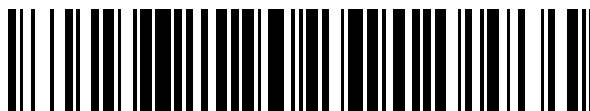


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 451**

51 Int. Cl.:
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09165161 .2**
96 Fecha de presentación: **10.07.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2272862**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2011**

54 Título: **Rock2 y Rock3, dos nuevas variantes de ganancia de función de los receptores de citoquinina AHK2 y AHK3**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.07.2012

73 Titular/es:
**Freie Universität Berlin
Kaiserswerther Str. 16-17
14195 Berlin, DE**

72 Inventor/es:
**Schmülling, Thomas;
Werner, Tomás;
Bartrina y Manns, Isabel y
Braun, Helen**

74 Agente/Representante:
Izquierdo Faces, José

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).

ES 2 385 451 T3

DESCRIPCION

Rock2 y Rock3, dos nuevas variantes de ganancia de función de los receptores de citoquinina AHK2 y AHK3

- 5 **[0001]** Para ser capaz de suministrar a una población que crece continuamente con comida y otros productos derivados de plantas, la gente siempre ha estado interesada en mejorar la productividad en la agricultura.
- 10 **[0002]** La productividad de una planta puede ser influenciada de varias maneras diferentes, por ejemplo, mejorando las características de crecimiento de la planta o retrasando la senescencia de la hoja. Hay varios mecanismos y rutas conocidas que están implicadas en el crecimiento y desarrollo de las plantas.
- 15 **[0003]** La citoquinina es una hormona vegetal que juega papeles regulatorios positivos y negativos en muchos aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal. Estimula la formación y activación de meristemas de brotes, es capaz de establecer tejidos sumideros, retarda la senescencia de la hoja, inhibe el crecimiento y ramificación de la raíz, y juega un papel en la germinación de las semillas y las respuestas al estrés. El análisis de plantas deficientes en citoquinina ha mostrado que la citoquinina juega papeles opuestos en los meristemas de brotes y de raíz, y sugiere que la hormona tiene una función esencial en el control cuantitativo del crecimiento orgánico (Mok, D. W. S. & Mok, M. C. (2001) Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Bio. 52, 89-118). Para la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se ha mostrado que la señal de citoquinina se percibe por tres miembros de la familia receptora de citoquinina, que son quinasas de histidina sensores (Inoue, T. y otros (2001) Nature 409, 1060-3; Suzuki, T y otros (2001) Plant Cell Physiol. 42, 107-13; Yamada, H. y otros (2001) Plant Cell Physiol. 42, 1017-23.). Estos tres receptores de citoquinina, AHK2, AHK3 y CRE1/AHK4, muestran un alto grado de identidad de secuencias, pero cada uno tiene características distintivas.
- 20 **[0004]** Recientemente se ha divulgado una variante de ganancia de la función del receptor de citoquinina AHK3 y se le ha llamado ore 12 (ver WO 2007/108931 A1). Se ha mostrado que la expresión *ore12* en la *Arabidopsis thaliana* produce plantas con senescencia de las hojas retardada, mientras que la apariencia general de la planta completa no mostró diferencias significativas en comparación con las plantas del tipo salvaje. A pesar de que la expresión del *ore12* puede llevar a plantas con senescencia de las hojas retardada y de este modo a plantas con productividad mejorada, la expresión *ore12* no tuvo un efecto significativo en otras características del crecimiento vegetal. En consecuencia, permanece una necesidad para una mejora adicional de la productividad vegetal.
- 25 **[0005]** Es un objeto de la presente invención proporcionar medios y métodos adecuados para producir plantas transgénicas con características de productividad y/o crecimiento mejoradas.
- 30 **[0006]** Este objetivo se consigue por la presente invención como se establece en detalle a continuación.
- 35 **[0007]** La presente invención proporciona nuevas variantes de ganancia de función de los receptores de citoquinina, concretamente *rock2*. El polipéptido *rock2* con la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 1 es una variante activa constitutivamente del receptor de citoquinina AHK2 de la *Arabidopsis thaliana* y puede ser codificada por un ácido nucleico con la secuencia de la SEQ ID No. 3.
- 40 **[0008]** Se descubrió sorprendentemente que la expresión transgénica de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1 lleva a plantas transgénicas que muestran características de crecimiento mejoradas y senescencia retardada de las hojas. El efecto de la expresión transgénica de una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1 en una planta en senescencia de las hojas es más pronunciada que la ya observada para la variante de función de ganancia conocida del AHK3, *ore12*. Incluso más sorprendentemente, se descubrió por primera vez que la expresión transgénica de la variante de función de ganancia del AHK2 de una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No.1 tiene un efecto significativo en el crecimiento de brotes, número de silicuas por tallo principal, grosor del tallo y/o tamaño de las flores de la planta transgénica resultante en comparación con el tipo salvaje, mientras que las plantas que expresan el *ore12* carecen de tal efecto. En consecuencia, la expresión transgénica de una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1 lleva a plantas que muestran productividad mejorada.
- 45 **[0009]** En un primer aspecto de la presente invención, un ácido nucleico aislado está provisto como se define en las reivindicaciones. El ácido nucleico aislado de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante constitutivamente activa del receptor de citoquinina AHK2 con:
- 50 i) Una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No.1 o un ortólogo de la misma;
- 55 ii) una secuencia de aminoácido que tiene al menos un 48%, preferiblemente al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 55% de identidad sobre la longitud de la secuencia completa de la SEQ ID No. 1; o iii) una secuencia de aminoácido que tiene al menos un 50%, preferiblemente al menos un 53%, más preferiblemente un 55% de identidad sobre un segmento de secuencia de aminoácido 50 de SEQ ID No. 1 teniendo la SEQ ID No. 5;
- 60

en donde la secuencia de aminoácido tiene la fenilalanina del aminoácido (F) en una posición correspondiente a la posición 552 de la SEQ ID No. 1. La SEQ ID No. 5 engloba los residuos de aminoácido 50 de la SEQ ID No. 1 localizada directamente hacia el término-N de la fenilalanina del aminoácido (F) en la posición 552 de la SEQ ID No.1.

[0010] Preferiblemente se proporciona un ácido nucleico aislado, comprendiendo una secuencia de ácido nucleico codificando al menos la secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1 o un ortólogo de la misma. El término "ortólogo" como se usa en la presente se refiere a una secuencia de ácido nucleico o aminoácido de una especie, preferiblemente diferente de la *Arabidopsis thaliana*, que muestra similitud más alta, preferiblemente identidad de secuencia más alta, con la secuencia de ácido nucleico o aminoácido de la *Arabidopsis thaliana* debido a que ambos genes se originaron de un antecesor común. La presente invención también proporciona un polipéptido aislado codificado por un ácido nucleico aislado de la invención, preferiblemente un polipéptido aislado que comprende al menos la secuencia de aminoácido con la SEQ ID No.1.

[0011] En un segundo aspecto la invención proporciona un casete de expresión transgénica para la expresión de ácidos nucleicos, en donde el casete de expresión transgénica de la invención comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo a la presente invención. El casete de expresión transgénica de la invención puede ser diseñado de tal forma que media la expresión transgénica de la secuencia de ácido nucleico codificando al menos la secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1 en un tejido vegetal bajo el control de al menos un promotor en un organismo huésped, preferiblemente una célula vegetal.

[0012] En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo a la invención o un casete de expresión transgénica de la invención.

[0013] En un cuarto aspecto, la presente invención está dirigida a un organismo transgénico que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo a la invención, un casete de expresión transgénica de la invención o un vector de la presente invención.

[0014] La presente invención proporciona un polipéptido aislado comprendiendo:

- i) Una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1 o un ortólogo de la misma;
- ii) Una secuencia de aminoácido que tiene al menos un 48%, preferiblemente al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 55% de identidad sobre la longitud de la secuencia completa de la SEQ ID No. 1; o
- iii) Una secuencia de aminoácido que tiene al menos un 50%, preferiblemente al menos un 53%, más preferiblemente un 55% de identidad sobre el segmento de la secuencia de aminoácido 50 de la SEQ ID No. 1 que tiene la SEQ ID No. 5;

en donde la secuencia de aminoácido tiene la fenilalanina del aminoácido (F) en una posición correspondiente a la posición 552 de la SEQ ID No. 1.

[0015] En una realización preferida, el polipéptido aislado de la invención comprende y/o consiste de la secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1.

[0016] La presente invención también se refiere a un ácido nucleico aislado, que comprende una secuencia de aminoácido codificando al menos la secuencia de aminoácido con la SEQ ID No.1.

[0017] Un ácido nucleico "aislado" es aquel que está sustancialmente separado de otras moléculas de ácido nucleico, que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico (por ejemplo, secuencias que codifican otros polipéptidos). Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está libre de algunas de las secuencias, que flanquean de forma natural el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en su replicón de origen natural. Por ejemplo, un ácido nucleico clonado está considerado aislado. En varias realizaciones, el ácido nucleico aislado de la invención puede contener menos que alrededor de 5 kb, 4 kb, 3kb, 2kb, 1 kb, 0,5kb, ó 0,1kb de las secuencias de nucleótido que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que se deriva el ácido nucleico. Un ácido nucleico es también considerado aislado si ha sido alterado por la intervención humana, o colocado en un locus o localización que no es su sitio natural, o si es introducido en una célula por ejemplo por agroinfección. Por otra parte, un ácido nucleico "aislado", como una molécula de ADNc, puede estar libre de alguno del otro material celular que está asociado de forma natural, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. Están excluidos específicamente de la definición de "ácido nucleico aislado": los cromosomas de origen natural (como las propagaciones de cromosoma), las librerías genómicas, y las preparaciones de ADN genómico celular completo o ARN celular completo de fuentes de origen natural (incluyendo las preparaciones celulares completas que son cortadas mecánicamente o digeridas enzimáticamente). Los ácidos nucleicos y/o los polipéptidos de la presente invención pueden ser proporcionados en forma aislada, es decir, purificados de su ambiente natural, preferiblemente en una forma sustancialmente pura u homogénea o libre o sustancialmente libre de ácidos nucleicos o genes de la especie de origen que no sea la secuencia deseada.

[0018] El ácido nucleico de acuerdo a la presente invención puede incluir ADN, ARN, mezclas y/o sustituyentes funcionales de los mismos, particularmente ADNC, ADN y ARN genómico y puede ser completamente o parcialmente sintético. Los ácidos nucleicos de la invención comprenden secuencias de poli-nucleótidos de monocatenarias o totalmente o parcialmente bicatenarias. El término "aislado" engloba todas estas posibilidades. Para el propósito de la presente invención, donde se especifica una cadena de ADN, por ejemplo, con referencia a una SEQ ID No. Particular, a menos que el contexto requiera lo contrario, se engloba el equivalente de ARN, con U sustituido por T donde tiene lugar. El ácido nucleico de la invención puede ser producido por cualquier medio, incluyendo preparaciones genómicas, preparaciones de ADNc, síntesis in vitro, PCR, RT-PCR, y/o transcripción in vitro o in vivo.

[0019] El ácido nucleico aislado de la invención puede comprender al menos una secuencia de ácido nucleico seleccionada de:

i) una de la SEQ ID No. 3 o un complemento contrario a la misma;

ii) una secuencia funcionalmente equivalente o un complemento contrario de la misma con al menos un 70% de homología, preferiblemente al menos un 75% de homología, más preferiblemente al menos un 80% de homología con la secuencia con la SEQ ID No. 3 sobre un segmento de secuencia de codificación de al menos 300 pares de base, preferiblemente sobre un segmento de secuencia de codificación de al menos 500 pares de base, más preferiblemente sobre la longitud de secuencia de codificación completa, y que codifica al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1; o

iii) secuencias funcionalmente equivalentes o un complemento contrario de las mismas que hibridizan bajo condiciones estándar con la secuencia de ácido nucleico con SEQ ID No. 3 o con secuencias de ácido nucleico complementarias a las mismas, y que codifican al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1.

[0020] La secuencia de ácido nucleico con la SEQ ID No. 3 codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácido de SEQ ID No. 1, mientras que la secuencia de ácido nucleico con la SEQ ID No. 4 codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácido de SEQ ID No. 2.

[0021] Para el propósito de la presente invención el término "secuencia equivalente funcional" se refiere a cualquier secuencia no idéntica con una de la SEQ ID No. 3 o un complemento contrario de la misma, y que codifica al menos la secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1. La persona experta es consciente de la degeneración del código genético, permitiendo para un número de secuencias de ácido nucleico diferentes codificar la misma secuencia de aminoácido y no tiene dificultades en determinar si una secuencia de ácido nucleico dada codifica menos la secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1.

[0022] Los métodos para preparar secuencias equivalentes funcionales o fragmentos de la invención comprenden preferiblemente la introducción de mutaciones en la secuencia descrita por la SEQ ID No. 3 o un complemento contrario de la misma. La mutagénesis puede ser aleatoria, en cuyo caso las secuencias mutagenizadas son posteriormente cribadas de sus propiedades por un proceso de prueba y error. Los métodos para la mutagénesis de secuencias de ácidos nucleicos son conocidos por el trabajador experto e incluyen a modo de ejemplo el uso de oligonucleótidos con una o más mutaciones en comparación con la región a ser mutada (por ejemplo, en una mutagénesis de sitio específico). Se emplean típicamente cebadores con aproximadamente de 15 a aproximadamente 75 nucleótidos o más, con preferiblemente de alrededor de 10 a alrededor de 25 o más residuos de nucleótido estando localizados en ambos lados de la secuencia a ser modificada. Los detalles y el proceso para dichos métodos de mutagénesis son familiares para el trabajador experto (Kunkel y otros (1987) Methods Enzymol 154:367-382; Tomic y otros (1990) Nucl Acids Res 12:1656; Upender y otros (1995) Biotechniques 18(1):29-30; Patente U.S. Nº 4.237.224). También se puede conseguir una mutagénesis tratando por ejemplo vectores de expresión transgénicos que comprenden una de las secuencias de ácido nucleico de la invención con agentes mutagenizantes como la hidroxilamina.

[0023] El uso de secuencias equivalentes funcionales puede ser particularmente beneficioso para cumplir con un uso del codón particular de un organismo seleccionado que puede ser usado para transcribir el ácido nucleico de la invención y para expresar el polipéptido codificado que comprende o consiste de al menos la secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1.

[0024] El ácido nucleico de la invención puede comprender al menos una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las secuencias funcionalmente equivalentes o un complemento contrario de las mismas que tienen al menos un 80% de homología, preferiblemente al menos un 90% de homología, más preferiblemente al menos un 95% de homología con la secuencia de SEQ ID No. 3 sobre un segmento de secuencia codificante de al menos 300 pares de base, preferiblemente sobre un segmento de secuencia de codificación de al menos 500 pares de base, más preferiblemente sobre la longitud de secuencia de codificación completa, y que codifica al menos una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1.

[0025] La homología o identidad entre dos secuencias de ácido nucleico se entiende que significa la identidad de las secuencias respectivas sobre una longitud de secuencia dada en cada caso, que es calculada por comparación con la ayuda del algoritmo del programa GAP (Wisconsin Package Version 10.0, Universidad de Wisconsin, Genetic Computer Group (GCG), Madison, USA), estableciendo los siguientes parámetros:

Peso del Hueco: 12
 Peso de la Longitud: 4
 Coincidencia Media: 2,912
 Falta de Coincidencia Media: -2,0003

[0026] Por ejemplo, una secuencia con al menos un 70% de homología o identidad con la secuencia de SEQ ID No. 3 en la base del ácido nucleico se entiende que significa una secuencia que, en comparación con la secuencia SEQ ID No. 3 por el algoritmo del programa anterior con los parámetros anteriormente establecidos, tiene al menos un 70% de homología. La identidad u homología entre dos secuencias de aminoácidos se entiende que significa la identidad de las secuencias respectivas sobre una longitud de secuencia dada en cada caso, que es calculada por comparación con la ayuda del algoritmo ClusatW_Bioedit (Thompson JD y otros (1994) Nucleic Acids Res 22:4673-4680) usando los ajustes por defecto en el paquete de software Bioedit (disponible en: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

[0027] Por ejemplo, una secuencia con al menos un 48% de homología o identidad con la secuencia de SEQ ID No. 1 en base al aminoácido se entiende que significa una secuencia que, en comparación con la secuencia SEQ ID No. 1 por el algoritmo del programa anterior con el juego de parámetros anteriores, tiene al menos un 48% de identidad.

[0028] El ácido nucleico aislado de la invención puede comprender al menos una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las secuencias funcionalmente equivalentes o un complemento contrario de las mismas que hibridizan bajo condiciones estándar con la secuencia de ácido nucleico con la SEQ ID No. 3 o con secuencias de ácido nucleico complementarias a las mismas, y que codifican al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1.

[0029] El término "condiciones de hibridación estándar" se debe entender en términos generales y significa condiciones de hibridación rigurosas y/o menos rigurosas. Dichas condiciones de hibridación se describen entre otros en Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T y otros, en Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, páginas 9.31-9.57 o en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

[0030] Por ejemplo, las condiciones durante el (los) paso(s) de lavado pueden ser seleccionadas de un intervalo de condiciones limitado por aquellas de rigor bajo (con aproximadamente 2*SSC a 50° C) y de rigor alto (con aproximadamente 0,2*SSC a 50° C, preferiblemente a 65° C) (20*SSC: citrato de sodio, 3 M NaCl, pH 7,0). Además, la temperatura durante el paso de lavado puede ser elevada de condiciones de rigor bajo a temperatura ambiente, aproximadamente 22° C, a condiciones de más rigor a aproximadamente 65° C. Ambos parámetros, la concentración de sal y la temperatura, pueden ser variados simultáneamente, y también es posible que uno de los dos parámetros es mantenido constante y sólo se varíe el otro. Es también posible emplear agentes desnaturalizantes como, por ejemplo, formamida o SDS durante la hibridación.

[0031] La hibridación en presencia de un 50% de formamida es preferiblemente llevada a cabo a 42° C. Se dan a continuación algunas condiciones ejemplares para los pasos de hibridación y lavado:

(1) Condiciones de hibridación con por ejemplo

[0032]

- a) 4*SSC a 65° C, o
- b) 6*SSC, 0,5% de SDS, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 65° C, o
- c) 4*SSC, 50% de formamida, a 42° C, o
- d) 2* ó 4*SSC a 50° C (condición de rigor bajo), o
- e) 2* ó 4*SSC, 30 a 40% de formamida a 42° C, (condición de rigor bajo), o
- f) 6*SSC a 45° C, o,
- g) 0,05 M de regulador de fosfato de sodio pH 7,0, 2 mM EDTA, 1% BSA y 7% SDS:

(2) Pasos de lavado con por ejemplo

[0033]

- a) 0,1*SSC a 65° C, o
- b) 0,1*SSC, 0,5% SDS a 68° C, o

- c) 0,1*SSC, 0,5% SDS, 50% de formamida a 42° C, o
- d) 0,2*SSC, 0,1% SDS a 42° C, o
- e) 2*SSC a 65° C (condición de rigor bajo), o
- f) 40 mM de regulador de fosfato de sodio pH 7,0, 1% SDS, 2mM EDTA.

[0034] El ácido nucleico aislado de la invención puede comprender al menos una secuencia promotora que puede estar localizada hacia arriba en la posición 5' a la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1.

[0035] Una secuencia promotora es una secuencia de ácido nucleico que es capaz de facilitar o mejorar la transcripción de un gen particular. La referencia en la presente a un "promotor" debe ser tomada en su sentido y contexto más amplio e incluye las secuencias reguladoras transcripcionales derivadas de un gen genómico eucariota clásico, incluyendo la caja TATA que es requerida para la iniciación de la transcripción precisa, con o sin una secuencia de caja CCAAT y elementos reguladores o de control adicionales (por ejemplo, secuencias de activación hacia arriba, represores, potenciadores y silenciadores) que alteran la expresión del gen en respuesta al desarrollo y/o estímulo externo, o de una manera específica del tejido.

[0036] El término "promotor" puede también incluir las secuencias reguladoras transcripcionales de un gen procarionta clásico, en cuyo caso puede incluir una secuencia de caja -35 y/o secuencias reguladoras transcripcionales de caja -10.

[0037] El término "promotor" también se usa para describir una molécula sintética o de fusión, o un derivado que confiere, activa o potencia la expresión de una molécula de ácido nucleico en una célula, tejido u órgano. Los promotores pueden contener copias adicionales de uno o más elementos reguladores específicos, para potenciar adicionalmente la expresión y/o alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal de una molécula de ácido nucleico a la que está enlazada funcionalmente. Dichos elementos reguladores pueden ser colocados adyacentes a una secuencia promotora heteróloga para manejar la expresión de una molécula de ácido nucleico en respuesta a por ejemplo, cobre, glucocorticoides, dexametasona, tetraciclina, giberelina, CAMP, ácido abscísico, auxina, heridas, etileno, ácido jasmonato o salicílico o para conferir expresión de una molécula de ácido nucleico a células, tejido u órganos específicos como meristemos, hojas, raíces, embriones, flores, semillas o frutos.

[0038] En el contexto de la presente invención, el promotor es preferiblemente una secuencia promotora expresable en plantas. Los promotores que también funcionan o únicamente funcionan en células no vegetales como las bacterias, células de levadura, células de insectos y células animales no son excluidos de la invención. Por "expresable en plantas" se entiende que la secuencia promotora, incluyendo cualquier elemento regulador añadido a la misma o contenido en la misma, es al menos capaz de inducir, conferir, activar o potenciar la expresión en una célula, tejido u órgano vegetal, preferiblemente una célula, tejido u órgano vegetal monocotiledónea o dicotiledónea. Los términos "operativo en plantas" y "operativo en una planta" cuando se usan en la presente, respecto de una secuencia promotora, deben ser tomados como equivalentes a una secuencia promotora expresable en plantas.

[0039] También son conocidos para el experto en la técnica los promotores regulables como parte de un sistema de expresión vegetal viral binario (Yadav 1999 – WO 99/22003; Yadav 2000 – WO 00/17365). En el presente contexto, una "secuencia promotora regulable" es un promotor que es capaz de conferir expresión de un gen en una célula, tejido u órgano particular o grupo de células, tejidos u órganos de una planta, opcionalmente bajo condiciones específicas, sin embargo no confiere generalmente expresión a través de la planta bajo todas las condiciones. Por consiguiente, una secuencia promotora regulable puede ser una secuencia promotora que confiere expresión de un gen al que está enlazada funcionalmente en una localización particular dentro de la planta o alternativamente, a través de la planta bajo un conjunto específico de condiciones, como después de la inducción de la expresión del gen por un compuesto químico u otro elicitor. Preferiblemente, el promotor regulable usado en el funcionamiento de la presente invención confiere expresión en una localización específica dentro de la planta, ya sea constitutivamente o después de la inducción, sin embargo, no en la planta completa bajo cualquier circunstancia. Incluidos dentro del ámbito de dichos promotores están las secuencias promotoras específicas de células, las secuencias promotoras específicas de tejidos, las secuencias promotoras específicas de órganos, las secuencias promotoras específicas de ciclos celulares, las secuencias promotoras inducibles y las secuencias promotoras constitutivas que han sido modificadas para conferir expresión en una parte particular de la planta en cualquier momento, como por la integración del mencionado promotor constitutivo dentro de un elemento genético transponible ((Ac, Ds, Spm, En, u otro transposón). De manera similar, el término "específico de tejidos" debe ser entendido como que indica que la expresión está predominantemente en un tejido particular o tipo de tejido, preferiblemente de origen vegetal, aunque no necesariamente exclusivamente en el mencionado tejido o tipo de tejido. De manera similar, el término "específico de órganos" debe entenderse como que indica que la expresión está predominantemente en un órgano particular, preferiblemente de origen vegetal, aunque no necesariamente exclusivamente en dicho órgano. De manera similar, el término "específico del ciclo celular" debe entenderse que indica que la expresión es predominantemente cíclica y que tiene lugar en una o más, no necesariamente consecutivas, fases del ciclo celular aunque no necesariamente exclusivamente en las células en reproducción, preferiblemente de origen vegetal. Aquellos expertos en la técnica serán conscientes que un "promotor" inducible es un promotor en el que la actividad transcripcional del mismo está aumentada o inducida en respuesta a estímulos de desarrollo, químicos,

ambientales, o físicos. De manera similar, el experto en la técnica entenderá que un “promotor constitutivo” es un promotor que está transcripcionalmente activo a través de la mayoría, pero no necesariamente todas, las partes de un organismo, preferiblemente una planta, durante la mayoría, pero no necesariamente todas, las fases de su crecimiento y desarrollo. Aquellos expertos en la técnica serán fácilmente capaces de seleccionar secuencias promotoras apropiadas para el uso en la regulación de la expresión apropiada de las variantes de proteínas receptoras de citoquinina de fuentes públicamente disponibles, sin experimentación indebida.

[0040] Colocar una molécula de ácido nucleico bajo el control regulador de una secuencia promotora, o en una conexión o enlace funcional con una secuencia promotora, significa posicionar dicha molécula de ácido nucleico de tal forma que la expresión está al menos controlada en parte por la secuencia promotora. Un promotor está habitualmente, pero no necesariamente, posicionado hacia arriba, o en el extremo 5', y dentro de 2 kb del sitio de comienzo de la transcripción, de la molécula de ácido nucleico que regula, aunque los potenciadores y los silenciadores, que también están comprendidos por el término “promotor” pueden estar colocados más lejos del sitio de comienzo transcripcional. Se piensa que estos elementos se unen a proteínas capaces de acción de largo alcance debido a la formación de bucles de la secuencia interviniente. En la construcción de las combinaciones de promotor/gen estructural heterólogas se prefiere generalmente posicionar el promotor a una distancia del sitio de comienzo de la transcripción del gen que es aproximadamente la misma que la distancia entre esos promotor y el gen que controla en su ajuste natural (es decir, el gen del que se deriva el promotor). Como es conocido en la técnica, se puede acomodar alguna variación en esta distancia sin pérdida de la función promotora. De manera similar, el posicionamiento preferido de un elemento de la secuencia reguladora con respecto al gen heterólogo a ser colocado bajo su control se define por el posicionamiento del elemento en su ajuste natural (es decir, el gen del que se deriva). De nuevo, como se conoce en la técnica, puede tener lugar alguna variación en esta distancia.

[0041] De acuerdo a la presente invención cualquier secuencia promotora puede ser usada para producir un ácido nucleico aislado de la invención. Preferiblemente, la secuencia promotora está colocada hacia arriba de la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácido con la SEQ ID Nos. 1. Preferiblemente se usan las secuencias promotoras que están activas en al menos un tejido o tipo celular de una planta y/o que están activas en un microorganismo. Para servir a este propósito, la al menos una secuencia promotora y la secuencia de ácido nucleico codificando el al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1; están enlazadas funcionalmente entre sí.

[0042] La presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado de la invención, comprendiendo además al menos una secuencia promotora, en donde la al menos una secuencia promotora y la secuencia de ácido nucleico codificando el al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácido con la SEQ ID Nos. 1, están unidas funcionalmente entre sí.

[0043] La presente invención también se refiere a un ácido nucleico aislado de la invención, comprendiendo además al menos una secuencia promotora, en donde la secuencia de ácido nucleico codificando el al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1, está localizada en la posición 3' de el al menos un promotor y en donde la al menos una secuencia promotora y la secuencia de ácido nucleico están enlazadas funcionalmente entre sí.

[0044] Como se usa en la presente “enlace funcional” significa, por ejemplo, la disposición secuencial del al menos un promotor, de la secuencia de ácido nucleico codificando el al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1, y, si es apropiado, de los elementos reguladores adicionales como por ejemplo, un terminador, de tal forma que cada uno de los elementos reguladores es capaz de cumplir su función esperada en la expresión transgénica de la secuencia de ácido nucleico codificando el al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1. Esto no requiere necesariamente un enlace directo en un sentido químico. Las secuencias de control genético como, por ejemplo, las secuencias potenciadoras, pueden también ejercer su función en la secuencia objetivo desde posiciones que están más alejadas, o de hecho desde otras moléculas de ADN. Preferiblemente en el ácido nucleico aislado de la invención, la secuencia de ácido nucleico codificando el al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1 está posicionado hacia debajo de la secuencia que actúa como la al menos una secuencia promotora de tal forma que ambas secuencias están acopladas covalentemente entre sí. Preferiblemente, la distancia entre la al menos una secuencia promotora y la secuencia de ácido nucleico codificando el al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1 es menos que 200 pares de base, especialmente preferiblemente menos que 100 pares de base, más específicamente preferiblemente menos que 50 pares de base. El al menos un promotor y el ácido nucleico codificando al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1 pueden ser seleccionados y enlazados funcionalmente de tal manera que se permita la expresión transgénica de un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente de al menos la secuencia de aminoácido con la SEQ ID No. 1 en un organismo transgénico.

[0045] “Expresión” significa en este contexto la transcripción de la secuencia de ácido nucleico a ser expresada transgénicamente, pero también incluye la traslación del ARN transcrito de la secuencia de ácido nucleico a ser expresada transgénicamente en un polipéptido correspondiente.

[0046] “Transgénico” significa – por ejemplo en referencia a un casete de expresión transgénica, un vector de expresión transgénico, un organismo transgénico o un método para la expresión transgénica de los ácidos nucleicos – todos ellos constructos que son el resultado de métodos transgénicos, o todos métodos que los utilizan, en los que un ácido nucleico aislado de la invención no está localizado en sus ambientes genéticos naturales o ha sido modificado por métodos transgénicos, donde la modificación puede ser por ejemplo una sustitución, adición, delección, inversión o inserción de uno o más residuos de nucleótido. Preferiblemente, la al menos una secuencia promotora del ácido nucleico aislado de acuerdo a la invención es heteróloga respecto a la secuencia de ácido nucleico adicional que está enlazada funcionalmente con ella y que se va a expresar transgénicamente. En este contexto, “heteróloga” significa que la secuencia de ácido nucleico adicional no comprende la secuencia codificante que está de forma natural bajo el control de dicho promotor.

[0047] “Ambiente genético natural” significa el locus cromosómico natural en el organismo de origen o la presencia en una librería genómica. En el caso de una librería genómica, el ambiente genético natural de la secuencia de ácido nucleico se mantiene preferiblemente al menos en parte. El ambiente flanquea la secuencia de ácido nucleico al menos en un lado y tiene una longitud de secuencia de al menos 50 bp, preferiblemente al menos 500 bp, especialmente preferentemente al menos 1000 bp, muy especialmente preferiblemente al menos 5000 bp. Un constructo de expresión que tiene lugar de forma natural se vuelve un constructo de expresión transgénica cuando esta combinación se modifica por métodos no naturales, sintéticos (“artificiales”) como, por ejemplo, una mutagénesis in vitro. Dichos métodos han sido descritos (Patente U.S. Nº 5.565.350; WO 00/15815; ver también la presente anteriormente).

[0048] “Transgénico” con respecto a una expresión (“expresión transgénica”) significa preferiblemente todas esas expresiones que han sido llevadas a cabo usando un casete de expresión transgénica, vector de expresión transgénico u organismo transgénico, como se define en la presente anteriormente o más adelante.

[0049] Un enlace funcional entre el al menos un promotor y la secuencia de ácido nucleico a ser expresada se puede producir por medio de recombinación convencional y técnicas de clonación como se describen, por ejemplo, en Maniatis T y otros (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. y en Silhavy T J y otros (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. y en Ausubel F M y otros (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience. Un método que es adecuado para este propósito es, por ejemplo, la tecnología de clonación GATEWAY(TM) (Invitrogen Inc.), que se basa en la recombinación.

[0050] El ácido nucleico aislado de acuerdo a la invención puede comprender secuencias o elementos de control genético adicionales, además de la al menos una secuencia promotora de acuerdo a la invención.

[0051] El concepto de las secuencias o elementos de control genético debe ser entendido ampliamente y significa todas esas secuencias que tienen un efecto en el origen o la función del ácido nucleico aislado o el casete de expresión transgénica de acuerdo a la invención. Las secuencias de control genético modifican, por ejemplo, la transcripción y/o la traslación en organismos procariotas o eucariotas. Preferiblemente, el ácido nucleico aislado o los casetes de expresión transgénica de acuerdo a la invención comprenden al menos una secuencia promotora 5' hacia arriba de la secuencia de ácido nucleico particular a ser expresada transgénicamente y una secuencia terminadora 3' hacia abajo como secuencia de control genético, y, si es apropiado, elementos reguladores convencionales adicionales, en cada caso enlazados funcionalmente con la secuencia de ácido nucleico a ser expresada transgénicamente.

[0052] Las secuencias de control genético pueden también comprender promotores adicionales, elementos promotores o promotores mínimos que son capaces de modificar las propiedades de control de la expresión. Es por lo tanto posible, por medio de las secuencias de control genético, que por ejemplo la expresión específica del tejido tenga lugar además en dependencia de factores de estrés determinados.

[0053] Las secuencias de control genético además también comprenden la región no traducida 5', intrones, la región 3' no codificante u otras secuencias de genes. Se ha mostrado que las secuencias no trasladadas 5' son capaces de potenciar la expresión transitoria de los genes heterólogos. Además, pueden promover la especificidad del tejido (Rouster J y otros (1998) Plant J 15:435-44a). A la inversa, la región no traducida 5' del gen opaco 2 suprime la expresión. La delección de la región en cuestión resulta en un aumento en la actividad de los genes (Lohmer S y otros (1993) Plant Cell 5:65-73).

[0054] El ácido nucleico aislado puede ventajosamente comprender una o más de las que se conocen como secuencias potenciadoras en enlace funcional con el promotor, lo que hace la expresión transgénica aumentada de la secuencia de ácido nucleico posible. También se pueden insertar secuencias ventajosas adicionales en el extremo 3' de las secuencias de ácido nucleico a ser expresadas transgénicamente, como elementos reguladores o

terminadores adicionales. Las secuencias de ácido nucleico a ser expresadas transgénicamente pueden estar presentes como una o más copias en uno de los casetes de expresión genética de acuerdo a la invención.

[0055] Las secuencias de control se entenderán además que significan aquellas que hacen posible la recombinación o la inserción homóloga en el genoma de un organismo huésped, o que permiten la delección del genoma. En el caso de la recombinación homóloga, uno de los promotores de acuerdo a la invención puede ser sustituido por el promotor natural de un gen particular, por ejemplo. Dichas secuencias se entenderán como secuencias de control genético. Los métodos como la tecnología cre/lox permiten la delección específica del tejido, y en algunas circunstancias, inducible del casete de expresión transgénica del genoma del organismo huésped (Sauber B (1998) Methods (Duluth) 14(4):381-92). Aquí, ciertas secuencias flanqueadoras son añadidas al gen objetivo (secuencias lox), que más tarde hacen posible la delección por medio de la recombinación cre.

[0056] Para seleccionar células que han sido objeto exitosamente de recombinación homóloga, u otra transformación, es, como regla, necesario adicionalmente introducir un marcador seleccionable (ver la presente más adelante). La recombinación homóloga es un hecho relativamente raro en eucariotas más altos, en particular en plantas. Predominan las integraciones aleatorias en el genoma huésped. Una posibilidad de borrar las secuencias integradas aleatoriamente, y por lo tanto aumentar la concentración de clones celulares con una recombinación homóloga correcta, es el uso de un sistema de recombinación específico de la secuencia como se describe en la Patente U.S. N° 6.110.736.

[0057] Las señales de poliadenilación que son adecuadas como secuencias de control comprenden señales de poliadenilación vegetales y preferiblemente aquellas que corresponden esencialmente a las señales de poliadenilación del ADN-T de la *Agrobacterium tumefaciens*. En una realización particularmente preferida, el ácido nucleico aislado o el casete de expresión transgénica comprende una secuencia terminadora que es funcional en plantas. Las secuencias terminadoras que son funcionales en plantas generalmente significan aquellas secuencias que son capaces de producir, en plantas, la terminación de la transcripción de la secuencia de ADN. Ejemplos de secuencias terminadoras adecuadas son el terminador OCS (octopina sintasa) y el terminador NOS (nopalina sintasa). Sin embargo, se prefieren especialmente las secuencias terminadoras vegetales. Las secuencias terminadoras vegetales generalmente se refieren a aquellas secuencias que son parte de un gen vegetal natural. Especialmente preferido en este contexto es el terminador del gen inhibidor D de la catepsina de la patata o el terminador del gen de la proteína de almacenamiento de la alubia de campo VfLE1B3. Estos terminadores son, al menos, equivalentes a los terminadores virales o ADN-T descritos en el estado de la técnica.

[0058] El ácido nucleico aislado o los casetes de expresión transgénica de acuerdo a la invención y los vectores que los comprenden pueden comprender elementos funcionales adicionales. El término elemento funcional debe ser entendido ampliamente y significa todos aquellos elementos que tienen un efecto en la generación, multiplicación o función de los casetes de expresión transgénica de acuerdo a la invención o en los vectores de expresión transgénica o en los organismos derivados de ellos. Lo siguiente puede ser mencionado a modo de ejemplo, pero no por limitación.

1. Marcadores de Selección

[0059] El término "marcador de selección" comprende no sólo marcadores de selección positivos, que confieren una resistencia a un antibiótico, herbicida u otro biocida, sino también marcadores de selección negativos, que confieren una sensibilidad precisamente a los anteriores, y también marcadores que confieren una ventaja de crecimiento a un organismo transformado (por ejemplo por expresión de genes clave de biosíntesis de citoquinina; Ebinuma H y otros (2000) Proc Natl Acad Sci USA 94:2117-2121). En el caso de la selección positiva, sólo aquellos organismos que expresan el marcador de selección en cuestión prosperan, mientras que precisamente estos organismos mueren en el caso de la selección negativa. El uso de un marcador de selección positivo se prefiere en la generación de plantas transgénicas. Más preferido es el uso de marcadores de selección que confieren ventajas de crecimiento. Los marcadores de selección negativos pueden ser usados ventajosamente cuando la tarea en cuestión consiste en eliminar ciertos genes o segmentos de genoma de un organismo (por ejemplo para el propósito de un proceso de hibridación).

i) Marcadores de Selección Positivos: El marcador seleccionable introducido en el casete de expresión transgénica confiere resistencia a un biocida, por ejemplo un herbicida (como la fosfinotricina, el glifosato o el bromoxinil, un inhibidor metabólico (como la 2-desoxiglucosa-6-fosfato; WO 98/45456) o un antibiótico (como por ejemplo, tetraciclinas, ampicilina, kanamicina, G 418, neomicina, bleomicina o higromicina) a las células transformadas exitosamente. El marcador de selección permite la selección de las células transformadas de células no transformadas (McCormick y otros (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Esencialmente los marcadores de selección preferidos son aquellos que confieren resistencia a herbicidas.

ii) Marcadores de Selección Negativos: Los Marcadores de selección negativos hacen posible por ejemplo la selección de organismos con secuencias borradas exitosamente que comprenden el gen marcador (Koprek T y otros (1999) The Plant Journal 19 (6):719-726). Cuando se lleva a cabo una selección negativa, por ejemplo un compuesto que de otra manera no tiene un efecto desventajoso en la planta es convertido en un

compuesto que es desventajoso, por ejemplo debido al marcador de selección negativo introducido en la planta. Los genes que tienen un efecto desventajoso de por sí son aún más adecuados.

2) Genes Reporteros

[0060] Los genes reporteros codifican fácilmente proteínas cuantificables que, que por su color o actividad de los enzimas, permiten una valoración de la eficiencia de transformación, el sitio o tiempo de la expresión (ver también Schenbron E, Groskreutz D. Mol. Biotechnol. 1999; 13(1):29-44). Ejemplos que pueden ser mencionados son: "proteína de fluorescencia verde" (GFP) (Chui W L y otros (1996), Curr Biol 6:325-330; Leffel S M y otros (1997) Biotechniques 23(5):9128; Sheen y otros (1995) Plant J 8(5):777-785; Haseloff y otros (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2122-2127; Reichel y otros (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(12):5888-5893; Tian y otros (1997) Plant Cell Rep 16:267-271; WO 97/41228). La cloranfenicol transferasa (Fromm y otros (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82:5824-5828), la Luciferasa (Millar y otros (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414; Ow y otros (1986) Science 234:856-859); permiten la detección por bioluminiscencia. La β -Galactosidasa, codifica un enzima para el que están disponibles una variedad de sustratos cromogénicos. La β -Glucuronidasa (GUS) (Jefferson y otros (1987) EMBO J. 6:3901-3907) o el gen uidA, que codifica un enzima para una variedad de sustratos cromogénicos. El producto del gen del Locus-R: proteína que regula la producción de pigmentos de antocianina (coloración roja) en el tejido vegetal y por lo tanto hace posible el análisis directo de la actividad promotora sin la adición de sustancias auxiliares adicionales o sustratos cromogénicos (Dellaporta y otros (1988) En: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18^o Stadler Genetics Symposium, 11:263-282). Tirosinasa (Katz y otros (1983) J Gen Microbiol 129:2703-2714), un enzima que oxida la tirosina a DOPA y dopaquinona, que posteriormente forman la melanina, que puede ser detectada fácilmente. La aequorina (Prasher y otros (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), puede ser usada en la detección por bioluminiscencia sensible al calcio.

3) Orígenes de Replicación

[0061] Los orígenes de replicación aseguran la multiplicación de los casetes de expresión transgénica o los vectores de expresión transgénica de acuerdo a la invención en, por ejemplo, el *E. coli* o las agrobacterias. Ejemplos que pueden ser mencionados son el OR1 (origen de la replicación de ADN), el pBR322 ori o el P15A ori (Sambrook y otros: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Ejemplos de orígenes de replicación que son funcionales en agrobacterias son pRK2, pRi, PVS1 o pSA.

4) Secuencias limítrofes

[0062] Las "secuencias limítrofes" (como, por ejemplo, el límite derecho o izquierdo del ADN-T) permiten una transferencia mediada por agrobacterias en células vegetales para la transferencia e integración en el genoma vegetal.

5) Sitios de Clonación Múltiples (MCS) permiten y facilitan la inserción de una o más secuencias de ácido nucleico

[0063] La invención también se refiere a vectores que comprenden el anteriormente descrito ácido nucleico de la invención o el casete de expresión transgénica de la invención. Los vectores generalmente significan estructuras que son capaces de replicación y que son preferiblemente específicas del huésped, y que permiten la absorción de secuencias de ácido nucleico y su transferencia en otras células. Ejemplos de vectores pueden ser los plásmidos, los cósmidos, los fagos, los virus u otra agrobacteria. Los vectores que son particularmente adecuados para los propósitos de la biotecnología vegetal están descritos ejemplarmente en la presente más adelante. Los vectores de la presente invención comprenden vectores de expresión transgénicos.

[0064] Otro sujeto de la invención se refiere a organismos transgénicos transformados o transfectados transitoriamente o establemente con al menos un ácido nucleico aislado de la invención o al menos un casete de expresión transgénica de acuerdo a la invención o al menos un vector de acuerdo a la invención o a la progenie de dichos organismos transgénicos. Además la presente invención se refiere a células, cultivos celulares, tejidos, partes - como, por ejemplo en el caso de organismos vegetales, hojas, raíces y similares - o material de propagación derivado de dichos organismos, por ejemplo semillas de organismos transgénicos de la invención. Se entiende que para el propósito de la presente invención el término organismo transgénico no solo engloba el organismo donde el ácido nucleico de la invención ha sido transitoriamente o establemente introducido, sino que también se refiere a la progenie de dichos organismos con independencia de la distancia de generación, por ejemplo progenie de primera generación así como progenie de generación X^a, siempre que estos organismos todavía comprendan el ácido nucleico de la invención.

[0065] Preferiblemente el organismo transgénico es una planta o un microorganismo, más preferiblemente el organismo transgénico es una planta seleccionada de la familia *Brassicaceae*, incluso más preferiblemente de los géneros *Brassica* o *Arabidopsis*.

[0066] Organismo, organismos de partida u organismos huésped se entiende que significan organismos procariotas o eucariotas como, por ejemplo, microorganismos u organismos vegetales. Los microorganismos preferidos son las bacterias, las levaduras, las algas o los hongos.

5 **[0067]** Las bacterias preferidas son las bacterias del género *escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* o *cyanobacteria*, por ejemplo del género *Synechocystis*.

10 **[0068]** Especialmente preferidos son los microorganismos que son capaces de infectar plantas y por lo tanto de transferir el ácido nucleico, el casete de expresión transgénica y/o el vector de la invención. Los microorganismos preferidos son aquellos del género *Agrobacterium* y en particular la especie *Agrobacterium tumefaciens*.

15 **[0069]** Los organismos huésped o de partida que se prefieren como organismos transgénicos son, sobre todo, organismos vegetales. Los organismos vegetales generalmente significan todos aquellos organismos que son capaces de la fotosíntesis. Están incluidos como organismos vegetales dentro del ámbito de la invención todos los géneros y especies de las plantas superiores e inferiores del reino vegetal. También están incluidas las plantas maduras, las semillas, los tubérculos, remolachas/raíces principales engrosadas, frutas, brotes y retoños y también partes, material de propagación y cultivos, por ejemplo cultivos celulares, derivados de los mismos. Plantas maduras significa plantas en cualquier estado de desarrollo más allá del retoño. Retoño significa una planta inmadura joven en un estado de desarrollo temprano. Se prefieren como organismos huésped para preparar las plantas transgénicas las plantas anuales, perennes, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Se da preferencia a las plantas de la siguiente familia vegetal: *Brassicaceae* en particular a plantas de los géneros *Brassica* y *Arabidopsis*.

25 **[0070]** La preparación de un organismo transformado o de una célula transformada requiere introducir el ADN apropiado en la célula huésped apropiada. Hay una multiplicidad de métodos disponible para este proceso que es referido como transformación (ver también Keown y otros 1990 *Methods in Enzymology* 185:527-537). Por lo tanto, a modo de ejemplo, el ADN puede ser introducido directamente por microinyección o por bombardeo con micropartículas recubiertas de ADN. La célula puede ser también permeabilizada químicamente, por ejemplo usando polietilenglicol, de tal forma que el ADN puede entrar en la célula por difusión. El ADN puede también ser realizado por fusión de protoplastos con otras unidades que contienen ADN como minicélulas, células, lisosomas o liposomas. Otro método adecuado para introducir ADN es la electroporación en la que las células son permeabilizadas inversamente por un impulso eléctrico.

35 **[0071]** En el caso de las plantas, los métodos descritos para transformar y regenerar plantas de tejidos vegetales o células vegetales se utilizan para la transformación transitoria o estable. Los métodos adecuados son especialmente la transformación de protoplastos por absorción de ADN inducida por polietilenglicol, el método biolístico usando la pistola de genes, el método de "bombardeo de partículas", la electroporación, la incubación de embriones secos en solución que contiene ADN y la microinyección.

40 **[0072]** Aparte de estas técnicas de transformación "directas", también se puede llevar a cabo una transformación por infección bacteriana por medio de *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. Estas cepas contienen un plásmido (plásmido Ti o Ri), una parte del cual (que es conocida como ADN-T) es transferida a la planta tras la infección con *Agrobacterium* e integrada en el genoma de la célula vegetal. La transformación mediada por *Agrobacterium* está mejor adecuada para células vegetales dicotiledóneas, mientras que las técnicas de transformación directa son adecuadas para cualquier tipo de célula.

45 **[0073]** Se puede introducir ventajosamente un casete de expresión transgénica de la invención en las células, preferiblemente en células vegetales, usando vectores, preferiblemente vectores de la invención.

50 **[0074]** En una realización ventajosa, el casete de expresión transgénica es introducido por medio de vectores plásmidos. Se da preferencia a aquellos vectores de expresión transgénica que permiten una integración estable del casete de expresión transgénica en el genoma huésped. En este contexto, genoma huésped significa la información hereditaria entera del huésped y comprende por ejemplo no solo el ADN cromosómico del núcleo, sino también el ADN de los plástidos y la mitocondria. Sin embargo, se prefiere la inserción en el ADN cromosómico del núcleo.

55 **[0075]** En el caso de inyección o electroporación de ADN en células vegetales, no se hacen exigencias particulares en el plásmido usado. Es posible usar plásmidos simples como aquellos de la serie pUC. Si se van a regenerar plantas completas de las células transformadas, es necesario que esté presente un gen marcador seleccionable adicional en el plásmido.

60 **[0076]** Se han descrito las técnicas de transformación para varios organismos vegetales monocotiledóneos y dicotiledóneos. Además están disponibles varios vectores plásmidos posibles que normalmente contienen un origen de la replicación para la propagación en el *E. coli* y un gen marcador para la selección de bacterias transformadas para introducir genes extraños en plantas. Ejemplos son el pBR322, la serie pCU, la serie M13 mp, el pACYC184, etc.

[0077] El casete de expresión transgénica puede ser introducido en el vector por un sitio de escisión de restricción adecuado. El plásmido resultante es primero introducido en el *E. coli*. Las células de *E. coli* correctamente transformadas se seleccionan, se cultivan y el plásmido recombinante es obtenido usando métodos familiares para el trabajador experto. El análisis y la secuenciación de restricción pueden ser usados para comprobar el paso de clonación.

[0078] Las células transformadas, es decir, aquellas que contienen el ADN introducido integrado en el ADN de la célula huésped pueden ser seleccionadas de las células no transformadas, si un marcador seleccionable es parte del ADN introducido. Un marcador puede ser, a modo de ejemplo, cualquier gen que es capaz de impartir una resistencia a antibióticos o herbicidas. Las células transformadas que expresan dicho gen marcador son capaces de sobrevivir en presencia de concentraciones de un antibiótico o herbicida apropiado, que mata una del tipo salvaje no transformada. Ejemplos son el gen *bar* que imparte resistencia a la fosfinotricina herbicida (Rathore K S y otros, Plant Mol Biol. 1993 Marzo; 21(5):871-884), el gen *npII* que imparte resistencia a la kanamicina, el gen *hpt* que imparte resistencia a la higromicina y el gen EPSP que imparte resistencia al glifosato herbicida.

[0079] Dependiendo del método de introducción de ADN, se pueden requerir genes adicionales en el plásmido del vector. Si se usan agrobacterias, el casete de expresión transgénica ha de ser integrado en los plásmidos específicos, ya sea en un vector intermedio (vector lanzadera) o un vector binario. Si, por ejemplo, el plásmido Ti o Ri se va a usar para la transformación, al menos el extremo derecho, en la mayoría de los casos, sin embargo el borde derecho y el izquierdo, del ADN-T del plásmido Ti o Ri está conectado como región flanqueante con el casete de expresión transgénica a ser introducido. Se da preferencia a usar vectores binarios. Los vectores binarios pueden replicar tanto en el *E. coli* como en la *Agrobacterium*. Normalmente contienen un gen marcador de selección y un conector o policonector flanqueado por las secuencias del borde del ADN-T derecha e izquierda. Pueden ser transformados directamente en *Agrobacterium* (Jolsters y otros Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187). El gen marcador de selección permite la selección de agrobacterias transformadas; un ejemplo es el gen *npII* que imparte una resistencia a la kanamicina. La *Agrobacterium* que en este caso actúa como el organismo huésped debería contener ya un plásmido con la región vir. Esta región se requiere para la transferencia del ADN-T en la célula vegetal. Una *Agrobacterium* transformada de esta manera puede ser usada para la transformación de células vegetales.

[0080] El uso de ADN-T para la transformación de células vegetales ha sido estudiado y descrito intensamente (B. Jenes y otros Techniques for Gene Transfer, en: TRAngenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, editado por Kung S D y Wu R, Academic Press (1993), pp. 128-43 y en Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225; PE 120516; Hoekema, En: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B. V., Alblaserdam, Capítulo V; Fraley y otros, Crit. Rev. Plant, Sci., 4:1-46 y An y otros (1985) EMBO J. 4:277-287). Se conocen y están parcialmente disponibles varios vectores binarios, como, por ejemplo, el pBIN19 (Bevan y otros (1984) Nucl Acids Res 12:8711f.; Clontech Laboratories, Inc. USA) e los derivados del PSUN (SunGene GmbH & Co. KGaA; WO 02/00900). El casete de expresión de acuerdo a la invención puede ser insertado en estos vectores binarios e integrado en el genoma vegetal como se describe en la presente anteriormente y/o en la presente más adelante.

[0081] El ADN es transferido en la célula vegetal cocultivando explantes vegetales con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. Empezando de material vegetal infectado (por ejemplo, hoja, raíz, o partes del tallo, pero también protoplastos o suspensiones de células vegetales), es posible regenerar plantas completas usando un medio adecuado que puede contener, por ejemplo, antibióticos o biocidas para la selección de las células transformadas. Las plantas obtenidas pueden entonces ser cribadas para la presencia del ADN introducido, en este caso el casete de expresión transgénica de la invención. Tan pronto como el ADN se ha integrado en el genoma huésped, el genotipo correspondiente es normalmente estable y la inserción correspondiente se encuentra también de nuevo en generaciones posteriores. Normalmente, el casete de expresión transgénica integrado contiene un marcador de selección que imparte a la planta transformada una resistencia a un biocida (por ejemplo un herbicida), a un inhibidor del metabolismo como el 2-DOG o a un antibiótico como la kanamicina, G418, bleomicina, higromicina o fosfinotricina, etc. El marcador de selección permite la selección de células transformadas de células no transformadas (McCormick y otros (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Las plantas obtenidas pueden ser cultivadas y cruzadas de la manera común. Dos o más generaciones deben ser cultivadas para asegurar que la integración genómica es estable y heredable.

[0082] Tan pronto como una célula vegetal transformada se ha preparado, es posible obtener una planta completa usando métodos conocidos por el trabajador experto. Con este fin, se usan cultivos de callos como punto de partida, a modo de ejemplo. De estas masas celulares todavía no diferenciadas, es posible inducir la formación de brotes y raíces de la manera conocida. Los brotes obtenidos pueden ser trasplantados y cultivados.

[0083] La integración del ADN-T puede ser determinada, por ejemplo, en base a la eficacia de la expresión de los ácidos nucleicos a ser expresados transgénicamente o del marcador de selección, por ejemplo, in vitro por propagación de los meristemas de brotes usando uno de los métodos de selección anteriormente descritos.

[0084] La invención además se refiere a células, cultivos celulares, partes, como, por ejemplo, raíces, hojas, etc. en el caso de organismos vegetales transgénicos, y material de propagación transgénico como semillas, tubérculos,

remolachas/raíces principales engrosadas o frutos derivados de los organismos transgénicos anteriormente descritos y/o que comprenden un ácido nucleico aislado de la invención, un casete de expresión transgénica de la invención o un vector de la invención.

5 [0085] Las plantas modificadas genéticamente de la invención, que pueden ser consumidas por humanos y animales, pueden también ser usadas, por ejemplo directamente o después de la preparación conocida por sí misma, como alimentos o piensos.

10 [0086] La invención además se refiere al uso de los organismos transgénicos anteriormente descritos de la invención y de las células, cultivos celulares, partes, como, por ejemplo, raíces, hojas, etc., en el caso de organismos vegetales transgénicos, y material de propagación transgénico como semillas, tubérculos, remolachas/raíces principales engrosadas o frutos derivados de ellos para la producción de alimentos o piensos, productos farmacéuticos o productos químicos finos.

15 [0087] La invención también se refiere al uso de un ácido nucleico aislado de la invención, un casete de expresión de acuerdo a la invención o un vector de la invención para la fabricación de una planta transgénica.

[0088] La presente invención además se refiere a un método para la fabricación de una planta transgénica, comprendiendo los pasos de:

- 20 a) introducir en una o más células vegetales un ácido nucleico aislado de la invención, un casete de expresión de la invención o un vector de la invención para producir células transgénicas; y
b) la selección de células transgénicas que comprende el mencionado ácido nucleico aislado, casete de expresión o vector de la invención integrado en el genoma; y
25 c) la regeneración de plantas intactas de dichas células transgénicas.

[0089] La información de cómo se pueden realizar estos pasos se da en detalle en la presente anteriormente.

30 [0090] Además, la presente invención se refiere a un método para mejorar el crecimiento de brotes vegetales, comprendiendo:

- i) introducir en una planta un ácido nucleico aislado de la invención; y
ii) expresar el ácido nucleico introducido de la invención.

35 [0091] En lo sucesivo se describe adicionalmente la presente invención por medio de ejemplos.

Figuras:

[0092]

40 FIG. 1 muestra el crecimiento vegetativo de los mutantes *rock2*, *rock3* y *ore12* en comparación con el tipo salvaje; (A.) Foto de retoños 19 DAG (*días después de la germinación*). Las plantas fueron cultivadas bajo condiciones de día largo. (B.) Comparación de las hojas de las plantas mostradas en (A.), sin *ore12*. (C.) Comparación de peso fresco 18 DAG. n = 10; *, · = p<0,01; **, ·· = p<0,005; ***, ··· = p<0,0001. * = comparado con WT; · = comparado con *ore12*.

FIG. 2 muestra la senescencia natural de la hoja 6 de las plantas mutantes *rock* y *ore12* bajo condiciones de día largo: (A.) Reducción de la eficiencia fotosintética del fotosistema II de 16 a 378 DAE (*días después de la emergencia*). (B.) Reducción del contenido de clorofila 16 a 35 DAE. (C.) comparación de las hojas mostradas en (A.) y (B.). n = 10; · = p<0,01; ··p<0,005 en comparación con el *ore12*.

FIG. 3 muestra el parámetro de los brotes de las plantas mutantes *rock2*, *rock3* y *ore12* y las líneas transgénicas que expresan *pAHK2:rock2* o *pAHK3:rock3*. (A.) La altura de la planta del *rock2* y las plantas mutantes *rock2* y *rock3* transgénicas aumenta. (B.) los mutantes *rock2* y las líneas *rock2* y *rock3* transgénicas forman más silicuas en el tallo principal. n = 10; *, = p<0,01; ***, ··· = p>0,0001; * = en comparación con el WT; · = en comparación con el *ore12*.

FIG. 4 muestra el parámetro de brotes de las plantas mutantes *rock2*, *rock3* y *ore12* y las líneas transgénicas que expresan *pAHK2:rock2* o *pAHK3:rock3*: (A., B.) los mutantes *rock2* y *rock3* y las líneas *rock2* y *rock3* transgénicas forman (A.) tallos más gordos y (B.) flores más grandes. n = 10; ***, ··· = p<0,0001; * = en comparación con WT; · = en comparación con *ore12*.

FIG. 5 muestra la producción de semillas de dos líneas transgénicas *pAHK3:rock3* independientes en comparación con el tipo salvaje. Las líneas transgénicas tienen un incremento de hasta el 47% de producción de semillas en comparación con las plantas del tipo salvaje. n = 10. ** = p<0,005; *** = p<0,0001 en comparación con WT.

Ejemplos:**Material y Métodos**

- 5 [0093] Los alelos *rock2* y *rock3* fueron identificados y aislados en base a su capacidad para suprimir las consecuencias fenotípicas de la deficiencia de citoquinina causada por la sobreexpresión de un gen CKX codificando una oxidas/deshidrogenasa de citoquinina.

Material vegetal y condiciones de crecimiento

- 10 [0094] El ecotipo Columbia (col-0) de la *Arabidopsis thaliana* se usó como el tipo salvaje. Las plantas fueron cultivadas en el invernadero en tierra bajo condiciones estériles en fuentes Petri que contenían un medio ATS (Estelle, M.A. y Somerville, C. (1986). Los mutantes resistentes a la auxina de la *Arabidopsis thaliana* con una morfología alterada. Mol. Gen. Genet. 206, 200-206). Todas las plantas fueron cultivadas a 22° C bajo condiciones de día largo (16 h de luz/8 h de oscuridad).

Mutagenesis

- 20 [0095] Aproximadamente 25000 semillas 35S:CKX1 (Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., y Schmülling, T. (2003). Las plantas de *Arabidopsis* transgénicas deficientes en citoquinina muestran múltiples alteraciones del desarrollo indicando funciones opuestas de citoquininas en la regulación de la actividad meristemática de brotes y raíces. La Célula Vegetal 15,2532-2550) fueron empapadas durante 16 h en 100 ml 0,2% (v/v) de metanosulfonato de etilo a temperatura ambiente. La generación M1 fue cultivada como plantas únicas y la generación M2 fue cribada para plantas con el fenotipo similar al tipo salvaje.

Análisis Genético

- 30 [0096] Se generaron mapas de poblaciones para la *rock2* y la *rock3* cruzando las plantas *rock2* 35S:CKX1 Y el *rock3* 35S:CKX1 con el ecotipo de tipo salvaje Landsberg *erecta*. Las plantas de la progenie F2 se usaron para mapear la *rock2* y la *rock3*.
- 35 [0097] Para analizar las consecuencias de las mutaciones *rock2* y *rock3* en el tipo salvaje, los mutantes supresores *rock2* y *rock3* en el antecedente 35S:CKX1 fueron cruzadas con el tipo salvaje Columbia. Las plantas de la progenie F1 de este cruce mostraban todavía el fenotipo de reversión sugiriendo que los alelos *rock2* y *rock3* son dominantes. La generación F2 fue cribada para las plantas *rock2* y *rock3* en el antecedente del tipo salvaje (llamadas entonces mutantes *rock2* y *rock3*).

Establecimiento de las líneas transgénicas

- 40 [0098] Para la construcción del transgén *pAHK2:rock2* se amplificó una región promotora de 2124 bp del *AHK2* por PCR del ADN genómico de la *A. thaliana* Col-0 y se clonó con tecnología Gateway™ en el vector de entrada pDONR™P4-P1R (Invitrogen, Karishure, Alemania). Después de clonar la secuencia de codificación *AHK2* con la tecnología Gateway™ en el vector de entrada pDONR™221 (Invitrogen) la mutación de punto *rock2* fue introducida por PCR basada en mutagénesis con el Kit "QuickChange Site-Directed Mutagenesis" (Stratagene, La Jolla, USA) para obtener el Alelo *rock2*. Ambos fragmentos fueron combinados con la clonación recombinatoria Multisite Gateway™ en el vector pK7m24GW,3 (Karini y otros, 2005). Para obtener el constructo *pAHK3:rock3* se amplificó una región promotora de 2062bp por PCR del ADN genómico de la *A. thaliana* Col-0 y el fragmento fue insertado en el vector de entrada pDONR™P4-P1R. El ADNc *AHK3* que contenía el marco de lectura abierto del gen fue amplificado por PCR de la *A. thaliana* Col-0 y clonado en el vector de entrada pDONR™222 (Invitrogen). Para introducir la mutación de punto *rock3* se usó el Kit "QuickChange Site-Directed Mutagenesis" (Stratagene, La Jolla, USA) para conseguir el alelo *rock3*. El promotor *AHK3* y el ADNc *ROCK3* fueron combinados con clonación recombinatoria Multisite Gateway™ en el vector pK7m24GW,3 (Karimi, M., DE Meyer, B., y Hilson, P. (2005). Modular Cloning in plant cells. Trends Plant Sci. 10, 103-105). Ambos constructos fueron introducidos en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 y las plantas *A. thaliana* Col-0 fueron transformadas usando el método de goteo floral (Clough, S.J., y Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16,735-743). Las líneas transgénicas fueron seleccionadas usando kanamicina y propagadas en la generación T3 o T4.

Mediciones morfométricas

- 60 [0099] Al de 18 días después de la germinación se tomaron fotografías digitales de las rosetas y se midió el diámetro de la roseta usando el programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA). Las Flores en el estado 14 fueron fotografiadas y su tamaño también fue medido usando el programa Scion Image.

Determinación del peso fresco, altura de la planta final y parámetros de rendimiento

[0100] Los pesos frescos fueron medidos pesando cualquiera de las rosetas, los brotes sin las rosetas, o la parte aérea completa de las plantas. La altura final de la planta y el número de silicuas fueron determinados tras la finalización de la floración. Para el análisis de la producción de semillas, las plantas fueron puestas en bolsas de papel después de la finalización de la floración. Después de que las plantas fueron mantenidas secas durante tres semanas adicionales, se determinó el peso de las semillas total.

Parámetros fotosintéticos

[0101] La eficiencia máxima de la fotoquímica PSII (proporción Fv/Fm) de las plantas adaptadas a la oscuridad fue medida con FluorCam (Photon Systems Instruments, Brno, República Checa). Los contenidos de clorofila de las hojas individuales fueron medidos usando el Chlorophyll Meter SPAD-502 (Konika Minolta, Bremen, Alemania), tomando el valor medio de dos mediciones de la misma hoja.

Resultados

1. Análisis de alelos mutantes en el antecedente 35S:CKX1

[0102] Para comparar las consecuencias de la mutación *rock3* con las de la mutación *ore12* la última fue introgresada en el antecedente 35S:CKX1 (el *rock3* fue identificado en este antecedente). Se pudo demostrar que la mutación *ore12* revierte parcialmente las consecuencias fenotípicas de la sobreexpresión CKX1. Sin embargo, en diferentes puntos temporales durante el desarrollo el grado de reversión es menos fuerte que la reversión alcanzada con el alelo *rock3*. Esta diferencia es más evidente para el tamaño de los retoños y el diámetro de la roseta. Estos dos parámetros son indicadores buenos para un estado de citoquinina cambiado de las plantas CKX1ox.

2. Análisis de los alelos mutantes en antecedentes del tipo salvaje

[0103] A continuación se compararon las consecuencias de los tres alelos mutantes (*rock2*, *rock3* y *ore12*) en el antecedente del tipo salvaje (Col-0). En la Figura 1 se muestra que sólo los alelos *rock2* y *rock3* mejoran significativamente el crecimiento vegetativo de las plantas del tipo salvaje, mientras que el alelo *ore12* no resulta en una mejora del crecimiento significativa. Este efecto puede ser ya visto poco después de la germinación de la semilla (Figura 1A) y es también evidente de la comparación del tamaño de la hoja en un estado de desarrollo posterior (Figura 1B). Los efectos de los alelos *rock2* y *rock3* no fueron sólo significativamente más fuertes en comparación con las plantas del tipo salvaje sino también en comparación con el alelo *ore12*. Tanto el *rock2* como el *rock3* causaron un aumento de >75% del peso fresco 18 días después de la germinación (DAG) en comparación con el tipo salvaje. Un análisis del aumento del peso fresco de las rosetas y toda la planta sobre el ciclo vital completo de las plantas mostró que el aumento en la diferencia de peso fresco es particularmente evidente en 32-40 DAG y que el efecto es más fuerte con el alelo *rock2*.

[0104] Se conoce que el estado de citoquinina potenciado causado por el alelo *ore12* retrasa la senescencia de la hoja. Se comparó la senescencia de las hojas en plantas del tipo salvaje, en plantas mutantes *ore12* y mutantes *rock*. La Figura 2 muestra claramente un comienzo retardado de la senescencia de las hojas en todas las plantas mutantes en comparación con el tipo salvaje. La eficiencia fotosintética del PS II (FV/Fm) comenzó a declinar en la hoja de la roseta 6' de las plantas del tipo salvaje alrededor del 17 DAE y alrededor del 21 a 23 DAE en las plantas mutantes (Figura 2A). Entre estas, las plantas *rock2* mostraron el comienzo más temprano de la senescencia de las hojas, seguida por el *ore12* y el *rock3*. Esta diferencia en el momento de la senescencia de las hojas se mantuvo llevando a un tiempo de vida diez días más largo de las hojas del *rock3* en comparación con las hojas del tipo salvaje (Figura 2A). Este resultado fue confirmado midiendo otro parámetro de la senescencia, la disminución de clorofila (Figura 2B), así como con la inspección visual de las hojas (Figura 2C).

3. Análisis de la expresión transgénica de los alelos *rock*

[0105] En el siguiente paso se analizaron las consecuencias de la expresión transgénica de los alelos *rock* dominantes. Con este fin transformamos plantas *Arabidopsis* Col-0 con genes que comprendían ca. 2 kb de las regiones regulatorias hacia arriba 5' de la AHK2 y la AHK3 respectivamente y las secuencias de codificación del *rock2* y *rock3*, respectivamente. Estos genes fueron denominados *pAHK2:rock2* y *pAHK3:rock3*, respectivamente, y están etiquetados *pAHK2:rock2* y *pAHK3:rock3* en la Figura 3 a la Figura 5. De forma general, se descubrió una mejora adicional de los rasgos fenotípicos que fueron alterados en las plantas mutantes *rock*. Las Figuras 3 y 4 muestran que las plantas transgénicas *pAHK2:rock2* y *pAHK3:rock3* tienen en comparación con las plantas del tipo salvaje o *ore12* un aumento significativo en la altura de los brotes (Figura 3A), un número significativamente aumentado de silicuas en el tallo principal (Figura 3B), tallos más gruesos causado por un número mejorado de células más grandes en la dimensión radial (Figura 4A) y un tamaño significativamente aumentado de las flores (Figura 4B). Como se demuestra en la Figura 5, se pudo demostrar que las plantas transgénicas *pAHK3:rock3* tienen una producción de semillas significativamente más alta en comparación con el tipo salvaje.

LISTA DE SECUENCIAS

5	[0106]	<110> FU Berlin Institut fur Biologie Angewandte Genetik
		<120> rock2 y rock3, dos nuevas variantes de ganancia de función de los receptores de citoquinina AHK2 y AHK3
10		<130> P658809EP
		<160> 6
15		<170> PatentIn version 3.3
		<210> 1
		<211> 1176
		<212> PRT
20		<213> Arabidopsis thaliana
		<400> 1
25		Met Ser Ile Thr Cys Glu Leu Leu Asn Leu Thr Ser Lys Lys Ala Lys
		1 5 10 15
30		Lys Ser Ser Ser Ser Asp Lys Lys Trp Leu Lys Lys Pro Leu Phe Phe
		20 25 30
		Leu Ile Leu Cys Gly Ser Leu Val Ile Val Leu Val Met Phe Leu Arg
		35 40 45
35		Leu Gly Arg Ser Gln Lys Glu Glu Thr Asp Ser Cys Asn Gly Glu Glu
		50 55 60
40		Lys Val Leu Tyr Arg His Gln Asn Val Thr Arg Ser Glu Ile His Asp
		65 70 75 80
45		Leu Val Ser Leu Phe Ser Asp Ser Asp Gln Val Thr Ser Phe Glu Cys
		85 90 95
		His Lys Glu Ser Ser Pro Gly Met Trp Thr Asn Tyr Gly Ile Thr Cys
		100 105 110
50		Ser Leu Ser Val Arg Ser Asp Lys Gln Glu Thr Arg Gly Leu Pro Trp
		115 120 125
55		Asn Leu Gly Leu Gly His Ser Ile Ser Ser Thr Ser Cys Met Cys Gly
		130 135 140
60		Asn Leu Glu Pro Ile Leu Gln Gln Pro Glu Asn Leu Glu Glu Glu Asn
		145 150 155 160
		His Glu Glu Gly Leu Glu Gln Gly Leu Ser Ser Tyr Leu Arg Asn Ala
		165 170 175
65		Trp Trp Cys Leu Ile Leu Gly Val Leu Val Cys His Lys Ile Tyr Val
		180 185 190

5 Ser His Ser Lys Ala Arg Gly Glu Arg Lys Glu Lys Val His Leu Gln
195 200 205

10 Glu Ala Leu Ala Pro Lys Lys Gln Gln Gln Arg Ala Gln Thr Ser Ser
210 215 220

15 Arg Gly Ala Gly Arg Trp Arg Lys Asn Ile Leu Leu Leu Gly Ile Leu
225 230 235 240

20 Gly Gly Val Ser Phe Ser Val Trp Trp Phe Trp Asp Thr Asn Glu Glu
245 250 255

25 Ile Ile Met Lys Arg Arg Glu Thr Leu Ala Asn Met Cys Asp Glu Arg
260 265 270

30 Ala Arg Val Leu Gln Asp Gln Phe Asn Val Ser Leu Asn His Val His
275 280 285

35 Ala Leu Ser Ile Leu Val Ser Thr Phe His His Gly Lys Ile Pro Ser
290 295 300

40 Ala Ile Asp Gln Arg Thr Phe Glu Glu Tyr Thr Glu Arg Thr Asn Phe
305 310 315 320

45 Glu Arg Pro Leu Thr Ser Gly Val Ala Tyr Ala Leu Lys Val Pro His
325 330 335

50 Ser Glu Arg Glu Lys Phe Glu Lys Glu His Gly Trp Ala Ile Lys Lys
340 345 350

55 Met Glu Thr Glu Asp Gln Thr Val Val Gln Asp Cys Val Pro Glu Asn
355 360 365

60 Phe Asp Pro Ala Pro Ile Gln Asp Glu Tyr Ala Pro Val Ile Phe Ala
370 375 380

65 Gln Glu Thr Val Ser His Ile Val Ser Val Asp Met Met Ser Gly Glu
385 390 395 400

70 Glu Asp Arg Glu Asn Ile Leu Arg Ala Arg Ala Ser Gly Lys Gly Val
405 410 415

75 Leu Thr Ser Pro Phe Lys Leu Leu Lys Ser Asn His Leu Gly Val Val
420 425 430

80 Leu Thr Phe Ala Val Tyr Asp Thr Ser Leu Pro Pro Asp Ala Thr Glu
435 440 445

85 Glu Gln Arg Val Glu Ala Thr Ile Gly Tyr Leu Gly Ala Ser Tyr Asp
450 455 460

5 Met Pro Ser Leu Val Glu Lys Leu Leu His Gln Leu Ala Ser Lys Gln
465 470 475 480

10 Thr Ile Ala Val Asp Val Tyr Asp Thr Thr Asn Thr Ser Gly Leu Ile
485 490 495

15 Lys Met Tyr Gly Ser Glu Ile Gly Asp Ile Ser Glu Gln His Ile Ser
500 505 510

20 Ser Leu Asp Phe Gly Asp Pro Ser Arg Asn His Glu Met His Cys Arg
515 520 525

25 Phe Lys His Lys Leu Pro Ile Pro Trp Thr Ala Ile Thr Pro Ser Ile
530 535 540

30 Leu Val Leu Val Ile Thr Phe Phe Val Gly Tyr Ile Leu Tyr Glu Ala
545 550 555 560

35 Ile Asn Arg Ile Ala Thr Val Glu Glu Asp Cys Gln Lys Met Arg Glu
565 570 575

40 Leu Lys Ala Arg Ala Glu Ala Ala Asp Ile Ala Lys Ser Gln Phe Leu
580 585 590

45 Ala Thr Val Ser His Glu Ile Arg Thr Pro Met Asn Gly Val Leu Gly
595 600 605

50 Met Leu Lys Met Leu Met Asp Thr Asp Leu Asp Ala Lys Gln Met Asp
610 615 620

55 Tyr Ala Gln Thr Ala His Gly Ser Gly Lys Asp Leu Thr Ser Leu Ile
625 630 635 640

60 Asn Glu Val Leu Asp Gln Ala Lys Ile Glu Ser Gly Arg Leu Glu Leu
645 650 655

65 Glu Asn Val Pro Phe Asp Met Arg Phe Ile Leu Asp Asn Val Ser Ser
660 665 670

70 Leu Leu Ser Gly Lys Ala Asn Glu Lys Gly Ile Glu Leu Ala Val Tyr
675 680 685

75 Val Ser Ser Gln Val Pro Asp Val Val Val Gly Asp Pro Ser Arg Phe
690 695 700

80 Arg Gln Ile Ile Thr Asn Leu Val Gly Asn Ser Ile Lys Phe Thr Gln
705 710 715 720

85 Glu Arg Gly His Ile Phe Ile Ser Val His Leu Ala Asp Glu Val Lys
725 730 735

5	Glu	Pro	Leu	Thr	Ile	Glu	Asp	Ala	Val	Leu	Lys	Gln	Arg	Leu	Ala	Leu
				740					745							750
10	Gly	Cys	Ser	Glu	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Pro	Ala	Val	Asn
			755					760					765			
15	Ala	Trp	Gly	Ser	Trp	Lys	Asn	Phe	Lys	Thr	Cys	Tyr	Ser	Thr	Glu	Ser
		770					775					780				
20	Gln	Asn	Ser	Asp	Gln	Ile	Lys	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Thr	Gly
						790					795					800
25	Val	Gly	Ile	Pro	Val	Asp	Ala	Gln	Gly	Arg	Ile	Phe	Thr	Pro	Phe	Met
					805					810					815	
30	Gln	Ala	Asp	Ser	Ser	Thr	Ser	Arg	Thr	Tyr	Gly	Gly	Thr	Gly	Ile	Gly
			820						825					830		
35	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Arg	Leu	Val	Glu	Leu	Met	Gln	Gly	Glu	Met	Gly
			835					840					845			
40	Phe	Val	Ser	Glu	Pro	Gly	Ile	Gly	Ser	Thr	Phe	Ser	Phe	Thr	Gly	Val
		850					855					860				
45	Phe	Gly	Lys	Ala	Glu	Thr	Asn	Thr	Ser	Ile	Thr	Lys	Leu	Glu	Arg	Phe
		865				870					875					880
50	Asp	Leu	Ala	Ile	Gln	Glu	Phe	Thr	Gly	Leu	Arg	Ala	Leu	Val	Ile	Asp
					885					890					895	
55	Asn	Arg	Asn	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Thr	Arg	Tyr	Glu	Leu	Arg	Arg	Leu
			900						905					910		
60	Gly	Ile	Ser	Ala	Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Leu	Arg	Met	Ala	Cys	Thr	Cys
			915					920					925			
65	Cys	Ile	Ser	Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Ala	Met	Ile	Leu	Ile	Asp	Lys	Asp
		930					935					940				
70	Ala	Trp	Asn	Lys	Glu	Glu	Phe	Ser	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Phe	Thr	Arg
		945				950					955					960
75	Ser	Lys	Val	Thr	Phe	Thr	Arg	Val	Pro	Lys	Ile	Phe	Leu	Leu	Ala	Thr
					965					970					975	
80	Ser	Ala	Thr	Leu	Thr	Glu	Arg	Ser	Glu	Met	Lys	Ser	Thr	Gly	Leu	Ile
				980					985					990		
85	Asp	Glu	Val	Val	Ile	Lys	Pro	Leu	Arg	Met	Ser	Val	Leu	Ile	Cys	Cys
			995					1000						1005		

5 Leu Gln Glu Thr Leu Val Asn Gly Lys Lys Arg Gln Pro Asn Arg
1010 1015 1020

10 Gln Arg Arg Asn Leu Gly His Leu Leu Arg Glu Lys Gln Ile Leu
1025 1030 1035

15 Val Val Asp Asp Asn Leu Val Asn Arg Arg Val Ala Glu Gly Ala
1040 1045 1050

20 Leu Lys Lys Tyr Gly Ala Ile Val Thr Cys Val Glu Ser Gly Lys
1055 1060 1065

25 Ala Ala Leu Ala Met Leu Lys Pro Pro His Asn Phe Asp Ala Cys
1070 1075 1080

30 Phe Met Asp Leu Gln Met Pro Glu Met Asp Gly Phe Glu Ala Thr
1085 1090 1095

35 Arg Arg Val Arg Glu Leu Glu Arg Glu Ile Asn Lys Lys Ile Ala
1100 1105 1110

40 Ser Gly Glu Val Ser Ala Glu Met Phe Cys Lys Phe Ser Ser Trp
1115 1120 1125

45 His Val Pro Ile Leu Ala Met Thr Ala Asp Val Ile Gln Ala Thr
1130 1135 1140

50 His Glu Glu Cys Met Lys Cys Gly Met Asp Gly Tyr Val Ser Lys
1145 1150 1155

55 Pro Phe Glu Glu Glu Val Leu Tyr Thr Ala Val Ala Arg Phe Phe
1160 1165 1170

Glu Pro Cys
1175

<210> 2
<211> 1036
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

ES 2 385 451 T3

5	Met	Ser	Leu	Phe	His	Val	Leu	Gly	Phe	Gly	Val	Lys	Ile	Gly	His	Leu
	1				5					10					15	
10	Phe	Trp	Met	Leu	Cys	Cys	Trp	Phe	Val	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asn	Gly
				20					25					30		
15	Ile	Glu	Asp	Lys	Ser	Gly	Leu	Leu	Val	Gly	Ser	Val	Gly	Asp	Leu	Glu
			35				40						45			
	Lys	Thr	Lys	Met	Thr	Thr	Leu	Lys	Lys	Lys	Asn	Lys	Met	Trp	Phe	Trp

ES 2 385 451 T3

	50		55		60	
5	Asn 65	Lys	Ile	Ser Ser 70	Gly Leu Lys Ile 75	Pro Ser Phe Ser Tyr Gln 80
10	Phe	Leu Gly	Ser Val 85	Lys Phe Asn Lys 90	Ala Trp Trp Arg Lys Leu Val 95	
15	Val Val	Trp Val 100	Val Phe Trp Val 105	Leu Val Ser Ile Trp Thr Phe Trp 110		
20	Tyr Phe Ser 115	Ser Gln Ala Met 120	Glu Lys Arg Lys Glu Thr Leu Ala Ser 125			
25	Met Cys Asp Glu Arg Ala Arg Met Leu Gln Asp Gln Phe Asn Val Ser 130 135 140					
30	Met Asn His Val Gln Ala Met Ser Ile Leu Ile Ser Thr Phe His His 145 150 155 160					
35	Gly Lys Ile Pro Ser Ala Ile Asp Gln Arg Thr Phe Ser Glu Tyr Thr 165 170 175					
40	Asp Arg Ile Ser Phe Glu Arg Pro Leu Thr Ser Gly Val Ala Tyr Ala 180 185 190					
45	Met Arg Val Leu His Ser Glu Arg Glu Glu Phe Glu Arg Gln Gln Gly 195 200 205					
50	Trp Thr Ile Arg Lys Met Tyr Ser Leu Glu Gln Asn Pro Val His Lys 210 215 220					
55	Asp Asp Tyr Asp Leu Glu Ala Leu Glu Pro Ser Pro Val Gln Glu Glu 225 230 235 240					
60	Tyr Ala Pro Val Ile Phe Ala Gln Asp Thr Val Ser His Val Val Ser 245 250 255					
65	Leu Asp Met Leu Ser Gly Lys Glu Asp Arg Glu Asn Val Leu Arg Ala 260 265 270					
70	Arg Ser Ser Gly Lys Gly Val Leu Thr Ala Pro Phe Pro Leu Ile Lys 275 280 285					
75	Thr Asn Arg Leu Gly Val Ile Leu Thr Phe Ala Val Tyr Lys Arg Asp 290 295 300					
80	Leu Pro Ser Asn Ala Thr Pro Lys Glu Arg Ile Glu Ala Thr Asn Gly 305 310 315 320					
85	Tyr Leu Gly Gly Val Phe Asp Ile Glu Ser Leu Val Glu Asn Leu Leu					

ES 2 385 451 T3

	325	330	335
5	Gln Gln Leu Ala Ser Lys Gln Thr Ile Leu Val Asn Val Tyr Asp Ile		
	340	345	350
10	Thr Asn His Ser Gln Pro Ile Ser Met Tyr Gly Thr Asn Val Ser Ala		
	355	360	365
15	Asp Gly Leu Glu Arg Val Ser Pro Leu Ile Phe Gly Asp Pro Leu Arg		
	370	375	380
20	Lys His Glu Met Arg Cys Arg Phe Lys Gln Lys Pro Pro Trp Pro Val		
	385	390	400
25	Leu Ser Met Val Thr Ser Phe Gly Ile Leu Val Ile Ala Leu Leu Val		
	405	410	415
30	Ala His Ile Ile His Ala Thr Val Ser Arg Ile His Lys Val Glu Glu		
	420	425	430
35	Asp Cys Asp Lys Met Lys Gln Leu Lys Lys Lys Ala Glu Ala Ala Asp		
	435	440	445
40	Val Ala Lys Ser Gln Phe Leu Ala Thr Val Ser His Glu Ile Arg Thr		
	450	455	460
45	Pro Met Asn Gly Val Leu Gly Met Leu His Met Leu Met Asp Thr Glu		
	465	470	475
50	Leu Asp Val Thr Gln Gln Asp Tyr Val Arg Thr Ala Gln Ala Ser Gly		
	485	490	495
55	Lys Ala Leu Val Ser Leu Ile Asn Glu Val Leu Asp Gln Ala Lys Ile		
	500	505	510
60	Glu Ser Gly Lys Leu Glu Leu Glu Glu Val Arg Phe Asp Leu Arg Gly		
	515	520	525
65	Ile Leu Asp Asp Val Leu Ser Leu Phe Ser Ser Lys Ser Gln Gln Lys		
	530	535	540
70	Gly Val Glu Leu Ala Val Tyr Ile Ser Asp Arg Val Pro Asp Met Leu		
	545	550	555
75	Ile Gly Asp Pro Gly Arg Phe Arg Gln Ile Leu Thr Asn Leu Met Gly		
	565	570	575
80	Asn Ser Ile Lys Phe Thr Glu Lys Gly His Ile Phe Val Thr Val His		
	580	585	590
85	Leu Val Asp Glu Leu Phe Glu Ser Ile Asp Gly Glu Thr Ala Ser Ser		

ES 2 385 451 T3

	595		600		605
5	Pro	Glu 610	Ser Thr Leu Ser	Gly 615	Leu Pro Val Ala Asp Arg Gln Arg Ser
10	Trp	Glu Asn Phe Lys	Ala 630	Phe Ser Ser Asn	Gly His Arg Ser Phe Glu 635 640
15	Pro Ser Pro Pro	Asp 645	Ile Asn Leu Ile	Val 650	Ser Val Glu Asp Thr Gly 655
20	Val Gly Ile	Pro 660	Val Glu Ala Gln	Ser 665	Arg Ile Phe Thr Pro Phe Met 670
25	Gln Val	Gly 675	Pro Ser Ile Ser	Arg 680	Thr His Gly Gly Thr Gly Ile Gly 685
30	Leu Ser	Ile Ser Lys Cys	Leu 695	Val Gly Leu Met	Lys Gly Glu Ile Gly 700
35	Phe Ser Ser Thr Pro	Lys 710	Val Gly Ser Thr	Phe 715	Thr Phe Thr Ala Val 720
40	Phe Ser Asn Gly	Met 725	Gln Pro Ala Glu	Arg 730	Lys Asn Asp Asn Asn Gln 735
45	Pro Ile Phe	Ser 740	Glu Phe Arg Gly	Met 745	Lys Ala Val Val Val Asp His 750
50	Arg Pro	Ala 755	Arg Ala Lys Val	Ser 760	Trp Tyr His Phe Gln Arg Leu Gly 765
55	Ile Arg	Val Glu Val Val	Pro 775	Arg Val Glu Gln	Ala Leu His Tyr Leu 780
60	Lys Ile Gly Thr Thr	Thr 790	Val Asn Met Ile	Leu 795	Ile Glu Gln Glu Ile 800
65	Trp Asn Arg Glu	Ala 805	Asp Asp Phe Ile	Lys 810	Lys Leu Gln Lys Asp Pro 815
70	Leu Phe Leu	Ser 820	Pro Lys Leu Ile	Leu 825	Leu Ala Asn Ser Val Glu Ser 830
75	Ser Ile	Ser 835	Glu Ala Leu Cys	Thr 840	Gly Ile Asp Pro Pro Ile Val Ile 845
80	Val Lys	Pro 850	Leu Arg Ala Ser	Met 855	Leu Ala Ala Thr Leu Gln Arg Gly 860
85	Leu Gly Ile Gly Ile Arg Glu Pro Pro Gln His Lys Gly Pro Pro Ala				

5	865		870		875		880									
	Leu	Ile	Leu	Arg	Asn 885	Leu	Leu	Leu	Gly	Arg 890	Lys	Ile	Leu	Ile	Val 895	Asp
10	Asp	Asn	Asn	Val 900	Asn	Leu	Arg	Val	Ala 905	Ala	Gly	Ala	Leu	Lys 910	Lys	Tyr
15	Gly	Ala	Asp 915	Val	Val	Cys	Ala	Glu 920	Ser	Gly	Ile	Lys	Ala 925	Ile	Ser	Leu
20	Leu	Lys 930	Pro	Pro	His	Glu	Phe 935	Asp	Ala	Cys	Phe	Met 940	Asp	Ile	Gln	Met
25	Pro 945	Glu	Met	Asp	Gly	Phe 950	Glu	Ala	Thr	Arg	Arg 955	Ile	Arg	Asp	Met	Glu 960
	Glu	Glu	Met	Asn 965	Lys	Arg	Ile	Lys	Asn 970	Gly	Glu	Ala	Leu	Ile	Val 975	Glu
30	Asn	Gly	Asn 980	Lys	Thr	Ser	Trp	His	Leu 985	Pro	Val	Leu	Ala	Met 990	Thr	Ala
35	Asp	Val	Ile 995	Gln	Ala	Thr	His	Glu 1000	Glu	Cys	Leu	Lys	Cys 1005	Gly	Met	Asp
40	Gly	Tyr 1010	Val	Ser	Lys	Pro	Phe 1015	Glu	Ala	Glu	Gln	Leu 1020	Tyr	Arg	Glu	
	Val	Ser 1025	Arg	Phe	Phe	Asn	Ser 1030	Pro	Ser	Asp	Thr	Glu 1035	Ser			
45	<210> 3 <211> 4595 <212> ADN <213> Arabidopsis thaliana															
50	<400> 3															

ES 2 385 451 T3

5	atgtctataa cttgtgagct cttgaatctt acttcaaaga aagctaagaa gtcgtcgagc	60
	agtgacaaga aatggctaaa gaagcctctc ttcttcctga ttttgtgtgg ctctttggta	120
10	attgttttgg ttatgttctt acggttaggt agaagtcaga aggaggagac agattcttgt	180
	aatggagaag agaaagtgtt gtatagacat caaaatgtca caagaagtga gattcatgat	240
	ttggtctctt tgttctctga ttcagatcag gtaattgcat gaattgactt gtatttgttg	300
15	aaattgagct tttgaatacg caccagattt gccttaaagt gtaacagttt ctctgtattt	360
	gttgtaggta acatcctttg aatgtcataa ggaatcaagc cctggaatgt ggacaaacta	420
	tggtattaca tgttccttga gtgtgcgttc tgataaacia gagactagag ggcttccctg	480
20	gaatcttggc ttaggacatt ctatctcatc aacatcttgt atgtgtggta atcttgaacc	540
	ggtaagataa tattcgattc gacaacatgt gaaggaaatg ctttaagatt tgggtgttag	600

	ctagttctca caaaagttta ttgtgaatgt gtttggttat gagtagattt tacagcaacc	660
5	tgaaaacctt gaggaagaaa accatgaaga agggctggag cagggtttgt catcgtattt	720
	aagaaatgca tgggtggtgtc taatccttgg tgtgttagtg tgccataaga tttatgtatc	780
	tcatttctaaa gcacgaggtg agaggaaaga gaaagtacat ctgcaagagg ctttagctcc	840
10	aaagaagcag caacaacgtg ctacagacttc ttctagaggg gctggaagat ggaggaagaa	900
	tatccttctc cttggtattt taggaggagt ttccttctct gtttggtggt tttgggacac	960
	taatgaggag atcataatga aaaggaggga gactttggca aacatgtgtg acgaacgagc	1020
15	acgtgtttta caagatcagt tcaatgttag cttgaaccat gttcatgcct tgtctattct	1080
	tgtatctaca tttcatcatg gtaaaatccc atctgccatt gatcaggtga tgttttttct	1140
20	ttactgctaa atacattttg tgtctcaagt ttatgtttaa atcatcaact tctgttacat	1200
	ttacagagaa catttgaaga atatactgag agaacaaact ttgagaggcc acttactagt	1260
	ggtgtagcgt atgctttgaa agtcccacac tcagaaagag agaaatttga aaaggagcat	1320
25	ggatgggcaa taaagaaaat ggaaactgag gaccagacag ttgtacaaga ttgtgttcct	1380
	gaaaactttg atcccgacc gattcaagac gaatacgcgc cagttatatt tgctcaagaa	1440
30	actgtttccc atattgtatc ggtcgacatg atgtctggag aagtcagtaa cgtctaaaag	1500
	tttcttgaac tattttgcc aaccaatgtc cttaaaagag aattcaaaaag tctaactatt	1560
	ttgcaggaag accgtgaaaa catcttacgg gcaagggcat caggaaaagg agtgtaaca	1620
35	tctccattta agcttcttaa gtcaaatcat cttggtgttg tgttgacctt tgctgtctat	1680
	gacacgagcc taccgcctga tgctacagaa gaacagcgtg ttgaagcaac tattgggtac	1740
	tacttctact taaaatgatt ctaggactga agaaattgaa cctatgtaac aaagaatgat	1800
40	ctctggacca gaaaatatta ataagataca cttaaaaaca ggtaccttgg tgcatcatat	1860
	gatatgccat cgctggtgga gaaacttctt caccaacttg ccagcaaaca gacaattgct	1920
45	gtggatgttt acgacacaac taacacttca ggtctaataa aaatgtatgg ctacagaaatt	1980
	ggggatataa gtgagcagca tataagtagc cttgattttg gtgatccatc aaggaaccat	2040
	gagatgcatt gcagggttagt tagctctaac tgttatggta cttttttata agatatgttt	2100
50	cacttctctg ttttctgaag tatgaaagtg gcatttttca tttacagggt taagcataaa	2160
	cttcccatc cctggacagc gataacaccg tcgatcttag ttctggttat tacttttttt	2220
	gttggttata ttttatatga agccatcaac cgaattgcga cagttgaaga ggattgtcag	2280
55	aagatgaggg aactcaaagc tcgtgctgag gccgctgaca ttgcaaagtc acagggtgatc	2340
	tttgtgaatc atatagtctc aaaagcttta cttgtttttt cactgaaatg cttcttattt	2400
60	tgacgttcct agcaactgtt tctcatgaga tacggactcc gatgaatgga gttttaggta	2460
	ctttttctac ttatccttgg tcaatattgc atgttctctt aaaatcagct gaaacgttta	2520
	agcattttgt tacaggaatg ctgaaaatgc tgatggacac cgatcttgat gcgaagcaga	2580
65	tggactatgc gcaaactgct catggcagtg ggaaggatct tacatcacta ataaatgagg	2640

5	ttcttgatca ggcaaagatt gaatccggaa ggctcgagct tgaaaatgtg ctttttgata	2700
	tgcgttttat tcttgataat gtttcatctc tcctctctgg caaggcaa at gaaaaaggaa	2760
10	ttgaggata attataaact gcatgacctt ctactttctt aatgttttca tatggcaa ac	2820
	aaattccata tgtaatgaaa tgttgacttc ttgttacagt tggccgttta tgtttctagt	2880
	caagttcctg atgttgtagt cggatgatccg agtcgggtcc ggcagatcat tacaaacctg	2940
15	gttgaaaact caatcaaagt aattttactcc ttactttcta cagaacaaca ggcttcacga	3000
	atctctacta ttacagtact catttggtat ttacttaata acagttcaca caggaaaggg	3060
	gacacatatt tatctcagt gaccttgcag atgaggtaaa ggagcctctt actattgaag	3120
20	acgcagtgct aaaacagcga ctagctttag gatgcagcga gtccgggtgag acagttagcg	3180
	ggtttcctgc ggtaaatgca tggggaagct ggaagaattt caagacatgt tacagtactg	3240
	agagtcagaa ttctgatcaa atcaaattgc tagttacagt ggaggacact ggagttggca	3300
25	tacctgtgga tgcacaaggc cgaatcttca caccttttat gcaagccgac agttccacat	3360
	cgccggactta tgggtggaact ggcataagggt tgagtataag caaacgtttg gttgaactca	3420
	tgcaaggaga gatgggggtt gtgagtgagc ccgggatagg cagtactttt tcattttactg	3480
30	gagttttcgg gaaagcagaa acaaatacgt cgattactaa gctggaacga ttcgatctag	3540
	ctattcagga gtttacagga ttgagagcat tagttattga taacagaaac attagagcag	3600
	aggtcaccag gtacgaactt cggagactgg gaatatctgc agacattgtt tcaagtctga	3660
35	gaatggcatg cacttggtgt atcaggtact ttacgtacat tagtgtctgt ctgtcttttag	3720
	agattatagt gagttcacta aaagcgtttt attgttctgg aatctttgca gcaaattaga	3780
40	aaatttggtc atgattctaa tagacaaaga cgcttggaa aaggaagaat tttcagtact	3840
	tgacgagttg tttacccgaa gcaaagtaac ctttacaaga gtcccaaaga tttttctttt	3900
	ggcaacttct gcaactctta ctgagcgag tgagatgaag tctactggtc tcatcgatga	3960
45	ggtggtgata aagcctcttc ggatgagtggt cttaatatgt tgcttgcaag aaacccttgt	4020
	caatggcaag aagaggcaac cgaacagaca gcgaagaaat cttggacact tgctaagaga	4080
	aaaacagatt ctggttggtg atgataatct tgtgaacaga cgagttgcag aaggtgcact	4140
50	taagaaatat ggagctattg ttacatgcgt tgagagtggc aaagctgcat tggcaatgct	4200
	taagccgcct cataacttcg atgcttgctt catggatctc cagatgcctg aaatggatgg	4260
	gtagataact atttttcaat cttatctctt cagcttggtt atttcttgga tgtcgtcctt	4320
55	ggtaacttta taattttttg cgcagatttg aagcgacaag gagagtccgt gagctggaga	4380
	gggaaatcaa taagaaaata gcttctggag aagtttcagc tgaaatgttc tgtaaattta	4440
	gtagttggca cgtcccgaata tagcaatga cagcagatgt tattcaggct actcatgaag	4500
60	aatgcatgaa atgtggaatg gatggttatg tatcaaaacc gtttgaagag gaagtgtctt	4560
	acacagcggg agcaagattc tttgaacctt gttaa	4595

65
<210> 4

<211> 4248

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 4

5

10 atgagctctgt tccatgtgct agggtttggt gtcaagattg ggcattctctt ctggatgcta 60
 tgctgctggt ttgtttcttg gttcgttgat aatgggatcg aggacaagtc tggctcttta 120
 gttggctctg tcggtgatct tgagaagact aagatgacta cgttgaagaa gaagaacaag 180

15 atgtggttct ggaataagat ctctagcagc ggactcaaga tcccagagttt ctcttatcag 240
 tttcttggct ctgttaaatt caacaaggcg tggtaggagga agcttggtgt ggtttgggtt 300
 gtcttctggg tcttggcttc tatttggacg ttttggtagt ttagctcgca agctatggag 360

20 aagaggaaaag agacgctagc tagtatgtgt gatgagagag ctcgtatgct gcaggatcag 420
 ttcaacgtta gcatgaatca tgttcaagcc atgtctatct tgatctcaac cttccaccat 480

25 ggcaagattc cttctgctat cgatcaggta ttctcgattc cgcattctct tgtcttctaa 540
 tctgtttgga ttgatgcctg agatctagtc ttgctttagt tacataagtt gttcctacgg 600
 tgtagtatat gaacggctct tggatgatgg tagctttttt cattcaactt gctctcgaat 660

30 ttcagttagg atttacaatt ttgctgattg ttgcttacag tctttgtatt tagctaacac 720
 ttggtagctt gattcctatc ttcttgagta ttagtgaaca gtaactaaca ttaagaagct 780
 ttgtgtagag aacattctca gactacactg atagaatttc ctttgagagg cctcttacta 840

35 gcggggtagc ttatgctatg agggtagctc attcagagag ggaagagttc gagaggcaac 900
 aaggttggac tattaggaag atgtattctc ttgaacaaaa ccagttcac aaggatgact 960

40 atgacctgga agctttggaa ccatcccctg tccaagaaga gtacgctcca gtcattcttg 1020
 ctcaggacac tgtttctcac gttgtttctc tcgatatgct gtctgggaaa gtaagcttct 1080
 ttactgggtc taattttact gtttttatgt aatttactat catgggtctac actcactacc 1140

45 gggcgaatcc tgccgacatg gctagttcat atttcaatct cggcttaccg attagttgt 1200
 tttgatcatt ttatttaaag ttttagacac tgttttaact gatacttatt ctactcaat 1260

50 tcctcttgat aggaagatcg tgaacacgtt ttgctgggca ggagttcagg taaaggggtt 1320
 ttgacagctc ctttcccatt gataaagaca aatagacttg gggtagtcct gacatttgca 1380
 gtgtacaaga gagatctccc ctccaatgca acgcaaaaag agagaattga ggctactaac 1440

55 ggggtgtgtag catagggctc taaataaata ataacgcata agttttacaa cattattttt 1500
 gctcattcat ctcttttgat gcccctgaag gtatctcggg ggagtgtttg acattgagtc 1560
 cctggtagaa aacttgcttc aacagctggc tagcaagcaa acgattcttg tcaatgtgta 1620

60 cgatatcacc aatcactctc aaccgattag catgtatggt acaaagtgtg cggctgatgg 1680
 gttggaacgt gttagtccac taatctttgg cgatccattg agaaagcatg agatgcgttg 1740

65 caggtagctg cagttggcac atacatatgt ctgtaatttc ttcttggttg caagaatcca 1800
 ggtgctaaca ttttggtgtg agcttcttcc tctttgtaga ttttaagcaga aaccaccatg 1860

	gccagtgcta tcaatggtga catcattcgg tacccttggtg attgcgttac ttgttgacaca	1920
	tataatccac gcaaccgtta gtcgaataca caaagttgaa gaagattgtg ataaaatgaa	1980
5	gcagctcaag aaaaaggctg aagcagcaga tgttgcaaag tcacaggtaa atacatcatc	2040
	ctcagttgat aaatttccac agcatattaa actttctatg acagagagaa gagttgtaat	2100
	ctaacttttt tttatgcagt tccttgccac tgtttcacat gaaatcagaa ctccaatgaa	2160
10	tggtgttcta ggtgagtatc gaaatggcca ctatgttgcc tccttctctc acctatgccc	2220
	atgaatatatt tctgaagaac aaacttaacc aaatattctc atgttgactt tgatctgggg	2280
15	tgtaggaatg ttgcatatgc ttatggacac agagttagat gttacgcaac aggattatgt	2340
	taggaccgca caggcaagtg gaaaagcttt agtctcgcta ataaatgagg ttttggacca	2400
	agcaaagatt gaatctggaa agcttgaact tgaggaggtg cggtttgatt tgagaggaat	2460
20	attagatgat gtcctgtcac tcttctctag caagtcccaa caaaaggggg tggaggtaac	2520
	ttactatatg atctgcaaag caagggttgt aactgatagc aagtctttct tactgatttt	2580
25	ttgagtgttg ctgatgaacg cagttggcag tatacatatc tgatcgtgtt ccagatatgt	2640
	taattggtga tcctgggagg tttcgacaaa tactcacaaa tcttatgggt aattccatta	2700
	aggtaaactt ttttattatg ttttttctg accattcctt gcatccgagt tgatcaacgg	2760
30	agctgatcat ttatatatat tctggcagtt cactgagaaa ggacacatct ttgtaactgt	2820
	tcatttggtg gatgagctat ttgaatctat cgatggagag acagcatcat ctccggaaag	2880
	tacactgagt gggcttccag ttgcagaccg gcagaggagc tgggaaaact ttaaagcttt	2940
35	cagctccaac gggcatcggg gctttgaacc atctccccct gatataaacc taatcgtctc	3000
	agttgaggat actggcgtag ggatccctgt agaagcgcag tcccgtattt ttacgccttt	3060
40	catgcaagtc ggaccatcca tatccaggac gcatggaggc acaggaattg gacttagcat	3120
	aagcaaatgt ctagttggac tgatgaaggg agaaattgga ttctcgagta ctccaaggt	3180
	tgggtccaca ttcacattta ctgctgtatt ttccaatggg atgcaaccag ctgaaagaaa	3240
45	gaatgacaac aaccagccca tattctcgga attccggggc atgaaagctg tggttgtgga	3300
	ccataggcct gcaagggcaa aagtctcgtg gtaccatttt cagcgtcttg gaattcgagt	3360
50	cgaagtagtt ccacgtgttg aacaggctct acattatctg aagattggta ctaccactgt	3420
	gaatatgata ctcatagagc aagaaatatg gaatagggaa gcagatgatt tcattaaaaa	3480
	gctacagaaa gaccctcttt tcctttctcc taagttgatt ttgttagcaa actcagtaga	3540
55	atcgtcaata tcagaggctt tatgcaccgg tatagatcct ccaatagtga tagtgaaacc	3600
	attgagggcg agtatgctag cagcaacttt gcagagggga ttgggtattg gaatcagaga	3660
60	accacctcaa cacaagggac ctctgcttt gattctcagg aatcttctcc ttggtagaaa	3720
	aattttaatc gtggatgata acaacgtaaa cctcagagtg gcagcgggag ctctgaaaaa	3780
	gtacggagct gatgtggtct gcgctgagag tgggataaag gcaatctcat tgcttaagcc	3840
65	acctcacgag tttgatgctt gcttcatgga cattcagatg ccagaaatgg atgggtatgc	3900

ES 2 385 451 T3

5 ctgattggta tactagtttt ttgaaaagt tcgaaatatg taataagaaa attgaaatgt 3960
 ttttctgccc tgtctttctg cagatttgaa gctacaagga gaatacgaga tatggaagag 4020
 gagatgaaca agagaataaa gaatggggag gctttgatag tagagaacgg taacaaaaca 4080
 10 agctggcatc ttccggtatt agcaatgacg gcagatgtga tccaagcaac gcatgaggaa 4140
 tgtctgaagt gtggaatgga tgggtatgta tcaaaacat ttgaagcaga gcagctgtac 4200
 aggggaagttt ctgcgttttt caattcgctt tcagatacag aatcataa 4248
 15

<210> 5
 <211> 50
 <212> PRT
 20 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 5

25 Glu Ile Gly Asp Ile Ser Glu Gln His Ile Ser Ser Leu Asp Phe Gly
 1 5 10 15

30 Asp Pro Ser Arg Asn His Glu Met His Cys Arg Phe Lys His Lys Leu
 20 25 30

35 Pro Ile Pro Trp Thr Ala Ile Thr Pro Ser Ile Leu Val Leu Val Ile
 35 40 45

40 Thr Phe
 50

45 <210> 6
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 6

50 Ser Phe Glu Arg Pro Leu Thr Ser Gly Val Ala Tyr Ala Met Arg Val
 1 5 10 15

55 Leu His Ser Glu Arg Glu Glu Phe Glu Arg Gln Gln Gly Trp Thr Ile
 20 25 30

60 Arg Lys Met Tyr Ser Leu Glu Gln Asn Pro Val His Lys Asp Asp Tyr
 35 40 45

Asp Leu
 50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ácido nucleico aislado, que comprende una secuencia de ácido nucleico codificando una variante constitutivamente activa del receptor de citoquinina AHK2 con:
 - 10 i) una secuencia de aminoácido con la SEQ ID No.1 o un ortólogo de la misma;
 - ii) una secuencia de aminoácido que tiene al menos un 48%, preferiblemente al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 55% de identidad sobre la longitud de la secuencia completa de la SEQ ID No. 1; o
 - 15 iii) una secuencia de aminoácido que tiene al menos un 50%, preferiblemente al menos un 53%, más preferiblemente un 55% de identidad sobre un segmento de secuencia de aminoácido 50 de SEQ ID No. 1 teniendo la SEQ ID No. 5;
- en donde la secuencia de aminoácido tiene la fenilalanina del aminoácido (F) en una posición correspondiente a la posición 552 de la SEQ ID No.1.
- 20 2. Un ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, comprendiendo además al menos una secuencia promotora, en donde la al menos una secuencia promotora y la secuencia del ácido nucleico codificante están enlazadas funcionalmente entre sí.
- 25 3. Un casete de expresión transgénica para la expresión de los ácidos nucleicos que comprende un ácido nucleico aislado de una de las reivindicaciones 1 a 2.
4. Un vector que comprende un ácido nucleico aislado de una de las reivindicaciones 1 a 2 o un casete de expresión transgénica de la reivindicación 3.
- 30 5. Un organismo transgénico transformado o transfectado transitoriamente o establemente con un ácido nucleico aislado de las reivindicaciones 1 a 2, un casete de expresión de la reivindicación 3 o un vector de la reivindicación 4 o progenie de dicho organismo transgénico.
- 35 6. Un organismo transgénico de la reivindicación 5, en donde el organismo es una planta o un microorganismo.
7. Un organismo transgénico de la reivindicación 6, en donde el organismo es una planta seleccionada de la familia *Brassicaceae*, preferiblemente de los géneros *Brassica* o *Arabidopsis*.
- 40 8. Una célula, cultivo celular, parte, órgano, tejido o material de propagación transgénico que comprende un ácido nucleico aislado de las reivindicaciones 1 a 2, un casete de expresión transgénica de la reivindicación 3 o un vector de la reivindicación 4.
9. El uso de un ácido nucleico aislado de las reivindicaciones 1 a 2, un casete de expresión transgénica de la reivindicación 3 o un vector de la reivindicación 4 para la fabricación de una planta transgénica.
- 45 10. El método para la fabricación de una planta transgénica, comprendiendo los siguientes pasos:
 - 50 a) introducir en una o más células vegetales un ácido nucleico aislado de las reivindicaciones 1 a 2, un casete de expresión transgénica de la reivindicación 3 o un vector de la reivindicación 4 para producir células transgénicas;
 - b) la selección de células transgénicas que comprende dicho ácido nucleico aislado, casete de expresión o vector integrado establemente en el genoma; y
 - c) la regeneración de las plantas intactas de dichas células transgénicas o células derivadas de las mismas.
- 55 11. Un polipéptido aislado codificado por un ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
12. Un polipéptido aislado que comprende al menos la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No.1.
- 60 13. Un método para mejorar el crecimiento de brotes vegetales, que comprende:
 - i) introducir en una planta un ácido nucleico aislado de las reivindicaciones 1 a 2; y
 - ii) expresar el ácido nucleico introducido de las reivindicaciones 1 a 2.

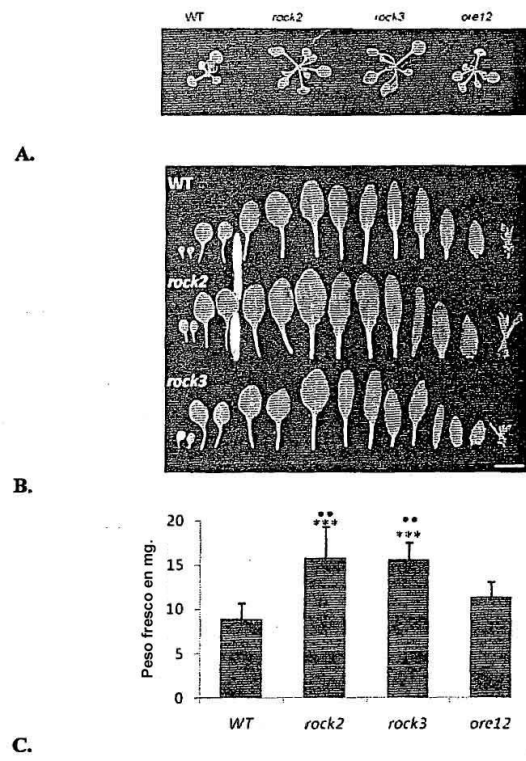


FIG. 1

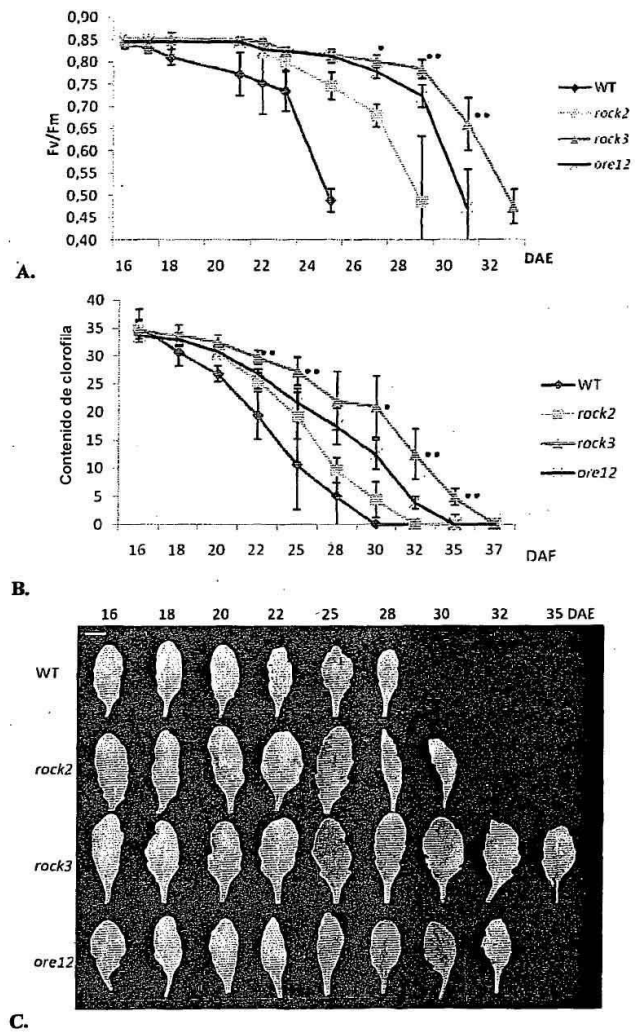


FIG. 2

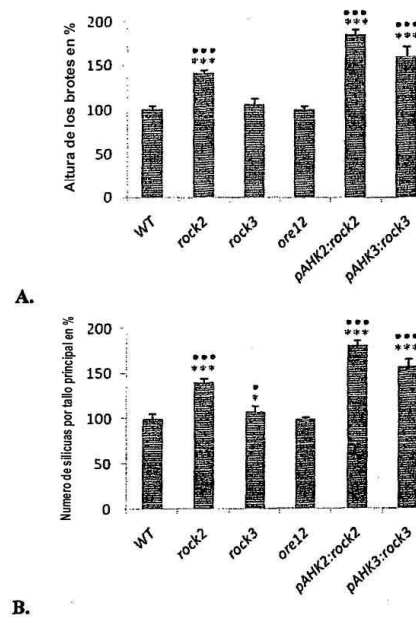


FIG. 3

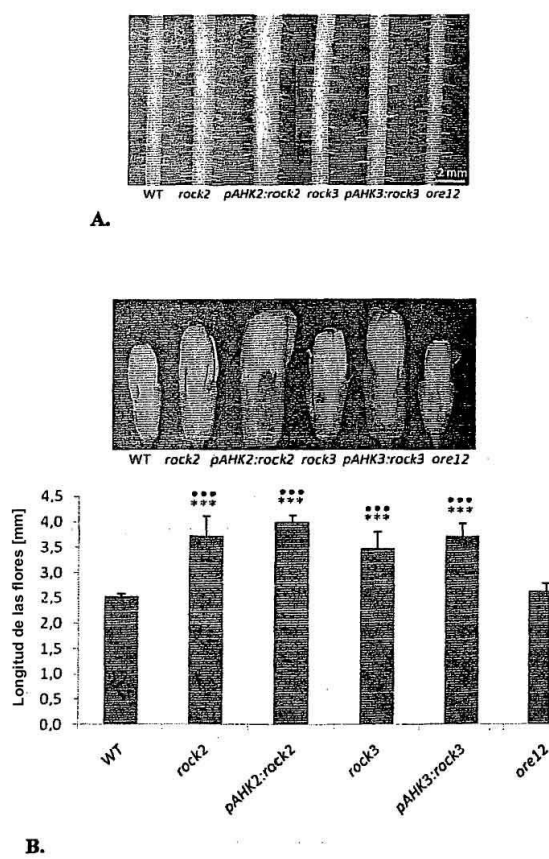


FIG. 4

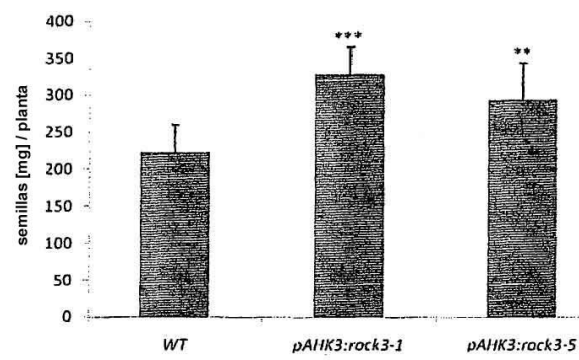


FIG. 5