incubaron a 37 °C en la oscuridad durante 6 horas, o hasta tres días. Después, la solución se eliminó y los tejidos se aclararon en etanol al 70%. Se aislaron óvulos sobre un portaobjetos de vidrio diseccionando los pistilos con una jeringuilla en una gota de tampón de fosfato de sodio, pH 7,0. Los óvulos se aclararon usando bien solución de Hoyers (Liu y Meinke, Plant J 16: 21-31, 1998), o bien tampón aclarador de hidrato de cloral (80 g de hidrato de cloral, 20 ml de H₂O, 10 ml de glicerol) y se analizaron en un microscopio Zeiss Axioskop en instrumentos ópticos de contraste de interferencia diferencial (DIC). Las imágenes se capturaron en una cámara AxioCam (Zeiss) usando el programa de Axiovision AC Release 4.1 (Zeiss).

45 Ejemplo 13

Materiales y procedimientos - Tinción de GUS

50 Se diseccionaron óvulos de plantas de *Arabidopsis* transgénicas en portaobjetos de vidrio en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,24 g de KH₂PO₄). Se observó fluorescencia usando un Microscopio Confocal de Barrido Láser (CLSM), como se describe por Knebel y cols. (Eur J Cell Biol 52: 328-340, 1990).

Ejemplo 14

55

Materiales y procedimientos - Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* no radiactiva con sondas de ARN marcadas con DIG de *AtEC1.1* y *AtEC1.2a* se llevó a cabo como se describe por Vielle-Calzada (Genes Dev 13: 2971-2982, 1999). Para generar sondas de ARN por transcripción *in vitro*, la fase de lectura abierta y 3'-UTR de *AtEC1.1* y *AtEC1.2a* se amplificó a partir de ADN genómico por PCR y se clonó subsiguientemente en pCR®II-TOPO® (Invitrogen).

Los cebadores usados para amplificación de *AtEC1.1* fueron:

65 1-1fwXbal 5'-ATCTGTCTAGAAATGGCTTC-3' (SEC ID N.º: 65)

1-1revXbal 5'-TTTATTCTAGAAAGTAATAACAG-3' (SEC ID N.º: 66)

Los cebadores usados para amplificación de *AtEC1.2a* fueron:

5 At2a-BgIIIfw 5'-AAAGAAAGATCTATGGCTTCTAAC-3' (SEC ID N.º: 67) At2a-Salrev 5'-TCATTAGTCGACTTT-GCATACATC-3' (SEC ID N.º: 68)

La ligación de productos de PCR en pCR®II-TOPO® y la transformación de células competentes se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del fabricante.

10 Las colonias positivas se seleccionaron por PCR de colonias, usando los cebadores de vector M13-20 y M13rev. Los plásmidos se prepararon usando el Kit 100 de Midi de plásmido de QIAGEN (Qiagen). Los fragmentos clonados se verificaron por secuenciación, usando los cebadores de vectores M13fw y M13rev. Los plásmidos se linealizaron usando BamHI (sentido) y XhoI (antisentido) y se purificaron por dos veces de extracciones en fenol/cloroformo seguidas por precipitación. Se generaron los transcritos de eliminación de los plásmidos linealizados (0,5 µg/µl en agua tratada con DEPC) usando polimerasas T7 y SP6 para transcripción *in vitro*. La hibridación *in situ* de óvulos de *Arabidopsis* con sondas de sentido correcto y antisentido se llevaron a cabo usando secciones 8 µm de pistilos no fertilizados y fertilizados maduros, siguiendo esencialmente un protocolo de Jackson, D. (en: Molecular Plant Pathology, A Practical Approach. (Bowles, D.J., Gurr, S.J. y McPherson, M., eds.), Oxford University Press, Reino Unido, 163-174, 1991).

20 Las secuencias de ADN y proteínas se alinearon usando el software Clustalw (Higgins y cols., Nucl. Acids Res. 22: 4673-4680, 1994) y alineaciones trazadas por GeneDoc versión 2/6/02 (Nicholas y cols., Embnew. News 4: 14, 1997).

25 Ejemplo 15

Detección de restos conservados en secuencias de control transcripcional derivadas de EC1

30 Cada una de las secuencias de control transcripcional derivadas de EC1 definidas en el presente documento (es decir SEC ID N.º: 24, de acuerdo con la presente invención y SEC ID N.º: 25, SEC ID N.º: 26, SEC ID N.º: 27, SEC ID N.º: 28, SEC ID N.º: 29, SEC ID N.º: 30, SEC ID N.º: 31, SEC ID N.º: 32) se inspeccionó por elementos reguladores en cis conocidos por PLACEdb 26.0 (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>), una base de datos de restos encontrados en elementos reguladores de ADN que actúan en cis de plantas.

35 Se llevó a cabo identificación de restos de secuencia novedosos computacionalmente usando el software de análisis de secuencia Lasergene/MegAlign (DNASTAR, Inc., 1228 South Park Street, Madison, WI 53715, EE.UU.).

40 Todas las secuencias de control transcripcional se alinearon por pares unas con otras usando dos algoritmos, Alineamiento de ADN de Martínez Needleman-Wunsch (Apareamiento Mínimo: 9; Penalización De Hueco: 1,10; Penalización de Longitud De Hueco: 0,33) y Alineamiento de ADN de Wilbur-Lipman (Ktuple: 3; Penalización De Hueco: 3; Ventana: 20). Además, restos sobrerrepresentados en todas las regiones anteriormente en la cadena de las secuencias de control transcripcional se analizaron por el algoritmo de hallazgo de restos MotifSampler (Thijs y cols., Journal of Computational Biology, 9 (2), 447-464, 2002) en <http://homes.esat.kuleuven.be/~thijs/Work/MotifSampler.html> (véase la figura 10).

45 Se identificaron dos restos en las regiones anteriormente en la cadena de SEC ID N.º: 24, de acuerdo con la presente invención y SEC ID N.º: 25, SEC ID N.º: 26, SEC ID N.º: 27, SEC ID N.º: 28, SEC ID N.º: 30 y SEC ID N.º: 31. Las secuencias consenso de dos restos de secuencia novedosos identificados fueron como sigue:

50 Resto n.º 1 de secuencia de nucleótidos de promotor de EC1: 5'-CCACTAAT-3' (SEC ID N.º: 33)
Resto n.º 2 de secuencia de nucleótidos de promotor de EC1: 5'-kTAATTAm-3' (SEC ID N.º: 69)

Como la expresión de genes objeto EC1 se regula de una manera similar, los restos identificados representan elementos reguladores en cis teóricos para especificidad de oosferas de las secuencias control transcripcionales.

55 Aquellos expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible a variaciones y modificaciones distintas de aquellas específicamente descritas.

60 Además, debe destacarse que, como se usa en el presente documento, las formas del singular "un", "uno" y "el" incluyen aspectos plurales a menos que el contexto ya establezca lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una secuencia de nucleótidos de interés" incluye una secuencia de nucleótidos individual así como dos o más secuencias de nucleótidos; "una oosfera" incluye una oosfera individual así como dos o más oosferas; y así sucesivamente.

Listado de secuencias

<110> Adelaide Research & Innovation Pty Ltd Grains Research & Development Corporation

5 <120> SECUENCIAS DE CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE LA OOSFERA VEGETAL

<130> SECUENCIAS DE CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE LA OOSFERA VEGETAL

<160> 69

10 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 52

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia consenso de polipéptido EC1

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

25 <220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> Leu puede reemplazarse con Ile

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

35 <220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> Ser puede reemplazarse con His

40 <220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> Thr puede reemplazarse con Ser

45 <220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

50 <220>

<221> VARIANTE

<222> (14)..(14)

<223> Asp puede reemplazarse con Glu

55 <220>

<221> VARIANTE

<222> (15)..(15)

<223> Ile puede reemplazarse con Leu

60 <220>

<221> VARIANTE

<222> (16)..(16)

<223> Ile puede reemplazarse con Leu o Val

65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (20)..(20)
 <223> Leu puede reemplazarse con Ile o Val

10

<220>
 <221> NON_CONS
 <222> (20)..(21)

15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (21)..(21)
 <223> Leu puede reemplazarse con Ile

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(24)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

30

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (28)..(28)
 <223> Ala puede reemplazarse con Ser

35

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (29)..(29)
 <223> Ile puede reemplazarse con Leu o Val

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(35)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

45

<220>
 <221> NON_CONS
 <222> (37)..(38)

50

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (38)..(38)
 <223> Ile puede reemplazarse con Leu o Val

55

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (40)..(40)
 <223> Phe puede reemplazarse con Leu

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (42)..(43)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(47)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (49)..(51)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

<400> 1

Cys Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Ser Cys Thr Xaa Asp Ile Ile
 1 5 10 15

Xaa Phe Phe Leu Leu Xaa Xaa Xaa Cys Cys Xaa Ala Ile Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Cys Trp Ile Gly Phe Thr Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Leu
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Cys
 50

10

<210> 2

<211> 158

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

15

<400> 2

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

Met Leu Met Val Ala Ser Ser Thr Val Thr Ala Arg Pro Leu Met Lys
 20 25 30

Pro Ser Met Gly Thr Ser Ser Pro Thr Thr Ser Leu Val Tyr Arg Leu
 35 40 45

Lys Leu Asp Glu Asp Thr Gly Tyr Cys Trp Asp Ser Leu Met Gln Leu
 50 55 60

Gln His Cys Ser Gly Glu Leu Ile Leu Phe Phe Leu Asn Gly Glu Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Gly Pro Gly Cys Cys Ser Ala Ile Arg Thr Ile Gly Arg Lys
 85 90 95

Cys Trp Pro Thr Met Ile Gly Val Leu Gly Phe Thr Ala Gln Glu Gly
 100 105 110

Asp Met Leu Gln Gly Tyr Cys Asp Gly Asn Asp Ser Asp Asn Asn Gly
 115 120 125

Glu Asp His Ala Leu Ala Ser Ser Thr Leu Pro Leu Ser Val Asn Phe
 130 135 140

Lys Thr Thr Val Val Arg Ser Ser Ala Ser Pro Ser Asn Pro
 145 150 155

<210>3

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

ES 2 381 845 T3

Met Ala Ser Asn Thr Ser Phe Leu Phe Ala Thr Ile Ala Ile Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Leu Asn Ile Ser Gly Arg Thr Leu Pro Glu Thr Glu Asp Ser Thr
 20 25 30
 Asn Ile Ala Ala Arg Leu Asn Gly Gly Gly Leu Met Glu Cys Trp Asn
 35 40 45
 Ala Leu Tyr Glu Leu Lys Ser Cys Thr Asn Glu Ile Val Leu Phe Phe
 50 55 60
 Leu Asn Gly Glu Thr Lys Leu Gly Val Asp Cys Cys Gln Ala Val Glu
 65 70 75 80
 Val Ile Thr Thr Asp Cys Trp Pro Ala Met Leu Thr Ser Leu Gly Phe
 85 90 95
 Thr Ser Asp Glu Thr Asn Val Leu Arg Gly Phe Cys Gln Ser Pro Asn
 100 105 110
 Ser Gly Gly Ser Ser Pro Ala Pro Ser Ser Val Lys Leu
 115 120 125

<210>4

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

ES 2 381 845 T3

Met Ala Ser Asn Thr Ser Phe Leu Phe Val Thr Val Thr Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Leu Asn Val Ser Ser Arg Ala Leu Pro Pro Val Ala Asp Ser Thr
 20 25 30
 Asn Ile Ala Ala Arg Leu Thr Gly Gly Gly Leu Met Gln Cys Trp Asp
 35 40 45
 Ala Leu Tyr Glu Leu Lys Ser Cys Thr Asn Glu Ile Val Leu Phe Phe
 50 55 60
 Leu Asn Gly Glu Thr Lys Leu Gly Tyr Gly Cys Cys Asn Ala Val Asp
 65 70 75 80
 Val Ile Thr Thr Asp Cys Trp Pro Ala Met Leu Thr Ser Leu Gly Phe
 85 90 95
 Thr Leu Glu Glu Thr Asn Val Leu Arg Gly Phe Cys Gln Ser Pro Asn
 100 105 110
 Ser Gly Gly Ser Ser Pro Ala Leu Ser Pro Val Lys Leu
 115 120 125

<210>5

<211> 127

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 5

ES 2 381 845 T3

Met Ala Ser Asn Thr Thr Phe Leu Phe Ser Thr Val Thr Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Ile Leu Leu Asn Thr Thr Val Ser Gly Arg Asp Leu Pro Ala Glu Ser
 20 25 30
 Ser Thr Asn Ile Ala Ala Arg Leu Gln Ser Gly Gly Leu Met Glu Cys
 35 40 45
 Trp Asn Ala Leu Tyr Glu Leu Lys Ser Cys Thr Asn Glu Ile Val Leu
 50 55 60
 Phe Phe Leu Asn Gly Glu Thr Lys Leu Gly Val Ser Cys Cys Glu Ser
 65 70 75 80
 Val Asp Ile Ile Thr Thr Asn Cys Trp Pro Ala Met Leu Thr Ser Leu
 85 90 95
 Gly Phe Thr Pro Glu Glu Ala Asn Val Leu Arg Gly Phe Cys Gln Asn
 100 105 110
 Pro Asn Ser Gly Asp Ser Ser Pro Ala Pro Ser Pro Lys Ile Val
 115 120 125

<210> 6

<211> 155

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

ES 2 381 845 T3

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

Met Ser Tyr Leu Ile Ser Thr Phe His Val Ile Thr Val Ala Glu Gly
20 25 30

Arg Thr Leu Gln Phe Thr Lys Met Ala Thr Asp His Ser Gly Ala Gly
35 40 45

Asn Leu Met Asp Cys Trp Asn Ala Gly Leu Glu Leu Lys Ser Cys Thr
50 55 60

Asp Glu Ile Val Lys Phe Phe Leu Ser Gln Thr Gly Thr Ser Glu Pro
65 70 75 80

Pro Val Lys Gly Gly Ile Asp Lys Asp Cys Cys Gly Ala Ile Gly Leu
85 90 95

Val Val Lys Asp Cys Trp Ser Val Met Phe Thr Ser Leu Gly Leu Thr
100 105 110

Thr Met Glu Gly Asn Asn Leu Arg Glu Tyr Cys Glu Phe Gln Ala Glu
115 120 125

Lys Ser Glu Leu Ser Pro Ser Pro Ala Pro Glu Thr Leu Ala Leu Ser
130 135 140

Pro Val Glu Ile Thr Tyr Pro Gly Leu Asp Tyr
145 150 155

<210> 7

<211> 133

<212> PRT

5 <213> Medicago truncatula

<400> 7

ES 2 381 845 T3

Met Ala Phe Phe Leu Lys Leu Phe Ile Ile Ile Ser Leu Ser Thr Ile
1 5 10 15

Val Thr Ala Thr Ser Leu Ser Ser Thr Lys Thr Leu Ala Ser Arg Leu
20 25 30

Glu Leu Phe Asp Gly Ser Gly Pro Asn Asn Lys Cys Trp Glu Thr Met
35 40 45

Leu Glu Leu Gln His Cys Thr Gly Asp Ile Val Thr Phe Phe Leu Asn
50 55 60

Gly Gln Thr His Leu Gly Ser Gly Cys Cys Asn Ala Leu Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ala Gln Glu Cys Trp Gly Asn Leu Leu Thr Ser Leu Gly Leu Thr Val
85 90 95

Glu Glu Ala Glu Ile Leu Arg Gly Phe Cys Ala Arg Val Ala Ser Val
100 105 110

Asn Asn Ser Leu Leu Pro Ser Ile Thr Val Asp Ala Pro Ser Pro Ala
115 120 125

Pro Ile Asn Asn Tyr
130

<210> 8

<211> 151

<212> PRT

5 <213> Oryza sativa

<400> 8

ES 2 381 845 T3

Met Ala Cys Ser Gly Ser Phe Leu Pro Ile Met Leu Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Gly Ala Ala Val Ala Gly Gly Ala Pro Pro Gly Leu Gly Leu
 20 25 30
 Ala Gln Arg Leu Ala Asp Gly Val Gly Gln Gln Gln Gln Gln Cys Trp
 35 40 45
 Glu Val Leu Met Glu Ile Lys Ser Cys Thr Gly Glu Ile Leu Leu Phe
 50 55 60
 Phe Ile Asn Gly Glu Ala Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Cys Arg Ala Ile
 65 70 75 80
 Arg Val Ile Glu Gln Ser Cys Trp Ala Thr Asp Ala Met Leu Ser Val
 85 90 95
 Ile Gly Phe Thr Pro Glu Glu Gly Asp Met Leu Lys Gly Tyr Cys Asp
 100 105 110
 Ala Gly Asp Glu His Lys Pro Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Ala Val
 115 120 125
 Gly Tyr Val Ala Val Gly Glu Asn Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Lys
 130 135 140
 Ser Leu Ala Leu Gln His Arg
 145 150

<210> 9

<211> 139

<212> PRT

5 <213> Oryza sativa

<400> 9

ES 2 381 845 T3

Met Ala Ser Leu Leu Ser Val Ala Val Val Leu Val Val Val Ser Ala
1 5 10 15

Gln Ala Leu Ala Ala Val Ala Val Ala Asp Ala Ala Arg Val Asn Ala
20 25 30

Gly Ala Ala Ala Phe Ser Pro Ala Val Pro Leu Gly Gly Arg Leu Asp
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Gly Leu Val Glu Cys Trp Ser Ala Val Ala Glu Leu
50 55 60

Arg Ser Cys Thr Asp Glu Ile Val Leu Phe Phe Leu Asn Gly Glu Thr
65 70 75 80

Thr Gln Leu Gly Ala Gly Cys Cys Arg Ala Val Arg Ala Ala Thr Arg
85 90 95

Asp Cys Trp Pro Ala Met Leu Ala Ala Val Gly Phe Thr Ala Glu Glu
100 105 110

Ala Asp Val Leu Arg Gly Leu Cys Asp Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala
115 120 125

Ala Asp Ser Thr Ser Pro Ala Pro Ser Ala Ala
130 135

<210> 10

<211> 144

<212> PRT

5 <213> Oryza sativa

<400> 10

ES 2 381 845 T3

Met Ala Leu Ala Val Lys Leu Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Gly Gly Ser Ser Thr Thr Thr Val Pro Pro Leu Glu Glu Arg
 20 25 30
 Leu Gly Ala Ala Phe Asp Gly Met Ala Ala Ala Ala Glu Gly Gly Gly
 35 40 45
 Gly Gly Gly Trp Met Met Glu Cys Trp Ser Ala Val Thr Lys Leu Gly
 50 55 60
 Ser Cys Thr Asn Glu Ile Val Leu Phe Phe Val Asn Gly Glu Ser Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gly Pro Asp Cys Cys Val Ala Ile Arg Thr Val Thr Arg Arg Cys
 85 90 95
 Trp Pro Ala Met Leu Ala Ser Ile Gly Phe Thr Ala Gln Glu Ala Asp
 100 105 110
 Ile Leu Arg Gly Phe Cys Asp Ala Glu Leu Ala Ala Pro Pro Pro Pro
 115 120 125
 Ser Thr Asn Ala Ser Ser Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ser Ala
 130 135 140

<210> 11

<211> 151

<212> PRT

5 <213> Triticum aestivum

<400> 11

Met Ala Ser Ser Gly Ser Leu Leu Pro Ala Leu Leu Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Thr Val Ala Ala Thr Ala Ser Thr Thr Thr Thr Thr Phe Val Arg
 20 25 30
 Ala Gly Ala Pro Pro Ala Glu Leu Ala Glu Arg Leu Gln Gly Val Gly
 35 40 45
 Gln Gln Gln Cys Trp Glu Ile Leu Met Asp Ile Arg Ser Cys Thr Gly
 50 55 60
 Glu Ile Ile Leu Phe Phe Leu Asn Gly Glu Ala Tyr Leu Gly Pro Gly
 65 70 75 80
 Cys Cys Arg Ala Ile Arg Ala Val Glu Gln His Cys Trp Ala Ala Asp
 85 90 95
 Ala Thr Leu Ser Val Ile Gly Phe Thr Pro Glu Glu Gly Asp Met Leu
 100 105 110
 Lys Gly Tyr Cys Asp Ala Gly Asp Ser Gly Glu Gly Gln Gln Arg Gly
 115 120 125
 Ala Phe Asp Gly Val Ala Ser Asp Gly Ala Val Ala Ala Ala Ala Gly
 130 135 140
 Arg Lys Gly Leu Gly Ala Pro
 145 150

<210> 12

<211> 174

<212> PRT

5 <213> Hordeum vulgare

<400> 12

Met Ala Ser Ser Gly Pro Leu Leu Pro Thr Leu Leu Val Leu Leu Ala
 1 5 10 15

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

Thr Thr Ala Thr Thr Phe Val Arg Ala Ala Asp Leu Ala Asp Arg Leu
 35 40 45

Glu Gly Ala Val Ser Gln Gln Cys Trp Glu Thr Leu Leu His Ile Lys
 50 55 60

Ser Cys Thr Gly Glu Ile Ile Leu Phe Phe Leu Asn Gly Glu Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gly Pro Gly Cys Cys Arg Ala Ile Arg Ala Ile Glu Gln Arg Cys
 85 90 95

Trp Ala Ala Asp Leu Met Leu Ser Val Ile Gly Phe Thr Pro Glu Glu
 100 105 110

Gly Asp Met Leu Lys Gly Tyr Cys Asp Ala Gly Asp Asp Asp Asn Asn
 115 120 125

Asn Gly Pro Arg His Ser Phe Gly Gly Ser Ser Pro Ala Pro Pro Pro
 130 135 140

Arg Arg Ala Leu Gly Ala Asp Gly Val Ala Thr Gly Ala Gly Thr Val
 145 150 155 160

Ala Ala Ala Ala Gly Arg Lys Gly Leu Gly Ala Pro Val Gly
 165 170

<210> 13
 <211> 477
 <212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 13

atggcttcca aatctagttt catggctacc ttcaacattg tgactctcat gctcatggtg 60
 gcttctcca cagtgcagc tcgccctctc atgaaacat ccatggggac gtcttctct 120
 accacaagcc ttgtgtacag gctcaagctt gatgaagata cagggactg ctgggactca 180
 ctgatgcagc tccaacactg ttctggagag ctgatcttgt tcttctcaa cggtgagact 240
 tacattggcc ctgggtggtg cagtgcata agaaccattg gacgcaagtg ttggcctact 300
 atgattggtg ttcttggtt tactgctcaa gaaggatgata tgctccaagg ttactgtgat 360
 ggcaatgact ctgacaacaa tggatgaagac catgctcttg cctcctcaac actgcctctc 420
 tccgtgaatt tcaagactac cgttggttaga tcttctgctt ctccttctaa cccttga 477

<210> 14

<211> 378

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 14

atggcttcta acacaagttt cctctttgcc accatcgcta tctcctcgt tctcaacatc 60
 tccggaagaa ctctcccga gacggaagat tccacaaaca tagcggcaag actcaacgga 120
 ggaggactaa tggagtgttg gaacgcactt tatgagctca aatcatgcac caacgaaatc 180
 gttctcttct tctcaacgg tgaaaccaaa ctcggcgctg attgctgtca agccgctcag 240

 gtcacacca ccgattggtg gccctgcgatg ctacagcttc taggctttac ctctgatgaa 300
 accaacgttc ttctgggtt ctgtcaatct ccaaattccg gtggttcttc tccggcgcct 360
 tctctgtga aactttga 378

10 <210> 15

<211> 378

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

15 <400> 15

atggcttctā acacaagttt cctctttgct accgtcactc ttctcctcgt tctcaacgtc 60
 tccagcagag cactcccgcc cgtggcggat tccaccaaca tagcggctag actaaccgga 120
 ggaggactga tgcagtgttg ggatgcactc tacgagctga agtcatgtac taatgagatc 180
 gttctcttct ttctcaacgg tgagaccaaa ctcggtctag gttgctgcaa cgccgttgat 240
 gtcattacca ctgattggtg gccggcgatg cttacttctc ttggctttac actggaggaa 300
 accaatgtcc tccgtgggtt ctgtcaatct ccgaactccg gcggttcttc tccagctctt 360
 tcccctgtca aactttga 378

<210> 16

<211> 384

<212> ADN

20

ES 2 381 845 T3

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 16

atggcctcga acactacttt cctcttctcc accgtcacac ttctcatcat cctcctaaac	60
accaccgtct ccggtagaga tctcccagcg gagtcatcaa ccaacatagc tgcgaggctc	120
caaagtggag gactgatgga atgctggaac gcattatacg agctgaaatc atgcaccaac	180
gagatcgttc tcttcttctt caacgggtgaa acaaaacttg gtgttagttg ttgcgaatcc	240
gtagacatca tcaccaccaa ttgctggccg gcgatgctca cttctctcgg atttacgcct	300
gaggaagcta atgtccttcg tggcttttgt cagaatccaa actccggcga ctcttctcgg	360
gctccgtctc ccaaaatagt ttga	384

5

<210> 17

<211> 468

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

10

<400> 17

atggctaact aatctacttc gaagcctctt ctgctctcat ttctaagat gtcatatctc	60
atatcgacct ttcatgtcat cactgtcgcc gagggaagga ctctccagtt cacgaagatg	120
gctacggatc attccggcgc cggaaacttg atggactgtt ggaacgcggg gttggagctt	180
aagtcatgca ccgatgagat tgtcaagttt ttccttagtc aaaccggtac gagtgaaccg	240
ccggttaaag gtggaattga caaagattgt tgtggagcca ttgggttggt tgtgaaagat	300
tgttggtccg ttatgtttac ttctttaggg cttacgacta tgggaagggaa taacttgaga	360
gagtattgtg agtttcaagc tgagaagtcg gaattatctc cttcaccggc gccggaaact	420
ttggctttgt ctccggttga gataacgtat cccggacttg attattga	468

<210> 18

15

<211> 402

<212> ADN

<213> Medicago truncatula

<400> 18

20

ES 2 381 845 T3

atggctttct ttttgaaact gtttattatc atatccttgt cgacaatagt tacagcaacg 60
 tcattgagct caacaaaaac cctagcatca cgtttagaat tatttgatgg aagtggcccc 120
 aacaacaaat gttgggagac aatggtggag cttcaacatt gtactgggta tattgttaca 180
 tttttcctta atggtcagac acatccttga tctggttgtt gtaatgctct tcttactata 240
 gctcaagaat gttggggaaa tttgcttacc tcggtggggtc tcacggtaga agaagctgaa 300
 attctacgtg gcttttgtgc tcgtgttgcc tctgttaaca attctctttt accatctatc 360
 actgttgatg ccccttcacc tgcacctatc aacaattatt ga 402

<210> 19
 <211> 456
 <212> ADN
 5 <213> Oryza sativa

<400> 19

atggcgtgct cgggcagttt cctaccgata atgctcctgc cgctgctcct cgccggcgcc 60
 gcggtggcgg gcggcgcccc gccggggctt gggctggcgc agcggctggc cgacggcgtg 120
 gggcagcagc agcagcagtg ctgggaggtt ctgatggaga tcaagtcgtg cacgggggag 180
 atcctcctct tcttcatcaa cggcgaggcg tacctggggc ccggctgctg ccgcgccatc 240
 cgcgctcatc agcagagctg ctgggccacc gacgccatgc tgtccgtcat cgggttcacc 300
 ccggaggagg gggacatgct caagggctac tgcgacgccg gcgacgagca caagccgtcg 360
 ccgccccccg cctcgccggc cgtcggctac gtcgccgtcg gagagaacgc cgccgtaccg 420
 gccggacgga agagcctggc gctgcagcac cgttag 456

10 <210> 20
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa

15 <400> 20

atggcgtcct tgctgagcgt cgccgtcgtc ctcgtcgtgg tcagcgtca ggccctcgcc 60
 gccgttgccg ttgccgacgc cgcgcgcgtc aacgccggcg ccgcggcctt ctcgcctgca 120
 gtacccctcg gcggccggct tgacggcggc ggcggagggc tggtaggagtg ctggagcgcg 180
 gtggcggagc tccggtcgtg cacggacgag atcgtgctct tcttctcaa cggcgagacg 240
 acgcagctcg gcgccgggtg ctgccgcgcc gtgcgcgccg cgacgcgcga ctgctggccc 300
 gccatgctcg ccgcccgtcg gttcaccgcc gaggaggccg acgtcctccg cggcctctgc 360
 gacgccgagg ccgcccgcgc cgccgccgac tccacgtcgc cggcgccatc ggccgcgtag 420

<210> 21
 <211> 435
 20 <212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 21

atggcgctcg ccggaagct cgccgtcctc ctactacttg ccgcggcagc agctggagga	60
agcagcacga cgaccgtgcc gccgctggag gagaggctgg gcgcggcggt cgacgggatg	120
gcggcggcgg cggagggagg aggaggggga gggtagatga tggagtgctg gagcgcggtg	180
acgaagctgg ggtcgtgcac gaacgagatc gtgctcttct tcgtcaacgg cgagtcctac	240
ctcggccccg actgctgcgt cgccatccgc accgtcacc gccgctgctg gccggccatg	300
ctcgcctcca tcggcttcac cgcccaggag gccgacatcc tccgcggctt ctgcgacgcc	360
gagctcgccg ccccgcccc gccctccacc aacgcctcct ccgccgcccc cgcccgccg	420
ccggcgctccg cttag	435

5

<210> 22

<211> 716

<212> ADN

10 <213> Triticum aestivum

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)..(40)

15

<220>

<221> 3'UTR

<222> (497)..(686)

20

<220>

<221> característica miselánea

<222> (509)..(509)

<223> n es a, c, g, o t

25

<220>

<221> sitio de poliadenilación

<222> (687)..(716)

30

<400> 22

gacagccagc acttgctaga gcctagaggc gatcagtacc atggcttcct ccggctcact 60
 cctccccgcc ctctctgtgc tgctctgtct cacagtcgcc gccaccgcgt cgacgactac 120
 gacgaccttc gtccgggagg gcgctcctcc ggccgagctc gccgagcggc tgcagggagt 180
 ggggcagcag cagtgtctgg agatactgat ggacatcagg tcgtgcacgg gggagatcat 240
 cctcttcttc ctcaacggcg aggcgtacct ggggcccggg tgctgccgcy ccatccgcgc 300
 cgtcgagcag cactgtctgg ccgcygacgc cacgctgtcc gtcatcgggt tcaccccaga 360
 ggagggggac atgtcaagg gctactgcga cgccggtgac agcggcgagg ggcagcagcy 420
 tgggtgctttt gacggcgttg caagtgacgg cgccgtggcc gccgctgccg gaaggaaggg 480
 gcttggtgcc ccgtgaagct gagagtctna agtgtgtgtc cacgtccacc tgtaggttct 540
 cgtgaatcct gtgatgcttc atgagttcat gtaatctttg ttgcgaagct gggaggcgag 600

ttgtgttctc tgggttttgt tcgtgtaacc cgacccgagt tggctatcgc taaccccagc 660
 aaggctcgaa taatagtttc tctgccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 716

- <210> 23
- <211> 525
- <212> ADN
- 5 <213> Hordeum vulgare

<400> 23

atggcgtctt ccggccctct ccttcccacc cttctggtgc tgctcgccgc cgccgccgca 60
 accgcgtcgg cggcaggtgc gcggccggcg agtacgacga cggcgacgac gttcgtccgg 120
 gccgccgacc tcgcygaccg gctggagggg gcggtgtcgc agcagtgtctg ggagacgctg 180
 ctgcacatca agtcgtgcac gggggagatc atcctcttct tcctcaacgg cgaggcgtac 240
 ctggggccgg ggtgctgccg cgccatccgc gccatcgagc agcgtgtctg ggccgccgac 300
 ctcatgctgt ccgtcatcgg gttcaccctg gaggaggggg acatgctcaa gggctactgc 360
 gacgccggcg acgacgacaa caacaacggg cctcgccata gcttcggcgg atcgtccccg 420
 gccccgccgc ctcgtcgcgc tcttgccgcc gacggcgttg caaccggagc cggcaccgtg 480
 gccgccgcgg cgggaaggaa agggctcggg gcgcccgtag gctga 525

- 10 <210> 24
- <211> 463
- <212> ADN
- <213> Arabidopsis thaliana

15 <400> 24

ES 2 381 845 T3

tgcccttatga tttcttcggt ttcaagatga tcaaataggt atagatttca tgctcacaca 60
 tgctcattag atgtgtacat accttactta cccaaatcta ttttctcgca aagattttga 120
 tggtaaagct gatttggttc tattgaacta aatcaaacga gtttcagact gagtgattct 180
 aatccggccc attagcccct aaacagacc cactaattac cagcttttaa tagagtaatt 240
 acacctagtt taccactaa accactaagc actaattatc tcacaatcta atgagcttcc 300
 ctcgtaatta cttgggcttt cactctacca tttatttga acagtcaagt ctctactgtc 360
 tctatataaa ctctctaaag ttaacacaca attctcatca caaacaaatc aaccaaagca 420
 acttctactc tttcttcttt cgaccttacc aatctgttga gaa 463

<210> 25
 <211> 894
 <212> ADN
 5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 25

aagcatttgc gtttggttta tcattgctgt tatacaagga cagagatcca ctgagctgga 60
 atagcttaaa accattatca gaacaaaata aaccattttt tgtaagaat cagagcatag 120
 taaacaacag aaacaaccta agagaggtaa cttgtccaag aagatagcta attatatcta 180
 ttttataaaa gttatcatag tttgtaagtc acaaaagatg caaataacag agaaactagg 240
 agacttgaga atatacattc ttgtatattt gtattcgaga ttgtgaaaat ttgaccataa 300

 gtttaaattc ttaaaaagat atatctgac tagatgatgg ttatagactg taattttacc 360
 acatgtttta tgatggatag tgacacacat gacacatcga caacactata gcatcttatt 420
 tagattacia catgaaattt ttctgtaata catgtctttg tacataattt aaaagtaatt 480
 cctaagaaat atatttatac aaggagttta aagaaaacat agcataaagt tcaatgagta 540
 gtaaaaacca tatacagtat atagcataaa gttcaatgag tttattacia aagcattggt 600
 tcactttctg taacacgacg ttaaaccttc gtctccaata ggagcgtac tgattcaaca 660
 tgccaatata tactaaatac gtttctacag tcaaatgctt taacgtttca tgattaagtg 720
 actatttacc gtcaatcctt tcccattcct cccactaatc caacttttta attactctta 780
 aatcaccact aagcttcgaa tccatccaaa accacaatat aaaaacagaa ctctcgtaac 840
 tcaatcatcg caaaacaaaa caaaacaaaa caaaaacccc aaaaagaaag aata 894

10 <210> 26
 <211> 254
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

15 <400> 26

ES 2 381 845 T3

caagtaacca ttgactcttc gcttgtatct ttccgtaag accacctatt caatcattct 60
 ctaagttaca tgatttaaga ttttaagtaaa atcattaact ctctgccctc tcccacttcc 120
 tccactaaaa accatcttta atcataatta aacctcaaaa atcctttcat aatcacagta 180
 ttataaatag cagctcttac caaatcctct aaaccatcac acaatacaac acaaaatctt 240
 caaaagaaaa caca 254

<210> 27
 <211> 217
 <212> ADN
 5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 27

tttcgtatgc attgtctggt actcatcttc atcagaagcc ttaatcgcac catccaccac 60
 taatcattta ctttcaacta tccctcccca ctaataaacc ttttaattac tctttaatat 120
 ccactaacac aacaaatcct tccacaaaca cactataaat accaaaccat cacaagctag 180
 tctaatacaca ctaaaattcc aaacaaaaac cacacca 217

10 <210> 28
 <211>251
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

15 <400> 28

ggg⁻⁻⁻⁻tttccat aaagcccaat ttagttggcc caatagcttg caaaactggg cgtaacggat 60
 aatttaataa agacacggta aatgcttaga tagaggatta gagggtaatt aaattaacca 120
 cgatcactgt gataattact acaacattaa acgacaaaaa aacttttctg ctccctcata 180
 atcttctact atatattcgt cacatcacac tcataatctc ttacaaaaaa tccataaacac 240

aaaaagaagc a 251

<210> 29
 <211>1000
 20 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 29

ES 2 381 845 T3

```

atcctcaaca tttctatcgc aaatagctac gagtttctat cttccatcac cgccgcatct      60
tcgccgccgc gatgcctcta tgtaactcac aaagcgtctt catcggtgtc gccggtgagc      120
aacactatct tccttcagca tcaacttctt ctttgcgacg gtggccggag caaaggcctt      180
gacggaggag tagacatctt gcgactcttg ttcggaggta agtgtgacgg cggggtgctt      240
atgggtttgt gatgtgtgag ggaggaagct tatggtggtg gacgattggt ctctctctct      300
ctctctcget atgttacagg cttttttatt ttattttaaa aacagatgtg ccacgtggca      360
cgttctgatt gactatgtca catgacatag cccgccttaa tgtcacggaa gtggaatccc      420
tcatatatca ccaaataagt ctccaattat gtgtaacaaa atggcagcaa tcgattcacc      480
ctttgaagtc aatattagcc gttatatttg taacaacaac aactcaatct gtaagtgaac      540
gtttttaatt agcaattaaa gattccatct gcataacgta catatacata cacaatatga      600
gatcatatat acaatcaaat attcaagtgt cattttatct tataaataaa ttaaaaaaaaa      660
aacaagtttc attgcaataa aaataactaat aatccagctt cacactctct tatttaattt      720
aattttccac cagggtcctt ttcagctcct gactttcaca gttacacttt tatatatcac      780
tcttaattta tttctttaat tccttaactg aaaaataacc gttggaaact ctatagacga      840
tagtcataca aattgggtat agtaaaagct ttatagaacc taatggccaa acatatgcta      900
tataaattat catcaccggt tcctcatttt tcatcacatc aaataatctc tatccctcac      960
tcaaagtatc attcccatta tcactaaata atctccagcc      1000

```

<210> 30

<211> 700

<212> ADN

5 <213> *Oryza sativa*

<400> 30

atgctctggt ccttttcaag gaatggaatg atggatgaat gtteacgttc ttgagttcct 60
 aaatgggtact aattttgcaa aaactttcta tatgtgtttt ttgtaagaa tgttgtttta 120
 aacccatctt ttcactttat aatatttaat taaatcgttc gtaccctcga atagttattg 180
 caaattatac ttaactattc agtcattcag cacaaaagaa cagggccatg aaattgtaat 240
 actagtacat ttctgttctt ttcttttctt tttgaggttg tctgaaacac ctgtatctta 300
 aactatcgca gactagccaa tgagtcgtac tcacctgaaa ctgaaaccaa gtgattaacc 360
 aagctgggtc gacagtaatt ccatccataa tgcagctccg gagcccttca tctcctgcat 420
 gttactcaaa caacatcccc acctcctcat ttctctctcc ctattgcatg gcataattgc 480
 agaagattaa gccgctaatg cataattaca cattatttgt gtccactaat tttccctttc 540

 ccacacgcta cgaaactcaa aagccggcct cctcgcttcc ttccctgaac gttactaatc 600
 gcgtcatgta taaatacaga gcttgccac gcaccggcac attgcatcgc actacgcaca 660
 tctacacgat acccaagcag caaagctaga aagaaaaacc 700

<210> 31
 <211>450
 <212> ADN
 5 <213> Oryza sativa

<400> 31

tcgagttacc tgactcctga ctgctgcaat tgcataattg tcagtatcct gaaccatttg 60
 ataagcaatc gatcatacat gcatgattca ttcttgatg tgaatctaaa tttatagatg 120
 catcataagt gttgccgta ctcttttgca atgtgctaact actaattgaa gcgcactaat 180
 caataattaa ctcataactc gttgaagttc cactactagt accagtacca ggagcatgtg 240
 atctgctcat ctttaattaac gatccgtaa tctaatecct ttgcctccac cgttctgcat 300
 gcgcgccgtc agctaattgat tcgattaatt acgtcccccg cgagcttacg ttaccactaa 360
 gtacgtactt aacatattat cctatataag tgtgagcaat tagcaggagt taatcgtgtc 420
 cacttaacat acatcgcaca gcattcagca 450

10 <210> 32
 <211>1095
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa

15 <400> 32

aagcttccaa atggacaaca tgcaacaata caaactacat acatgagtgt tgagaccatc	60
ccctggagaa aggataaatc aaacaatcca gatataacta gatgtgtacc ccgcgcgttg	120
ctgcggaaga attatgtaat aatatagtag atatgagttc taaaattttc tttcaaacca	180
actatatgat ttcttttcat gtgtttatat attttttacc tttattaatt atccaaatgt	240
cataaataat tgggttgtat ggtgtatctt ttggtgaaa gagatgcaat ttacactttt	300
gatgaatcat ccaaagtctt aaaagaattg agttgatgtg gcttcacgac agaagagaga	360
attagcatta actacacgta gtggggatga acttgataga tatatataga tataggattt	420
gttttcgttt gccataatat gaagagaaaa taatactatt tgtttattaa gcctgtaaga	480
aactctgtaa tatagtaatt ttgtgcggtg aggatatatt atcagtcgct gcagaaacgc	540
tatagggcag cattttgctg ggtaaatagg attgaagcaa aatagggtgag gaagccaaac	600
tgattacttt gcaatagttt gaagcaaaat accaaaaatt ttatttttgc cattgacaca	660
ctaggtgagc aattttgtta ccacgtccat gtgctgattt aaagtttttt ttttaaaaaa	720
gaaacttatt ttttttcttt gccacaatat aaagctaaaa tttttgtcat taactgatcc	780
tgttgcaaac aatgaatttt accccaccat agctaaatta actcatgatt aataaataag	840
cctgtaagtt acagaactga agaaactctg taataataat aattgatcac taagaatag	900
atcagtcgcc gccattgatc actaagctag tgcagtgtaa tggcaatgga cgccactacc	960
atcaacaatg gcagcgatcc catccccctc ccttctctg cgcctataat aaccacagct	1020
cgccggcgat cgatcactgc accatcagct cccacaaacc cagctaacca agtttaattg	1080
ccaccaagct cacca	1095

<210> 33
 <211> 8
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> resto de secuencia de promotor de EC1

 10 <400> 33

 ccactaat 8

 <210> 34
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> cebador oligonucleotídico

 <400> 34

 aggtggtgc caagaagtc a 21
 25
 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 5 <400> 35
 tatccccact cgtgtcgta 20
 <210> 36
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 36
 20 ccgagcggct gcaggagtg g 21
 <210> 37
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 37
 30 gcgtcggagt agcccttgag ca 22
 <210> 38
 <211> 26
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 40 <400> 38
 gatttgcat cacacttct acaatg 26
 45 <210> 39
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 39
 55 gttccaccac tgagacaat g 21
 <210> 40
 <211> 21
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 65 <400> 40

acagtgacag ctcgccctct c 21

5 <210> 41
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 41

agtcattgcc atcatagtaa cctt 24

15 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 42

25 agttcctct ttgccacat c 21

30 <210> 43
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 43

caccgttgag gaagaagaga a 21

40 <210> 44
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 44

50 ccagcggagt catcaaccaa cata 24

55 <210> 45
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 45

65 ggagacggag cggagaaga gt 22

<210> 46
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico

5 <400> 46
gcgccgaaa cttgatggac t 21

<210> 47
10 <211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
15 <223> cebador oligonucleotídico
<400> 47
ggcgccggtg aaggagataa t 21

20 <210> 48
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> cebador oligonucleotídico
<400> 48

30 <210> 49
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial
tgccttatga tttcttcggt ttc 23

35 <220>
<223> cebador oligonucleotídico
<400> 49
tcagagtcac tgccatcaca gtaacctt 28

45 <210> 50
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> cebador oligonucleotídico
<400> 50
aagcatttgc gtttggtta tc 22

55 <210> 51
<211> 20
<212> ADN
60 <213> Artificial
<220>
<223> cebador oligonucleotídico

65 <400> 51

aatgcggtt tagtcacacg 20

5 <210> 52
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 52

ccatttctct gcagattgat aa 22

15 <210> 53
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 53

25 ccatagatct ttcttttg gg 22

30 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 54

atccagactg aatgccaca 20

40 <210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 55

gccttatgat ttctcggtt 20

50 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 56

60 gcaggagtgt aaagatgaat 20

65 <210> 57
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 5 <400> 57
 ccccgaaattc cttatgattt cttcggg 27
 <210> 58
 10 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 58
 ctcggatccg ggtagaagg agaa 24
 20 <210> 59
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 59
 30 ccagttccac caggattg 18
 <210> 60
 <211> 17
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 40 <400> 60
 cccaagatct ggccctt 17
 45 <210>61
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 61
 55 gcgtggtgat gtggagtatt g 21
 <210> 62
 <211> 21
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 65 <400> 62

tcaccgaagt tcatgccagt c 21

5 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 63

ccgtaccgag cgcaggaac 20

15 <210> 64
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 64

25 cagatctcgg tgacgggcag gac 23

30 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 65

atctgtctag aaatggcttc 20

40 <210> 66
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 66

50 tttattctag aaagtaataa cag 23

55 <210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico
 <400> 67

aaagaaagat ctatggcttc taac 24

65 <210> 68
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotídico

5 <400> 68

tcattagtcg actttgcata catc 24

<210> 69

10 <211>8

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> resto de secuencia de promotor de EC1

<220>

<221> variación

<222> (1)..(1)

20 <223> k es g o t

<220>

<221> variación

<222> (8)..(8)

25 <223> m es a o c

<400> 69

ktaattam 8

30

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Construcción de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de control transcripcional específica de gametos femeninos de plantas, en la que la secuencia de control transcripcional comprende SEC ID N.º: 24, conectada operativamente a una secuencia de nucleótidos de interés que es heteróloga con respecto a la secuencia de control transcripcional.
- 10 **2.** Célula que comprende una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1; y/o una forma integrada genómicamente de dicha construcción, con la condición de que la célula no sea una célula madre embrionaria humana o una célula germinal humana.
- 15 **3.** Célula de acuerdo con la reivindicación 2 en la que la célula es una célula vegetal.
- 4.** Célula de acuerdo con la reivindicación 3 en la que la célula es una oosfera vegetal.
- 20 **5.** Célula de acuerdo con la reivindicación 4 en la que el nivel, la velocidad y/o el patrón de expresión de la secuencia de nucleótidos de interés están alterados en la oosfera vegetal en relación con una forma de tipo silvestre de la oosfera vegetal.
- 6.** Estructura pluricelular que comprende una o más células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
- 25 **7.** Estructura pluricelular de acuerdo con la reivindicación 6 en la que la estructura pluricelular comprende una planta o una parte, órgano o tejido de la misma.
- 8.** Estructura pluricelular de acuerdo con la reivindicación 7 en la que la estructura pluricelular comprende una oosfera vegetal.
- 30 **9.** Procedimiento para expresar específicamente o preferencialmente una secuencia de nucleótidos de interés en una oosfera vegetal, comprendiendo el procedimiento llevar a cabo transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés en una planta sometida al control transcripcional de una secuencia de control transcripcional que comprende SEC ID N.º: 24.
- 35

FIGURA 1

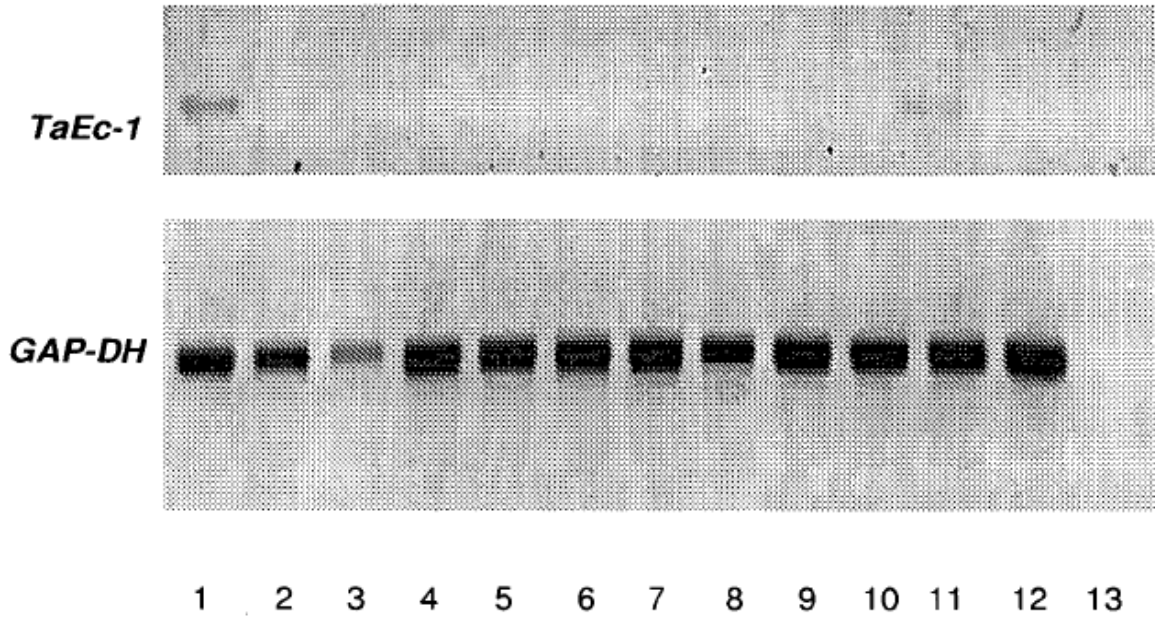


FIGURA 2

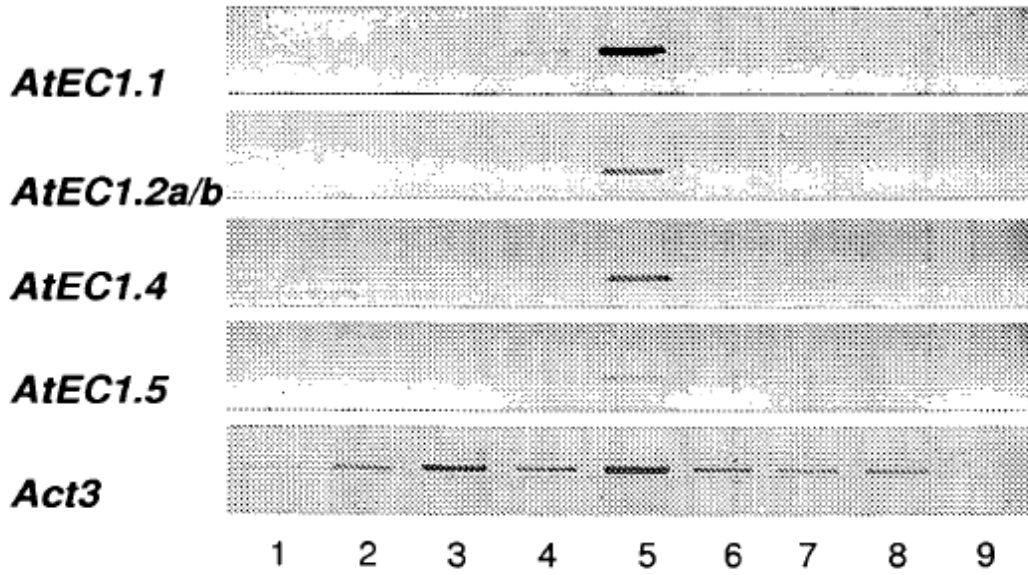


FIGURA 3

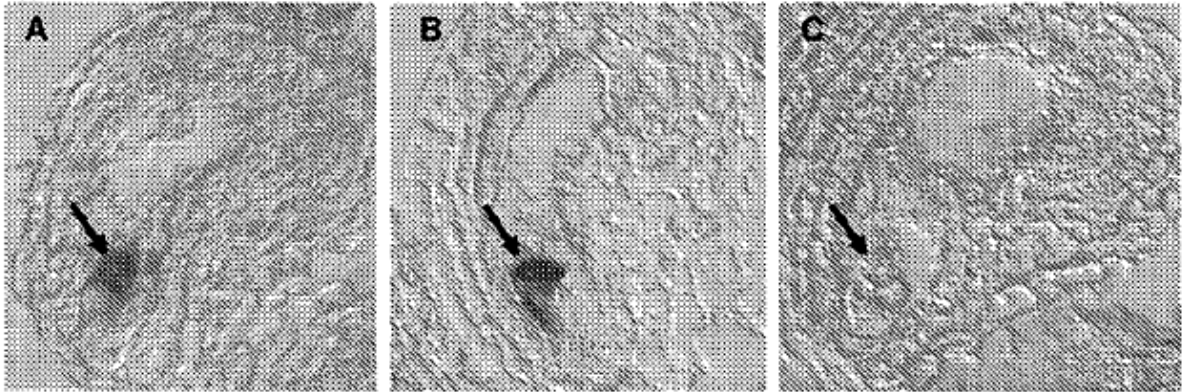


FIGURA 4

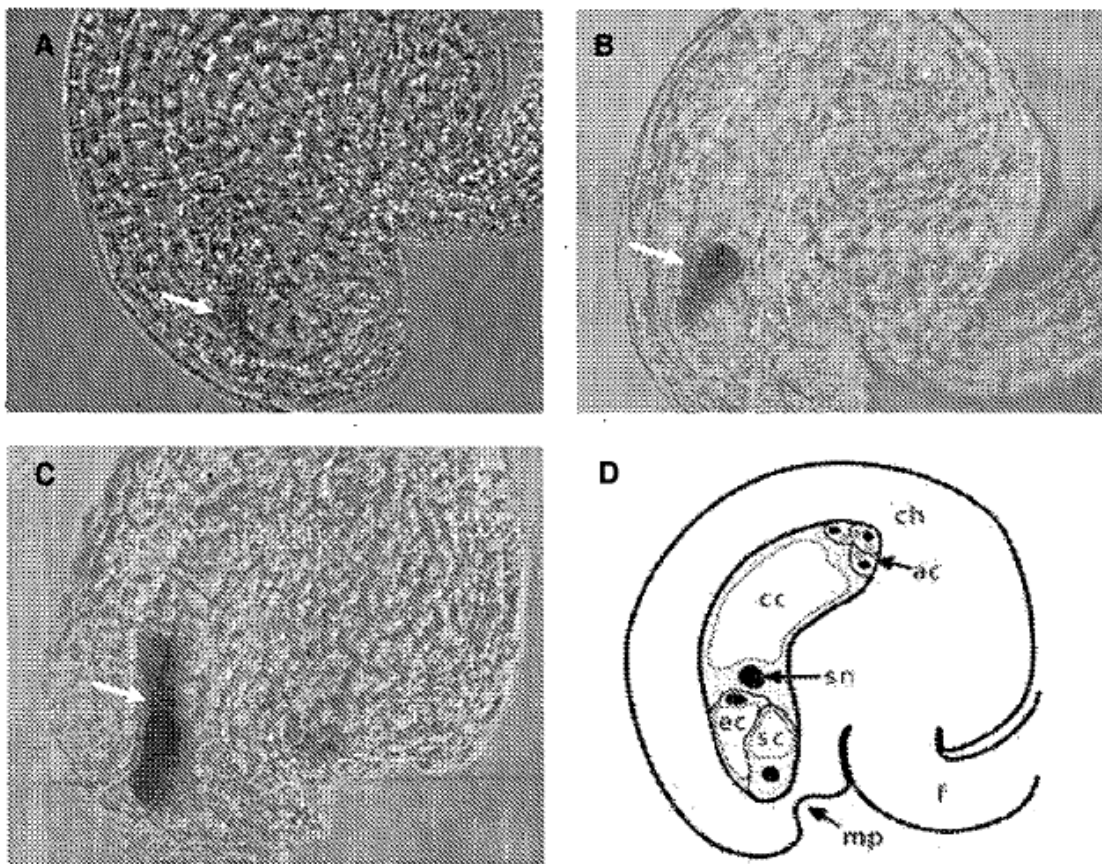


FIGURA 5

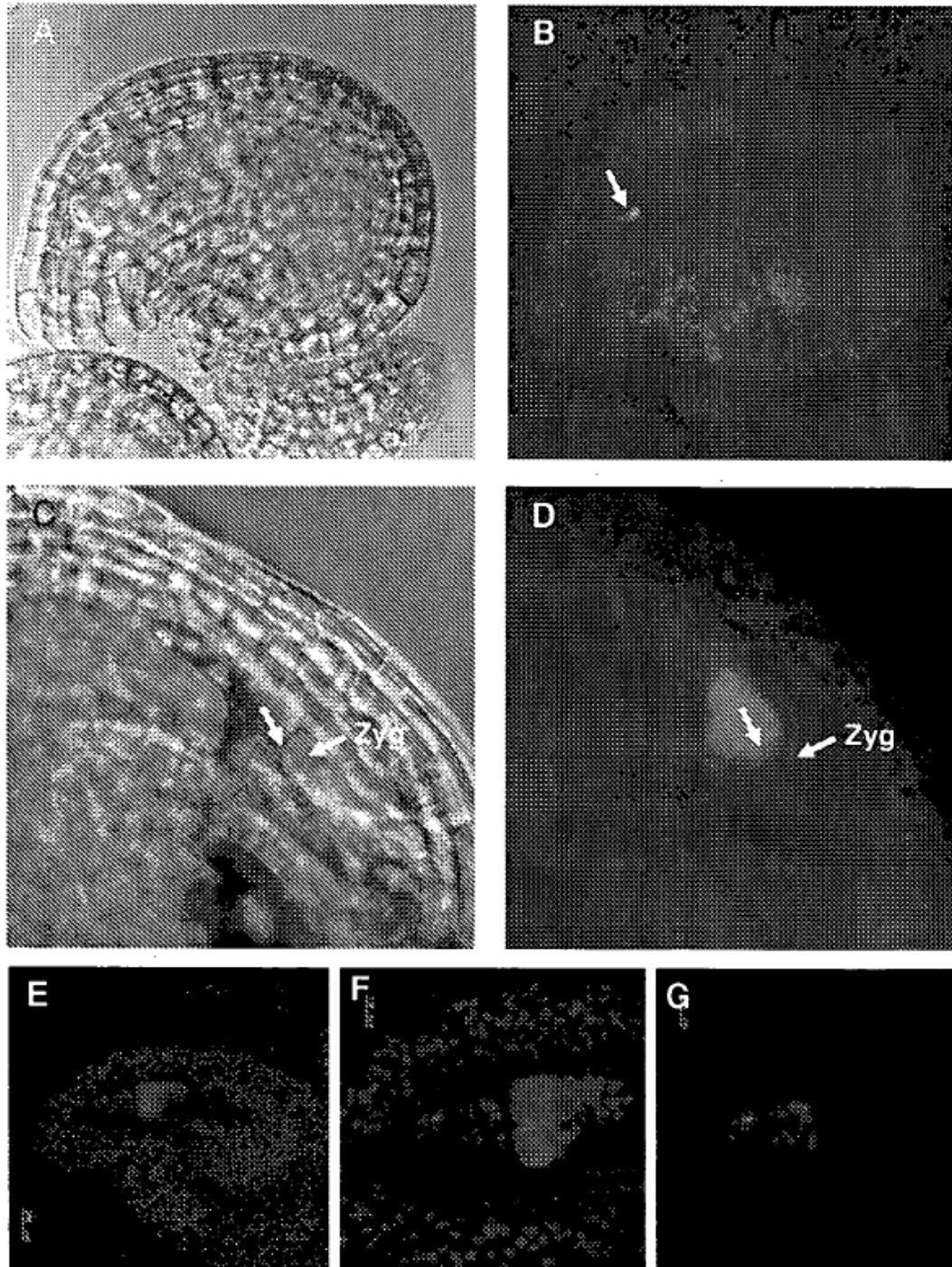


FIGURA 7

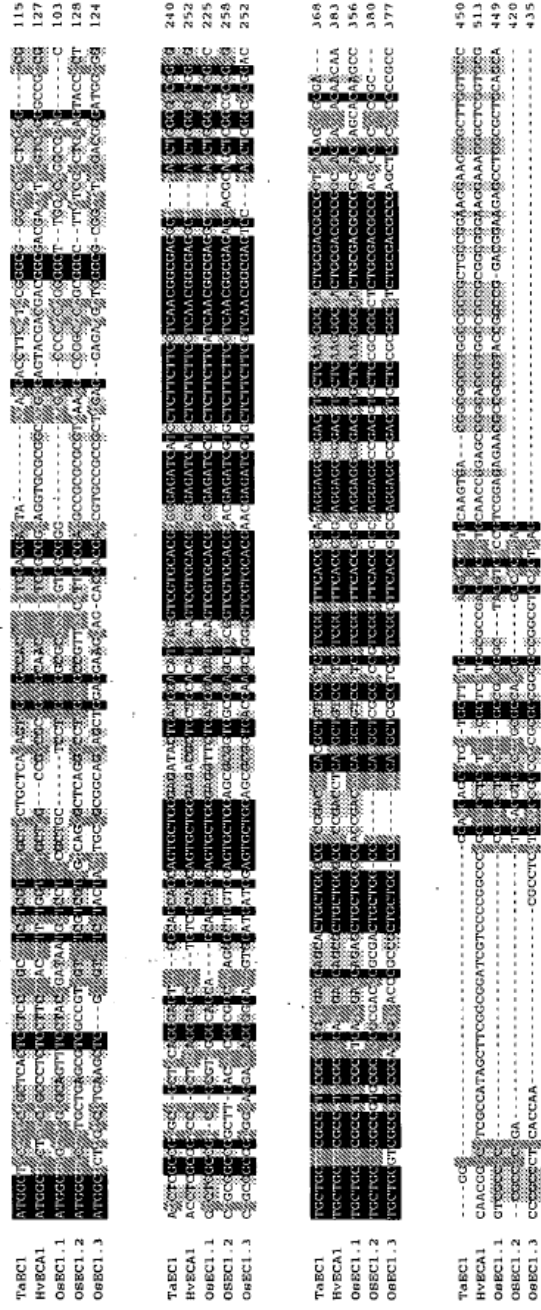


FIGURA 8

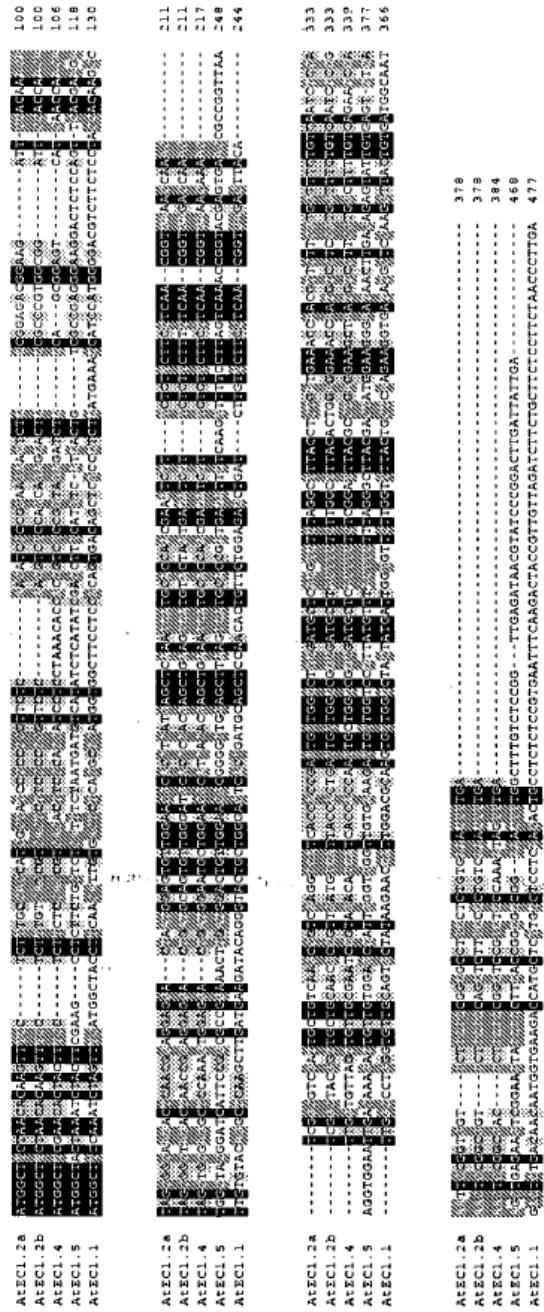


FIGURA 9

TaECl	SSCSLLPFAVWLELLTVAAT	ASTTTTTVRAGAPP	ELAEERL	QVGGQQCNELIMET	CTE	IL	FFL	92								
HvECl1	SSGPIILPTLNLLAAATAAGARPAS	TTTATT	VFVRA	DLADRL	EGAVSQCVETL	LEIK	CUC	IL	FFL	96						
OseCl.1	CSGDFLPTLHPILGAGAAV	AGGAP	PGUGLA	QELADG	VGGQQCCNEV	MEI	CTE	IL	FFL	87						
OseCl.2	GILLVAVVWVYSAQAIAAVAVA	DAARV	NGAAAFS	PAVPLGGRLDGGGGLVECVSA	AFLE	CTD	IV	FFL	98							
OseCl.3	LAVKLAVLHRAAAGGSSTVT	VPPLEER	LGAAPDGM	AAABGG	GGGHWMMKCS	ITV	CT	IV	FFV	96						
MtECl.1	MAPFLKFLKILSLSTVVTATSLSS	TKL	LSRLFLD	GSPHKKCVETL	LEI	Q	CTG	DIV	FFFL	84						
AtECl.1	KSSPWATFNIVLMLNVAASVT	TARPL	MPKPSMTSSPT	LVYRLKIDE	DTG	Y	KND	ML	Q	CS	IL	FFL	97			
AtECl.2a	SNTS	FP	YVYKLEVLN	ISGR	TLPETEDSTN	IARLN	GGG	LM	EC	WNA	YEL	CTE	IV	FFL	86	
AtECl.2b	SNTS	FP	YVYKLEVLN	VSSRAL	PPVADSTN	IARLT	GGG	LM	EC	WNA	YEL	CTE	IV	FFL	86	
AtECl.4	SNTS	FP	YVYKLEVLN	VSGR	DLP	AESSTN	IARLQ	GGG	LM	EC	WNA	YEL	CTE	IV	FFL	88
AtECl.5	TKSTSKPLLSFEMSYLISIFH	VIT	VAEGRTLO	TKM	TDHS	GAN	LM	EC	WNA	YEL	CTE	IV	FFL	101		

TaECl	RAADATL	SVIG	TE	EC	GDAG	DSG	EQ	QRGAF	151															
HvECl1	RAADL	SVIG	TE	EC	GDAG	DD	NNNG	PRH	FGSS	P	PPRR	RALG	DG	VATG	ATG	VAA	AA	GRK	GLG	PV	174			
OseCl.1	ATDN	SVIG	TE	EE	GDAG	DE	HK	PS	PPP	P	AV	YV	AV	GE	NA	AV	AV	AV	AV	AV	151			
OseCl.2	XP	A	AA	VC	TE	EA	L	LD	AE	AAAA	ADS	SP	AS	AA	139									
OseCl.3	XP	A	AS	IC	TE	EA	L	CD	AE	LA	AP	PP	PS	144										
MtECl.1	Q	N	AS	IC	TE	EA	L	CD	AE	LA	AP	PP	PS	133										
AtECl.1	XP	T	GV	IC	TE	EA	L	CD	Q	D	G	N	S	D	N	G	E	D	H	A	L	A	S	158
AtECl.2a	XP	A	AS	IC	TE	EA	L	CD	SP	HS	GG	125												
AtECl.2b	XP	A	AS	IC	TE	EA	L	CD	SP	HS	GG	125												
AtECl.4	XP	A	AS	IC	TE	EA	L	CD	NP	HS	GG	127												
AtECl.5	AS	V	FS	IC	TE	EA	L	CD	GF	Q	A	E	K	S	E	L	S	P	A	P	E	155		

FIGURA 10

