

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 489**

51 Int. Cl.:
C12N 15/54 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05707054 .2**
96 Fecha de presentación: **14.01.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1704237**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.09.2006**

54 Título: **CCaMK quinasas implicadas en la nodulación y la endomicorrización**

30 Prioridad:
15.01.2004 EP 04290107

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:
**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA)
147, RUE DE L'UNIVERSITE
75007 PARIS CEDEX 07, FR**

72 Inventor/es:
**DEBELLE, Frédéric;
LEVY, Julien;
BRES, Cécile y
ROSENBERG, Charles**

74 Agente/Representante:
Aznárez Urbieto, Pablo

ES 2 385 489 T3

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

DESCRIPCIÓN

CCAMK quinasas implicadas en la nodulación y la endomicorrización

La invención se refiere a polipéptidos y polinucleótidos que están implicados en la nodulación y la micorrización en plantas.

- 5 Una amplia variedad de plantas terrestres son capaces de asociarse, a través de su sistema radicular, con simbiontes microbianos.

10 Los más conocidos de estos sistemas endosimbióticos son aquellos que se producen entre las bacterias del suelo denominadas colectivamente como rizobia y las raíces de muchas especies de legumbres (familia *Leguminosae*). La simbiosis legumbre-rizobia fija tanto el nitrógeno existente como el procedente de la industria de los abonos químicos, gracias a la capacidad de las bacterias rizobia de inducir la morfogénesis de nuevos órganos en la planta, nódulos en la raíz de las legumbres, con el que fijan nitrógeno.

15 Otro tipo importante de relaciones simbióticas entre plantas y microorganismos es la simbiosis de micorrizas arbusculares (MA), que se da no sólo en las legumbres, sino también en la mayoría de las plantas terrestres (una excepción notable es la familia *Brassicaceae*, que incluye la *Arabidopsis thaliana*), e implica hongos del orden *Glomales* (GIANINAZZI-PEARSON, *Plant Cell*, vol. 8, pág. 1871, 1996; HARRISON, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 50, pág. 361, 1999; BRUNDRETT, *New phytologist*, vol. 154, pág. 275, 2002).

Aunque a primera vista pueda parecer que la simbiosis legumbre-rizobia y la simbiosis MA no tienen mucho en común, tanto las parejas fúngicas como las bacterianas tienen una capacidad sumamente restringida para desencadenar un programa genético en una planta hospedadora que permita una infección controlada y localizada.

- 20 Los estudios sobre la simbiosis legumbre-rizobia han llevado a identificar la estructura e importancia de las señales rizobianas, los factores Nod lipo-quito-oligosacáridos, que inician respuestas simbióticas en las raíces de las legumbres hospedadoras y son necesarias para el reconocimiento, la infección controlada y la formación de nódulos (DÉNARIÉ, y col., *Annu Rev Biochem*, vol. 65, pág. 503, 1996; LEROUGE y col., *Nature*, vol. 344, pág. 781, 1990; GEURTS and BISSELING, *Plant Cell*, vol. 14, Suppl, S239, 2002). A concentraciones pico-nano molares, estas moléculas inducen diversas respuestas, incluyendo la afluencia rápida y el pulso del calcio, inducción génica específica, alteraciones en la morfología celular epidérmica y mitosis celular cortical (GEURTS and BISSELING, 2002, arriba mencionado).

25 Estudios genéticos en modelos de legumbre *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus* han llevado a identificar genes implicados en la percepción y transducción de los factores Nod. Recientemente se han clonado genes que codifican para dos tipos de serina/treonina-quinasas de tipo receptor transmembrana con regiones putativas extracelulares que contienen dominios LysM (LysM-RLKs), necesarias para las respuestas relativas a los factores Nod y a la infección rizobiana (RADUTOIU y col., *Nature*, vol. 425, pág. 585, 2003; LIMPENS y col., *Science*, vol. 302, pág. 630, 2003; MADSEN y col., *Nature*, vol. 425, pág. 637, 2003). Existe la hipótesis de que los productos génicos forman receptores de factor Nod heterodiméricos (RADUTOIU y col., 2003, arriba mencionado).

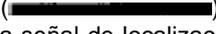
35 Aguas abajo estos genes, se han mapeado tres genes en *M. truncatula*, *DMI1*, *DMI2* y *DMI3*, necesarios tanto para la nodulación como para la formación de micorrizas arbusculares (simbiosis MA). Los mutantes en *DMI1*, *DMI2* y *DMI3* están bloqueados para la mayoría de las respuestas a factores Nod: tienen un fenotipo similar y no inducen ramificación del pelo radicular (sino que, en su lugar, provocan hinchamiento del pelo), ni expresión génica de nodulina temprana, ni división celular cortical (CATOIRA y col., *Plant Cell*, vol. 12, pág. 1647, 2000). Sin embargo, se diferencian en su capacidad para responder a los factores Nod mediante la inducción de oscilaciones rápidas de la concentración de calcio citoplasmático (pulso de calcio), que se pierde en los mutantes *dmi1* y *dmi2*, pero no en *dmi3* (EHRHARDT y col., *Cell*, vol. 85, pág. 673, 1996; WAIS y col., *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 97, pág. 13407, 2000). Además, los mutantes en los genes *DMI1* y *DMI2* (= *NORK*), que son incapaces de formar nódulos y micorrizas (CATOIRA y col., 2000, arriba mencionado), son defectivos para la mayoría de las respuestas a factores Nod, incluyendo la respuesta del pulso del calcio, pero aún son capaces de generar la respuesta de afluencia rápida del calcio (EHRHARDT y col., 1996, arriba mencionado; SHAW and LONG, *Plant Physiol*, vol. 131, pág. 976, 2003).

Recientemente se ha demostrado que *DMI2* codifica una proteína quinasa de tipo receptor LRR (*NORK*; ENDRE y col., *Nature*, vol. 417, pág. 962, 2002).

50 Los inventores han aislado y caracterizado ahora el gen *DMI3* de *M. truncatula* y han descubierto que codifica un miembro de la pequeña familia vegetal de proteína quinasas dependientes de Ca^{2+} -calmodulina quiméricas. También han identificado el gen *DMI3* ortólogo en el guisante.

55 En diversas plantas se han descrito miembros del grupo CCaMK, que van desde el musgo *Physcomitrella* hasta plantas superiores, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. *DMI3* es muy similar a las CCaMK del arroz, el tabaco y el lirio (73,5% de identidad entre CCaMK de lirio y *Medicago*). Todas estas proteínas comparten con las proteína quinasas vegetales dependientes del calcio (CDPK) más comunes un dominio quinasa N-terminal. Sin embargo, se diferencian de las CDPK en la estructura de su dominio regulador de unión de calcio C-terminal, que es más similar a un dominio de tipo visinina de mamífero (con tres manos EF de unión al Ca) que al dominio de tipo calmodulina típico de las CDPK

(con cuatro manos EF). Entre el dominio quinasa y el dominio de unión de calcio se halla un dominio de unión de calmodulina que está solapado a un dominio autorregulador. Esta estructura permite regular la actividad de la quinasa tanto mediante el calcio como mediante la calmodulina (SATHYANARAYANAN y col., J Biol Chem, vol. 276, pág. 32940, 2001; TAKEZAWA y col., J Biol Chem, vol. 271, pág. 8126, 1996).

- 5 La Figura 1 muestra la comparación de CCaMK de *M. truncatula* (MtCCaMK) y *P. sativum* (PsCCaMK), caracterizadas por los inventores con respecto a CCaMK previamente caracterizadas de lirio (LICCaMK: U24188), arroz (OsCCaMK: AK070533), tabaco (NtCCaMK: AF087813) y *Physcomitrella* (PpCCaMK: AY155462). Sobre las secuencias se indica el dominio de serina/treonina quinasa () , el sitio de unión de calmodulina () , los motivos de mano EF de unión de calcio () y el sitio de autofosforilación (*) de las CCaMK. Bajo las secuencias se indica la firma del sitio activo de quinasa () . Entre las posiciones 60 y 75 de la secuencia de CCaMK de *M. truncatula* puede detectarse una señal de localización nuclear bipartita putativa, pero ésta no está presente en la secuencia de *P. sativum*.

- 15 Se sabe poco del papel biológico de las CCaMK en las plantas. El hecho de que las CCaMK del lirio, el tabaco y el arroz se expresen de manera preferente en puntas de raíces y anteras en desarrollo (POOVAIAH y col., Planta, vol. 209, pág. 161, 1999; WANG and POOVAIAH, J Biol Chem, vol. 274, pág. 12001, 1999) ha llevado a sugerir que podrían desempeñar un papel en la mitosis y la meiosis (YANG and POOVAIAH, Trends Plant Sci, vol. 8, pág. 505, 2003).

- 20 Los inventores demuestran aquí por primera vez, mediante el uso de mutantes de *DMI3*, que una CCaMK desempeña un papel en la vía de señalización que conduce a la endomicorrización y en el proceso de desarrollo de la nodulación en las legumbres. *DMI3* parece actuar inmediatamente aguas abajo del pulso del calcio y aguas arriba de todas las demás respuestas simbióticas. Sin ceñirse a ningún mecanismo en particular, puede plantearse la hipótesis de que el pulso del calcio, y no la afluencia rápida de calcio, es la firma del calcio reconocida por *DMI3*, cuyo papel sería traducir esta señal a diversos componentes celulares que controlan las respuestas de nodulación y micorrización.

- 25 Los descubrimientos de la presente invención permiten suponer que las CCaMK previamente conocidas de las plantas no leguminosas, cuya función era desconocida hasta ahora, también desempeñan un papel en la endomicorrización en dichas plantas y, por tanto, que la modulación de la expresión o actividad de dichas CCaMK puede permitir regular la endomicorrización.

La presente invención proporciona medios para regular las respuestas de nodulación y/o endomicorrización de las plantas con respecto a simbiontes microbianos.

- 30 Así, La invención proporciona un método para regular la nodulación y/o endomicorrización en una planta, comprendiendo dicho método la modulación de la expresión o actividad de una CCaMK en dicha planta.

Según una realización preferente de la invención, dicha CCaMK tiene como mínimo un 80% de identidad o como mínimo un 90% de semejanza, preferentemente como mínimo un 85% de identidad o como mínimo un 90% de semejanza, en especial como mínimo un 90% de identidad o como mínimo un 95% de semejanza y en particular como mínimo un 95% de identidad o como mínimo un 99% de semejanza, con el polipéptido de SEQ ID n°: 2.

- 35 A no ser que se especifique de otra manera, los valores de identidad o semejanza de secuencia aquí proporcionados están calculados utilizando los programas BLAST (ALTSCHUL y col., Nucleic Acids Res., vol. 25, pág. 3389, 1997) con los parámetros por defecto y secuencia de referencia de longitud completa como ventana comparativa.

Según la invención, la expresión de una CCaMK en una planta puede aumentarse o disminuirse con el fin de modular la nodulación y/o endomicorrización.

- 40 La expresión de una CCaMK en una planta puede aumentarse, por ejemplo, expresando en dicha planta un constructo de ADN que produzca dicho polipéptido o alterando el promotor endógeno del gen de *CCaMK* para una sobre-regulación positiva de la expresión génica; a la inversa, puede lograrse una disminución de la expresión de una CCaMK por ejemplo expresando en dicha planta un polinucleótido que induzca el silenciamiento de un gen de *CCaMK*, por ejemplo mediante una cosupresión o inhibición antisentido. También es posible utilizar ribozimas dirigidas a ARNm de CCaMK o alterar el promotor de *CCaMK* para una sub-regulación de la expresión génica.

- 45 La actividad de la CCaMK en una planta puede aumentarse, por ejemplo, expresando una CCaMK mutante desprovista del dominio autoinhibidor situado alrededor del dominio de unión de calmodulina, como el mutante dado a conocer por RAMACHANDIRAN y col. (J. Biochem. (Tokio), 121, 984-90, 1997). A la inversa, la actividad de la CCaMK en una planta puede disminuirse, por ejemplo, expresando una CCaMK que tenga una mutación que afecte a la función del dominio quinasa.

Preferentemente dicha CCaMK se selecciona de entre la CCaMK de *Medicago truncatula* de SEQ ID n°: 2 y la CCaMK de *Pisum sativum* de SEQ ID n°: 4.

SEQ ID n°: 1 es una secuencia de ADN genómico que codifica la CCaMK de *Medicago truncatula* de SEQ ID n°: 2; y SEQ ID n°: 3 es una secuencia de ADN genómico que codifica la CCaMK de *Pisum sativum* de SEQ ID n°: 4.

Otros polinucleótidos que codifican una CCaMK pueden obtenerse por métodos bien conocidos en la técnica actual, tales como el "screening" de librerías genómicas o de ADNc de cualesquiera especies de plantas leguminosas capaces de formar nódulos radiculares con rizobia, utilizando cebadores y/o sondas de ácido nucleico obtenidos de SEQ ID n°: 1, 3 o cebadores o sondas degenerados obtenidos de SEQ ID n°: 2 ó 4.

- 5 A modo de ejemplo, tales polinucleótidos pueden obtenerse de librerías genómicas o de ADNc de *Papilionoideae*, en particular pertenecientes a cualquiera de los géneros *Pisum*, *Glycine*, *Phaseolus* o *Medicago*.

Un polinucleótido que codifique una CCaMK puede insertarse en un casete de expresión bajo el control de secuencias reguladoras que dirijan la transcripción y traducción del polinucleótido en una célula huésped deseada.

- 10 En general, dichas secuencias reguladoras comprenden como mínimo un promotor que impulsa la expresión en la célula hospedadora. Generalmente comprenden también un sitio de inicio de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma, una señal de procesamiento de ARN, un sitio de terminación de la transcripción y/o una señal de poliadenilación.

Todas o parte de dichas secuencias reguladoras pueden derivarse del gen de CCaMK natural o consistir en secuencias reguladoras heterólogas.

- 15 A modo de ejemplo, puede utilizarse el promotor endógeno del gen de CCaMK eventualmente alterado con el fin de realizar una sobre-regulación o una sub-regulación de la expresión génica; también puede sustituirse el promotor de CCaMK endógeno por un promotor heterólogo que proporcione un mayor o menor nivel de expresión y/o un perfil de expresión diferente (es decir un promotor que confiera una expresión inducible o constitutiva, regulada en cuanto al medio ambiente o el desarrollo o específica/selectiva de células o tejidos).

- 20 En la técnica actual existe una amplia gama de promotores adecuados para la expresión en diversos hospedadores.

En particular, entre los promotores capaces de dirigir la transcripción en células vegetales, se incluye una gran variedad de promotores, los cuales pueden obtenerse, por ejemplo, de plantas, virus de plantas o bacterias tales *Agrobacterium*. Incluyen promotores constitutivos, es decir promotores que son activos en la mayoría de los tejidos y células y bajo la mayoría de las condiciones medioambientales, promotores específicos de tejidos o células que son activos sólo o principalmente en ciertos tejidos o ciertos tipos de células y promotores inducibles que se activan mediante estímulos físicos o químicos.

- 25 Ejemplos no limitativos de promotores utilizados comúnmente en células vegetales son el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S, el promotor Nos, el promotor rubisco. Puede utilizarse ventajosamente un promotor específico de la raíz o preferido por la raíz.

- 30 Entre los ejemplos no limitativos de promotores específicos de raíz o preferidos por la raíz se incluyen el promotor de la alotioneína del maíz (de FRAMOND y col., FEBS 290, 103-106, 1991); EP 452269), el promotor de la quitinasa ácida descrito por SAMAC y col., (Plant Physiol. 93, 907-914, 1990), el promotor de la glutamino-sintetasa específico de la raíz de soja descrito por HIRE y col. (Plant Mol. Biol. 20, 207-218, 1992) o los promotores específicos de la raíz descritos en el documento WO/9113992 o en el documento US 5.837.848.

- 35 El casete de expresión puede insertarse en un vector hospedador mediante técnicas convencionales o de ingeniería genética. El vector hospedador puede ser cualquier vector adecuado para la transfección de una célula hospedadora deseada. A modo de ejemplo no limitativo, pueden derivarse vectores adecuados para la transfección de células vegetales y/o para el establecimiento de plantas transgénicas del plásmido inductor tumoral (Ti) de *Agrobacterium tumefaciens*.

- 40 Estos vectores pueden comprender también uno o varios genes marcadores que confieran un fenotipo seleccionable en las células hospedadoras. Ejemplos de genes marcadores son genes indicadores, tales como aquellos que codifican para beta-glucuronidasa (GUS), para proteína verde fluorescente (GFP), para luciferasa. Otros ejemplos de genes marcadores son genes de resistencia a antibióticos, tales como de resistencia a la kanamicina, G418, bleomicina, higromicina, o genes de resistencia a herbicidas, tales como de resistencia a Basta.

- 45 La introducción de un polinucleótido que codifique una CCaMK en células o tejidos hospedadores puede llevarse a cabo por medios bien conocidos en la técnica actual, por ejemplo por transfección, microinyección, electroporación, transducción, introducción balística o similares. En caso de las células vegetales, también puede utilizarse la transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes* o ventajosamente por *Agrobacterium tumefaciens*.

- 50 Las células, tejidos u órganos transformados pueden utilizarse para regenerar plantas transgénicas. En la técnica actual son bien conocidos numerosos métodos de transformación celular y regeneración vegetal para diversas especies de plantas.

La invención proporciona también medios para evaluar las características de nodulación y/o endomicorrización de una planta, en particular de una legumbre.

En particular, la invención proporciona:

- un método para identificar un alelo de un gen de *CCaMK* asociado a determinadas características de nodulación y/o endomicorrización, comprendiendo dicho método el aislamiento de un fragmento de ácido nucleico que comprende el gen de *CCaMK* o una parte del mismo, a partir de como mínimo una planta que expresa dicho fenotipo, y la secuenciación de dicho fragmento.

5 La invención proporciona además:

- un método para identificar un polimorfismo en el gen de *CCaMK* asociado a un fenotipo de nodulación y/o endomicorrización, comprendiendo dicho método la identificación, según se describe más arriba, de como mínimo dos alelos diferentes de *CCaMK* asociados a diferentes fenotipos de nodulación y/o endomicorrización y la comparación de las secuencias de dichos alelos.

10 Una vez identificado un polimorfismo pueden diseñarse reactivos y kits que permitan la detección rutinaria de dicho polimorfismo. Los reactivos comúnmente utilizados son sondas de ácido nucleico o enzimas de restricción o cebadores de PCR o combinaciones de los mismos. La selección de un reactivo o de una combinación de reactivos depende de la naturaleza del polimorfismo.

15 Los kits y reactivos preferentes son los que comprendan un conjunto de cebadores que permitan una amplificación por PCR específica de un segmento de ADN que se extiende sobre el locus polimórfico. Para microsatélites y polimorfismos de inserción/delección pueden ser suficientes los cebadores de PCR, dado que las formas alélicas del polimorfismo pueden diferenciarse por el tamaño del producto de amplificación. En el caso de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), generalmente se utilizará también una enzima de restricción que permita diferenciar las formas alélicas por la presencia o el tamaño de los fragmentos de restricción.

20 La invención proporciona también un método para ensayar una planta en cuanto a sus características de nodulación y/o endomicorrización, comprendiendo dicho método la detección de si un alelo de un gen de *CCaMK* asociado a determinadas características de nodulación y/o endomicorrización está presente en dicha planta.

25 Según una realización preferente del método de la invención, dichas características de nodulación y/o endomicorrización son la falta de nodulación y/o endomicorrización, o una nodulación y/o endomicorrización reducida y que el alelo del gen de *CCaMK* asociado a dicho fenotipo no exprese ninguna *CCaMK*, o exprese un nivel menor de *CCaMK*, o una *CCaMK* menos activa que el alelo de tipo salvaje, o una *CCaMK* inactiva.

Ejemplos de alelos que dan como resultado dicho fenotipo son:

- alelos que presentan un delección de todo o parte del gen de *CCaMK*, o que son variantes de corte y empalme del gen de *CCaMK*, y tienen como resultado la expresión de una *CCaMK* truncada;
- 30 – alelos que presentan una mutación que tiene como resultado la expresión de una variante menos activa o inactiva de *CCaMK*;
- alelos que presentan una mutación en el promotor de *CCaMK* que tiene como resultado una menor expresión de *CCaMK*.

35 En la Tabla 1 siguiente se citan a modo de ejemplo algunos alelos de *CCaMK* de *Medicago truncatula* y *Pisum sativum* que los inventores han descubierto están asociados a dicho fenotipo:

Tabla 1

Campo genético	Mutación
<i>Medicago truncatula</i>	delección de 14 pb: 198-203/parada
	CGA/TGA: R97/parada
<i>Pisum sativum</i>	CAA/TAA: Q230/parada
	CAA/TAA: Q230/parada
	CAA/TAA: Q230/parada
	TGG/TGA: W240/parada
	TGT/TGA: S224/parada
	CTT/C-T: L188/parada
	GGG/AGG: G202/R
TCT/TTT: S24/F	

Todas estas mutaciones se hallan en el dominio quinasa.

A continuación se explica la presente invención en detalle mediante la descripción adicional siguiente, que se refiere a ejemplos de obtención y uso de polinucleótidos que codifican una CCaMK de la invención. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos se ofrecen sólo a modo ilustrativo de la invención y no constituyen en modo alguno una limitación a la misma.

Ejemplo 1: Clonación y caracterización de DMI3 de *M. TRUNCATULA*

Se amplificó el gen *DMI3* a partir de ADN genómico de *M. truncatula* de tipo salvaje Jemalong A17 (CATOIRA y col., 2000, arriba mencionado) y dos mutantes de *dmi3*, TRV25 (SAGAN y col., en Biological nitrogen fixation for the 21st century Elmerich, Kondorosi, Newton, Ed, Kluwer Academic Publishers, pág. 317-318, 1998) y T1-5, ambos defectivos para la nodulación. El mutante T1-5 se obtuvo de una población de semillas mutagenizadas con EMS derivadas de Jemalong A17 *ENOD11-GUS* (JOURNET y col., Mol Plant Microbe Interact, vol. 14, pág. 737, 2001), mediante screening de las plántulas en cuanto a la falta de actividad GUS en las raíces después del tratamiento con factores Nod.

En la tabla II siguiente se muestran los cebadores PCR utilizados para la amplificación:

Tabla II

Secuencia	Cebador	Pos. en SEQ ID 1:
GGCCAAATGTTGAACAGTGA	cand1A (SEQ ID nº: 5)	2819-2839
GGGTTTTGATTGCTACTTGTGA	cand1B (SEQ ID nº: 6)	3288-3315
TCACCATGGGATATGGAACA	cand2A (SEQ ID nº: 7)	3166-3185
CCACAGTTGCAGCTTCAGTC	cand2B (SEQ ID nº: 8)	3605-3624
CTTTGTTCCGGTGGTGAAC	cand3A (SEQ ID nº: 9)	3549-3568
TGGACATGTTGAGTTTGACGA	cand3B (SEQ ID nº: 10)	4050-4070
TCGTGGTTTTAACAAAACCTCCA	cand4A (SEQ ID nº: 11)	3990-4011
ATTTTGGGCAATGAAAGGTG	cand4B (SEQ ID nº: 12)	4473-4491
TTTCGTAAACTCAACGTATCCAA	cand5A (SEQ ID nº: 13)	4387-4410
CATTTGAAGATAATGTCATGAAAAA	cand5B (SEQ ID nº: 14)	4908-4932
TGACTTAAAGGACCAATTTATAACAA	cand6A (SEQ ID nº: 15)	4819-4844
TCGACATTTTTGCCAGTTGA	cand6B (SEQ ID nº: 16)	5383-5399
AAATTTACAAGGAACCAAACA	cand7A (SEQ ID nº: 17)	5285-5306
GAAGCAAAAGGGATCAATGATAA	cand7B (SEQ ID nº: 18)	5828-5850
TGTGCAGATAGAGACAATGCAA	cand8A (SEQ ID nº: 19)	5765-5786
CAAGTTATGAGGCCCAATG	cand8B (SEQ ID nº: 20)	6203-6222
CAACATTGGGGCCTCATAAC	cand9A (SEQ ID nº: 21)	6200-6219
CAATCATATGGCAAAGCCTGT	cand9B (SEQ ID nº: 22)	6765-6785
ATCCATGCTCAGGGTAATGC	cand10A (SEQ ID nº:23)	6674-6693
ACGACGATCACACTCACAGG	cand10B (SEQ ID nº:24)	7204-7223

Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando la polimerasa Taq (IN VITROGEN) según las instrucciones del fabricante (MgCl₂ 2,5 mmol/l). Programa PCR: *1 ciclo (94° durante 5 min) * 30 ciclos (94° durante 15 s, 55° durante 15 s, 72° durante 1 min); * 1 ciclo (72° durante 7 min).

La secuencia genómica del *DMI3* de tipo salvaje está representada en la lista de secuencias adjunta como SEQ ID nº: 1.

El gen *DMI3* comprende 7 exones. El marco de lectura abierto de longitud completa de 1.569 nucleótidos codifica para una proteína de 523 aminoácidos con una masa molecular prevista de 58.600 Da.

La posición de los intrones y exones en la secuencia SEQ ID nº: 1 es la siguiente:

exón: 3171-3901

exón2: 4467-4521

exón3: 4600-4710

5 exón4: 5000-5232

exón5: 5764-5971

exón6: 6627-6686

exón7: 6769-6942

10 Un análisis de la secuencia polipeptídica deducida indicaba que DMI3 pertenece al grupo de las proteína-quinasa dependientes del calcio y la calmodulina de las serina-treonina proteína-quinasa, junto con proteínas codificadas por genes previamente caracterizados de tabaco, lirio, arroz y musgo *Physcomitrella* (Figura 1).

15 Al igual que estas proteínas, DMI3 comparte con las proteína quinasa vegetales dependientes del calcio (CDPK) más comunes un dominio quinasa N-terminal. Sin embargo, se diferencia de las CDPK en la estructura de su dominio regulador de unión del calcio C-terminal, que es más similar a un dominio de tipo visinina de mamífero (con tres manos EF de unión de calcio) que al dominio de tipo calmodulina típico de las CDPK (con cuatro manos EF). Entre el dominio quinasa y el dominio de unión del calcio se halla un dominio de unión de calmodulina que está solapado a un dominio autorregulador. Esta estructura permite la regulación de la actividad de la quinasa tanto mediante el calcio como mediante la calmodulina.

20 En la Figura 2 se muestra esquemáticamente la estructura intrón-exón del gen *DMI3* y la posición de los motivos y dominios de proteína previstos.

Se indican el dominio quinasa () , el dominio de unión de calmodulina (CaMB) () y las manos EF de unión de calcio ().

Ejemplo 2: Complementación funcional de una mutación de *DMI3* mediante el clon de *cCaMK* de tipo salvaje.

25 Se transformaron raíces de plántulas del mutante TRV25 de *dmi3*, defectivo para la nodulación (SAGAN y col., 1998, arriba mencionado), con *Agrobacterium rhizogenes* cepa Arqual, que incluye el plásmido pF5 que lleva el gen *DMI3* de tipo salvaje.

30 Se clonó en pCAMBIA2201 (www.cambia.org) un fragmento *Xba*I de 11 kb, que llevaba la secuencia codificadora de *DMI3* de tipo salvaje, 1.040 pb aguas arriba con respecto al codón de iniciación. El plásmido recombinante pF5 resultante se introdujo en *A. rhizogenes* Arqual mediante electroporación (MCCORMAC y col., Molecular Biotechnology, vol. 9, pág. 155, 1998). Se realizó una transformación de raíz en cabellera del mutante TRV25 de *dmi3* como ya se ha descrito (BOISSON-DERNIER y col., Mol Plant Microbe Interact, vol. 14, pág. 695, 2001), con las siguientes modificaciones. En primer lugar se seleccionaron raíces transgénicas en un medio agar de Fahraeus complementado con canamicina (20 mg 1⁻¹), luego se transfirieron las plántulas transformadas a bolsas y se inocularon con el simbionte rizobiano *Sinorhizobium meliloti* GMI6526 = RCR2011 (pXLGD4), que lleva un gen indicador *lacZ* para facilitar la visualización en planta de las bacterias.

35 40 Dos semanas después de la inoculación se puntuaron los nódulos. Los experimentos se realizaron dos veces. El 90% de las plantas presentaba raíces transformadas según se detectó por la actividad GUS. En total se ensayaron 45 plantas transformadas mediante pF5, 36 de éstas formaron nódulos con una media de 5 nódulos por planta. Un tratamiento con X-Gal y un examen microscópico de una muestra representativa de nódulos reveló la presencia de bacterias dentro de los nódulos. En las 26 plantas de control transformadas mediante el vector pCAMBIA2201 no se detectó ningún nódulo.

Esta complementación, junto con la evidencia genética descrita en el Ejemplo 1, demuestra que el *DMI3* codifica una CCaMK necesaria para el fenotipo de nodulación y micorrización.

Ejemplo 3: Patrón de expresión de ARNm de *DMI3* en *M. truncatula*

45 Se midieron los niveles de ARNm de *DMI3* mediante una RT-PCR cuantitativa en hojas, tallos, flores, raíces, raíces 48 h tras la inoculación con *S. meliloti*, y nódulos de raíz de *M. truncatula*, y se normalizaron contra *AtACTIN2* (*MtACT2*), que se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos ensayados.

50 Se extrajo ARN total y se trató con ADNasal. Se sintetizó ADNc a partir de 1 µg de ARN total utilizando el kit Taqman Gold RT-PCR (Perkin-Elmer Applied Biosystems) en un volumen total de 50 µl. Se realizaron reacciones RT-PCR cuantitativas por triplicado en 6,5 µl de ADNc utilizando el kit SYBR-GreenR PCR Master (Perkin-Elmer Applied

Biosystems) (40 ciclos de 95°C durante 10 s, 58°C durante 1 min) y se realizó una detección en tiempo real en el ABI 7700 y un análisis utilizando el software GeneAmp 5700 SDS (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

Cebadores utilizados:

DMI3-1: TCATTGATCCCTTTTGCTTCTCGT (SEQ ID n°: 25),

5 DMI3-2: GATGCTACTTCCTCTTTGCTGATGC (SEQ ID n°: 26),

MtACT2: TGGCATCACTCAGTACCTTTCAACAG (SEQ ID n°: 27),

MtACT2-2: ACCCAAAGCATCAAATAATAAGTCAACC (SEQ ID n°: 28).

10 Los resultados se muestran en la Figura 3. En las raíces se observó una expresión de *DMI3* 10 veces mayor que en las flores, mientras que en las hojas y en los tallos no se detectó ninguna expresión significativa. Además, 48 h tras la inoculación se observó una ligera sobre-regulación de la expresión radicular de *DMI3* tanto en las raíces como en los nódulos de las raíces, en respuesta a la pareja simbiote *S. meliloti*.

15 En paralelo se estudió el gen *DMI2* (=NORK), otro gen de *M. truncatula* necesario para la nodulación y la micorrización, cuya mutación tiene como resultado un fenotipo simbiótico similar al del mutante TRV25 de *dmi3*, aparte del enriquecimiento de calcio. Su patrón de expresión era similar al de *DMI3*, aunque el nivel de expresión era mayor en *DMI2* (datos no mostrados).

Ejemplo 4: Clonación y aislamiento de un homólogo de DMI3 en el guisante

20 Ya se han descrito en el guisante mutantes con fenotipos y posiciones de mapa sinténicas similares a las de TRV25. Como en los mutantes de *dmi3*, los mutantes de guisante en el locus *sym9* están alterados inmediatamente aguas abajo con respecto a la respuesta de enriquecimiento del calcio inducida por tratamiento de los pelos radiculares con factores Nod y son defectivos para el rizado de los pelos radiculares, la formación de hebras de infección, la nodulación y la endomicorrización.

Se realizó una amplificación por PCR a partir de ADN genómico de tipo salvaje y mutantes *sym9* de *P. sativum*. Las plantas se muestran en la Tabla III siguiente:

Tabla III

Variedad		Referencia
Frisson	Tipo salvaje	(DUC and MESSEAGER, Plant Science, vol. 60, pág. 207, 1989)
P1	Mutante <i>sym9</i> EMS de Frisson	(DUC and MESSEAGER, 1989, arriba mencionado)
P2	Mutante <i>sym9</i> EMS de Frisson	(DUC and MESSEAGER, 1989, arriba mencionado)
P3	Mutante <i>sym9</i> EMS de Frisson	(DUC and MESSEAGER, 1989, arriba mencionado)
P53	Mutante <i>sym9</i> EMS de Frisson	(SAGAN y col., Plant Science, vol. 100, pág. 59, 1994)

25

En la Tabla IV siguiente se indican los cebadores utilizados, diseñados en base a la secuencia de *DMI3* de *M. truncatula*:

Tabla IV

Secuencia	Cebador	Posición en SEQ ID 1
GGTGGCGAACTTTTCGATAG	pscand1 (SEQ ID nº:29)	705-724
ACCTGAAAAACAATCAAAGCAA	pscand2 (SEQ ID nº: 30)	1199-1220
GCAGTTGACTCTCTCTTTGTCC	pscand3 (SEQ ID nº: 31)	1-14
TCTGTGCTATTTTCACCACCA	pscand4 (SEQ ID nº: 32)	506-526
AACGAGAGAGGACTACAATAGACGA	pscand6 (SEQ ID nº: 33)	1104-1128
TCAAAATCACAGCTGGAACC	pscand7 (SEQ ID nº: 34)	1928-1947
GGAAGAGGTGGATTTTCTGTTG	pscand8 (SEQ ID nº: 35)	348-369
TCAGGCTTCAAATCCCTATGA	pscand9 (SEQ ID nº: 36)	821-841
AAAATTGAAATCCTTGTTGGA	pscand10 (SEQ ID nº: 37)	1696-1717
AACACAAACGGAGAGCATCC	pscand11 (SEQ ID nº: 38)	2161-2180
AGAAAATCGTGAGGCGGATT	pscand12 (SEQ ID nº: 39)	1887-1906
TTGGTGATGCATCCTGATCT	pscand13 (SEQ ID nº: 40)	2282-2305
TTGTGGCTTTTCGAGTCTCA	pscand14 (SEQ ID nº: 41)	2125-2144
GCAGCTTTGAATTCATCAAATGTA	pscand15 (SEQ ID nº: 42)	2511-2534
TGGACGAATAGAAGAGAGAACTACA	pscand16 (SEQ ID nº: 43)	2562-

Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando la polimerasa Taq (IN VITROGEN) según las instrucciones del fabricante (MgCl₂ 2,5 mmol/l). Programa de PCR: *1 ciclo (94° durante 5 min); * 30 ciclos (94° durante 15 s, 55° durante 15 s, 72° durante 1 min) * 1 ciclo (72° durante 7 min).

5 La secuencia genómica obtenida de *P. sativum* cv Frisson de tipo salvaje está representada en la lista de secuencias adjunta como SEQ ID nº: 3.

El gen comprende 7 exones. Codifica una CcMK con una gran semejanza global (90% de identidad) con la de *M. truncatula*.

La posición de los intrones y exones en la secuencia SEQ ID nº: 2 es la siguiente:

- exón1: 294-1048
- 10 exón2: 1219-1273
- exón3: 1349-1459
- exón4: 1541-1773
- exón5: 1978-2192
- exón6: 2284-2330
- 15 exón7: 2416-parada

5 Todas las CCaMK secuenciadas de ocho mutantes *sym9* de *P. sativum*, obtenidas en tres contextos genéticos diferentes presentaron alteraciones de un solo par de bases en el dominio quinasa, que según lo previsto alterarían la función de la CCaMK. Esto confirma adicionalmente el papel de la CCaMK en la nodulación y la micorrización. Además, permite la caracterización molecular de un gen principal que controla tanto la nodulación como la micorrización en el guisante, un importante cultivo de granos de leguminosa.

Para la amplificación por PCR de ADN genómico de *P. sativum* *SYM9* en las diferentes variedades de tipo salvaje cultivadas y mutantes *sym9* se utilizaron diversas combinaciones de los cebadores siguientes, diseñados en base a la secuencia de *DMI3* de *M. truncatula*.

LISTA DE SECUENCIAS

- 10 <110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE DEBELLE, Frédéric LEVY, Julien; BRES, Cécile; ROSENBERG, Charles
- <120> CCaMK que interviene en la nodulación y la endomicorrización
- <130> MJPbv539/122
- <150> EP04290107.4
- 15 <151> 2004/01/15
- <160> 43
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 11200
- 20 <212> ADN
- <213> Medicago truncatula
- <220>
- <221> exón
- <222> (3171)..(3901)
- 25 <223>
- <220>
- <221> exón
- <222> (4467) .. (4521)
- <223>
- 30 <220>
- <221> exón
- <222> (4600)..(4710)
- <223>
- <220>
- 35 <221> exón
- <222> (5000) .. (5232)
- <223>
- <220>
- <221> exón
- 40 <222> (5764) .. (5971)

ES 2 385 489 T3

<223>

<220>

<221> exón

<222> (6627)..(6686)

5 <223>

<220>

<221> exón

<222> (6769)..(6942)

<223>

10 <400> 1

```

ggcacagccg ttacacatgg ggtcgggtgt ttcaatggag attccgtttg cagatagtca      60
tatggcattg gatacgcaga tgcctggaag aaaaaggagc actccggagg atatggtgga      120
gaagactggt gagagaaggc agaaaaggat gatcaagaat cgggaatctg ctgcccgttc      180
aagagcacgg aaacaggtga tctctctctt tctttatttc aagtgttgta actcgcaagt      240
ccttattatt tgattggttt ttgttgtaat gaatacccta aacctgaata ataactttaa      300
caagcaggct tacacaaatg aattggagat taaagtttca cgcctggaag aggaaaatga      360
aatgctgagg aaacgaaagg ttgattctt ctttgaaatt ataagtttaa ttgatttgac      420
tgagtatggt tttataatga tcttaattcc tttcattccc cagattgagt agtttgta      480
tttgtggatt ataatttcag cataagatag gagacagtct cagtttcaat tactatacaa      540
atctctgcat ttttttgat taatgaaact ctgcatatta tgttctctag ttgagacctg      600
agcatgtgtc atttgcattt gttaaatttg aattaaagag gaatcgggcc attgatcaga      660
agcaagtctt gtaacgtaga ataaacattg ttaaatcatt acaccatcag cattgccgtc      720
ttgatgttat ttatttgat gtatctctct tatggcctct gctctatctt ttacatagtc      780
attaagaatt gttcaggaaa ataaatcaca tgagacacat ttaattttgt gattgacaaa      840
cacaaatgaa catgtagtt ctgatgcaac ttttggatta ttctgctctg aatataccac      900
aatgaatctc actaagggga tttaaatfff tccattcata caaaaacctt accgtgtgac      960

```

ES 2 385 489 T3

atgtttccca cttagagcac agagttgcac ctttgaaata aaaattactg ctttcattaa 1020
 ttgagtttca tatcaggaac tatatgcctt gaatttccac tgcttcgtta agtcagtttt 1080
 ttttatattg ggtgatttgg aatttgattt atcggctcaa cagtctttgc tctttttcat 1140
 tcaattagca gtgcttgtgg aagatcttgg atcgtacaac catacatgct ataataaaaa 1200
 ctatatctat atgcacattg tatccatggt catttttacc tgttaaaatc atgggaacaa 1260
 aattgctctt ttatacatgc taacttactc ctttgccttg tatatactat cagattatat 1320
 tattaatfff tgtcctcaac atgcaggagc tagagaatat gttgccttgt gcaccgattg 1380
 ctgaacctaa atatcagcta cgccgaatag catcctgtcc attctgagat ctttgtacct 1440
 ataagtagag gtttgtagat atgaaaatca gggaaatgtt tcttgtagtt caatgtttgg 1500
 ctgacacctg ccttttgttt tctctggaat actctgttaa gttcttaagt aattatagct 1560
 aatgtttagt ttttattatt cattacatag ccattttaat tattggttaa tttcatcttg 1620
 gtctattggc gatagaataa tagtcgggtc ttgccaatff cgttgtcatg agaaaatagg 1680
 accactttta gcagagagtt gtatttcaca cccctgtttt tctaagacat ttccctaacg 1740
 agttctttca aaatttgccc aaaatttccct gtatggaagt accttctggg gaatatattc 1800
 ccattttctta cttattatac cttctgaaag tgtgctttca gagtatttat aactttcaga 1860
 caattctagt gcatactctt tatacatttt ggaggttgat tgtgtggatg caatggagta 1920
 tttgaagaaa ttagtacatt aatcatttga tagagttttc tgatacatga ttgcattttg 1980
 cccctttgct agttgcttgg tatacactct aaactctagc agtcccttaa ccttcacgat 2040
 ggcccctata atgagtagta taagtgcaa tgtataatgg gcatatcctc tgatggcatc 2100
 ttccaccatt tgttgatcaa agtctagatg tgtgccattc acgatggccc ctatttgaat 2160
 tttatcttta tttttattgc agaagaaaac acattgttat atatttacca aaaatattta 2220
 tttaatagta aaaaatttac gaaaaccaag aaccagtctt tgtgatggca atttctttta 2280
 ttttatggaa tagcaaatcc atatcttgat gcgcacgcgc gtattataaa caataataat 2340
 actcttttta tttttcaaaa aaaatttttt tttagagcaa acaataataa tactttacaa 2400
 tttctttttc cttaaaaaag caataatact ttacaaaaaa aaaaaaaaaa aacctcttg 2460
 ttttccgcta aaaaaataac actttttacg agaacaaaac tatatgtaat ttcttctcta 2520
 agaaaaacta tatatggttt ttctcctaaa aaaactatat ataatatctg taatagaaaa 2580
 agctatatat ttcaaagaaa atcaaacaaa tatactctgt ggaatggaat gatgaattaa 2640
 ggggttgttt gacaataatc gagtcaccta aaaattattt tttttatata caaagagaaa 2700
 ggaaaaaaaa aacttatcat gatatgcatt ttgttaaaaa taaaaacca aattcagttt 2760
 tcttagtggtt actcttttgt tttatacttt agccagaaac acatttctaa tttcaatttg 2820
 gccaaatggt gaacagtgaa agttagaata caaatgtagc agttgactct ctctttgtcc 2880
 attctaaaac agctcttacc agcctactta atattccctt gtacctatct taatttaatt 2940
 cataatttat ttcataaaca aatacaataa ctcttatcct tcaaaaaata aaaatacaat 3000
 aactcttata ttattatatt tatatgctaa tgtcaatttc aaccatttca ataacgcggt 3060
 ttatatgctc tcattattga acatattata taccatcttg ttctttttct atagttcctt 3120
 gtctttgcac attttctaag tcttcaaaaa tattccattt tttcatcacc atg gga 3176

Met Gly

ES 2 385 489 T3

1

tat gga aca aga aaa ctc tca gat gaa tat gaa gtt tca gaa att cta	3224
Tyr Gly Thr Arg Lys Leu Ser Asp Glu Tyr Glu Val Ser Glu Ile Leu	
5 10 15	
ggt aga ggt gga ttt tct gtt gtt aga aaa ggt aca aaa aaa tca agc	3272
Gly Arg Gly Gly Phe Ser Val Val Arg Lys Gly Thr Lys Lys Ser Ser	
20 25 30	
att gaa gaa gaa aaa tca caa tca caa gta gca atc aaa acc cta aga	3320
Ile Glu Glu Glu Lys Ser Gln Ser Gln Val Ala Ile Lys Thr Leu Arg	
35 40 45 50	
agg tta ggt gct tca aat aac cct agt gga tta cca aga aaa aaa gat	3368
Arg Leu Gly Ala Ser Asn Asn Pro Ser Gly Leu Pro Arg Lys Lys Asp	
55 60 65	
att gga gaa aaa agc aca ata ggg ttc cct aca atg aga caa gtt tca	3416
Ile Gly Glu Lys Ser Thr Ile Gly Phe Pro Thr Met Arg Gln Val Ser	
70 75 80	
gtt tca gat aca tta cta aca aat gag ata ctt gta atg aga cga ata	3464
Val Ser Asp Thr Leu Leu Thr Asn Glu Ile Leu Val Met Arg Arg Ile	
85 90 95	
gtc gaa aac gtt tcg cca cat cca aat gtg att gat ctt tat gat gta	3512
Val Glu Asn Val Ser Pro His Pro Asn Val Ile Asp Leu Tyr Asp Val	
100 105 110	
tat gag gac aca aat ggt gtt cat ctt gtt ctt gag ctt tgt tcc ggt	3560
Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Val His Leu Val Leu Glu Leu Cys Ser Gly	
115 120 125 130	
ggt gaa ctt ttc gat agg att gtt gca caa gat aag tat agt gag act	3608
Gly Glu Leu Phe Asp Arg Ile Val Ala Gln Asp Lys Tyr Ser Glu Thr	
135 140 145	
gaa gct gca act gtg gtt cat caa ata gct tca ggg tta gaa gct gtt	3656
Glu Ala Ala Thr Val Val His Gln Ile Ala Ser Gly Leu Glu Ala Val	
150 155 160	
cat aga gct aat ata gtt cat aga gat ttg aaa cct gaa aat tgt ctt	3704
His Arg Ala Asn Ile Val His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Cys Leu	
165 170 175	
ttt tta gat gtt agg aaa gat tct cct ctt aag att atg gat ttt ggg	3752
Phe Leu Asp Val Arg Lys Asp Ser Pro Leu Lys Ile Met Asp Phe Gly	
180 185 190	
ttg agt tct gtt gaa gag ttt act gat cct gtt gtt ggt ttg ttt gga	3800

ES 2 385 489 T3

Leu Ser Ser Val Glu Glu Phe Thr Asp Pro Val Val Gly Leu Phe Gly
 195 200 205 210
 tct att gat tat gtt tca cct gag gct ctt tct caa gga aag att act 3848
 Ser Ile Asp Tyr Val Ser Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Lys Ile Thr
 215 220 225
 act aag agt gat atg tgg tct ctt ggg gtt att cta tat atc tta ctt 3896
 Thr Lys Ser Asp Met Trp Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Ile Leu Leu
 230 235 240
 tca gg gtagtgtttt acttttcttt ctttcttata tttaaattgt attaggtttt 3951
 Ser Gly

 atgttttgat tctagcgatg atgagtttgt atgtatcatc gtggttttaa caaaactcca 4011
 ctttagatct tctacaaaat tacggtgcta ctgtgatttc gtcaaactca acatgtccaa 4071
 acatgtacta gtagtatggt tagttttaaa ttggaattt acaaactaa cctacaagaa 4131
 atagcgccga ttgggaaca cggtagctca catctcaccg cgtggtagct cgtctctcca 4191
 aattaatagt gcgtttggtt ttatgtttgg aatttccaac ccaaactac aagaaatagt 4251
 gtctgtttgg aaacatgtag cttacctctc acagcgaggt agctcattac ttcaagatga 4311
 acttctctoga agtgacatca taaaaaaga aaccacaaca aacacatgct taagcttttg 4371
 ttagatacct tgtgatttcg ttaaactcaa cgtatccaaa catatactag tggtatgttt 4431
 agttttaaaa ttattttcat ataattgtta tgcag g tat cca cct ttc att gcc 4485
 Tyr Pro Pro Phe Ile Ala
 245 250
 caa aat aat cgc caa aaa caa caa atg ata atg aat gtaagtacca 4531
 Gln Asn Asn Arg Gln Lys Gln Gln Met Ile Met Asn
 255 260
 tctcttacag aatatagaag ttctttccac aattactttg cttactaaaa caaaatggtt 4591
 tggaacag ggg aat ttt agt ttt tat gag aag act tgg aag gga att tca 4641
 Gly Asn Phe Ser Phe Tyr Glu Lys Thr Trp Lys Gly Ile Ser
 265 270 275
 caa cca gca aag aat ttg att tca agt ctt tta acc gtt gat cct agc 4689
 Gln Pro Ala Lys Asn Leu Ile Ser Ser Leu Leu Thr Val Asp Pro Ser
 280 285 290
 aag aga cct agt gct ctt gag gtattgtaca ctactactat cttgaacata 4740
 Lys Arg Pro Ser Ala Leu Glu
 295
 ccaacttaac attaaatgct cacataaata ttttttaatc gagtttgatg aaattagaat 4800
 aatgatgtag atattttatg acttaaagga ccaatttata acaaaaaaaaa cttaaagac 4860
 taacttgcta taatacaact taagaatcgt agatgatatt tgacctatit ttcacatgat 4920

ES 2 385 489 T3

425	430	435	
gag gat gct ctt cgt ttg tgc ttc cag gtgaattata ctcaacaccc			5991
Glu Asp Ala Leu Arg Leu Cys Phe Gln			
440	445		
aaacaaatat taagttttac aaatatgaat atgtgaagca aatggattca aattatagat			6051
atgttgagat tgaaatttat gttgtagta tcagactaga tagttcgact agtttaaact			6111
aaatgttaag gagtttagac attgaattta aacaacacta acgaaatagt aaatattaac			6171
ctaaaattat gtatttaact tagttgatca acattggggc ctcataactt gttagacctg			6231
tacattcaaa ccttagactt agtacaacat gatttatttt atttttctaa gtcttgataa			6291
aacgttcact atatatttag gcttaatttt tttgtcaag ttttacttac cttcaagctg			6351
aattacggat tattaaagtc tcgttcacct aagaatcgaa gagttaacac caaaataaaa			6411
taaaaattac ttttgacctt taaatatggt ggactgaatc aataaattag ttttttttta			6471
gaggtgaac caataaatta gtcttttttt taaggaataa attaatgtct ctaaagaat			6531
agcttaaaaa ttaatggtat gaacatacac tctataacta gttttcaaca tgtaaccac			6591
atgtgcctct ttatttttat tttggtggca aatag atg tat gat aca gat aga			6644
Met Tyr Asp Thr Asp Arg			
450			
tca ggc tgc atc agc aaa gag gaa gta gca tcc atg ctc agg			6686
Ser Gly Cys Ile Ser Lys Glu Glu Val Ala Ser Met Leu Arg			
455	460	465	
gtaatgcaca cacatctcaa ttaattagct tcatcttttc actttcatta tattaacaca			6746
cattataca ttaattaaac ag gct ttg cca tat gat tgt ctt cca act gat			6798
Ala Leu Pro Tyr Asp Cys Leu Pro Thr Asp			
470			
475			
atc act gaa cct gga aaa ttg gat gag att ttt gac tta atg gat gct			6846
Ile Thr Glu Pro Gly Lys Leu Asp Glu Ile Phe Asp Leu Met Asp Ala			
480	485	490	
aat aat gat gga aaa gtt aca ttt gat gaa ttc aaa gct gct atg caa			6894
Asn Asn Asp Gly Lys Val Thr Phe Asp Glu Phe Lys Ala Ala Met Gln			
495	500	505	
aga gat agc tct ctt caa gat gta gtt ctc tct tct att cgt cca taa			6942
Arg Asp Ser Ser Leu Gln Asp Val Val Leu Ser Ser Ile Arg Pro			
510	515	520	
tagtttatg ttcattgatg tatggtattt taatacttga gtacttttat gctcctttga			7002
ggactttttt atgaagtttt cgtagtaaaa catagtgttc aggcccgacc ctgatatttt			7062
tggtgccctt atcgagtaaa ataatacatat cattcaacaa cttatcgagt attccaccat			7122
caatgtgaag tggttggtcaa ttcaacaact ctcgtgaatc gtttgctgtc tcttctaggg			7182
tttcaactgtt cgccgtctac ccctgtgagt gtgatcgctg tttggttagg ttctcataat			7242

ES 2 385 489 T3

ttgtatgttt tggatcttgc ctaatctatg tatcatgtat gattatggtg atcaagtatg 7302
 catgcgtagt tggtaattgg attagatttc aattgatggg tcttacatta gatttggtgc 7362
 atagataata gtttttttat ctctcccaca aaaatcctca agcgtgtctc tatttcaagc 7422
 tactcgatct ggttatatgt gttggtatga tctggattcc atggacgggt tcaagaccg 7482
 gcgagcccgg gtagtcgccc aagctctggc ccaaattttt tgcaatttct tttgtaaatc 7542
 tccttgaatt tcttatataa acccctataa attgggtaat ttctctatct agtattttat 7602
 tatttgcttg caatttttta tataaacccc tataaatgtg ttgaattttt tttttgccaa 7662
 ggctttataa taatcctgga tccgcatact atttatcatc ccctagtaga gagtcgaatt 7722
 aagcttggca tatggttacc atgtgttctt atcaaacatt agtctataaa aaatagtatt 7782
 ataagttgga attaccaagg cttaggaaac ctgagtgtat agcttcaaaa ttgaaataca 7842
 tagtccgtta ctataagcca aatgctttat ttctaaatga actttagtcc actccaataa 7902
 aactgaagaa ttacgttggt tgcttgattt tgatagttgt ttagcaatta gcagtcttcg 7962
 tctaaatggt ggcttagcgc tatcttgagg caactctttt aattgtattg tgttaaatta 8022
 tatgcaaatc atattaatgt agaagttcat gatcctcgac aaggtaaag acaattcaca 8082
 agtttttaca acttcttgga agagggagaa ggtgtgcctc atgggatttc ttgcataata 8142
 tgtcaciaag tatttcgctc ccatggtgta ttatgggtga ctttattgat atcatgggtg 8202
 tccgtgagaa acgggggtggc tatgaacggt ctatgtgggt gataagcggg ttcaggcaac 8262
 catggctcag tagtggatcc ctcccatcta actagccttt ggaaacgaat gacgcatctg 8322
 atgatacaag aagacaagta gtggagacag cgcactaaga aacattggta tagagacgat 8382
 gatcttaata caaaattttt acatgcctct gccacttctc ggaaaaaggt aatccgcatt 8442
 ttttccttag aaaacaacgt tgggtgagggg atttcatatg ataatgggtat gtgtcagggt 8502
 gcaaaggggt attttgaaga attgttttta ggaagaaaaa tagcattaga gcttcggttg 8562
 ttggtgctat tttagaggta gttatagatg aggatagcaa tttccttact actccttttc 8622
 atacacaaga gttcaaggaa cccttgtttt ccatgcaccg gacaagtgtc caggaccgaa 8682
 tggtttcaat tatgtttttt tttttaaaca tttttgtct gttttagacc ctgatacatt 8742
 tcataaatgt tacacatggt tgagtaataa ccaaatccct tcctctctaa actttgataa 8802
 cattgccttg attcctcggg ggaatgaaca taagacaatg aaggattggc gaccaattgc 8862
 attgtgtata ttctttataa attacatgta aaagttcttg ctaaccgact taagcatata 8922
 ttacacaaat gcatctgtga caataagtca ccttttgttt gagagtcttt ttgtaacaat 8982
 ttttgttttt tctcatttga ttttaactata ctcttttttc tagttctttt ggcacttctg 9042
 gtgctataac ttcatgtgtg ttttaataata tttcatttta ccttcttcaa aaataaatat 9102
 tttaaaaaat atatataaat tgtttttttt aattattttc ctgaaaacga gaattttacg 9162
 tgtaacaaat ttttaattact gaaaagataa aaatattttg atttctaatt aaattgaaat 9222
 aaaaaaaaaa atcaattttg aatgttatct aaatatgaat catacacaat tgattcttca 9282
 tgattcggat gtattaaata tgactaattg agtcatgcat tttttgagtc atacatgttt 9342
 ctcgttaaaa acacatctaa ccagtggcgg agccacgtat tggtcagctg gtgcagctgc 9402
 atccctcaa agtttttaaat ttagaccaat atttcttatt ttattcattt tgaacctcct 9462
 caaattataa ctttgacca gcttaaatct tgtcactgca caatggtaat aataatagtg 9522

ES 2 385 489 T3

acgtatatgc agctaataat aatagggtcaa aacaacgtag ccattgggct ggaccctact 9582
aatgtagtg atatatgcag ctcataataa taggccaata tatatgttac acttaatact 9642
tgaaaaaaaa ctatgggaca ctcaaaaatt taatttgtat caatatattc ggtcttttaa 9702
ttaatagtta aatgcggtat attttaaaaa aaattacaat aactaaattt attatccaaa 9762
gtatcgacga aataaaattt attgattggt ttattacgat aaaatataaa aaatttgata 9822
tgattcttat aaacaatgag atgatatttt tttttcttat gaaatgacat tttataaaat 9882
accaatttga aaaataactc tttatttcat aaaaataatt ggttatttta aaaaacacgt 9942
gtaccgggtac acttaaaatg taacttgaca tcaatttggga tcaaatttaa gagactaaac 10002
tcttacaatg tgatagacta atgtttaaat ctgacttaaa gagatacttg tgttttgtac 10062
ttgacatatt tcgaaactca aataagatta tcctcaacaa gaagaactta taaaaagaaa 10122
tattaatttg aggataaaaa tgtaaagagg ataaaaatgt gaggtaaata atattttttat 10182
taaaatttag ttattctagt atttatgaat aaaccataat tgtatcttta tcttcataca 10242
tacatatata attataataa tatgtacaaa aaaaataaca ataatgatga taaatttttt 10302
taaaaaaatt gcacctcctg acccgaggtc ctggctacgc cactgcatct aactacttac 10362
aagacaccac caatatgtct tatatcttat aatatacatg tttttctatg cttcatgtat 10422
taaatatgat ttttgaagtc agggttcggc cctttaaatt tggatgtctt ggacgaatca 10482
agagagtggg gtccttataa aaaaaatttc acaaaaattg ataagattaa gagaaatgat 10542
ctaaaagact attaaacatt tcatttgaca ttgtacaaga aaaacacaag tatgaatcat 10602
tgaagtgtga accaattagc tattattcat ctctctttc ctcttcttg atttgttatt 10662
gtttcctata aaaaaaattg accaagcatt taaaactatt taaatatttt ctctggtgaa 10722
ttttttgttg caaaatcatc aataattcgt tcaaaatcaa ggttcttcac aaaaaatcca 10782
tctgtttatt attcaactcca tateattatt tcaatttaag taccccaatt aaactattga 10842
ctatttactt gctttccaca aattactcat cagttcattt gctaattgat tttttggtac 10902
atgaattcaa atattaaaaa agtghtaaca acacaaaatt tttgattacc atacaaaata 10962
tatcatgtaa caaacacgat atgagtatat gtagattttt cttttatcct taataaaagt 11022
gtaacaaact agatcaaata tatgttctta taaatataat caataagaaa aggaaaatta 11082
tcatcgatac atcgagataa aatattttat atacaggcaa accaaaatag gtcgagttga 11142
taaaataatt tgttatatgc tttgacaata atttgtagat acatcgacgt acagataa 11200

<210> 2

<211> 523

<212> PRT

5 <213> Medicago truncatula

<400> 2

Met Gly Tyr Gly Thr Arg Lys Leu Ser Asp Glu Tyr Glu Val Ser Glu

1

5

10

15

ES 2 385 489 T3

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

ES 2 385 489 T3

Val Ser Arg Leu Gln Ser Phe Asn Ala Arg Arg Lys Leu Arg Ala Ala
 325 330 335
 Ala Ile Ala Ser Val Trp Ser Ser Thr Ile Phe Leu Arg Thr Lys Lys
 340 345 350
 Leu Lys Ser Leu Val Gly Ser Tyr Asp Leu Lys Glu Glu Glu Ile Glu
 355 360 365
 Asn Leu Arg Met His Phe Lys Lys Ile Cys Ala Asp Arg Asp Asn Ala
 370 375 380
 Thr Leu Ser Glu Phe Glu Glu Val Leu Lys Ala Met Asn Met Leu Ser
 385 390 395 400
 Leu Ile Pro Phe Ala Ser Arg Ile Phe Asp Leu Phe Asp Asn Asn Arg
 405 410 415
 Asp Gly Thr Val Asp Met Arg Glu Ile Leu Cys Gly Phe Ser Ser Leu
 420 425 430
 Lys Asn Ser Lys Gly Glu Asp Ala Leu Arg Leu Cys Phe Gln Met Tyr
 435 440 445
 Asp Thr Asp Arg Ser Gly Cys Ile Ser Lys Glu Glu Val Ala Ser Met
 450 455 460
 Leu Arg Ala Leu Pro Tyr Asp Cys Leu Pro Thr Asp Ile Thr Glu Pro
 465 470 475 480
 Gly Lys Leu Asp Glu Ile Phe Asp Leu Met Asp Ala Asn Asn Asp Gly
 485 490 495
 Lys Val Thr Phe Asp Glu Phe Lys Ala Ala Met Gln Arg Asp Ser Ser
 500 505 510
 Leu Gln Asp Val Val Leu Ser Ser Ile Arg Pro
 515 520

<210> 3

<211> 2586

<212> ADN

5 <213> Pisum sativum

<220>

<221> exón

<222> (294) .. (1048)

<223>

ES 2 385 489 T3

<220>

<221> exón

<222> (1219)..(1273)

<223>

5 <220>

<221> exón

<222> (1349)..(1459)

<223>

<220>

10 <221> exón

<222> (1541)..(1773)

<223>

<220>

<221> exón

15 <222> (1978)..(2192)

<223>

<220>

<221> exón

<222> (2284)..(2330)

20 <223>

<220>

<221> exón

<222> (2416) .. (2586)

<223>

25 <400> 3

cctcttcttt	gtccattcta	aaacacctct	taccaacctta	cttaatatct	ccttctatct	60
ctcttaatth	aattcatatt	ttatttcata	aacaattcaa	ataactctta	tagtattatt	120
ataacctata	atgtctatth	caaccatttc	aataacgcgt	ttatatctt	cattattgaa	180
catattatca	ttattacata	tcctcttgth	cttttctct	tcatacatth	tcttactctt	240
caaaatatat	tccatththh	caaactctth	tgthththgth	aattatcact	acc atg	296

Met

ES 2 385 489 T3

1

gaa tat ggt aca aga aaa ctc tca gat gtg tat gaa gtt tca gag att	344
Glu Tyr Gly Thr Arg Lys Leu Ser Asp Val Tyr Glu Val Ser Glu Ile	
5 10 15	
cta gga aga ggt gga ttt tct gtt gtt aga aaa ggt aca aga aaa tca	392
Leu Gly Arg Gly Gly Phe Ser Val Val Arg Lys Gly Thr Arg Lys Ser	
20 25 30	
aac aat gat gat gaa aaa tca caa tca caa tca aaa tca caa tca caa	440
Asn Asn Asp Asp Glu Lys Ser Gln Ser Gln Ser Lys Ser Gln Ser Gln	
35 40 45	
tca caa gta gca atc aaa aca ctt aga aga tta ggt act tca aat aat	488
Ser Gln Val Ala Ile Lys Thr Leu Arg Arg Leu Gly Thr Ser Asn Asn	
50 55 60 65	
tta cca agg aaa aaa gat ggt ggt gaa aat agc aca gaa act atg atg	536
Leu Pro Arg Lys Lys Asp Gly Gly Glu Asn Ser Thr Glu Thr Met Met	
70 75 80	
aag ttc cct aca atg aga caa gtt tct gtc tca gat gca tta cta aca	584
Lys Phe Pro Thr Met Arg Gln Val Ser Val Ser Asp Ala Leu Leu Thr	
85 90 95	
aat gag att ctt gta atg aga aga ata gtc gaa aac gtt tcg ccg cat	632
Asn Glu Ile Leu Val Met Arg Arg Ile Val Glu Asn Val Ser Pro His	
100 105 110	
ccg aac gtt atc gat ctt tac gat gtt tat gaa gac aca aat ggt gtt	680
Pro Asn Val Ile Asp Leu Tyr Asp Val Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Val	
115 120 125	
cat ctt gtg ctt gag ctt tgt tct ggt ggc gaa ctt ttc gat agg att	728
His Leu Val Leu Glu Leu Cys Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp Arg Ile	
130 135 140 145	
ggt gca caa gat aag tat agt gag act gaa gct tca act gtg gtt cat	776
Val Ala Gln Asp Lys Tyr Ser Glu Thr Glu Ala Ser Thr Val Val His	
150 155 160	
cag att gtt gca ggg tta gaa gct att cat aga gct aac att att cat	824
Gln Ile Val Ala Gly Leu Glu Ala Ile His Arg Ala Asn Ile Ile His	
165 170 175	
agg gat ttg aag cct gaa aat tgt ctt ttt tta gat gtt ggg aaa gat	872
Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Cys Leu Phe Leu Asp Val Gly Lys Asp	
180 185 190	
tct agt ctt aag att atg gat ttt ggg ttg agt tct gtt gaa gag ttt	920

ES 2 385 489 T3

Ser Ser Leu Lys Ile Met Asp Phe Gly Leu Ser Ser Val Glu Glu Phe
195 200 205
act gat cct gtt gtt ggt ttg ttt gga tct att gat tat gtt tct cct 968
Thr Asp Pro Val Val Gly Leu Phe Gly Ser Ile Asp Tyr Val Ser Pro
210 215 220 225
gag gct ctt tct caa gga aag att act act aag agt gat atg tgg tct 1016
Glu Ala Leu Ser Gln Gly Lys Ile Thr Thr Lys Ser Asp Met Trp Ser
230 235 240
ctt gga gtc att cta tat atc tta ctt tcc gg gtatgttttt ttcttttgag 1068
Leu Gly Val Ile Leu Tyr Ile Leu Leu Ser Gly
245 250
tatctgtacg agtaacagga gaaactaatt ctttaaacga gagaggacta caatagacga 1128
caaagtatct tctcaagaga ttttaacactg ttgtattaag ttggaagaaa tctcttacca 1188
tctcatctaa ttgctttgat tgtttttcag g tat cca cct ttc att gct caa 1240
Tyr Pro Pro Phe Ile Ala Gln
255
aat aat cgc caa aag caa caa atg ata ttg aat gtaagtaaca tcttagacat 1293
Asn Asn Arg Gln Lys Gln Gln Met Ile Leu Asn
260 265 270
gataaattca tttcataatg ttttttttgg tactaaataa aatgttttgg aacag gga 1351
Gly
aat ttt agt ttt tat gag aag act tgg aag gga att tca caa tca gca 1399
Asn Phe Ser Phe Tyr Glu Lys Thr Trp Lys Gly Ile Ser Gln Ser Ala
275 280 285
aag aat ttg att tca agt ctt cta act gtt gat cct gct aaa aga cct 1447
Lys Asn Leu Ile Ser Ser Leu Leu Thr Val Asp Pro Ala Lys Arg Pro
290 295 300
agt gca caa gag gtactctaata tctacactct taataactta agtaattgaa 1499
Ser Ala Gln Glu
305
aatattgaag tgttttcaat ttttttttgg tattggaaca g ctt tta agt gat cca 1555
Leu Leu Ser Asp Pro
310
tgg gtt aaa ggt gag aag gcc aaa gat gat caa atg gac cct gaa att 1603
Trp Val Lys Gly Glu Lys Ala Lys Asp Asp Gln Met Asp Pro Glu Ile
315 320 325
gtg tca agg cta caa aga ttc aat gca aga cgc aaa ctt cgc gca gct 1651

ES 2 385 489 T3

Val Ser Arg Leu Gln Arg Phe Asn Ala Arg Arg Lys Leu Arg Ala Ala
 330 335 340
 gca att gct agt gtt tgg agc tcc aca att ttt cta aga act aaa aaa 1699
 Ala Ile Ala Ser Val Trp Ser Ser Thr Ile Phe Leu Arg Thr Lys Lys
 345 350 355 360
 ttg aaa tcc ttg gtt gga tcc tat gat ctc aaa gaa gat gaa att gaa 1747
 Leu Lys Ser Leu Val Gly Ser Tyr Asp Leu Lys Glu Asp Glu Ile Glu
 365 370 375
 aat ctt agg atg cac ttc aag aaa at gtaagtacag tattccaaat 1793
 Asn Leu Arg Met His Phe Lys Lys Ile
 380
 cgcatttgta atgacatgag cgtttttttaa atgtctgtgt cattgtcaat gtaatttcta 1853
 ttaagtatat ttaacatcaa attttcaata ataagaaaat cgtgagggcgg attgagacta 1913
 ctatttaaaa tcttggttcc agctgtgatt ttgatttaac taatgggtgct atggttgta 1973
 acag a tgt gca gat aga gac aat gcg act ctt tgt gag ttt gaa gag 2020
 Cys Ala Asp Arg Asp Asn Ala Thr Leu Cys Glu Phe Glu Glu
 390 395
 gtg tta aaa gca atg aaa atg cca tca ttg atc cct ttc gca gct cgt 2068
 Val Leu Lys Ala Met Lys Met Pro Ser Leu Ile Pro Phe Ala Ala Arg
 400 405 410 415
 ata ttt gat tta ttt gac aac aac cgc gat gga acg gtt gac atg aga 2116
 Ile Phe Asp Leu Phe Asp Asn Asn Arg Asp Gly Thr Val Asp Met Arg
 420 425 430
 gag att ctt tgt ggc ttt tcg agt ctc aag aac tcc aaa gga gag gat 2164
 Glu Ile Leu Cys Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asn Ser Lys Gly Glu Asp
 435 440 445
 gct ctc cgt ttg tgt ttt cag gca agg g gtgtgcaaaa atatgattaa 2212
 Ala Leu Arg Leu Cys Phe Gln Ala Arg
 450 455
 ttgaaacata tttccaacat gtgaacgcat ttctgatttt atttttgttg gcaattagat 2272
 gtatgacaca g at aga tca gga tgc atc acc aag gaa gaa gta gca tct 2321
 Asp Arg Ser Gly Cys Ile Thr Lys Glu Glu Val Ala Ser
 460 465
 atg cta aga gtaatgttca ttctctcaa tgaattagct ttatattttc 2370
 Met Leu Arg
 470
 actgtcatct ttttaacacaa gtgtatatat atatttccta aacag gct ttg cca tat 2427
 Ala Leu Pro Tyr

ES 2 385 489 T3

475

gat tgt ctt cca act gat atc act gaa cct gga aaa ttg gat gag att 2475
 Asp Cys Leu Pro Thr Asp Ile Thr Glu Pro Gly Lys Leu Asp Glu Ile
 480 485 490
 ttt gac tta atg gat gcc aat agt gat gga aaa gtt aca ttt gat gaa 2523
 Phe Asp Leu Met Asp Ala Asn Ser Asp Gly Lys Val Thr Phe Asp Glu
 495 500 505
 ttc aaa gct gca atg caa aga gat agc tct ctt caa gat gta gtt ctc 2571
 Phe Lys Ala Ala Met Gln Arg Asp Ser Ser Leu Gln Asp Val Val Leu
 510 515 520
 tct tct att cgt cca 2586
 Ser Ser Ile Arg Pro

525

<210> 4

<211> 529

<212> PRT

5 <213> Pisum sativum

<400> 4

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

ES 2 385 489 T3

	435		440		445										
Leu	Arg	Leu	Cys	Phe	Gln	Ala	Arg	Asp	Arg	Ser	Gly	Cys	Ile	Thr	Lys
	450					455					460				
Glu	Glu	Val	Ala	Ser	Met	Leu	Arg	Ala	Leu	Pro	Tyr	Asp	Cys	Leu	Pro
465					470					475				480	
Thr	Asp	Ile	Thr	Glu	Pro	Gly	Lys	Leu	Asp	Glu	Ile	Phe	Asp	Leu	Met
				485					490					495	
Asp	Ala	Asn	Ser	Asp	Gly	Lys	Val	Thr	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Ala	Ala
			500					505					510		
Met	Gln	Arg	Asp	Ser	Ser	Leu	Gln	Asp	Val	Val	Leu	Ser	Ser	Ile	Arg
	515						520							525	

Pro

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 5

ggccaatgt tgaacagtga 20

10 <210> 6

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador de PCR

<400> 6

gggtttgat tgctactgt ga 22

<210> 7

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 7

25 tcaccatggg atatgaaca 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 8
 ccacagttgc agcttcagtc 20
 <210> 9
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 15 <400> 9
 cttgttccg gtggtgaact 20
 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 10
 tggacatgtt gagtttgacg a 21
 25 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebador de PCR
 <400> 11
 tcgtggtttt aacaaaactc ca 22
 <210> 12
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cebador de PCR
 <400> 12
 atttgggca atgaaagggtg 20
 <210> 13
 5 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 10 <400> 13
 ttctgtaaa ctcaacgtat ccaa 24
 <210> 14
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 14
 cattgaaga taatgcatg aaaaa 25
 20 <210> 15
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador de PCR
 <400> 15
 tgactaaag gaccaattta taacaa 26
 <210> 16
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 16
 35 tcgacatttt tgccagttga 20
 <210> 17
 <211> 22

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 5 <400> 17
 aaatttcaca aggaaccaa ca 22
 <210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 18
 gaagcaaaag ggatcaatga taa 23
 15 <210> 19
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador de PCR
 <400> 19
 tgtgcagata gagacaatgc aa 22
 <210> 20
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 20
 30 caagttatga ggcccaatg 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 21

caacattggg gcctcataac 20
 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 22
 caatcatatg gcaaagcctg t 21
 10 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador de PCR
 <400> 23
 atccatgctc aggtaatgc 20
 <210> 24
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 24
 25 acgacgatca cactcacagg 20
 <210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 25
 tcattgatcc ctttgcttc tcgt 24
 <210> 26
 35 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 26
 gatgctactt cctcttgct gatgc 25
 5 <210> 27
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Cebador de PCR
 <400> 27
 tggcatcact cagtaccttt caacag 26
 <210> 28
 <211> 28
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 28
 20 acccaaagca tcaaataata agtcaacc 28
 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 29
 ggtggcgaac tttcgatag 20
 <210> 30
 30 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 35 <400> 30
 acctgaaaa caatcaaagc aa 22
 <210> 31

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador de PCR
 <400> 31
 gcagttgact ctctctttgt cc 22
 <210> 32
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 32
 15 tctgtgctat tttcaccacc a 21
 <210> 33
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 33
 aacgagagag gactacaata gacga 25
 <210> 34
 25 <211> 20'
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 30 <400> 34
 tcaaatcac agctgaacc 20
 <210> 35
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 35
 ggaagagggtg gattttctgt tg 22
 <210> 36
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 36
 10 tcaggcttca aatccctatg a 21
 <210> 37
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 37
 aaaattgaaa tccttggtg ga 22
 <210> 38
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 25 <400> 38
 aacacaaacg gagagcatcc 20
 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 39
 agaaaatcgt gaggcggatt 20
 35 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 40
 5 ttggtgatgc atcctgatct 20
 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 41
 ttgtggcttt tcgagtctca 20
 <210> 42
 15 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 20 <400> 42
 gcagcttga atcatcaaa tgta 24
 <210> 43
 <211> 25
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 43
 tggacgaata gaagagagaa ctaca 25
 30

REIVINDICACIONES

1. Método para regular la nodulación y/o la endomicorrización en una planta, comprendiendo dicho método modular la expresión o la actividad en dicha planta de una proteína quinasa dependiente del Ca^{2+} - calmodulina (CCaMK).
- 5 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha CCaMK tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de identidad o con al menos un 90% de semejanza con el polipéptido de SEQ ID n°: 2.
3. Método según la reivindicación 2, caracterizado porque dicha CCaMK se selecciona de entre la CCaMK de *Medicago truncatula*, con SEQ ID n°: 2, y la CCaMK de *Pisum sativum*, con SEQ ID n°: 4.
- 10 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la expresión o la actividad de dicha CCaMK en la planta se incrementa para aumentar la nodulación y/o la endomicorrización.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la expresión o la actividad de dicha CCaMK en la planta se disminuye para reducir la nodulación y/o la endomicorrización.
- 15 6. Método para identificar un alelo de un gen de *CCaMK*, estando dicho alelo asociado a un fenotipo determinado de características de nodulación y/o endomicorrización y comprendiendo dicho método el aislamiento de un fragmento de ácido nucleico que comprende el gen de *CCaMK* o una parte del mismo, a partir de como mínimo una planta que expresa dicho fenotipo, y la secuenciación de dicho fragmento.
7. Método para ensayar una planta en cuanto a sus características de nodulación y/o endomicorrización, comprendiendo dicho método la detección de si un alelo de un gen de *CCaMK* asociado a determinadas características de nodulación y/o endomicorrización está presente en dicha planta.

20

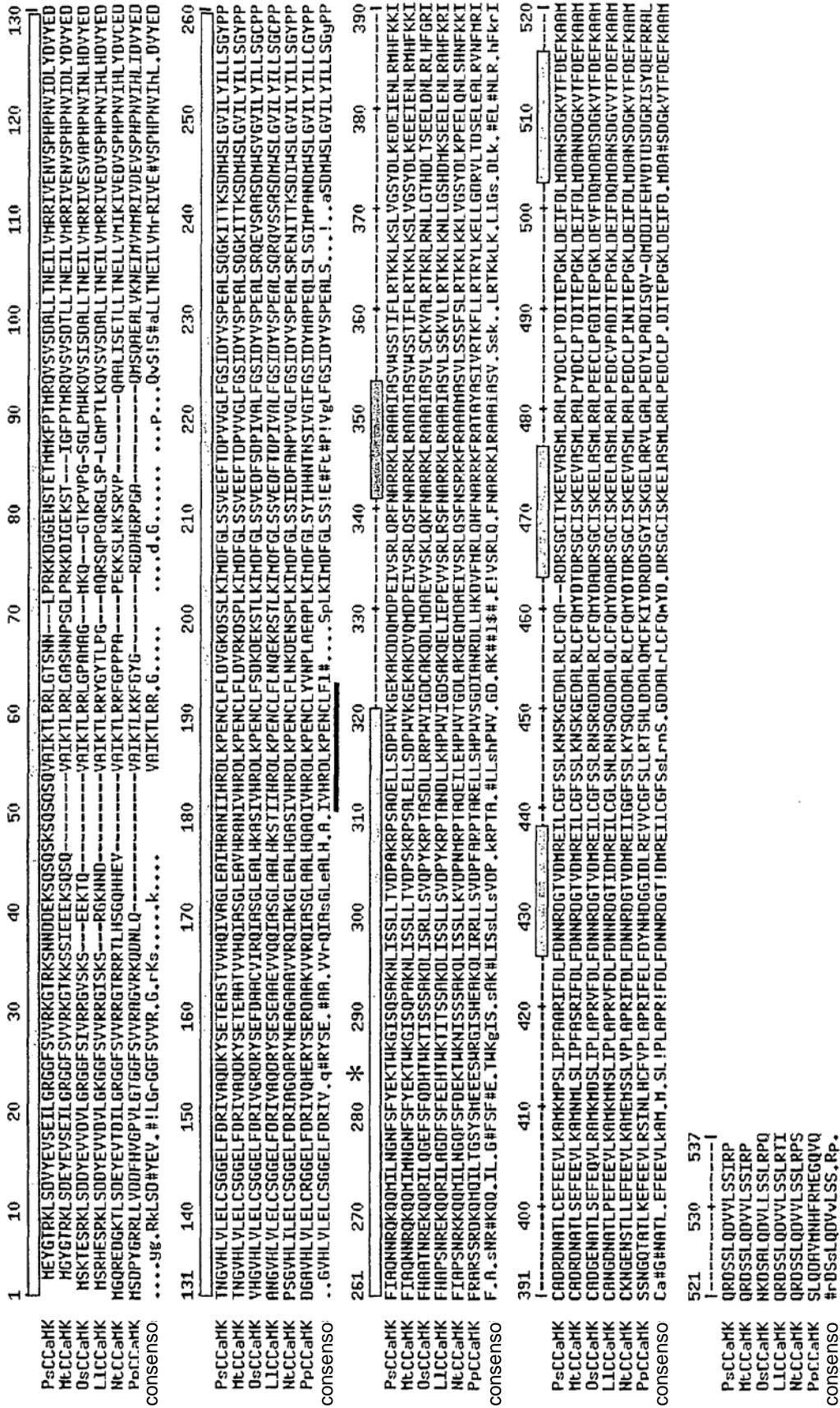


Figura 1

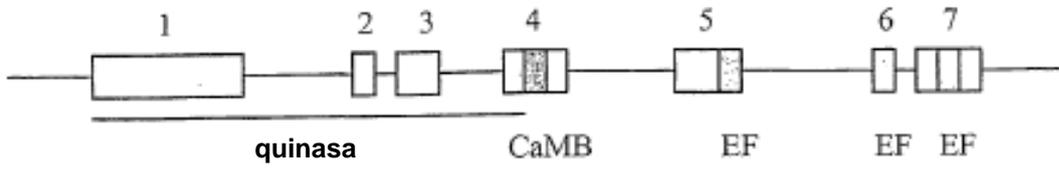


Figura 2

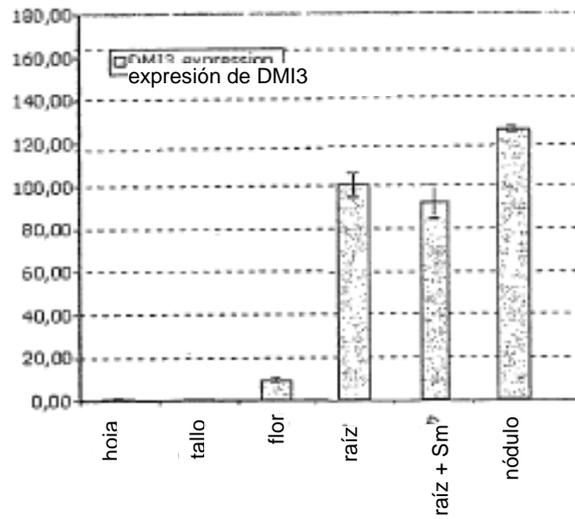


Figura 3