

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 190**

51 Int. Cl.:

C12N 9/06 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07113288 .0**

96 Fecha de presentación: **10.12.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1865053**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.12.2007**

54 Título: **Método para modificar la morfología, bioquímica y fisiología de plantas que comprende la expresión de citoquinina oxidasa de plantas**

30 Prioridad:

10.12.2001 US 14101

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

05.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

05.12.2012

73 Titular/es:

SCHMULLING, THOMAS (50.0%)
Preussenallee 30
14052 Berlin, DE y
WERNER, TOMÁS (50.0%)

72 Inventor/es:

SCHMULLING, THOMAS y
WERNER, TOMÁS

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 392 190 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

Método para modificar la morfología, bioquímica y fisiología de plantas que comprende la expresión de citoquinina oxidasa de plantas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se relaciona en general con métodos para modificar propiedades o características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de plantas, tales como uno o más procesos de desarrollo y/o procesos de adaptación ambiental, incluyendo desarrollo de semillas. Los métodos para incrementar el tamaño y/o peso de semillas, incrementar el tamaño y/o peso de los embriones, e incrementar el tamaño y/o peso de los cotiledoneos también se proveen aquí. Los métodos comprenden expresar una proteína de control de la degradación de la
- 10 citoquinina, en particular la citoquinina oxidasa, en la planta, operablemente bajo el control de una secuencia promotora regulable tal como una secuencia promotora específica de células, promotora específica de tejidos o promotora específica de órganos. Preferiblemente, las características modificadas por la presente invención son características mediadas por la citoquinina y/o mediadas por la auxina.

Antecedentes de la invención

- 15 Las raíces son un órgano importante de las plantas superiores. Sus funciones principales son anclar la planta al suelo y absorber agua y nutrientes (nutrición N, minerales, etc.) Así, el crecimiento de las raíces tiene una influencia directa o indirecta sobre el crecimiento y rendimiento de los órganos aéreos, en particular bajo condiciones de limitación de nutrientes. Las raíces también son relevantes para la producción de productos secundarios de las plantas, tales como compuestos defensivos y hormonas vegetales.

- 20 Las raíces también son órganos de almacenamiento en un cierto número de cultivos de consumo importantes. La remolacha de azúcar es la planta más importante para la producción de azúcar en Europa (260 Millones de toneladas/año, 38% de la producción mundial). La mandioca (casaba), ñames y patatas dulces (batatas) son productores importantes de almidón (aproximadamente 150 Millones de toneladas/cada año). Su contenido de almidón puede ser dos veces más alto que el de la patata. Las raíces también son el órgano relevante para el
- 25 consumo en un cierto número de vegetales (por ejemplo, zanahorias, rábanos), hierbas (por ejemplo, jengibre, cúrcuma) y plantas medicinales (por ejemplo, ginseng). Además, algunos de los productos vegetales secundarios encontrados en las raíces son de importancia económica para la industria química y farmacéutica. Un ejemplo es el ñame, el cual contiene moléculas básicas para la síntesis de hormonas esteroidales. Otro ejemplo es shikonina, la cual se produce en las raíces de la *Lithospermum erythrorhizon* en cultivos de raíces vellosas. La shikonina se utiliza
- 30 por sus propiedades antiinflamatorios, antitumorales y para curación de heridas.

Además, el crecimiento mejorado de las raíces de plantas de cultivo también potenciará la competitividad con malezas y mejorará el crecimiento en áreas áridas, incrementando la accesibilidad y absorción de agua.

El crecimiento mejorado de las raíces también es relevante para propósitos ecológicos, tales como la biorremediación y prevención/detención de la erosión del suelo.

- 35 La arquitectura de las raíces es un área que ha permanecido largamente inexplorada a través de los cruces clásicos, por las dificultades de establecer esta característica en el campo. Así, la biotecnología podría tener un impacto significativo en la mejora de estas características, porque no se basa en selecciones a gran escala en el campo. Al contrario, las metodologías biotecnológicas requieren un entendimiento básico de los componentes moleculares que determinan una característica específica de la planta. Hoy, este conocimiento es sólo fragmentario, y como
- 40 consecuencia, la biotecnología hasta ahora ha sido incapaz de generar un cambio en esta área.

- Un regulador bien establecido del crecimiento de las raíces es la auxina. La aplicación de ácido indol-3-acético (IAA) a plantas en crecimiento estimula el desarrollo de las raíces laterales y la elongación lateral de las raíces (Torrey, Am J Bot 37: 257-264, 1950; Blakely et al., Bot Gaz 143: 341-352, 1982; Muday and Haworth, Plant Physiol Biochem 32: 193-203, 1994). Raíces expuestas a un rango de concentraciones de IAA iniciaron números crecientes de raíces laterales. (Kerk et al., Plant Physiol, 122: 925-932, 2000). Además, cuando las raíces que han producido
- 45 laterales en respuesta a una concentración particular de auxina exógena fueron expuestas subsecuentemente a una concentración más alta de IAA, se formaron numerosas raíces laterales supernumerarias espaciadas entre las ya existentes (Kerk et al., Plant Physiol, 122: 925-932, 2000). Por el contrario, el crecimiento de las raíces sobre agar que contenía inhibidores de para el transporte de la auxina incluyendo NPA, disminuye el número de raíces laterales
- 50 (Muday and Haworth, Plant Physiol Biochem 32: 193-203, 1994).

- Se han aislado mutantes de arabidopsis que contienen inhibidores incrementados de IAA endógeno (Boerjan et al., Plant Cell 7: 1405-141, 1995; Celenza et al., Gene Dev 9: 2131-2142, 1995; King et al., Plant Cell 7: 2023-2037, 1995; Lehman et al., Cell 85: 183-194, 1996). Son conocidos por ser alelos de locus individuales localizados en el cromosoma 2. Estas plantas mutantes tienen raíces adventicias y laterales en exceso, lo cual está de acuerdo con
- 55 los efectos antes descritos de la aplicación externa de auxina.

Los efectos estimuladores de las auxinas sobre la formación de raíces adventicias y laterales sugiere que la sobreproducción de auxinas en las plantas transgénicas es una estrategia válida para incrementar el crecimiento de las raíces. Aún así, es también cuestionable si esto produciría un producto comercial con características mejoradas. Aparte de su efecto estimulador sobre la formación de raíces adventicias y laterales, la sobreproducción de auxina dispara otros efectos, tales como la reducción en el número de hojas, morfología anormal de las hojas (hojas estrechas, rizadas), inflorescencias abortadas, dominio incrementado apical, formación de raíces adventicias en el tallo, la mayoría de los cuales son indeseables desde una perspectiva agronómica (Klee et al., *Genes Devel* 1: 86-96, 1987; Kares et al., *Plant Mol Biol* 15: 225-236, 1990). Por lo tanto, el problema principal con la metodología que se basa en la síntesis de auxina incrementada es un problema de control, es decir confinar los efectos de la auxina a la raíz. Este problema de control no ha sido superado probablemente utilizando promotores específicos para tejidos: las auxinas son transportados en la planta y su acción consecuentemente no está confinada al sitio de síntesis. Otro aspecto es si las auxinas siempre potenciarán la biomasa de la raíz total. Para plantas cultivadas en agar, se ha notado que el incremento de las concentraciones estimuló progresivamente la formación de raíces laterales pero concurrentemente inhibió el crecimiento de estas raíces (Kerk et al., *Plant Physiol*, 122: 925-932, 2000).

Las semillas son la unidad reproductiva de las plantas superiores. Las semillas de las plantas contienen compuestos de reserva para asegurar la nutrición del embrión después de la germinación. Estos órganos de almacenamiento contribuyen significativamente a la nutrición humana así como a la alimentación animal. Las semillas consisten de tres partes principales, a saber el embrión, el endospermo y la cubierta de la semilla. Los compuestos de reserva están depositados en el órgano de almacenamiento el cual es bien sea el endospermo (resultante de doble fertilización, por ejemplo en todos los cereales), el así llamado perispermo (derivado del tejido de las nucelas) o los cotiledones (por ejemplo, variedades de judías). Los compuestos de almacenamiento son lípidos (colza de aceite), proteínas (por ejemplo, en el aleurón de los cereales) o hidratos (almidón, oligosacáridos como la rafinosa).

El almidón es el compuesto de almacenamiento en las semillas de los cereales. Las especies más importantes de maíz (producción anual cercana a 570 millones de toneladas; de acuerdo con FAO 1995), arroz (540 millones de toneladas por año) y trigo (530 millones de toneladas por año). Las semillas ricas en proteínas son diferentes clases de judías (*Phaseolus spec.*, *Vicia faba*, *Vigna spec.*; cerca de 20 millones de toneladas por año), guisantes (*Pisum sativum*; 14 millones de toneladas por año) y soja (*Glycine max*; 136 millones de toneladas por año). Las semillas de soja son también una fuente importante de lípidos. Las semillas ricas en lípidos son también aquellas de diferentes especies de Brassica (aproximadamente 30 millones de toneladas por año), algodón, sésamo oriental, linaza, amapola, castor, girasol, cacahuete, coco, aceite de palma y algunas otras plantas de menor importancia económica.

Después de la fertilización, las semillas en desarrollo se convierten en un órgano de acumulación que trae compuestos nutricionales a partir de órganos fuente de la planta y los utiliza para producir los compuestos de reserva en el órgano de almacenamiento. El incremento en el tamaño de las semillas y el peso, son deseables para muchas diferentes especies de cultivo. Además de las reservas incrementadas de almidón, proteína y lípidos y de una nutrición potenciada por ingestión, el incremento en el tamaño de las semillas y/o el peso y el tamaño y/o el peso de los cotiledones están correlacionados con un crecimiento más rápido después de la germinación (vigor temprano) y tolerancia mejorada al estrés. Las citoquininas son un factor importante en la determinación de la capacidad de almacenamiento. El concepto común predice que las citoquininas son un regulador positivo de la capacidad de almacenamiento.

Numerosos reportes adjudican una función estimuladora o inhibidora a las citoquininas en diferentes procesos del desarrollo tales como crecimiento y ramificación de las raíces, control del dominio apical en el brote, desarrollo del cloroplasto y senescencia de la hoja (Mok M.C. (1994) in *Cytokines: Chemistry, Activity and Function*, eds., Mok, D.W.S. & Mok, M.C. (CRC Boca Ratón, FL), pp.155-166). Las conclusiones acerca de las funciones biológicas de las citoquininas han sido derivadas principalmente de estudios sobre las consecuencias de la aplicación de citoquinina exógena o de niveles de citoquinina potenciados endógenamente (Klee, H.J. & Lanehon, M.B. (1995) in *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, ed. Davies, P.J. (Kluwer, Dordrecht, the Netherlands), pp. 340-353, Smulling, T., Rupp, H.M. Frank, M& Schafer, S. (1999) in *Advances in Regulation of Plant Growth and Development*, eds. Surnad, M. Pac P. & Beck, E. (Peres, Prague), pp. 85-96). Hasta ahora, no ha sido posible abordar la pregunta contraria: ¿cuáles son las consecuencias para el crecimiento y desarrollo de la planta si la concentración de citoquinina endógena disminuye? Se espera que las plantas con un contenido reducido de citoquinina produzcan información más precisa acerca de los procesos que las citoquininas limitan y, por lo tanto, puedan regular. A diferencia de otras hormonas vegetales tales como ácido abscísico, giberelinas y etileno, no se han aislado mutantes biosintéticos de la citoquinina (Hooykens, P.J.J., Hall, M.A. & Libbeuga, K.R., eds. (1999) *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones* (Elsevier, Ámsterdam).

La enzima catabólica citoquinina oxidasa (CKX) juega un papel principal en el control de los niveles de citoquinina en tejidos vegetales. La actividad de la CKX ha sido encontrada en un gran número de plantas superiores y en diferentes tejidos vegetales. La enzima es una oxidoreductasa que contiene FAD que cataliza la degradación de las citoquininas que portan cadenas laterales isoprenoides insaturadas. Las bases libres iP y Z, y sus ribósidos respectivos son los sustratos preferidos. Los productos de reacción del catabolismo de la iP son adenina y el

aldehído 3-metil-2-butanal insaturado (Armstrong, D.J. (1994) in Cytokinins: Chemistry, Activity and Functions, eds. Mok, D.W.S & Mok, M.C. (CRC Boca Ratón, FL), pp. 139-154). Recientemente, se ha aislado un gen de citoquinina oxidasa de *Zea mays* (Morris, R.O., Bilyeu, K.D., Laskey, J.G. & Cherich, N.N. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 255, 328-333, Houba-Heria, N., Pethe, C. d'Alayer, J & Lelouc, M. (1999) Plant J. 17:615-626). La manipulación de la expresión del gen de CKX podría superar parcialmente la falta de mutantes biosintéticos de citoquinina y puede utilizarse como una herramienta poderosa para estudiar la relevancia de las citoquininas tipo iP y Z durante el ciclo de vida completo de las plantas superiores.

La presente invención supera los problemas relacionados con el control de los efectos de la auxina, mantenimiento del crecimiento de raíces y promoción del tamaño y/o peso incrementado de semillas, embriones y cotiledones a través de la reducción de la concentración endógena de citoquinina.

Resumen de la invención

La presente invención se relaciona con el objetivo tal como se define en las reivindicaciones anexas 1 a 29.

La presente especificación describe proteínas de citoquinina oxidasa, secuencias de ácidos nucleicos que codifican tales proteínas y vectores, células huésped y células vegetales transgénicas, plantas y partes de plantas que comprenden las proteínas, secuencias de ácidos nucleicos y vectores. Por ejemplo, la presente invención se relaciona con un constructo genético que comprende un gen que codifica una proteína con actividad de citoquinina oxidasa de *Arabidopsis thaliana*. Este gen puede expresarse bajo el control de un promotor regulado. Este promotor puede ser regulado por factores específicos para tejidos o específicos para ambientes endógenos o, alternativamente, puede ser inducido por la aplicación de agentes químicos específicos.

La presente especificación también describe un método para modificar la arquitectura y biomasa de las raíces por expresión de un gen de citoquinina oxidasa o expresión de un ácido nucleico que codifica una proteína que reduce el nivel de citoquininas activas en plantas o partes de plantas. Preferiblemente, la expresión está bajo el control de un promotor que es específico para la raíz o para ciertos tejidos o tipos de células de la raíz.

Adicionalmente, la presente especificación describe métodos para incrementar el tamaño y/o peso de las semillas, tamaño y/o peso de los embriones, y tamaño y/o peso de los cotiledones. Los métodos involucran la expresión de un gen de citoquinina oxidasa o la expresión de un ácido nucleico que codifica una proteína que reduce el nivel de citoquininas activas en plantas o partes de plantas. Preferiblemente, la expresión está bajo el control de un promotor que dirige la expresión preferencialmente en la semilla, embrión, o cotiledón.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Representación esquemática de genes de citoquinina oxidasa de plantas

Se muestran las estructuras de diferentes genes de citoquinina oxidasa aislados a partir de maíz (ZmCKX1, número de acceso AF044603, Biochem. Biophys. Res. Com. 255:328-333, 1999) y Arabidopsis (AtCKX1 a AtCKX4). Los exones se denominan con "E" y se representan mediante cajas sombreadas. Los intrones son representados por cajas blancas. Se indican adicionalmente los tamaños de los genes (en kb, sobre la parte superior de cada estructura), los números de acceso genético (bajo los nombres) y una barra lateral que representa 0.5 kb.

Figura 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la citoquinina oxidasa de plantas.

Se alinean las secuencias de aminoácidos para citoquinina oxidasas de maíz (ZmCKX1) y Arabidopsis (AtCKX1 a AtCKX4). Se marcan residuos idénticos de aminoácidos mediante una caja negra, los residuos de aminoácidos similares están en una caja gris. Grupos de similitud de aminoácidos: (M, I, L, V), (F, W, Y), (G, A), (S, T), (R, K, H), (E, D), (N, Q),

Figura 3. Análisis por inmunoprecipitación Northern de tabaco que expresa AtCKX1 y plantas de Arabidopsis.

(A) Análisis de inmunoprecipitación Northern de plantas de tabaco que expresan constitutivamente (líneas 1-8) en comparación con tabaco SNN tipo silvestre (línea 9)

(B) Comparación de la expresión de gen inducida por tetraciclina en hojas después de 12 horas de inducción con un clon de expresión constitutiva. Líneas 2-9, hojas de cuatro diferentes clones AtCKX1-W38TetR (+, -, con o sin tratamiento con tetraciclina), línea 1, expresando constitutivamente el clon 35S::AtCKX1.

(C) Análisis por inmunoprecipitación Northern de plantas de Arabidopsis que expresan constitutivamente el gen AtCKX1. Líneas 2-4, tres diferentes clones que expresan constitutivamente 35S::AtCKX1 en comparación con una planta de Arabidopsis tipo silvestres (línea 1).

Figura 4: Características de crecimiento de plantas de Arabidopsis transgénicas 35S::AtCKX1.

- 5 (A) Dos tipos de plántones silvestres (izquierda) comparados con plántones que expresan 35S::AtCKX1 (derecha). Nótese la formación incrementada de raíces adventicias y ramificación de raíces incrementadas en los plántones transgénicos. Las imágenes fueron tomadas 14 días después de la germinación. Las plantas se cultivaron in vitro sobre medio MS en cajas de petri en una posición vertical.
- (B) Como A, pero con las raíces teñidas con azul de toluidina.
- (C) Vista superior de una caja de petri con plántones transgénicos de 35S::AtCKX1 tres semanas después de la germinación.
- 10 (D) Plantas transgénicas 35S::AtCKX1 cultivadas en cultivo líquido. Los plántones con raíces de tipo silvestre crecen pobremente bajo estas condiciones (no mostrada).
- (E) Transformantes (T0) que expresan el gen 35S::AtCKX1 (tres plantas a la derecha), un tipo de planta silvestre se muestra a la izquierda.
- (F) Fenotipo de plantas T1 cultivadas en suelo. La planta de tipo silvestre (izquierda) comparada con dos plantas transgénicas 35S::AtCKX1.

15 Figura 5: Fenotipo de plantas de Arabidopsis que sobreexpresan AtCKX2.

Generación de T1 de plantas de Arabidopsis que expresan 35S::AtCKX2 (dos plantas en la derecha) en comparación con una planta tipo silvestre (planta a la izquierda).

Figura 6. Análisis por inmunoprecipitación Northern de plantas de tabaco y Arabidopsis que expresan AtCKX2.

- 20 (A) Un análisis de inmunoprecipitación Northern de plantas de tabaco que expresan constitutivamente (líneas 1-7) en comparación con tabaco tipo SNN (línea 8)
- (B) Análisis por inmunoprecipitación Northern de plantas de Arabidopsis que expresan constitutivamente el gen AtCKX2. Las líneas 2-8, siete diferentes clones que expresan constitutivamente 35S::AtCKX2 en comparación con la planta de Arabidopsis (línea 1).

Figura 7. Fenotipo de brote de plantas de tabaco que expresan AtCKX1 y AtCKX2.

- 25 (A) Vista superior de plantas de seis semanas de edad.
- (B) Plantas de tabaco en etapa de floración.
- (C) Cinética de la elongación de tallos. Las flechas marcan la aparición de la floración. La edad de las plantas (días después de la germinación) y el número de hojas en esa etapa se indican por encima de las flechas. Las barras indican SD; n = 12.
- 30 (D) Número de hojas (n = 12) formadas entre el día 68 y el día 100 después de la germinación y área superficial final de estas hojas (100% del tipo silvestre es $3646 \pm 144 \text{ cm}^2$; n = 3).
- (E) Comparación del tamaño de las hojas y la senescencia. Las hojas fueron de los números 4, 9, 12, 16 y 20 desde arriba (de izquierda a derecha).

Figura 8. Fenotipo de raíz de plantas de tabaco transgénico que expresan AtCKX.

- 35 (A) Plántones de 17 días después de la germinación.
- (B) Sistema radicular de plantas de crecimiento en suelo en la etapa de floración.
- (C) Longitud de las raíces, número de raíces laterales (LR) y raíces adventicias (AR) en el día 10 después de la germinación.
- 40 (D) Curva de respuesta a la dosis de la inhibición de crecimiento de raíces por citoquinina exógena. Las barras indican \pm SD; n = 30.

Figura 9: Crecimiento de meristemas axilares de brotes en plantas de tabaco que expresan 35S::AtCKX1.

Figura 10: Histología de los meristemas de brotes, meristemas de hojas y raíz de plantas de tabaco que sobreexpresan AtCKX1 versus tabaco tipo silvestre (WT).

- (A) Sección media longitudinal a través del meristema apical de brote vegetativo. P, hoja primordial.
- (B) Tejido vascular en venas de segundo orden de las hojas. X, xilema, PH, un haz de floema.
- 5 (C) Secciones transversales de hojas completamente desarrolladas.
- (D) Microscopía electrónica de barrido de la epidermis superior de la hoja.
- (E) Ápices de raíz teñidos con DAPI. RM, meristema de raíz.
- (F) Secciones medias longitudinales de meristemas de raíz diez días después de la germinación. RC, punta de raíz; PM, promeristema
- 10 (G) Secciones transversales de raíz 10 mm desde el ápice. E, epidermis, C1-C4 capa celular cortical, X, xilema, PH, floema. Las barras son de 100 µm.

Figura 11: El análisis por inmunoprecipitación Northern de plantas de tabaco que expresan AtCKX3 y AtCKX4.

- (A) Un análisis de inmunoprecipitación Northern de plantas de tabaco que expresan constitutivamente AtCKX3. Las designaciones de línea incluyen números de plantas transgénicas individuales, WT es tabaco SNN tipo silvestre. La inmunoprecipitación sobre la izquierda fue probada con una sonda específica de AtCKX3, la inmunoprecipitación inferior con una sonda específica para el ARNr 25S y sirve como control para la carga de ARN.
- 15 (B) El análisis por inmunoprecipitación Northern de plantas de tabaco que expresan constitutivamente AtCKX4. La designación de línea indica números de plantas individuales transgénicas, WT es tabaco SNN tipo silvestre. La inmunoprecipitación sobre la parte superior fue probada con una sonda específica para AtCKX4, la inmunoprecipitación inferior con una sonda específica para el ARNr 25S y sirve como control para la carga de ARN.
- 20

Figura 12: Injertos recíprocos de plantas de tabaco transgénicas AtCKX2 y plantas tipo silvestre.

- (A) Dos plantas a la izquierda: Control (injerto WT injertado sobre raíces WT). Dos plantas a la derecha: injerto WT injertado sobre raíces transgénicas AtCKX2-38.
- (B) Izquierda: Control (injerto WT injertado sobre raíces WT). Derecha: Injerto de planta AtCKX2-38 injertada sobre raíz WT.
- 25 (C) Magnificación del área de raíz. Izquierda: Control (Injerto WT injertado sobre raíz WT). Derecha: Injerto WT injertado sobre una raíz transgénica AtCKX2-38.
- (D) Formación de raíces adventicias. Izquierda: Control (Injerto WT injertado sobre una raíz WT). Derecha: Injerto WT injertado sobre una raíz transgénica AtCKX2-38.
- 30

Figura 13: Fenotipo de semillas, embriones y plantones de Arabidopsis.

- (A) Semillas de una línea transgénica AtCKX1 y semillas tipo silvestre. Tamaño de barra 1 mm.
- (B) Semillas de líneas transgénicas AtCKX1, AtCKX2, AtCKX3 y AtCKX4 y semillas tipo silvestre. Tamaño de barra 1 mm.
- 35 (C) Embriones maduros de Arabidopsis transgénica AtCKX1 y de una planta tipo silvestre. Tamaño de barra 200 µm. Los embriones fueron obtenidos a partir de semillas maduras que habían estado embebidas durante 12 horas en EtOH al 20%, extraídas de la cubierta de la semilla, lavadas con cloralhidrato y fotografiadas utilizando óptica Nomarski.
- (D) Plantones de Arabidopsis tipo silvestre (parte superior) y de AtCKX1 que expresan después de 4 días de la germinación.
- 40 (E) Acercamiento de D.

Figura 14: Peso de semilla de tipo silvestre y dos clones independientes para cada uno de los cuatro genes AtCKX investigados. Peso promedio obtenido por el análisis de cinco lotes diferentes de 200 semillas para cada clon.

Descripción detallada de la invención

Para obviar los problemas antes mencionados con el incremento de la biosíntesis de la auxina, se decidió seguir una metodología alternativa. Razonamos que la subregulación de los antagonistas biológicos de las auxinas podría evocar efectos similares o incluso superiores sobre el crecimiento de las raíces en comparación con niveles de auxina incrementados. Las acciones e interacciones hormonales son extremadamente complejas, pero tenemos la hipótesis de que las citoquinas podrían funcionar como antagonistas de las auxinas con respecto al crecimiento de las raíces. Los estudios hormonales sobre cultivos de tejidos vegetales han demostrado que la relación de la auxina versus la citoquinina es más importante para la organogénesis que los niveles absolutos de cada una de estas hormonas, lo cual indica en efecto que estas hormonas funcionan como antagonistas – al menos en ciertos procesos biológicos. Además, la formación de raíces laterales es inhibida por la aplicación exógena de citoquininas. De manera interesante, también la elongación de la raíz es afectada negativamente por el tratamiento con citoquinina, lo que sugiere que las citoquininas controlan tanto la ramificación de las raíces como el crecimiento de las raíces.

Junto con lo anterior, los datos de la literatura actual indican que los niveles de citoquinina incrementados afectan negativamente el crecimiento de las raíces, pero los mecanismos que subyacen bajo este proceso no están entendidos. Los sitios de síntesis de la citoquinina en la planta son las puntas de las raíces y los tejidos jóvenes de los brotes. Las concentraciones endógenas de las citoquininas están en el rango de nM. Sin embargo, puesto que su cuantificación es difícil, se necesita extraer cantidades de tejido bastante grandes y las concentraciones locales reales no son conocidas. También la compartimentación subcelular de las citoquininas no es conocida. Se piensa generalmente que la base libre y los ribósidos están localizados en el citoplasma y el núcleo, mientras que los glucósidos están localizados en la vacuola. Existen también diferentes citoquininas con estructura química ligeramente diferente. Como consecuencia, no se sabe si los efectos de las citoquininas exógenas podrían ser adscritos a un incremento en la concentración total de citoquinina o más bien a la competencia de otras formas de citoquininas originadas en las plantas (que difieren bien sea en la estructura, localización celular o subcelular) para enzimas receptoras, translocalizadoras, transportadoras y modificadoras.

Con el fin de probar la hipótesis de que los niveles de citoquinina en la raíz exceden en efecto el nivel óptimo para el crecimiento de las raíces, se clonaron genes novedosos que codifican citoquinina oxidasas (las cuales son enzimas que metabolizan la citoquinina) de *Arabidopsis thaliana* (designadas AtCKX) y fueron expresadas subsecuentemente bajo un promotor fuerte constitutivo en tabaco y *Arabidopsis* transgénicos. Los transformantes que mostraron la expresión de AtCKX ARNm y actividad incrementada de citoquinina oxidasa también manifestaron una formación potenciada del crecimiento de las raíces. También se observaron efectos negativos sobre el crecimiento de los brotes. Esto último está de acuerdo con la expresión constitutiva del gen de citoquinina oxidasa en estas plantas, que ilustra la importancia de una expresión confinada del gen de citoquinina oxidasa para propiedades de crecimiento generales de las plantas. El control de la actividad de la citoquinina oxidasa puede ser logrado utilizando promotores específicos para células, tejidos u órganos, puesto que la degradación de la citoquinina es un proceso limitado a los tejidos o células que expresan la proteína CKX, esto en contraste con las metodologías que se basan en la síntesis hormonal, como se explicó anteriormente.

Los efectos negativos observados de la expresión de la citoquinina oxidasa sobre el crecimiento de brotes demuestran que la citoquinina oxidasas son objetivos interesantes para el diseño de o para la selección de agentes químicos promotores del crecimiento. Tales agentes químicos deberían inhibir la actividad de la citoquinina oxidasa, preferiblemente no deberían ser transportados a la raíz y deberán ser degradados rápidamente en el suelo, de tal manera que la aplicación de estos agentes químicos no inhiban el crecimiento de las raíces. Las citoquininas también retardan la senescencia de las hojas, lo que significa que los efectos positivos incluirán también el crecimiento y mantenimiento de los tejidos fotosintéticos. Además, la observación de que las citoquininas retardan la senescencia, potencian el enverdecimiento de las hojas (contenido de clorofila) y la reducción del dominio apical de los brotes muestra que las estrategias basadas en la supresión de la actividad de CKX (tales como tecnología antisentido, de ribozimas, y cosupresión) en las partes aéreas de la planta podría dar como resultado una senescencia retardada, enverdecimiento potenciado de las hojas y ramificación incrementada.

De la misma forma, los efectos positivos observados de la expresión de la citoquinina oxidasa sobre el crecimiento de raíces demuestra que las citoquinina oxidasas son objetivos interesantes para el diseño o selección de herbicidas. Tales herbicidas podrían inhibir la actividad de la citoquinina oxidasa, preferiblemente no ser transportados al brote, y deberían ser solubles y relativamente estables en un solvente que pueda ser administrado a la raíz a través del suelo.

Estos efectos de la sobreexpresión de citoquinina oxidasa sobre el desarrollo y arquitectura de la planta eran hasta ahora desconocidos y, como consecuencia, la invención presentada y sus realizaciones no podían ser previstas.

Los efectos negativos observados sobre el crecimiento de los brotes demuestran que la manipulación de las citoquinina oxidasas también puede ser utilizada para obtener fenotipos de enanos. Los fenotipos enanos son particularmente útiles en cultivos comerciales tales como cereales y árboles frutales por ejemplo.

De acuerdo con la presente invención, también se ha descubierto sorprendentemente que las plantas transgénicas que sobreexpresan un gen de citoquinina oxidasa desarrollan semillas (incluyendo embriones) y cotiledones de tamaño y/o peso incrementados. Estos resultados son sorprendentes puesto que se esperaría que el contenido reducido de citoquinina estuviera asociado con un crecimiento reducido de los órganos.

- 5 La especificación describe el efecto positivo de la expresión de citoquinina oxidasa sobre el crecimiento y arquitectura de las plantas, y en particular sobre el crecimiento y arquitectura de raíces, tamaño y peso de las semillas, tamaño y peso de los embriones y tamaño y peso de los cotiledones. La familia de genes de citoquinina oxidasa contiene al menos seis miembros en *Arabidopsis* (véase ejemplos más abajo) y los presentes inventores han demostrado que hay deferencias cuantitativas en los efectos alcanzados con algunos de estos genes en plantas transgénicas. Se anticipa que los homólogos funcionales de las citoquininas oxidasa de *Arabidopsis* descritas pueden aislarse a partir de otros organismos, dada la evidencia de la presencia de actividad de citoquinina oxidasa en muchas plantas verdes (Hare y van Staden, *Plant Physiol* 91:128-136, 1994; Jones y Schreiber, *Reg Plant Growth* 23:123-134, 1997), así como en otros organismos (Armstrong, en citoquininas: Química, Activity and function Eds Mok y Mok, CRC Press, pp139-154, 1994). Por lo tanto, la secuencia de la citoquinina oxidasa, funcional en la invención, no necesita ser idéntica a las descritas aquí. Esta invención es particularmente útil para cultivos de cereales y cultivos de monocotiledóneas en general y genes de citoquinina oxidasa del ejemplo de trigo o maíz también pueden utilizarse (Morris et al., 1999; Rinaldi and Comandini 1999). Se prevé que otros genes con actividad de citoquinina oxidasa o con cualquier otra actividad metabólica (véase Zaz-ímalová et al., *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*, Hooykaas, Hall and Libbenga (Eds.), Elsevier Science, pp141-160, 1997) pueden usarse también para el propósito de esta invención. De la misma forma, los genes que codifican proteínas que incrementarían la actividad metabolizadora de la citoquinina endógena pueden usarse también para el mismo propósito. En principio, podrían obtenerse también fenotipos similares interfiriendo con genes que funcionan corriente abajo de la citoquinina tal como receptores o proteínas involucrados en las rutas de transducción de señales de la citoquinina.
- 10
- 15
- 20
- 25 Debe entenderse que el término "crecimiento de raíces" abarca todos los aspectos del crecimiento de las diferentes partes que constituyen el sistema radicular en diferentes etapas de su desarrollo, tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas. Debe entenderse que el crecimiento potenciado de la raíz puede ser el resultado de un crecimiento potenciado de una o más de sus partes incluyendo las raíces primarias, raíces laterales, raíces adventicias, etc.
- 30 Para propósitos de esta invención, debe entenderse que los incrementos en el peso de las semillas o en el tamaño de las semillas pueden inducir incrementos en el tamaño de uno o más de embrión, endospermo, aleuronas, y recubrimiento de las semillas. Además, los incremento en el tamaño y/o peso de los embriones puede incluir incrementos en diferentes órganos asociados con los mismos tales como, por ejemplo, cotiledones, hipocotilos, y raíces.
- 35 La presente especificación describe un método para estimular el crecimiento de las raíces y/o potenciar la formación de raíces laterales y/o adventicias y/o alterar el geotropismo de las raíces que comprende la expresión de la citoquinina oxidasa de las plantas o comprende la expresión de otra proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas en plantas o partes de plantas.
- 40 De acuerdo con una primera realización, la presente invención se relaciona con un método para incrementar el tamaño y/o peso de una semilla de una planta, incrementando el nivel o actividad de una citoquinina oxidasa en la planta o por expresión de otra proteína que reduzca el nivel de las citoquininas activas en una planta o partes de una planta. Preferiblemente, el nivel o actividad incrementados de una citoquinina oxidasa o expresión de otra proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas en una planta o parte de una planta se localiza en la semilla incluyendo tejidos o tipos de células diferentes de la semilla.
- 45 En otra realización, la presente invención se relaciona con un método para incrementar el tamaño y/o peso del embrión de la planta, incrementando el nivel o actividad de una citoquinina oxidasa en una planta o por expresión de otra proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas en una planta o en una parte de una planta. Preferiblemente, el nivel o actividad incrementados de una citoquinina oxidasa o expresión de otra proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas en una planta o parte de una planta se localiza en la semilla. Aún más preferiblemente, el nivel o actividad incrementados de una citoquinina oxidasa o expresión de otra proteína que reduce el nivel de citoquininas activas en una planta o parte de una planta se localiza en el embrión.
- 50
- 55 En aún otra realización, la presente invención se relaciona con un método para incrementar el tamaño y/o peso de un cotiledón de una planta incrementando el nivel o actividad de una citoquinina oxidasa en la planta o por expresión de otra proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas en una planta o parte de una planta. Preferiblemente, el nivel o actividad incrementados de una citoquinina oxidasa o expresión de otra proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas en una planta o partes de una planta se localiza en el cotiledón.

- 5 En el contexto de la presente invención debe entenderse que los términos “expresión” y/o “sobreexpresión” se utilizan de manera intercambiable y ambos se relacionan con una “expresión potenciada y/o ectópica” de una citoquinina oxidasa de una planta o cualquier otra proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas en plantas. Debe quedar claro que se entiende con esto una expresión potenciada de la citoquinina oxidasa de una planta así como la expresión “de novo” de citoquininas oxidadas de plantas o dichas otras proteínas. Alternativamente, dicha otra proteína potencia la actividad metabolizante de la citoquinina de una citoquinina oxidasa de una planta.
- 10 Debe entenderse adicionalmente que en el contexto de la presente invención la expresión “raíces laterales y/o adventicias” puede significar “raíces laterales y adventicias”, pero también “raíces laterales o adventicias”. El potenciamiento puede existir en la formación de raíces laterales o en la formación de raíces adventicias así como en la formación de ambos tipos de raíces no primarias, pero no necesariamente.
- Además, tal como se utiliza aquí, “incrementar el tamaño y/o peso de la semilla”, puede significar incrementar el tamaño y peso de las semillas, pero también el tamaño o el peso. Así, el potenciamiento puede existir en un incremento en el tamaño de la semilla o en el peso de la semilla o ambos. Interpretaciones similares deben aplicarse a “incrementar el tamaño y/o peso del embrión” y “incrementar el tamaño y/o peso de los cotiledones”.
- 15 Los términos “plantas” y “parte de una planta” se utilizan de manera intercambiable con los términos “plantas” y “partes de una planta”.
- 20 La presente especificación describe un método para estimular el crecimiento de raíces y/o potenciar la formación de raíces laterales o adventicias y/o alterar el geotropismo de las raíces y/o incrementar el rendimiento y/o potenciar el vigor temprano y/o modificar la relación raíz/brote y/o mejorar la resistencia al alojamiento y/o incrementar la tolerancia a la sequía y/o promover la propagación in vitro de explantes, que comprende la expresión de una citoquinina oxidasa de una planta o comprende la expresión de otra proteína que reduce el nivel de citoquininas activas en plantas o partes de plantas.
- 25 La presente especificación también describe un método para estimular el crecimiento de raíces que dan como resultado un incremento en la masa de las raíces por sobreexpresión de citoquinina oxidasa, u otra proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas en plantas o en partes de plantas, preferiblemente en raíces.
- 30 La producción más alta de biomasa de raíces debida a la sobreexpresión de secuencias promotoras del crecimiento tiene un efecto directo en el rendimiento y un efecto indirecto de producción de compuestos producidos por células de raíces o por células de raíces transgénicas o cultivos celulares de dichas células de raíces transgénicas. Un ejemplo de un compuesto interesante producido en cultivos de raíces es la Shikonina, cuyo rendimiento puede ser potenciado ventajosamente por dichos métodos.
- 35 La presente especificación también describe métodos para estimular el crecimiento de las raíces o para potenciar la formación de raíces laterales y/o adventicias o para alterar el geotropismo de las raíces o para incrementar el tamaño y/o peso de las semillas, o para incrementar el tamaño y/o peso de los embriones, o para incrementar el tamaño y/o peso de los cotiledones. Los métodos comprenden la expresión de un ácido nucleico que codifica una citoquinina oxidasa de una planta seleccionada del grupo consistente de:
- (a) ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ADN tal como la dada en cualquiera de SEQ ID NOs: 27, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 25, 26, 28 a 31, 33 o 34, o el complemento de las mismas,
- (b) ácidos nucleicos que comprenden las secuencias de ARN correspondientes a cualquiera de SEQ ID NOs: 27, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 25, 26, 28 a 31, 33 o 34, o los complementos de las mismas.
- 40 (c) ácidos nucleicos que hibridan específicamente a cualquiera de SEQ ID NOs: 27, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 25, 26, 28 o 31, 33 o 34, o a complementos de las mismas,
- (d) ácidos nucleicos que codifican una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 32 o 35, o el complemento de las mismas,
- 45 (e) ácidos nucleicos tal como se define en cualquiera de (a) hasta (d) caracterizados porque dicho ácido nucleico es ADN, ADN genómico, ADNc, ADN o ARN sintéticos en donde T es remplazado por U,
- (f) ácidos nucleicos que son degenerados hasta un ácido nucleico como los dados en cualquiera de SEQ ID NOs: 27, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 25, 26, 28 a 31, 33 o 34, o que son degenerados hasta un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) a (e) como resultado del código genético,
- 50 (g) ácidos nucleicos que son divergentes de un ácido nucleico que codifica una proteína como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, o 35 o que son divergentes de un ácido nucleico tal como el definido en cualquiera de (a) a (e), debido a diferencias en el uso de codones entre los organismos,

(h) ácidos nucleicos que codifican una proteína como se da en SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, o 35 o ácidos nucleicos como se define en (a) a (e) los cuales son divergentes debido a las diferencias entre alelos,

(i) ácidos nucleicos que codifican una proteína tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 35,

5 (j) fragmentos funcionales de ácidos nucleicos tal como se define en cualquiera de (a) hasta (i) que tienen la actividad biológica de una citoquinina oxidasa, y

(k) ácidos nucleicos que codifican una citoquinina oxidasa de planta,

o comprenden la expresión, preferiblemente en raíces, o en semillas (incluyendo partes de semillas tales como el embrión, endospermo, recubrimiento de la semilla o aleurona) o en cotiledones, de un ácido nucleico que codifica una proteína que reduce el nivel de citoquininas activas en plantas o en partes de plantas.

10 En la presente especificación los ácidos nucleicos que codifican novedosa citoquinina oxidasas de Arabidopsis thaliana han sido aislados y por primera vez, los presentes inventores han mostrado sorprendentemente que la expresión de las citoquininas oxidasas en plantas transgénicas o en partes de plantas transgénicas dan como resultado las características antes mencionadas relacionadas con las raíces y las semillas. Con el fin de que se efectúen las características relacionadas con las raíces, la expresión de las citoquininas oxidasas debe tener lugar

15 en raíces, preferiblemente bajo el control de un promotor específico para raíces. Con el fin de que las características relacionadas con las semillas sean efectuadas (incluyendo el embrión), la expresión de las citoquininas oxidasas debería tener lugar en semillas, preferiblemente bajo el control de un promotor específico para semillas. Un ejemplo de tal promotor específico para raíces se provee en SEQ ID NO: 36. Ejemplos de promotores específicos para semillas incluye pero no se limitan a los listados en la Tabla 4.

20 Con el fin de que las características relacionadas con el cotiledón sean efectuadas, la expresión de las citoquininas oxidasas debería tener lugar en los cotiledones, preferiblemente bajo el control de un promotor que se exprese preferencialmente en cotiledones.

25 Debe quedar claro que, aunque la especificación de la invención divulga en la sección de ejemplos nuevos genes y proteínas AtCKX, el concepto inventivo también se relaciona con el uso de otras citoquininas oxidasas aisladas de y expresadas en otras plantas, preferiblemente en las raíces y/o semillas y/o cotiledones de dichas otras plantas para obtener efectos similares en plantas como las descritas en la sección de ejemplos.

30 Por lo tanto, la presente especificación describe más en general el uso de un ácido nucleico que codifica una citoquinina oxidasa de una planta o codifica una proteína que reduce el nivel de citoquininas activas en plantas o en partes de plantas para estimular el crecimiento de las raíces o para potenciar la formación de raíces laterales o adventicias o para alterar el geotropismo de las raíces. La presente invención también se relaciona con el uso de un ácido nucleico que codifica una citoquinina oxidasa de una planta o codifica una proteína que reduce el nivel de citoquininas activas en plantas o en partes de plantas para incrementar el tamaño y/o peso de las semillas, o para incrementar el tamaño y/o peso de los embriones, o para incrementar el tamaño y/o peso de los cotiledones. Las citoquininas oxidasas preferidas para uso son codificadas por los ácidos nucleicos que codifican la citoquinina oxidasa tal como se definieron anteriormente y son codificadas por los ácidos nucleicos novedosos de la invención

35 tal como se define aquí más adelante.

La especificación divulga un ácido nucleico aislado que codifica a una proteína de planta novedosa que tiene actividad de citoquinina oxidasa seleccionada del grupo consistente de:

40 (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN de SEQ ID NOs: 29, 3, 5, 9, 26, 27 31, 33 o 34, o el complemento de los mismos,

(b) un ácido nucleico que comprende las secuencias de ARN correspondientes a cualquiera de SEQ ID NOs: 29, 3, 5, 9, 26, 27, 31, 33 o 34, o los complementos de los mismos,

(c) un ácido nucleico que hibrida específicamente a un ácido nucleico como el dado en cualquiera de SEQ ID NOs: 29, 3, 5, 9, 26, 27, 31, 33 o 34, o los complementos de los mismos,

45 (d) un ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos que comprende el polipéptido tal como se da en SEQ ID NO:32 y el cual es al menos 70% similar, preferiblemente al menos 75%, 80% u 85%, más preferiblemente al menos 90% o 95%, lo más preferiblemente al menos 99% similar a la secuencia de aminoácidos tal como se da en SEQ ID NO: 4,

50 (e) un ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos la cual es al menos 35% similar, preferiblemente 37%, 40%, 45%, 47% o 50% similar, más preferiblemente 55%, 60%, 65%, 70%, 75% u 80% similar, lo más preferiblemente 85%, 90% o 95% similar a la secuencia de aminoácidos tal como se da en SEQ ID NO: 6,

- (f) un ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos que es al menos 35% similar, preferiblemente 37%, 40%, 45%, 47% o 50%, más preferiblemente 55%, 60%, 65%, 70%, 75% u 80% similar, lo más preferiblemente 85%, 90% o 95% similar a la secuencia de aminoácidos tal como se da en SEQ ID NO: 10 o 35,
- 5 (g) un ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs; 4, 6, 10, 32 o 35,
- (h) un ácido nucleico que es degenerado a un ácido nucleico como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 29, 3, 5, 9, 26, 27, 33 o 34, el cual es degenerado hasta un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) hasta (g) como resultado del código genético,
- 10 (i) un ácido nucleico el cual es divergente de un ácido nucleico que codifica una proteína como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 4, 6, 10 o 35 o el cual es divergente de un ácido nucleico como se define en cualquiera de (a) hasta (g) debido a las diferencias en el uso de codones entre los organismos,
- (j) Un ácido nucleico que codifica una proteína como se da en SEQ ID NOs: 4, 6, 10 o 35, o un ácido nucleico como el definido en (a) hasta (g) el cual es divergente debido a las diferencias entre alelos,
- 15 (k) un ácido nucleico que codifica un fragmento inmunológicamente activo de una citoquinina oxidasa codificado por un ácido nucleico como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 29, 3, 5, 9, 26, 27, 31, 33 o 34, o un fragmento inmunológicamente activo de un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) hasta (j),
- (l) un ácido nucleico que codifica un fragmento funcional de una citoquinina oxidasa codificado por un ácido nucleico como el dado en cualquiera de SEQ ID NOs: 29, 3, 5, 9, 26, 27, 31, 33 o 34, o un fragmento funcional de un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) hasta (j), en donde dicho fragmento tiene la actividad biológica de una citoquinina oxidasa, y
- 20 (m) un ácido nucleico que codifica una proteína como se define en SEQ ID NOs: 4, 6, 10 o 35, con la condición de que dicho ácido nucleico no sea el ácido nucleico tal como se ha depositado bajo los siguientes números de acceso de Genbank: AC005917, AB024035, y AC023754.
- 25 La especificación divulga un ácido nucleico aislado el cual es ADN, ADNc, ADN genómico o ADN sintético, o ARN donde T es remplazado por U.
- La especificación divulga una molécula de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud que hibridan específicamente con o amplifican específicamente un ácido nucleico de la invención.
- 30 Formas de citoquinina diferentes pueden tener papeles diferentes en los diversos procesos de desarrollo. Así, los efectos diferenciales de CKX1, CKX2, CKX3 y CKX4 pueden relacionarse con efectos distintos en las reservas de diferentes citoquininas. Por ejemplo, CKX1 y CKX3 promueven principalmente la elongación y ramificación de las raíces, mientras que CKX2 y CKX4 estimulan primariamente la formación de raíces adventicias. Además, CKX1 y CKX3 incrementan el tamaño y peso de la semilla hasta un grado mayor que CKX2 y CKX4. Sin estar ceñidos a un modo particular de acción, este efecto diferencial en las reservas de citoquinas puede resultar de algunas diferencias
- 35 en la especificidad del sustrato o de compartimentación diferencial de la citoquinina oxidadas en la célula (predichas como mitocondriales para CKX1 y CKX2, a la vez que extracelulares para CKX2, CKX4, CKX5 y CKX6).
- La especificación describe adicionalmente un vector que comprende un ácido nucleico como el descrito. Dicho vector puede ser un vector de expresión en donde el ácido nucleico esta enlazado de manera operativa a una o más secuencias de control que permiten la expresión de dicha secuencia en células huésped procarióticas y/o eucarióticas.
- 40 Debe entenderse que para la expresión de los genes de oxidasa divulgados en monocotiledóneas, debe utilizarse una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la secuencia de ADNc para evitar la división errónea de intrones en monocotiledones. Las secuencias de ADNc preferidas para ser expresadas en monocotiledones tienen una secuencia de ácido nucleico tal como la representada en cualquiera de SEQ ID NOs 25 a 30 y 34.
- 45 La especificación describe una célula huésped que contiene cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos o vectores tal como se describieron. Tal célula huésped se escoge del grupo que comprende células bacterianas, de insectos, fúngicas, de plantas o animales.
- La especificación también describe un polipéptido aislado codificable con un ácido nucleico tal como se describe, o un homólogo derivado del mismo, o un fragmento inmunológicamente activo o funcional del mismo. Los polipéptidos tal como se describen comprenden las secuencias de aminoácidos tal como se representan en cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 32 y 35, o un homólogo derivado de los mismos, o un fragmento inmunológicamente activo y/o funcional del mismo. La especificación también describe un polipéptido que tiene una secuencia de
- 50

aminoácidos como la que se da en SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10 12 o 35, o un homólogo o un derivado del mismo, o un fragmento inmunológicamente activo y/o funcional del mismo. Fragmentos funcionales preferidos de los mismos son aquellos fragmentos que están desprovistos de su péptido de señalización.

5 La especificación también describe un método para producir un polipéptido de la invención que comprende cultivar una célula huésped tal como se describe bajo condiciones que permiten la expresión del polipéptido y la recuperación del polipéptido producido a partir del cultivo.

La especificación también describe un anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido tal como se describe o un epítipo específico del mismo.

10 La especificación describe adicionalmente un método para la producción de plantas, células de plantas o tejidos de plantas transgénicos que comprende la introducción de una molécula de ácido nucleico divulgada en un formato expresable o en un vector divulgado en dicha planta, célula de la planta o tejido de la planta.

La especificación también describe un método para la producción de plantas, células de plantas o tejidos de plantas alterados que comprende la introducción de un polipéptido divulgado directamente en una célula, un tejido o un órgano de dicha planta.

15 La especificación también divulga un método para filtrar la expresión de un polipéptido descrito que comprende la introducción de una molécula de ácido nucleico divulgada enlazado operativamente con una o más secuencias de control o un vector divulgado de manera estable en el genoma de una célula de planta. La especificación describe adicionalmente un método tal como se describe más arriba que comprende adicionalmente regenerar una planta a partir de dicha célula de planta.

20 La especificación también describe una célula de planta transgénica que comprende una secuencia de ácido nucleico divulgada la cual está enlazada operativamente a elementos reguladores que permiten la transcripción y/o expresión de dicho ácido nucleico en células de plantas o que es obtenible por un método como el explicado anteriormente.

25 La especificación también describe una célula de planta transgénica tal como la descrita anteriormente en donde el ácido nucleico divulgado está integrado de manera estable en el genoma de dicha célula de planta.

30 La especificación describe también una planta transgénica o un tejido de planta que comprende células de planta tal como se describen aquí y también a una parte cosechable de dicha planta transgénica, preferiblemente seleccionada del grupo consistente de semillas, hojas, frutos, cultivos de tallos, raíces, tubérculos, rizomas y bulbos. La invención también se relaciona con la progenie derivada de cualquiera de dichas plantas o partes de plantas transgénicas.

La especificación también describe un método para estimular el crecimiento de las raíces que comprende la expresión de un ácido nucleico divulgado o que comprende la expresión de otra proteína que reduce el nivel de las citoquininas activas en plantas o partes de plantas.

35 En otro aspecto de la invención, se provee un método para incrementar el tamaño y/o peso de la semilla. El método comprende incrementar el nivel o actividad de una citoquinina oxidasa en una planta o incrementar el nivel o actividad de una proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas en una planta o en una parte de una planta, preferiblemente semillas.

40 También pueden incrementarse diversas partes (órganos) de la semilla en tamaño y/o peso, tal como, por ejemplo, embrión, endospermo, recubrimiento de la semilla o aleurona. Por ejemplo, de acuerdo con la presente invención, se provee un método para incrementar el tamaño y/o peso del embrión. El método comprende el incremento en el nivel o actividad de una citoquinina oxidasa en una planta o en el incremento del nivel o actividad de una proteína que reduzca el nivel de las citoquininas activas en una planta o parte de una planta, preferiblemente en embriones. En aún otro aspecto de la invención, se provee un método para incrementar el tamaño y/o peso de los cotiledones. El método comprende incrementar el nivel o actividad de una citoquinina oxidasa en una planta o incrementar el nivel o actividad de una proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas en una planta o parte de una planta, preferiblemente cotiledones.

50 De acuerdo con los métodos de incremento del tamaño y/o peso de la semilla, hay un incremento resultante en la velocidad de crecimiento de las semillas o un incremento en el vigor temprano. También se obtienen incrementos en rendimiento. De la misma forma, de acuerdo con los métodos para incrementar el tamaño y/o peso de los embriones, y tamaño y/o peso de los cotiledones, hay un incremento resultante en la velocidad de crecimiento de las semillas o un incremento en el vigor temprano. En muchos casos, se obtiene también incrementos en rendimiento. Los incrementos en el crecimiento de las semillas o del vigor temprano se asocian frecuentemente con tolerancia incrementada al estrés. Por ejemplo, el desarrollo más rápido de plántones, incluyendo los sistemas de raíces de los

de plantones por germinación es crítico para la supervivencia particularmente bajo condiciones adversas tales como sequía.

5 Cualquier secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de citoquinina oxidasa puede utilizarse en los métodos de la invención. Por ejemplo, cualquiera de las secuencias diversas provistas aquí que codifican un polipéptido con actividad de citoquinina oxidasa pueden utilizarse en los métodos para incrementar el tamaño y/o peso de semillas, embriones o cotiledones.

10 Preferiblemente, se producen plantas transgénicas que expresan un ácido nucleico tal como el definido en cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 5, 25, o 27 o un ortólogo de dicho ácido nucleico. Preferiblemente, el ortólogo se deriva de una especie relacionada de la planta transgénica. Aún más preferiblemente, el ortólogo es específico (nativo o endógeno) a las especies de la planta transgénica.

15 Tal como se describió anteriormente, los promotores que controlan la expresión específica o preferencialmente pueden ser usados en los métodos de la invención. Así, cuando se desean incrementos en tamaño o peso de semillas, puede utilizarse un promotor específico para semillas. Cuando se desean incrementos en tamaño y peso de embriones, puede usarse un promotor específico para embriones. Cuando se desean incrementos en tamaño o peso de cotiledones, se prefiere un promotor que controle la expresión en cotiledones. Tales promotores son bien conocidos, ampliamente disponibles y se listan aquí por ejemplo en la Tabla 4.

En otra realización, la invención se relaciona con un método para incrementar el tamaño o peso de la semilla, o ambos, comprendiendo dicho método la expresión de un ácido divulgado o comprendiendo la expresión de otra proteína que reduzca el nivel de la actividad de las citoquininas en plantas o partes de plantas.

20 En aún otra realización, la invención se relaciona con un método para incrementar el tamaño o peso de un embrión, o ambos, comprendiendo dicho método la expresión de un ácido divulgado o comprendiendo la expresión de otra proteína que reduzca el nivel de las citoquininas activas en plantas o partes de plantas.

25 En aún otra realización, la invención se relaciona con un método para incrementar el tamaño de los cotiledones que comprende la expresión de un ácido nucleico divulgado o comprende la expresión de otra proteína que reduzca el nivel de las citoquininas en plantas o partes de plantas. La expresión localizada de un gen sujeto de citoquinina oxidasa o parte del mismo, o de otra proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas en plantas o partes de plantas lleva a un crecimiento potenciado de los cotiledones. En especies que tienen cotiledones como órganos de almacenamiento, tal crecimiento potenciado de los cotiledones lleva a rendimientos potenciados y/o a un rendimiento potenciado del crecimiento de los plantones. Adicionalmente en este aspecto, los carbohidratos, lípidos y proteínas son todos almacenados dentro de las semillas y son metabolizados durante la germinación con el fin de proveer energía y metabolitos durante el crecimiento temprano de la planta. El tamaño de las semillas está asociado frecuentemente con el vigor temprano, puesto que semillas más grandes contienen más carbohidratos, lípidos y proteínas y así confieren un crecimiento más rápido. Así, los métodos de la presente invención llevan a un crecimiento más rápido de los plantones. Tal vigor temprano está asociado con una tolerancia mejorada al estrés.

30 Por ejemplo, el desarrollo más rápido de un sistema radicular de una planta es crítico para la supervivencia, particularmente bajo condiciones adversas, tales como sequía. El vigor temprano también está relacionado con el rendimiento potenciado y en tiempo acortado de la floración.

35 Una célula de una planta o un cultivo de tejidos es un cultivo producido artificialmente de células de la planta o tejidos de la planta que crece en un medio especial, bien sea líquido o sólido, el cual provee a estas células o tejidos vegetales con todos los requerimientos necesarios para el crecimiento y/o producción de ciertos compuestos. Los cultivos de células y/o tejidos vegetales pueden utilizarse para la propagación rápida de plantas y para la producción de plantas transgénicas para nombrar unos pocos ejemplos. La formación de las raíces puede ser difícil para algunos explantes o bajo algunas condiciones en dichos cultivos y la expresión de un gen de citoquinina oxidasa en dichas células o tejidos vegetales cultivados puede utilizarse para potenciar la formación de raíces. El cultivo de células y/o tejidos vegetales puede utilizarse para la producción industrial de compuestos valiosos. Los compuestos de producción posibles son agentes farmacéuticos, pesticidas, pigmentos, cosméticos, perfumes, aditivos para alimentos, etc. Un ejemplo de tal producto es la shikonina, la cual es producida por las raíces de la planta *Lithospermum erythrorhizon*. Un ejemplo de un cultivo de tejido vegetal es un cultivo de raíces vellosas, el cual es una masa producida artificialmente de raíces vellosas. Las raíces de *L. erythrorhizon* son difíciles de recolectar en gran número y preparando cultivos de raíces vellosas, la shikonina como producto final puede ser preparada industrialmente a una velocidad más rápida de lo que ocurriría normalmente. Como se divulga aquí, la expresión de la citoquinina oxidasa potencia el crecimiento y desarrollo de las raíces y por lo tanto puede ser utilizada ventajosamente en dichos procedimientos de cultivos de células y tejidos vegetales. La especificación describe un método para estimular el crecimiento y desarrollo de raíces que comprende la expresión de un ácido nucleico que

40

45

50

55

codifica una citoquinina oxidasa de planta, preferiblemente una citoquinina oxidasa divulgada, en un cultivo de célula o tejido de planta transgénica que comprende dichas células de planta transgénica.

- La especificación bien describe un método para potenciar la formación de raíces laterales o adventicias que comprende la expresión de un ácido nucleico de la invención o comprende la expresión de otra proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas en plantas o partes de plantas.
- 5 La especificación también describe un método para alterar el geotropismo de una raíz que comprende alterar la expresión de un ácido nucleico de la invención o comprende la expresión de otra proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas de plantas o partes de plantas.
- 10 La especificación también describe métodos para potenciar el vigor temprano y/o para modificar la relación raíces/brotos y/o para mejorar la resistencia al alojamiento y/o para incrementar la tolerancia a la sequía y/o para promover la propagación in vitro de explantes que comprende la expresión de un ácido nucleico divulgado que comprende la expresión de otra proteína que reduce el nivel de las citoquininas activas en plantas o partes de plantas.
- 15 La especificación describe adicionalmente métodos para incrementar el tamaño de la raíz o el tamaño del meristema de la raíz que comprende la expresión de un ácido nucleico divulgado o comprende la expresión de otra proteína que reduce el nivel de citoquininas activas en plantas o partes de plantas, preferiblemente en raíces. La especificación describe un método para incrementar el tamaño del meristema de brote que comprende la subregulación de la expresión de un ácido nucleico de la invención, preferiblemente en brotes.
- 20 La especificación también describe un método para retardar la senescencia de las hojas que comprende la subregulación de la expresión de cualquiera de las citoquinina oxidasas en hojas, preferiblemente en hojas senescentes. También la especificación describe un método para alterar la senescencia de las hojas que comprende la expresión de una de las citoquinina oxidasas en la senescencia de las hojas.
- 25 La especificación también describe métodos para incrementar el espesor de las hojas que comprende la expresión de un ácido nucleico divulgado o comprende la expresión de otra proteína que reduzca el nivel de citoquininas en plantas o partes de plantas, preferiblemente en hojas.
- 30 La especificación también describe un método para reducir el tamaño de los vasos que comprende la expresión de un ácido nucleico divulgado o comprende la expresión de otra proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas en plantas o partes de plantas, preferiblemente en vasos.
- La especificación describe adicionalmente un método para incrementar el tamaño del vaso que comprende la subregulación de la expresión de un ácido nucleico divulgado en plantas o partes de plantas.
- 35 La especificación también describe un método para mejorar la verticalidad de los plantones que comprende la expresión de un ácido divulgado o que comprende la expresión de otra proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas en plantones.
- 40 Adicionalmente, la especificación describe cualquiera de los métodos descritos anteriormente, llevando dicho método a un incremento en rendimiento.
- 45 La especificación describe adicionalmente cualquiera de los métodos en donde dicha expresión de dicho ácido nucleico ocurra bajo el control de un promotor constitutivo fuerte. Con respecto a aquellos aspectos que tiene efectos sobre las raíces de las plantas, tales como, por ejemplo, métodos para estimular el crecimiento de las raíces, potenciar la formación de raíces laterales o adventicias, o para alterar el geotropismo de las raíces, preferiblemente, la expresión de un ácido nucleico objeto preferiblemente ocurre bajo el control de un promotor que se expresa preferencialmente en las raíces. En la Tabla 5 se incluye una lista no exhaustiva de los promotores específicos para raíces. Un promotor específico para ser utilizado en los métodos de la especificación es el promotor homólogo de la raíz clavata, que tiene una secuencia como la dada en SEQ ID NO: 36.
- 50 Con respecto a aquellos aspectos de la invención que tienen efectos sobre las semillas de las plantas tales como, por ejemplo, métodos para incrementar el tamaño o peso de las semillas, tamaño o peso de los embriones, o que tienen efectos sobre los cotiledones de las plantas tales como métodos para incrementar el tamaño o peso de los cotiledones, la expresión de un ácido nucleico objeto ocurre bajo el control de un promotor que se expresa específicamente en semillas. Un promotor específico para semillas puede ser uno que se exprese en todos los órganos de las semillas o uno que permita una preferencia en la expresión en uno o más órganos o tejidos tales como el embrión, endospermo, o aleurona. Ejemplos de tales promotores se definen aquí en la Tabla 4.
- La especificación también describe un método para modificar el desarrollo de la célula y/o modificar el desarrollo de la planta y/o modificar la morfología de la planta y/o modificar la bioquímica de la planta y/o modificar la fisiología de la planta y/o modificar la velocidad de progresión del ciclo celular que comprende la medicación de la expresión en células, tejidos u órganos particulares de una planta, de un ácido nucleico divulgado.

- La especificación también describe un método para un crecimiento potenciado, y/o un rendimiento incrementado y/o una senescencia alterada de una célula, tejido y/o órgano de una planta y/ o una frecuencia incrementada de formación de órganos laterales en una planta, comprendiendo la expresión ectópica de un ácido nucleico divulgado.
- 5 La especificación también describe un método para promover y extender la actividad de división celular en células en condiciones adversas de crecimiento y/o bajo estrés, comprendiendo la expresión ectópica de una secuencia de ácido nucleico divulgado.
- La especificación también describe un método para identificar y obtener proteínas, interactuar con un polipéptido divulgado que comprende una prueba de selección donde se utiliza uno de los divulgados.
- 10 La especificación también describe un método para identificar y obtener proteínas que interactúan con un polipéptido divulgado que comprende una prueba de selección de dos híbridos en donde se usan un polipéptido divulgado como cebo y una biblioteca de ADNc como presa.
- La especificación describe adicionalmente un método para modular la interacción entre un polipéptido divulgado y asociados de interacción con la proteína mediante un método tal como el descrito anteriormente.
- 15 La especificación se relaciona con un método para identificar y obtener compuestos que interactúan con un polipéptido divulgado que comprende las etapas de:
- (a) proveer un sistema de dos híbridos en donde un polipéptido divulgado y un asociado proteínico interactuante obtenibles por el método como se describió anteriormente,
- (b) interactuar dicho compuesto con el complejo formado por los polipéptidos expresados tal como se define en a), y,
- 20 (c) llevar a cabo mediciones (en tiempo real) de la interacción de dicho compuesto con dicho polipéptido o el complejo formado por los polipéptidos expresados tal como se definen en a).
- La especificación describe adicionalmente un método para identificar compuestos o mezclas de compuestos que se enlazan específicamente a un polipéptido divulgado que comprende:
- (a) combinar un polipéptido divulgado con dicho compuesto o mezclas de compuestos bajo condiciones adecuadas para permitir la formación de complejos, y,
- 25 (b) detectar la formación de complejos, en donde la presencia de un complejo identifica un compuesto o mezcla que se enlaza específicamente a dicho polipéptido.
- La especificación también describe un método como el descrito anteriormente en donde dicho compuesto o mezcla inhibe la actividad de dicho polipéptido divulgado y puede ser utilizado para el diseño racional de agentes químicos.
- 30 La especificación describe el uso de un compuesto o mezcla identificado por medio de un método tal como se describió anteriormente como regulador del crecimiento vegetal o herbicida.
- La especificación también describe un método para la producción de una composición reguladora del crecimiento vegetal o herbicida que comprende las etapas de los métodos de selección de compuestos descritos anteriormente y la formulación de los compuestos obtenidos a partir de dichas etapas en una forma adecuada para la aplicación en agricultura o en el cultivo de células o tejidos vegetales.
- 35 La especificación también describe un método para incrementar la ramificación que comprende la expresión de un ácido nucleico divulgado en plantas o partes de plantas, preferiblemente en tallos o brotes axilares.
- La especificación también describe un método para mejorar la resistencia al alojamiento que comprende la expresión de un ácido nucleico de la invención en plantas o partes de plantas, preferiblemente en tallos o brotes axilares.
- 40 La especificación también describe un método para el diseño de o selección de agentes químicos promotores del crecimiento o herbicidas que comprende el uso del ácido nucleico divulgado o de un vector divulgado.
- La especificación describe el uso de una molécula de ácido nucleico divulgado, un vector divulgado o un polipéptido divulgado para incremento del rendimiento.
- 45 La especificación también describe el uso de una molécula de ácido nucleico divulgada, un vector divulgado o un polipéptido divulgado para la estimulación del crecimiento de la raíz.

La especificación también describe el uso de una molécula de ácido nucleico divulgado, un vector divulgado o un polipéptido divulgado para potenciar la formación de raíces laterales o adventicias.

La especificación también describe el uso de una molécula de ácido nucleico divulgado, un vector divulgado o un polipéptido divulgado para alterar el geotropismo de la raíz.

- 5 La especificación también describe el uso de una molécula de ácido nucleico divulgado, un vector divulgado o un polipéptido divulgado para incrementar al menos uno de tamaño de semilla, peso de semilla, tamaño del embrión, peso de embrión, tamaño de cotiledón, y peso de cotiledón.

- 10 La especificación describe adicionalmente el uso de una molécula de ácido nucleico divulgado, un vector divulgado o un polipéptido divulgado para potenciar el vigor temprano y/o para modificar la relación raíces/brotes y/o para mejorar la resistencia al alojamiento y/o para incrementar la tolerancia a la sequía y/o para promover la propagación in vitro de explantes.

La especificación también describe el uso de una molécula de ácido nucleico divulgado, un vector recombinante divulgado o un polipéptido divulgado para modificar el desarrollo de una planta y/o para modificar la morfología de una planta y/o para modificar la bioquímica de una planta y/o para modificar la fisiología de una planta.

- 15 La especificación describe una composición de diagnóstico que comprende al menos una molécula de ácido nucleico descrita, un vector divulgado, un polipéptido divulgado o un anticuerpo divulgado.

- 20 La presente especificación también describe el uso de material de raíces transgénicas que tiene un crecimiento y desarrollo de raíz potenciado debido a la expresión de una citoquinina oxidasa en procedimientos de injerto con un injerto para producir una planta o árbol con características agrícolas u hortícolas mejoradas. El injerto puede ser transgénico o no transgénico. Las características específicas previstas son aquellas conferidas por los sistemas de raíces e incluyen anclado mejorado de la planta/árbol en el suelo y/o absorción mejorada de agua dando como resultado por ejemplo en una tolerancia mejorada a la sequía y/o una absorción mejorada de nutrientes del suelo y/o un transporte mejorado de sustancias orgánicas a través de la planta y/o una secreción potenciada de sustancias en el suelo tales como por ejemplo fitosideróforos y/o respiración mejorada y/o resistencia mejorada a enfermedades y/o rendimiento mejorado. Una ventaja de utilizar raíces transformadas AtCKX para injertos, además de su sistema de raíces potenciado, es la senescencia retrasada de las hojas en el injerto, tal como se divulga aquí (véase Figura 12 A). Plantas o árboles preferidos para esta realización particular incluyen plantas o árboles que no crezcan bien con sus propias raíces y que se injertan en localizaciones cultivadas tales como variedades comercialmente explotables de viñas, cítricos, albaricoques, almendras, ciruelas, melocotones, manzanas, peras, cerezas, nueces, higos, avellanas y níspero del Japón.

- 35 Como se mencionó *supra*, las auxinas y las citoquininas actúan como antagonistas en ciertos procesos biológicos. Por ejemplo, la relación citoquinina/auxina regula la producción de raíces y brotes, teniendo una alta concentración de auxina el efecto de generar raíces organizadas y una alta concentración de citoquininas teniendo como efecto la producción de brotes. Tal como se divulgó en esta especificación, la expresión de las citoquinina oxidasas en tabaco y Arabidopsis da como resultado un desarrollo de raíces potenciado consistente con los efectos potenciados de la auxina. Las auxinas también están involucradas en el desarrollo de los frutos. El tratamiento de partes femeninas de la flor con auxina da como resultado el desarrollo de frutos partenocárpicas en algunas especies de plantas. El desarrollo de frutos partenocárpicas ha sido manipulado genéticamente en varias plantas de cultivo hortícola a través de la biosíntesis incrementada de auxinas en los órganos reproductores femeninos (WO0105985).

- 40 Por lo tanto, esta especificación describe un método para introducir las características partenocárpicas en plantas, consistiendo dicho método en la subregulación de la expresión de una o más de citoquinina oxidasas o de otra proteína que reduzca el nivel de citoquininas activas en plantas o partes de plantas, preferiblemente en los órganos reproductores femeninos tales como placenta, óvulos y tejidos derivados de la misma. La región promotora DefH9 de *Antirrhinum majus* o de uno de sus homólogos, la cual confiere una alta especificidad en la expresión en placenta y óvulos, puede ser utilizada para este propósito.

- 45 Los experimentados en la técnica entenderán que la invención descrita aquí está sujeta a variaciones y modificaciones diferentes a las descritas específicamente. Debe entenderse que la invención descrita aquí incluye todas tales variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, tales composiciones y compuestos citados o indicados en esta especificación, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones de cualquiera o más de dichas etapas o características.

- 50 La presente invención es aplicable a cualquier planta, en particular a plantas monocotiledóneas y plantas dicotiledóneas que incluyen una legumbre para alimentación o forraje, plantas ornamentales, cultivos para alimentación, árboles o arbustos seleccionados de la lista que comprende *Acacia spp.*, *Acer spp.*, *Actinidia spp.*, *Aesculus spp.*, *Agathis australis*, *Albizia amara*, *Alsophila tricolor*, *Andropogon spp.*, *Arachis spp.*, *Areca catechu*, *Astelia fragrans*, *Astragalus cicer*, *Baikiaea plurijuga*, *Betula spp.*, *Brassica spp.*, *Bruguiera gymnorhiza*, *Burkea africana*, *Butea frondosa*, *Cadaba farinosa*, *Calliandra spp.*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Capsicum spp.*,

- Cassia spp., Centroema pubescens, Chaenomeles spp., Cinnamomum cassia, Coffea arabica, Colophospermum mopane, Coronilla varia, Cotoneaster serotina, Crataegus spp., Cucumis spp., Cupressus spp., Cyathea dealbata, Cydonia oblonga, Cryptomeria japonica, Cymbopogon spp., Cynthea dealbata, Cydonia oblonga, Dalbergia monetaria, Davallia divaricata, Desmodium spp., Dicksonia squarosa, Diheteropogon amplexens, Dioclea spp., Dolichos spp., Dorycnium rectum, Echinochloa pyramidalis, Ehrharta spp., Eleusine coracana, Eragrestis spp., Erythrina spp., Eucalyptus spp., Euclea schimperi, Eulalia villosa, Fagopyrum spp., Feijoa sellowiana, Fragaria spp., Flemingia spp, Freycinetia banksii, Geranium thunbergii, Ginkgo biloba, Glycine javanica, Gliricidia spp, Gossypium hirsutum, Grevillea spp., Guibourtia coleosperma, Hedysarum spp., Hemarthis altissima, Heteropogon contortus, Hordeum vulgare, Hyparrhenia rufa, Hypericum erectum, Hyperthelia dissoluta, Indigo incarnata, Iris spp., Leptarrhena pyrolifolia, Lespediza spp., Lettuce spp., Leucaena leucocephala, Loudetia simplex, Lotonus bainesii, Lotus spp., Macrotiloma axillare, Malus spp., Manihot esculenta, Medicago sativa, Metasequoia glyptostroboides, Musa sapientum, Nicotianum spp., Onobrychis spp., Ornithopus spp., Oryza spp., Peltophorum africanum, Pennisetum spp., Persea gratissima, Petunia spp., Phaseolus spp., Phoenix canariensis, Phormium cookianum, Photinia spp., Picea glauca, Pinus spp., Pisum sativum, Podocarpus totara, Pogonarthria fleckii, Pogonarthria squarosa, Populus spp., Prosopis cineraria, Pseudotsuga menziesii, Pterolobium stellatum, Pyrus communis, Quercus spp., Raphiolepis umbellata, Rhopalostilis sapida, Rhus natalensis, Ribes grossularia, Ribes spp., Robinia pseudoacacia, Rosa spp., Rubus spp., Salix spp., Schyzachyrium sanguineum, Sciadopitys verticillata, Sequoia sempervirens, Sequoiadendron giganteum, Sorghum bicolor, Spinacia spp., Sporobolus fimbriatus, Stiburus alopecuroides, Stilosanthos humilis, Tadehagi spp, Taxodium distichum, Themeda triandra, Trifolium spp., Triticum spp., Tsuga heterophilla, Vaccinium spp., Vicia spp. Vitis vinifera, Watsonia pyramidata, Zantedeschia aetiopica, Zea mays, amaranto, alcachofa, espárragos, brócoli, repollitas de bruselas, repollo, canola, zanahoria, coliflor, apio, coles, linazaberja, lentejas, colza, oca, cebollas, patatas, arroz, soja, heno, remolacha de azúcar, caña de azúcar girasol, tomates, calabazas y te, entre otros, o la semilla de cualquier planta citada específicamente más arriba o un cultivo de tejidos, células u órganos de cualquiera de las especies anteriores.*
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25 A través de esta especificación, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprende", y sus variaciones tales como "comprenden" y "que comprende", se entenderán con la implicación de la inclusión del entero establecido o etapa o grupos de enteros o etapas pero no la exclusión de ningún entero o etapa o grupo de enteros o etapas.
- 30 Tal como se utiliza aquí, el término "derivado de" debe entenderse para indicar que un entero particular o grupo de enteros se ha originado de las especies identificadas, pero no ha sido obtenido de manera necesaria directamente de la fuente especificada.
- 35 Los términos "proteína (s)", "péptido (s)" u "oligopéptido (s)", cuando se utilizan aquí se refieren a aminoácidos en una forma polimérica de cualquier longitud. Dichos términos también incluyen modificaciones conocidas de aminoácidos tales como formación de puentes de disulfuro, cisteinilación, oxidación, glutationilación, metilación, acetilación, farnesilación, biotinilación, estearoilación, formilación, adición de ácido lipoico, fosforilación, sulfatación, , ubiquitinación miristoilación, palmitoilación, geranilgeranilación, ciclización (por ejemplo, formación de ácido piroglutámico), oxidación, desamidación, deshidratación, glicosilación (por ejemplo, pentosas, hexosaminas, N-acetilhexosaminas, desoxihexosas, hexosas, ácido siálico, etc.) y acilación, así como residuos de aminoácidos de origen no natural, residuos de L-aminoácidos y residuos de D-aminoácidos.
- 40 "Homólogos" de una proteína divulgada son aquellos péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que contienen sustituciones eliminaciones y/o adiciones de aminoácidos con respecto a la dicha proteína con respecto a la cual son un homólogo, sin alterar una o más de sus propiedades funcionales, en particular sin reducir la actividad del resultado. Por ejemplo, un homólogo de dicha proteína consistirá de una secuencia de aminoácidos bioactiva variante de dicha proteína. Para producir tales homólogos, los aminoácidos presentes en la dicha proteína pueden ser reemplazados por otros aminoácidos que tengan propiedades similares, por ejemplo hidrofobicidad, hidrofiliidad, momento hidrófobo, antigenicidad, propensión a formar o romper estructuras en hélice α o estructuras en lámina β y así sucesivamente. Una revisión de las propiedades físicas y químicas de los aminoácidos se da en la Tabla 1.
- 45
- 50 Las variantes de sustitución de una proteína divulgada son aquellas en las cuales al menos un residuo en dicha secuencia de aminoácidos de dicha proteína ha sido eliminado y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de residuos individuales, pero pueden ser aglomeradas dependiendo de las restricciones funcionales colocadas en el polipéptido; las inserciones normalmente serán del orden de aproximadamente 1 - 10 residuos de aminoácidos y las eliminaciones variarán desde aproximadamente 1 - 20 residuos. Preferiblemente las sustituciones de aminoácidos comprenderán sustituciones de aminoácidos conservadoras, tales como los descritos supra.
- 55

Tabla 1. Propiedades de aminoácidos de origen natural

Propiedades de Carga/ Hidrofobicidad	Grupo lateral	Aminoácido
No polar hidrófoba	Alifático Alifático, con contenido de S Aromático Imino	ala, ile, leu, val met phe, trp pro
polar no cargado	Alifático Amida Aromático Hidroxilo Sulfhidrilo	gly asn, gln tyr ser, thr cys
Cargado positivamente	Básico	arg, his, lys
Cargado negativamente	Ácido	asp, glu

5 Las variantes de la secuencia de inserción de aminoácidos de una proteína divulgada de la invención son aquellas en las cuales uno o más residuos de aminoácidos son introducidos en un sitio predeterminado en dicha proteína. Las inserciones pueden comprender fusiones amino terminales y/o carboxiterminales así como inserciones intrasecuencia de aminoácidos individuales o múltiples. En general, las inserciones dentro de la secuencia de aminoácidos serán más pequeñas que las fusiones amino o carboxilo terminales, del orden de aproximadamente 1 a 10 residuos. Ejemplos de proteínas o péptidos de fusión amino o carboxilo terminales incluyen el dominio de enlazamiento o dominio de activación de un activador transcripcional tal como se utiliza en un sistema de dos híbridos, proteínas de recubrimiento de fagos, etiqueta de (histidina)₆, glutatona S-transferasa, proteína A, proteína de enlazamiento a maltosa, dihidrofolato reductasa, epítipo tag•100 (EETARFQPGYRS) epítipo c-myc (EQKLISEEDL), epítipo FLAG® (DYKDDDK), lacZ, CMP (péptido de enlazamiento a la calmodulina), epítipo HA (YPYDVP-DYA), epítipo proteína C (EDQVDPRLIDGKI) y epítipo VSV (YTDIEMNRLGK).

10 15 Las variantes de eliminación de una proteína de la invención se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de dicha proteína.

Las variantes de aminoácidos de una proteína divulgada pueden hacerse fácilmente utilizando técnicas de síntesis de péptidos bien conocidas en el arte, tales como la síntesis de péptidos en fase sólida y similares, o por manipulaciones de ADN recombinante. La manipulación de secuencias de ADN para producir proteínas variantes que manifiesten las variantes de sustitución, inserción o eliminación son bien conocidas en el arte. Por ejemplo, las técnicas para hacer mutaciones por sustituciones en sitios predeterminados en ADN que tienen secuencia conocida son bien conocidas para los expertos en la técnica, tales como la mutagénesis M13, el conjunto de mutagénesis in vitro del gen T7 (USB, Cleveland, OH), el conjunto de mutagénesis de QuickChange Site Directed (Stratagene, San Diego, CA), mutagénesis mediada por PCR dirigida al sitio u otros protocolos de mutagénesis dirigidas al sitio.

20 25 En la presente especificación los porcentajes de "identidad" y/o "similitud" entre secuencias de ADN y/o proteínas se calculan utilizando programas de ordenador conocidos en la técnica tales como los programas DNASTar/MegAlign en combinación con el método Clustal.

"Derivados" de una proteína divulgada son aquellos péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que comprenden al menos aproximadamente cinco residuos de aminoácidos contiguos de dicho polipéptido pero que retienen la actividad biológica de dicha proteína. Un "derivado" puede comprender adicionalmente otros residuos de aminoácidos de origen natural, alterados por glicosilación, asilados o de origen no natural en comparación con la secuencia de aminoácidos de una forma de origen natural de dicho polipéptido. Alternativamente o además, un derivado puede comprender uno o más sustituyentes diferentes a aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una forma de origen natural de dicho polipéptido, por ejemplo, una molécula informadora u otro ligando, enlazada de manera covalente o no covalente a la secuencia de aminoácidos tal como, por ejemplo, una molécula informadora la cual es enlazada al mismo para facilitar su detención.

Con "inmunológicamente activo" se entiende que una molécula o fragmento específicos de la misma tales como epítopos o haptenos específicos son reconocidos por, por ejemplo enlazarse a anticuerpos. Pueden determinarse epítopos específicos utilizando, por ejemplo, técnicas de barrido de péptidos tal como se describe en Geysen et al.

(1996) (Geysen, H. M., Rodda, S.J. and Mason, T.J. (1986). A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol. Immunol.* 23, 709-715.).

El término "fragmento de una secuencia" o "parte de una secuencia" significa una secuencia truncada de la secuencia original a la cual se hace referencia. La secuencia truncada (secuencia de ácidos nucleicos o proteínas) puede variar ampliamente en longitud; es el tamaño mínimo para hacer una secuencia de tamaño suficiente para proveer una secuencia con al menos una función y/o actividad comparable o la secuencia original a la que se hace referencia (por ejemplo, "fragmento funcional"), mientras que el tamaño máximo no es crítico. En algunas aplicaciones, el tamaño máximo usualmente no es sustancialmente superior que el requerido para proveer la actividad y/o función deseadas de la secuencia original. Típicamente, la secuencia de aminoácidos truncada va desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 60 aminoácidos de longitud. Más típicamente, sin embargo, la secuencia tendrá un máximo de 50 aminoácidos de longitud, preferiblemente un máximo de aproximadamente 60 aminoácidos. Esto es deseable usualmente para seleccionar secuencias de al menos 10, 12 o 15 aminoácidos, hasta un máximo de aproximadamente 20 o 25 aminoácidos.

Los fragmentos funcionales también pueden incluir aquellos que comprenden un epítipo el cual es específico para las proteínas divulgadas. Los fragmentos funcionales preferidos tienen una longitud de al menos, por ejemplo, 5, 10, 25, 100, 150 o 200 aminoácidos.

Debe entenderse así que los fragmentos funcionales también pueden ser o no fragmentos inmunológicamente activos.

En el contexto de la presente especificación son homólogos incorporados, derivados y/o fragmentos inmunológicamente activos y/o funcionales de la citoquinina oxidasa tal como se definieron anteriormente. Homólogos, derivados y/o fragmentos inmunológicamente y/o funcionalmente activos preferidos particularmente de las proteínas de citoquinina oxidasa que se contemplan para uso en la presente invención son derivados de plantas, más específicamente de *Arabidopsis thaliana*, aún más específicamente dichas citoquinina oxidasas son la *Arabidopsis thaliana* (At) CKX, o son capaces de ser expresados en la misma. La presente invención contempla claramente el uso de homólogos funcionales o derivados y/o fragmentos inmunológicamente activos de las proteínas AtCKX y no está limitada en su aplicación al uso de secuencias de nucleótidos que codifican una de dichas proteínas AtCKX.

Cualquiera de dichas proteínas, polipéptidos, péptidos o fragmentos de los mismos pueden producirse en un sistema biológico, por ejemplo, un cultivo de células. Alternativamente cualquiera de dichas proteínas, polipéptidos, péptidos y fragmentos de los mismos pueden ser manufacturados químicamente, por ejemplo, mediante síntesis de péptidos en fase sólida. Dichas proteínas o fragmentos de los mismos pueden ser parte de una proteína de fusión como en el caso de por ejemplo, un ensayo de dos híbridos lo que permite, por ejemplo, la identificación de las proteínas que interactúan con una citoquinina oxidasa divulgada.

Las proteínas o fragmentos de las mismas son adicionalmente útiles, por ejemplo, para modular la interacción entre una citoquinina oxidasa divulgada y asociados proteínicos de interacción obtenidos por un método de la invención. Los péptidos sintetizados químicamente son particularmente útiles, por ejemplo, como fuente de antígenos para la producción de antisueros y/o anticuerpos.

"Anticuerpos" incluye anticuerpos monoclonales, policlonales, sintéticos o de camello de cadena pesada así como fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab, Fv o scFv. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales por técnicas tal como se describen en, por ejemplo, Liddle y Cryer (1991) los cuales comprenden la función de células de mieloma de ratón en células de bazo derivadas de animales inmunizados. Adicionalmente, los anticuerpos o fragmentos de los mismos hasta una molécula o fragmentos de la misma pueden obtenerse utilizando métodos como los que se describen en, por ejemplo, Harlow y Lane (1988). En el caso de anticuerpos dirigidos contra péptidos pequeños tales como fragmentos de una proteína divulgada, dichos péptidos están acoplados generalmente a una proteína portadora antes de la inmunización de los animales. Tales portadores proteínicos incluyen a la hemocianina de lapa (KLH), albumina de suero bovino (BSA), o valbúmina y toxoides de tétano. La proteína portadora potencia la respuesta inmune del animal y proporciona epítopos para los sitios de enlazamiento del receptor de células T. El término "anticuerpo" incluye adicionalmente derivados de los mismos tales como marcadores. Los marcadores de anticuerpos incluyen fosfatasa alcalina, PKH2, PKH26, PKH67, fluoresceína (FITC), Hoechst 33258, R-ficoeritrina (PE), rodamina (TRITC), rojo cuantum, rojo Texas, Cy3, biotina, agarosa, peroxidasa y esferas de oro. Herramientas en la biología molecular que se basan en anticuerpos contra una proteína incluyen análisis de inmunoprecipitación en gel de proteínas, selección de bibliotecas de expresión que permiten identificación de genes, métodos cuantitativos para proteínas incluyendo ELISA y RIA, purificación de proteínas por inmutofinidad, inmunoprecipitación de proteínas (véase, por ejemplo, Ejemplo 6) e inmunolocalización. Otros usos de anticuerpos y especialmente de anticuerpos de péptidos incluyen el estudio de el procesamiento proteolítico (Loffler et al 1994, Woulfe et al, 1994), la determinación de sitios activos en proteínas (Lerner 1982), el estudio del precursor y el tratamiento por postranslacional (Baron and Interactions (Murakami et al.

1992), identificación de dominios proteínicos involucrados en la interacciones proteína-proteína (Murakami et al, 1992) y el estudio de el uso de exones en la expresión genética (Tamura et al, 1991).

Se describen anticuerpos que reconocen específicamente una citoquinina oxidasa o un homólogo, derivado o fragmento de la misma como se definió anteriormente. Preferiblemente dicha citoquinina oxidasa es una citoquinina oxidasa vegetal, específicamente una de las citoquinina oxidasas de la *Arabidopsis thaliana* (ATCKX).

Los términos “gen (s)” “polinucleótido (s)”, ácido (s) nucleico (s)”, “secuencia (s)” de ácido (s) nucleico (s)”, “secuencia (s) de nucleótido (s)” o “molécula (s) de ácido (s) nucleico (s)”, cuando se utilizan aquí se refieren a nucleótidos, bien sea ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una combinación de ambos, en una forma polimérica de cualquier longitud. Dichos términos incluyen adicionalmente ADN y ARN de cadena doble y cadena individual. Dichos términos también incluyen modificaciones conocidas en nucleótidos tales como metilación, ciclización y “tapas” y sustitución de uno o más nucleótidos de origen natural con un análogo tal como inosina. Modificaciones de nucleótidos incluyen la adición de acridina, amina, biotina, azul cascada, colesterol, Cy3®, Cy5®, Cy5.5®, dabcil, digoxigenina, dinitrofenilo, Edans, 6-FMA, fluoresceína, 3'-glicerilo, HEX, IRD-700, IRD-800, JOE, fosfato psoraleno, rodamina, ROX, tiol (SH), espaciadores, TAMRA, TET, AMCA-S®, SE. BOOIPY®, Marina Blue®, Pacific Blue®, Oregon Green®, Rhodamine Green®, Rhodamine Red®, Rhodol Red® y Texas Red®. Modificaciones del esqueleto de los polinucleótidos incluyen metilfosfonato, 2'-OMe-metilfosfonato RNA, fosfortiorato, RNA, 2'-OMeRNA. Modificaciones en base incluyen 2-amino-dA, 2-aminopurina, 3'-(ddA), 3'dA(cordicepin), 7-desaza-dA, 8-Br-dA, 8-oxo-dA, N6-Me-dA, sitio abásico (dSpacer), biotina dT, 2'-OMe-5Me-C, 2'-OMe-propinil-C, 3'-(5-Me-dC), 3'-(ddC), 5-Br-dC, 5-1-dC, 5-MedC, 5-F-dC, carboxi-dT, dA convertible, dC convertible, dG convertible, dT convertible, dU convertible, 7-desaza-dG, 8-Br-dG, 8-oxo-dG, O⁶-Me-dG, S6-DNP-dG, 4-metil-indol, 5-nitroindol, 2'-OMe-inosiae, 2'-dl, O⁶-fenil-dl, 4-metilindol, 2'-desoxinebularina, 5-nitroindol, 2-aminopurina, dP (análogo de purina), dK análogo de pirimidina, 3-nitropirrol, 2-tio-dT, 4-tio-dT, biotin-dT, carboxi-dT, O4-Me-dT, O4-triazol dT, 2'-OMe-propinil-U, 5-Br-dU, 2'-dU, 5-F-dU, 5-IdU, O⁴-triazol dU. Dichos términos también abarcan ácidos nucleicos peptídicos (PNA), un análogo de ADN en el cual el esqueleto es un pseudopéptido que consiste de unidades N-(2-aminoetil)-glicina en vez de un azúcar. El PNA imita el comportamiento del ADN y se enlaza a cadenas de ácidos nucleicos complementarias. El esqueleto neutro de PNA da como resultado un enlazamiento más fuerte y una especificidad mayor de la alcanzada normalmente. Además, las propiedades químicas, físicas y biológicas únicas de PNA han sido explotadas para producir herramientas biomoleculares poderosas, agentes antisentido y antígeno, sondas moleculares y biosensores.

La presente especificación también provee ventajosamente secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de un ácido nucleico divulgado y preferiblemente de 15 a 50 nucleótidos. Estas secuencias pueden ser usadas, ventajosamente, como sondas para hibridar específicamente a secuencias de la invención tal como se define anteriormente o cebadores para iniciar amplificación o replicación específicas de secuencias divulgadas tal como se definen anteriormente, o similares. Tales secuencias de ácidos nucleicos pueden producirse de acuerdo con técnicas bien conocidas en el arte, tal como por medios recombinantes o sintéticos.

Pueden ser usadas también en kits de diagnóstico o similares para detectar la presencia de un ácido nucleico. Estas pruebas generalmente comprenden poner en contacto la sonda con la muestra bajo condiciones de hibridación y detectar la presencia de cualquier formación dúplex o triple entre la sonda y cualquier ácido nucleico en la muestra.

Ventajosamente, las secuencias de ácidos nucleicos, de acuerdo con la especificación pueden producirse utilizando tales medios recombinantes o sintéticos, tales como por ejemplo el uso de mecanismos de clonación por PCR los cuales generalmente involucran construir un par de cebadores, los cuales pueden tener de aproximadamente 15 a 50 nucleótidos hasta una región del gen en la cual se desea la clonación, poniendo los cebadores en contacto con ARNm, ADNc o ADN genómico de una célula, llevando a cabo una reacción en cadena de polimerasa bajo condiciones que produzcan la amplificación de la región deseada, aislando la región o fragmento amplificados y recuperando el ADN amplificado. En general, tales técnicas tal como se definen aquí son bien conocidas en el arte, tal como se describen en Sambrook et al. (Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 1989).

Una “secuencia de codificación” o “marco de lectura abierto” o “ORF” se define como una secuencia de nucleótidos que puede ser transcrita en ARNm y/o traducida en un polipéptido cuando se coloca bajo el control de secuencias de control apropiadas o secuencias reguladoras, esto es, cuando dicha secuencia de codificación u ORF está presente en un formato expresable. Dicha secuencia de codificación de ORF está enlazada mediante un codón de inicio de traducción 5' y un codón de detención de traducción 3'. Una secuencia de codificación u ORF puede incluir, pero no se limita a ARN, ARNm, ADNc, secuencias de nucleótidos recombinantes, secuencias de nucleótidos manufacturados sintéticamente o ADN genómico. Dicha secuencia de codificación u ORF puede ser interrumpida por secuencias de ácidos nucleicos intervinientes.

Los genes y secuencias de codificación que codifican esencialmente la misma proteína pero se aíslan a partir de diferentes fuentes pueden consistir de secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente divergentes. De manera reciproca, secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente divergentes pueden diseñarse para efectuar la expresión de esencialmente la misma proteína. Dichas secuencias de ácidos nucleicos son el resultado de, por ejemplo, la

5 existencia de alelos diferentes de un gen dado, o la degeneración del código genético o de diferencias en el uso de codones. Así, tal como se indica en la Tabla 2, aminoácidos tales como metionina o triptófano son codificados por un codón individualmente mientras que otros aminoácidos tales como arginina, leucina y serina pueden ser traducidos cada uno desde hasta 6 diferentes codones. Las diferencias en el uso de codones preferidos se ilustran en la Tabla 3 para *agrobacterium tumefaciens* (una bacteria), *A. thaliana*, *M. sativa* (plantas de dos dicotiledones) y *Oryza sativa* (una planta monocotiledónea). Para extraer un ejemplo, el codón GGC (para glicina) es el codón más frecuentemente usado en *A. tumefaciens* (36.2 ‰), es el segundo codón más frecuentemente utilizado en *O. sativa* pero se utilizan en frecuencias mucho menores en *A. thaliana* y *M. sativa* (9 ‰ y 8.4 ‰, respectivamente). De los cuatro posibles codones que codifican glicina (véase Tabla 2), dicho codón GGC es el más preferiblemente usado en *A. tumefaciens* y *O. sativa*. Sin embargo, el *A. thaliana* es el codón GGA (y GGU) mientras que en *M. sativa* es el codón GGU (y GGA).

15 Las secuencias de ADN tal como se definen en la presente especificación pueden ser interrumpidas por secuencias intervinientes. Con "secuencias intervinientes" se indica cualquier secuencia de ácidos nucleicos que perturbe una secuencia de codificación que comprende dicha secuencia de ADN de la invención o que perturba el formato expresable de una secuencia de ADN que comprende dicha secuencia de ADN de la invención. La eliminación de la secuencia interviniente restaura dicha secuencia de codificación o dicho formato expresable.

Ejemplos de secuencias intervinientes incluyen intrones y secuencias de ADN movilizables tales como transposones. Con "secuencia de ADN móvil" se entiende cualquier secuencia de ADN que puede ser movilizada como el resultado de un evento de recombinación

20 Tabla 2. Degeneración del código genético

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra	Codones posibles					
			GCA	GCC	GCG	GCU		
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU				
Ácido Aspártico	Asp	D	GAC	GAU				
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU				
Ácido Glutámico	Glu	E	GAA	GAG				
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG				
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidina	His	H	CAC	CAU				
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Lisina	Lys	K	AAA	AAG				
Metionina	Met	M	AUG					
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU				
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Triptófano	Trp	W	UGG					
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU				
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
			Posibles codones de "DETENCIÓN"					
			UAA	UAG	UGA			

ES 2 392 190 T3

Tabla 3. Uso de los codones indicados en los diferentes organismos dados como frecuencia por mil codones (<http://www.kazusa.or.jp/codon>)

Codón	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
UUU	13.9	22.5	24.1	11.3
UUC	24.3	20.7	16.9	26.3
UUA	3.5	12.9	10.4	4.7
UUG	13.2	21.0	22.4	11.8
UCU	7.0	24.6	19.8	10.1
UCC*	14.8	10.8	7.7	16.9
UCA	7.4	17.8	17.2	9.7
UCG	18.2	8.9	3.2	10.8
UAU	12.3	15.2	16.6	9.2
UAC	10.3	13.7	14.0	20.6
UAA	0.9	0.9	1.2	0.9
UAG	0.6	0.5	0.8	0.8
UGU	3.0	10.8	10.6	5.0
UGC	7.4	7.2	5.8	14.3
UGA	1.8	1.0	0.8	1.3
UGG	12.2	12.7	10.0	12.8
CUU	19.1	24.3	28.3	14.6
CUC	25.7	15.9	12.0	28.0
CUA	5.2	10.0	8.8	5.7
CUG	31.6	9.9	8.5	22.1
CCU	7.7	18.3	23.2	11.8
CCC	10.6	5.3	5.3	12.5
CCA	8.9	16.1	22.6	12.2
CCG	20.7	8.3	3.6	16.7
CAU	10.6	14.0	14.6	9.2
CAC	9.1	8.7	9.1	14.6
CAA	11.2	19.7	23.2	11.9
CAG	24.9	15.2	12.3	24.6
CGU	12.2	8.9	10.1	6.8
CGC	25.5	3.7	4.2	15.9
CGA	8.2	6.2	4.2	4.2
CGG	13.2	4.8	1.8	9.7
AUU	15.4	22.0	29.4	13.8
AUC	36.9	18.5	14.7	25.5

ES 2 392 190 T3

(continuación)

Codón	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
AUA	6.2	12.9	11.7	7.2
AUG	24.7	24.5	21.7	24.4
ACU	6.4	17.8	20.8	10.3
ACC	20.9	10.3	11.7	18.6
ACA	9.1	15.9	18.9	10.0
ACG	18.8	7.6	2.8	10.8
AAU	13.5	22.7	25.0	12.9
AAC	18.7	20.9	18.7	25.1
AAA	13.6	31.0	32.2	12.0
AAG	24.4	32.6	35.1	39.4
AGU	5.7	14.0	12.6	7.3
AGC	15.8	11.1	8.8	16.9
AGA	5.3	18.7	13.6	7.7
AGG	6.5	10.9	11.7	14.9
GUU	16.6	27.3	34.7	15.0
GUC	29.3	12.7	9.9	22.8
GUA	6.1	10.1	10.0	5.7
GUG	19.7	17.5	16.5	25.0
GCU	17.4	28.0	34.6	19.8
GCC	35.8	10.3	11.4	33.2
GCA	19.5	17.6	25.9	15.6
GCG	31.7	8.8	3.4	25.3
GAU	25.8	36.8	40.0	21.5
GAC	28.0	17.3	15.5	31.6
GAA	29.9	34.4	35.9	17.1
GAG	26.3	32.2	27.4	41.1
GGU	16.5	22.2	28.7	16.3
GGC	36.2	9.0	8.4	34.7
GGA	12.5	23.9	27.3	15.0
GGG	11.3	10.2	7.4	16.6

5 “Hibridación” es el proceso donde secuencias de nucleótidos complementarios sustancialmente homólogos se fusionan uno con otro. El proceso de hibridación puede ocurrir completamente en solución, esto es, ambos ácidos nucleicos complementarios están en solución. Las herramientas de biología molecular que se basan sobre tal proceso incluyen PCR, hibridación sustractiva y determinación de la secuencia de ADN. El proceso de hibridación también puede ocurrir con uno de los ácidos nucleicos complementarios y movilizado a una matriz tal como perlas magnéticas, perlas de Sefarosa o cualquier otra resina. Herramientas en biología molecular que se basan en tal proceso incluyen el aislamiento de poli ARNm (A+). El proceso de hibridación puede ocurrir adicionalmente con uno de los ácidos nucleicos complementarios inmovilizado sobre un soporte sólido tal como nitrocelulosa o membrana de nailon o inmovilizado por, por ejemplo, fotolitografía a, por ejemplo, un soporte de vidrio silíceo (el último conocido

10

5 como disposición de ácido nucleico o microdisposición o como chips de ácido nucleico). Las herramientas en biología molecular que se basan en tal proceso incluyen análisis de inmunoprecipitación en gel de ARN y ADN, hibridación de codones, hibridación en placa e hibridación en microdisposición. Con el fin de permitir que ocurra la hibridación, las moléculas de ácido nucleico son desnaturalizadas en general térmica o químicamente (por ejemplo, mediante NaOH) para fundir una cadena doble en dos cadenas sencillas y/o para eliminar horquillas u otras estructuras secundarias de ácidos nucleicos de cadena individual. La restricción de la hibridación es influenciada por condiciones tales como temperatura, concentración de sal y composición del regulador de hibridación. Las condiciones de alta restricción para la hibridación incluyen alta temperatura y/o baja concentración de sal (las sales incluyen NaCl y citrato de Na₃) y/o la inclusión de formamida en el regulador de hibridación y/o la disminución de la concentración de los compuestos tales como SDS (detergente en el regulador de hibridación y/o exclusión de compuestos tales como sulfato de dextrano o polietilén glicol (que promueve la aglomeración molecular) del regulador de hibridación. Las condiciones de hibridación convencionales están descritas en, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) pero el experto en la técnica apreciará que pueden diseñarse numerosas condiciones de hibridación diferentes en función de la homología conocida o esperada y/o la longitud de la secuencia de aminoácidos. De manera suficiente las condiciones de hibridación con baja restricción son particularmente preferidas para aislar ácidos nucleicos heterólogos a las secuencias de ADN definidas más arriba. Elementos que contribuyen a dicha heterología incluyen alélismo, degeneración del código genético y diferencias en el uso del codón preferido como se discutió más arriba.

20 El término "hibridación específica" o "hibridación específicamente" se refiere al enlazamiento, duplicación o hibridación de una molécula a una secuencia de nucleótido particular bajo condiciones medias a restrictivas cuando tal secuencia se presenta en una mezcla compleja, por ejemplo, ADN o ARN celular total.

25 "Condiciones de hibridación restrictivas" y "condiciones de lavado de hibridación restrictiva" en el contexto de los experimentos de hibridación de ácido nucleico tal como hibridaciones Southern y Northern dependen de las secuencias y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. Por ejemplo, secuencias más largas hibridan específicamente a altas temperaturas. La T_m es la temperatura bajo fuerza iónica y pH definidos, en la cual el 50% de la secuencia objetivo hibridiza a una sonda perfectamente coincidente. La especificidad es típicamente función de los lavados posthibridación. Factores críticos de tales lavados incluyen la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final.

30 En general, se seleccionan condiciones restrictivas alrededor de 50°C por debajo del punto de fusión térmico (T_m) de la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH definidos) en la cual el 50% de la secuencia objetivo hibridiza a una sonda perfectamente coincidente. Las T_m dependen de las condiciones de la solución y la composición básica de la sonda, y puede calcularse utilizando la siguiente ecuación:

$$T_m = 79.8^{\circ}\text{C} + (18.5 \times \text{Log}[\text{Na}^+]) + (58.4^{\circ}\text{C} \times \%[\text{G}+\text{C}]) - (820 / \# \text{ bp en duplex}) - (0.5 \times \% \text{ formamida})$$

35 Condiciones restrictivas más preferidas son cuando la temperatura está 20°C por debajo de T_m, y las condiciones de restricción más preferidas son cuando la temperatura está 10°C por debajo de T_m. El enlazamiento no específico puede controlarse también utilizando cualquiera de un número de técnicas conocidas tales como, por ejemplo, bloqueo de la membrana con soluciones que contienen proteína, adición de ARN, ADN y SDS heterólogos, al regulador de hibridación, y tratamientos con RNasa.

40 Las condiciones de lavado se ejecutan típicamente en o por debajo de la restricción. En general, las condiciones restrictivas adecuadas para los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos o procedimientos de detección de la amplificación genética están bien definidas anteriormente. Pueden seleccionarse también más o menos condiciones restrictivas

45 Para los propósitos de definir el nivel de restricción, puede hacerse referencia convenientemente a Sambrook, J., E.F. Fritsch, et al. 1989 "Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, at 11.45. Un ejemplo de condiciones de baja restricción es 4-6X SSC/0.1-0.5% p/v de SDS a 37°-45°C durante 2-3 horas. Dependiendo de la fuente y concentración del ácido nucleico involucrado en la hibridación, pueden emplearse condiciones alternativas de astringencia tales como condiciones de astringencia media. Ejemplos de condiciones de astringencia media incluyen 1-4X SSC/0.25% p/v de SDS a ≥ 45°C durante 2-3 horas. Un ejemplo de condiciones de alta restricción incluye 0.1-1X SSC/0.1% p/v de SDS a 60°C durante 1-3 horas. La persona experimentada en la técnica está al tanto de parámetros diversos que pueden ser alterados durante la hibridación y el lavado y que aún así mantendrán o cambiarán las condiciones de restricción. Por ejemplo, otra condición de hibridación restrictiva es hibridación a 4X SSC a 65°C, seguida por un lavado a 0.1 X SSC a 65°C durante aproximadamente una hora. Alternativamente, una condición de hibridación astringente de ejemplo es en

50% de formamida, 4XSSC, a 42°C. Aún otro ejemplo de condiciones de restricción incluye hibridación a 62°C en 6X SSC, .05 X BLOTTO, y lavado a 2X de SSC, 0.1% de SDS a 62°C.

Claramente, la especificación presente incorpora el uso de secuencias de ADN divulgadas que codifican una citoquinina oxidasa, homólogo, derivado o fragmento inmunológicamente activo y/o funcional de la misma tal como se define más claramente en cualquier método de hibridación. La especificación presente se relaciona adicionalmente también con secuencias de ADN que hibridizan a dichas secuencias de ADN de la especificación. Preferiblemente dicha citoquinina oxidasa es una citoquinina oxidasa vegetal, más específicamente la *Arabidopsis thaliana* (At)CKX.

Para efectuar la expresión de una proteína en una célula, tejido u órgano, preferiblemente de origen vegetal, la proteína puede ser introducida directamente en dicha célula, tal como mediante microinyección o medios balísticos o alternativamente, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica dicha proteína puede ser introducida en dicha célula, tejido u órgano en un formato expresable.

Preferiblemente, la secuencia de ADN divulgada comprende una secuencia de codificación o marco de lectura abierto (ORF) que codifica una proteína citoquinina oxidasa o un homólogo o derivado de la misma o un fragmento inmunológicamente activo y/o funcional de la misma como se definió anteriormente. La proteína preferida divulgada comprende la secuencia de aminoácidos de dicha citoquinina oxidasa. Preferiblemente dicha citoquinina oxidasa es una citoquinina oxidasa vegetal y más específicamente una *Arabidopsis thaliana* (At)CKX.

Con "vector" o "secuencia de vector" se entiende una secuencia de ADN que puede ser introducida en un organismo por transformación y puede ser mantenida de manera estable en dicho organismo. El mantenimiento del vector es posible por ejemplo en cultivos de *Escherichia coli*, *A. tumefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*. Otros vectores tales como fagémidos y vectores de cósmido pueden mantenerse y multiplicarse en bacterias y/o virus. Las secuencias de vector generalmente comprenden un conjunto de sitios únicos reconocidos por enzimas de restricción, el sitio de clonación múltiple (MCS), en donde pueden insertarse una o más secuencias no vectoras.

Con "secuencia no vectora" se entiende concordantemente una secuencia de ADN que está integrada en uno o más de los sitios del MCS comprendido dentro de un vector.

"Vectores de expresión" forman un subconjunto de vectores los cuales, en virtud de comprender las secuencias reguladoras o de control apropiadas permiten la creación de un formato expresable para la secuencia no vectora insertada, permitiendo así la expresión de la proteína codificada por dicha secuencia no vectora. Los vectores de expresión son conocidos en el arte por permitir la expresión de proteínas en organismos que incluyen bacterias (por ejemplo *E. coli*), hongos (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastoris*), células de insectos (por ejemplo vectores de expresión en baculovirus), células animales (por ejemplo, células COS o CHO) y células vegetales (por ejemplo, vectores de expresión basadas en virus de patata X).

La presente especificación incluye claramente cualquier citoquinina oxidasa, homólogo, derivado y/o fragmento inmunológicamente activo y/o funcional de la misma tal como se definió anteriormente. Preferiblemente dicha citoquinina oxidasa es una citoquinina oxidasa vegetal, más específicamente una *Arabidopsis thaliana* (At)CKX.

Como alternativa a la producción de proteína mediada por el vector de expresión en sistemas biológicos, puede aplicarse la síntesis química de proteínas. Los péptidos sintéticos pueden ser manufacturados en fase en solución o en fase sólida. La síntesis de péptidos en fase sólida (Merrifield 1963) es, sin embargo, la manera más común e involucra la adición secuencial de aminoácidos para crear una cadena de péptidos lineal. La síntesis de péptidos en fase sólida incluye ciclos consistente de tres etapas: (i) inmovilización del aminoácido carboxi terminal de la cadena peptídica en crecimiento a un soporte sólido o resina; (ii) ensamblaje de la cadena, un proceso consistente de la activación, acoplamiento y desprotección del aminoácido que se va a agregar a la cadena peptídica en crecimiento; y (iii) ruptura que involucra la eliminación de la cadena peptídica completa de la resina y eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos. Metodologías comunes en la síntesis de péptidos en fase sólida incluyen Fmoc/tBu (9-fluorenilmetiloxicarbonil/t-butil) y Boc (t-butiloxicarbonil) como grupos protectores amino terminales de aminoácidos. Grupos protectores de cadenas laterales de aminoácidos incluyen metil (Me), formil (CHO), etil (Et), acetil (Ac), t-butil (t-Bu), anisil, bencil (Bzl), trifluoroacetil (Tfa), N-hydroxisuccinimide (ONSu, OSu), benzoil (Bz), 4-metilbencil (Meb), tioanizil, tiocresil, benciloximetil (Bom), 4-nitrofenil (ONp), benciloxicarbonil (Z), 2-nitrobenzoil (NBz), 2-nitrofenilsulfenil (Nps), 4-toluenesulfonil (Tosil, Tos), pentafluorofenil (Pfp), difenilmetil (Dpm), 2-clorobenciloxicarbonil (ClZ), 2,4,5-triclorofenil, 2-bromobenciloxicarbonil (Br-Z), tripheilmetil (Tritil, Trt), and 2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonil (Pmc). Durante el ensamblaje de la cadena, se eliminan el Fmoc o Boc dando como resultado un terminal amino activado del residuo de aminoácido enlazado a la cadena en crecimiento. El terminal carboxi del aminoácido entrante es activado por conversión a un éster altamente reactivo, por ejemplo, mediante HBTU. Con tecnologías actuales (por ejemplo, sintetizador PerSeptive Biosystems 9050, Applied Biosystems Model 431A Peptide Synthesizer), pueden manufacturarse péptidos lineales de hasta 50 residuos. Hay disponible un cierto número de guías para producir péptidos que sean adecuados para uso en sistemas biológicos incluyendo (i) limitar

el uso de aminoácidos difíciles tales como Cis, Met, Trp (que se oxidan y/o degradan fácilmente durante la síntesis de péptidos) o arg; (ii) minimizar los aminoácidos hidrófobos (pueden impedir la solubilidad del péptido); y (iii) evitar un ácido glutámico aminoterminal (pueda ciclizarse a piroglutamato).

5 Por "formato expresable" se entiende que la molécula de ácido nucleico aislada está en una forma adecuada para ser transcrita en ARNm y/o traducida para producir una proteína, bien sea constitutivamente o siguiendo la inducción por una señal intracelular o extracelular, tal como un estímulo ambiental o tensión (mitógenos, anoxia, hipoxia, temperatura, sal, luz, deshidratación, etc.) o un compuesto químico tal como IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) o tales como un antibiótico (tetraciclina, ampicilina, rifampicina, kanamicina), hormonas (por ejemplo, giberelina, auxina, citoquinina, glucocorticoides, brasinoesteroides, etileno, ácido abscísico, etc.), análogos de hormonas (ácido indol acético (IAA), 2,4-D, etc.), metales (zinc, cobre, hierro, etc.) o dexametasona, entre otros. Tal como es conocido para los expertos en la técnica, la expresión de una proteína funcional puede requerir también una o más modificaciones postraducción, tales como glicosilación, fosforilación, desfosforilación, o una o más interacciones proteína-proteína, entre otras. Todos tales procesos están incluidos dentro del alcance del término "formato expresable".

15 Preferiblemente, la expresión de una proteína en una célula, tejido u órgano específicos, preferiblemente de origen vegetal, es efectuada por la introducción y expresión de una molécula de ácido nucleico aislada que codifica dicha proteína, tal como una molécula de ADNc, un gen genómico, una molécula de oligonucleótido sintética, una molécula de ARNm o un marco de lectura abierto, en dicha célula, tejido u órgano, en donde dicha molécula de ácido nucleico se coloca de manera operativa en conexión con secuencias reguladoras o de control adecuadas que incluyen un promotor, preferiblemente un promotor expresable en plantas, y una secuencia de terminación.

20 La referencia aquí a un "promotor" debe tomarse en su contexto más amplio e incluye las secuencias reguladoras transcripcionales derivadas de un gen genómico eucariote clásico, incluyendo la caja TATA la cual se requiere para una iniciación exacta de la transcripción, con o sin una secuencia de caja CCAAT y elementos adicionales reguladores o de control (esto es, secuencias activadoras corriente arriba, potenciadores y silenciadores) los cuales alteran la expresión del gen en respuesta a estímulos de desarrollo y/o externos, o en una manera específica para cada tejido.

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

30 El término "promotor" también se utiliza 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 cual está conectado operativamente. Tales elementos reguladores pueden colocarse de forma adyacente a una secuencia promotora heteróloga para conducir la expresión de una molécula de ácido nucleico en respuesta a, por ejemplo, cobre, glucocorticoides, dexametasona, tetraciclina, giberelina, cAMP, ácido abscísico, auxina, lesiones, etileno, jasmonato o ácido salicílico o para conferir la expresión de una molécula de ácido nucleico en células, tejidos u órganos específicos tales como meristemas, hojas, raíces, embriones, flores, semillas o frutos.

40 En el contexto de la presente especificación, el promotor preferiblemente es una secuencia promotora expresable en plantas. Los promotores que también funcionan o funcionan solamente en células no vegetales tales como bacterias, células de levadura, células de insectos y células animales no están excluidos. Por "expresable en plantas" se entiende que la secuencia promotora, incluyendo cualquier elemento regulador adicional agregado 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.

45 Los términos "operable en planta" y "operable en una planta" cuando se utilizan aquí, con respecto a una secuencia promotora, deben tomarse como equivalentes a una secuencia promotora expresable en plantas.

Los promotores regulables como parte de un sistema de expresión en plantas viral binario son también conocidos para la persona experimentada en la técnica (Yadav 1999 - WO9922003; Yadav 2000 - W00017365).

50 En el presente contexto, una "secuencia promotora regulable" es un promotor que es capaz de conferir expresión sobre un gen estructural en una célula, tejido u órgano en particular o grupo de células, tejidos u órganos de una planta, opcionalmente bajo condiciones específicas, sin embargo no confiere en general la expresión a través de la planta bajo todas las condiciones. De acuerdo con lo anterior, una secuencia promotora regulable puede ser una secuencia promotora que confiera expresión en un gen al cual está conectado operativamente en una localización particular dentro de la planta o alternativamente, a través de la planta bajo un conjunto específico de condiciones, tales como la inducción siguiente a la expresión de un gen por un compuesto químico u otro propiciador.

- 5 Preferiblemente, el promotor regulable usado en el desempeño de la presente invención confiere expresión en una localización específica dentro de la planta, bien sea constitutivamente o después de una inducción, sin embargo no en la planta completa bajo cualquier circunstancia. Incluidas dentro del alcance de tales promotores están las secuencias promotoras específicas para células, secuencias promotoras específicas para tejidos, secuencias promotoras específicas para órganos, secuencias promotoras de genes específicos de un ciclo celular, secuencias promotoras inducibles y secuencias promotoras constitutivas que han sido modificadas para conferir expresión en una parte particular de la planta en cualquier momento, tal como por integración de dicho promotor constitutivo con un elemento genético transponible (Ac, Ds, Spm, En, u otro transposón).
- 10 De la misma forma, el término "específico para tejido" será tomado para indicar que la expresión es predominantemente en un tejido o tipo de tejido en particular, preferiblemente de origen vegetal, aunque no necesariamente exclusiva en dicho tejido o tipo de tejido.
- De la misma forma, el término "específico para órgano" se tomará para indicar que la expresión es predominantemente en un órgano particular, preferiblemente de origen vegetal, aunque no necesariamente de forma exclusiva en dicho órgano.
- 15 De la misma forma, el término "específica para un ciclo celular" se tomará para indicar que la expresión es predominantemente cíclica y que ocurre en una o más fases, no necesariamente consecutivas del ciclo celular aunque no necesariamente de forma exclusiva en células en ciclo, preferiblemente de origen vegetal.
- 20 Los experimentados en la técnica entenderán que un "promotor inducible" es un promotor cuya actividad transcripcional se incrementa o induce en respuesta a un estímulo de desarrollo, químico, ambiental o físico. De la misma forma, la persona experimentado en la técnica entenderá que un "promotor constitutivo" es un promotor que es activo transcripcionalmente a través de la mayoría, pero no necesariamente de todas las partes de un organismo, preferiblemente una planta, durante la mayor parte pero no necesariamente de todas las fases de su crecimiento y desarrollo.
- 25 Los experimentados en la técnica será capaces fácilmente de seleccionar secuencias promotoras apropiadas para uso en la regulación de la expresión apropiada de la proteína de citoquinina oxidasa a partir de fuentes públicamente disponibles o fácilmente disponibles, sin experimentación indebida.
- 30 Colocar una molécula de ácido nucleico bajo el control regulador de una secuencia promotora, o en conexión operable con una secuencia promotora, significa posicionar dicha molécula de ácido nucleico de tal manera que la expresión es controlada por la secuencia promotora. Un promotor usualmente, pero no necesariamente, es posicionado corriente arriba, o en el extremo 5' y dentro de 2 kb del sitio de inicio de la transcripción de la molécula de ácido nucleico que regula. En la construcción de combinaciones de genes promotores/estructurales heterólogos se prefiere generalmente posicionar el promotor a una distancia del sitio de inicio de la transcripción de genes que sea aproximadamente la misma que la distancia entre el promotor y el gen que él controla en su localización natural (esto es, el gen del cual se deriva el promotor). Tal como es conocido en el arte, alguna variación en esta distancia puede ser admitida sin pérdida de la función promotora. De la misma forma, el posicionamiento preferido de un elemento de secuencia regulador con respecto a un gen heterólogo que se va a colocar bajo su control está definido por el posicionamiento del elemento en su localización natural (esto es, el gen del cual se deriva). De nuevo, tal como es conocido en el arte, puede ocurrir también alguna variación en esta distancia.
- 35 Ejemplos de promotores adecuados para uso en los constructos de genes divulgados incluyen los listados en la Tabla 4, entre otros. Los promotores listados en la Tabla 4 se proveen para propósitos de ejemplificación solamente y no van a estar limitados por la lista provista en la misma. Los expertos en la técnica estarán fácilmente en posición de proveer promotores adicionales que son útiles.
- 40 En el caso de promotores constitutivos o promotores que induzcan la expresión a través de la planta completa, se prefiere que tales secuencias sean modificadas mediante la adición de secuencias de nucleótidos derivadas de uno o más de los promotores específicos para tejidos listados en la Tabla 4, o alternativamente, secuencias de nucleótidos derivadas de uno o más de los promotores inducibles específicos para tejidos mencionados más arriba, para conferir a los mismos especificidad para tejidos. Por ejemplo, el promotor CaMV 35S puede ser modificado por la adición de la secuencia promotora Adh1 de maíz, para conferir expresión de la misma específica para raíces regulada anaeróticamente, tal como se describió previamente (Ellis et al., 1987). Otro ejemplo describe conferir expresión genética específica para raíces o abundante en raíces fusionando el promotor CaMV 35S con elementos de la proteína de maíz rica en proteína del gen GRP3 (Feix y Wulff 2000 - WO0015662). Tales modificaciones pueden alcanzarse por experimentación de rutina por parte de los experimentados en la técnica.
- 45 El término "terminador" se refiere a una secuencia de ADN en el extremo de una unidad transcripcional que señala la terminación de la transcripción. Los terminadores son secuencias de ADN no traducidas 3' que contienen una señal de poliadenilación, la cual facilita la adición de secuencias de poliadenilato al extremo 3' de un transcrito primario. Los terminadores activos en células derivados de virus, levaduras, mohos, bacterias, insectos, aves,
- 50
- 55

mamíferos y plantas son conocidos y están descritos en la literatura. Pueden ser aislados a partir de bacterias, hongos, virus, animales y/o plantas.

Tabla 4. Promotores expresables en plantas de ejemplo para uso en desarrollo de la presente especificación

I: PROMOTORES ESPECIFICOS PARA CÉLULAS, ESPECÍFICOS PARA TEJIDOS Y ESPECÍFICOS PARA ORGANOS		
FUENTE DEL GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
α -amilasa (Amy32b)	aleurona	Lanahan, M.B., et al., Plant Cell 4: 203-211, 1992; Skriver, K., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88: 7266-7270, 1991
Gen similar a catepsina β	aleurona	Cejudo, F.J., et al. Plant Molecular Biology 20:849-856, 1992.
<i>Agrobacterium rhizogenes rolb</i>	cambium	Nilsson et al., Physiol. Plant. 100: 456-462, 1997
AtPRP4	Flores	http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html
chalcone synthase (chsA)	Flores	Van der Meer, et al., Plant Mol. Biol. 15, 95-109, 1990.
LAT52	anteras	Twell et al Mol. Gen Genet. 217: 240-245 (1989)
<i>apetala-3</i>	Flores	
Quitinasa	Frutos (bayas, uvas, etc.)	Thomas et al. CSIRO Plant Industry, Urrbrae, South Australia, Australia; http://winetitles.com.au/gwrdc/csh95-1.html
rbcS-3A	Tejido verde (por ejemplo hoja)	Lam, E. et al., The Plant Cell 2: 857-866, 1990.; Tucker et al., Plant Physiol. 113: 1303-1308, 1992.
Genes específicos de hojas	Hoja	Baszczynski, et al., Nucl. Acid Res. 16: 4732, 1988.
AtPRP4	Hoja	http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html
Promotor del gen del virus clorela adenina metil transferasa	Hoja	Mitra and Higgins, 1994, Plant Molecular Biology 26: 85-93
Promotor del gen aldP de arroz	Hoja	Kagaya et al., 1995, Molecular and General Genetics 248: 668-674
Promotor rbcS de arroz o tomate	Hoja	Kyozuka et al., 1993, Plant Physiology 102: 991-1000
Pinus cab-6	Hoja	Yamamoto et al., Plant Cell Physiol. 35:773-778, 1994.
Promotor de rubisco	Hoja	
cab (proteína enlazantes clorofila a/b)	Hoja	
SAM22	Hoja senescente	Crowell, et al., Plant Mol. Biol. 18: 459-466, 1992.
<i>Gen ltp (gen de transferencia lipídica)</i>		Fleming, et al, Plant J. 2, 855-862.
<i>Gen de R. japonicum nif</i>	Nódulo	Patente de los Estados Unidos No. 4, 803, 165

(continuación)

I: PROMOTORES ESPECÍFICOS PARA CÉLULAS, ESPECÍFICOS PARA TEJIDOS Y ESPECÍFICOS PARA ÓRGANOS		
FUENTE DEL GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
<i>Gen de B. japonicum nifH</i>	Nódulo	Patente de los Estados Unidos No. 5, 008, 194
GmENOD40	Nódulo	Yang, et al., The Plant J. 3: 573-585.
PEP carboxilasa (PEPC)	Nódulo	Pathirana, et al., Plant Mol. Biol. 20: 437-450, 1992.
Leghemoglobina (Lb)	Nódulo	Gordon, et al., J. Exp. Bot. 44: 1453-1465, 1993.
<i>Gen del virus Tungro bacilliform</i>	Floema	Bhattacharyya-Pakrasi, et al, The Plant J. 4: 71-79, 1992.
Genes específicos para polen	polen; microespora	Albani, et al., Plant Mol. Biol. 15: 605, 1990; Albani, et al., Plant Mol. Biol. 16: 501, 1991)
Zm13	polen	Guerrero et al Mol. Gen. Genet. 224: 161-168 (1993)
Gen apg	Microespora	Twel et al Sex. Plant Reprod. 6: 217-224 (1993)
Gen específico de polen de maíz	polen	Hamilton, et al., Plant Mol. Biol. 18: 211-218, 1992.
Gen de girasol expresado en polen	polen	Baltz, et al., The Plant J. 2: 713-721, 1992.
<i>Gen de B. napus</i> específico de polen	polen; tapetum de la antera	Arnoldo, et al., J. Cell. Biochem., Abstract No. Y101, 204, 1992.
Genes expresables en raíz	Raíces	Tingey, et al., EMBO J. 6: 1, 1987.
Gen de tabaco inducible por auxina	Punta de raíz	Van der Zaal, et al., Plant Mol. Biol. 16,983,1991.
β -tubulina	Raíz	Oppenheimer, et al., Gene 63: 87, 1988.
Genes específicos de raíz de tabaco	Raíz	Conkling, et al., Plant Physiol. 93: 1203,1990.
<i>Gen de B. napus</i> G1-3b	Raíz	Patente de los Estados Unidos No. 5, 401, 836
SbPRP1	Raíces	Suzuki et al., Plant Mol. Biol. 21: 109-119, 1993.
AtPRP1; AtPRP3	raíces; raíces vellosas	http://saius.medium.edu/mmg/tierney/html
Gen RD2	cortex de raíz	http://www2.cnsu.edu/ncsu/research
Gen TobRB7	Vasculatura de raíz	http://www2.cnsu.edu/ncsu/research
AtPRP4	hojas; flores; raíces primordiales laterales	http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html

(continuación)

I: PROMOTORES ESPECÍFICOS PARA CÉLULAS, ESPECÍFICOS PARA TEJIDOS Y ESPECÍFICOS PARA ÓRGANOS		
FUENTE DEL GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
Genes específicos de semilla	Semilla	Simon, et al., Plant Mol. Biol. 5: 191, 1985; Scofield, et al., J. Biol. Chem. 262: 12202, 1987.; Baszczynski, et al., Plant Mol. Biol. 14: 633, 1990.
Albumina de nuez del Brasil	Semilla	Pearson, et al., Plant Mol. Biol. 18: 235-245, 1992.
Leguminosa	Semilla	Ellis, et al., Plant Mol. Biol. 10: 203-214, 1988.
glutelina (arroz)	Semilla	Takaiwa, et al., Mol. Gen. Genet. 208: 15-22, 1986; Takaiwa, et al., FEBS Letts. 221: 43-47, 1987.
Zeína	Semilla	Matzke et al Plant Mol Biol, 14(3): 323-32 1990
NapA	Semilla	Stalberg, et al, Planta 199: 515-519, 1996.
Glutenina-1 LMW y HMW de trigo	Endospermo	Mol Gen Genet 216:81-90, 1989; NAR 17:461-2, 1989
SPA de trigo	Semilla	Albani et al, Plant Cell, 9: 171-184, 1997
α , β , γ gliadinas de trigo	Endospermo	EMBO 3:1409-15, 1984
Promotor <i>ltr1</i> de cebada	Endospermo	
B1, C, D, hordeina de cebada	Endospermo	Theor Appl Gen 98:1253-62, 1999; Plant J 4:343-55, 1993; Mol Gen Genet 250:750-60, 1996
DOF de cebada	Endospermo	Mena et al, The Plant Journal, 116(1): 53-62, 1998
<i>blz2</i>	Endospermo	EP99106056.7
Promotor sintético	Endospermo	Vicente-Carbajosa et al., Plant J. 13: 629-640, 1998.
Prolamina NRP33 de arroz	Endospermo	Wu et al, Plant Cell Physiology 39(8) 885-889, 1998
α -globulina Glb-1 de arroz	Endospermo	Wu et al, Plant Cell Physiology 39(8) 885-889, 1998
OSH1 de	Embrión	Sato et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 8117-8122, 1996
α -globulin REB/OHP-1 de arroz	Endospermo	Nakase et al. Plant Mol. Biol. 33: 513-522, 1997
ADP-glucosa PP de arroz	Endospermo	Trans Res 6:157-68, 1997
Familia de genes ESR de maíz	Endospermo	Plant J 12:235-46, 1997
γ -kafirina de sorgo	Endospermo	PMB 32:1029-35, 1996
KNOX	Embrión	Postma-Haarsma et al, Plant Mol. Biol. 39:257-71, 1999
Oleosina de arroz	Embrión y aleurón	Wu et at, J. Biochem., 123:386, 1998

(continuación)

I: PROMOTORES ESPECÍFICOS PARA CÉLULAS, ESPECÍFICOS PARA TEJIDOS Y ESPECÍFICOS PARA ÓRGANOS		
FUENTE DEL GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
Oleosina de girasol	Semilla (embrión y semilla seca)	Cummins, et al., Plant Mol. Biol. 19: 873-876, 1992
<i>LEAFY</i>	Meristema de brote	Weigel et al., Cell 69:843-859, 1992.
<i>Arabidopsis thaliana knat1</i>	Meristema de brote	Accession number AJ131822
<i>Malus domestica kn 1</i>	Meristema de brote	Accession number Z71981
<i>CLAVATA1</i>	Meristema de brote	Accession number AF049870
Genes específicos de estigma	estigma	Nasrallah, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5551, 1988; Trick, et al., Plant Mol. Biol. 15: 203, 1990.
Gen patatina clase I	tubérculo	Liu et al., Plant Mol. Biol. 153: 386-395, 1991.
arroz PCNA	Meristema	Kosugi et al, Nucleic Acids Research 19:1571-1576, 1991; Kosugi S. and Ohashi Y, Plant Cell 9:1607-1619, 1997.
Tubulina de guisante TubA1	Células en división	Stotz and Long, Plant Mol. Biol. 41, 601-614. 1999
<i>Arabidopsis cdc2a</i>	Células en ciclo	Chung and Parish, FEBS Lett, 3;362 (2):215-9, 1995
<i>Arabidopsis Rop1A</i>	Anteras; polen maduro + tubos de polen	Li et al. 1998 Plant Physiol 118, 407-417.
<i>Arabidopsis AtDMC1</i>	Asociado con meiosis	Klimyuk and Jones 1997 Plant J. 11, 1-14.
PS-IAA4/5 y PS-IAA6 de guisante	Inducible por auxina	Wong et al. 1996 Plant J. 9, 587-599.
Farnesiltransferasa de guisante	Tejidos meristemáticos; floema cercano a tejidos en crecimiento; reprimido por luz y azúcar	Zhou et al. 1997 Plant J. 12, 921-930
Ciclina B1;1 de Tabaco (<i>N. glauca</i>)	Células en división/ tejido meristemático	Trehin et al. 1997 Plant Mol. Biol. 35, 667-672.
Ciclinas CYS (tipo A) y CYM (tipo B) mitóticas	Células en división/ tejido meristemático	Ito et al. 1997 Plant J. 11, 983-992
<i>cyc1At</i> (=cyc B1;1) y <i>cyc3aAt</i> (tipo A) de <i>Arabidopsis</i>	Células en división/ tejido meristemático	Shaul et al. 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93, 4868-4872.
<i>Caja promotora de Arabidopsis tef1</i>	Células en división/ tejido meristemático	Regad et al. 1995 Mol. Gen. Genet. 248, 703-711.
<i>Catharanthus roseus cyc07</i>	Células en división/ tejido meristemático	Ito et al. 1994 Plant Mol. Biol. 24, 863-878.

(continuación)

II: PROMOTORES CONSTITUTIVOS DE EJEMPLO		
FUENTE DEL GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
Actina	Constitutivo	McElroy et al, Plant Cell, 2: 163-171,1990
CAMV 35S	Constitutivo	Odell et al, Nature, 313: 810-812, 1985
CaMV 19S	Constitutivo	Nilsson et al., Physiol. Plant. 100:462, 1997
GOS2	Constitutivo	de Pater et al, Plant J. 2:837-844, 1992
Ubiquitina	Constitutivo	Christensen et al, Plant Mol. Biol. 18: 675-689, 1992
Ciclofilina de arroz	Constitutivo	Buchholz et al, Plant Mol Biol. 25: 837-843, 1994
histona H3 de maíz	Constitutivo	Lepetit et al, Mol. Gen. Genet. 231: 276-285,1992
histona H3 de alfalfa	Constitutivo	Wu et al., Nucleic Acids Res. 17: 3057-3063, 1989; Wu et al., Plant Mol. Biol. 11:641-649,1988
actina 2	Constitutivo	An et al, Plant J. 10(1); 107-121, 1996
III: PROMOTORES DE EJEMPLO INDUCIBLES POR ESTRÉS		
NOMBRE	ESTRÉS	REFERENCIA
P5CS (delta(1)-pirolin-5-carboxilato sintasa)	sal, agua	Zhang et al. Plant Science. 129: 81-89, 1997
cor15a	Frio	Hajela et al., Plant Physiol. 93: 1246-1252,1990
cor15b	Frio	Wlihelm et al., Plant Mol Biol. 23: 1073-1077, 1993
cor15a (-305 a +78 nt)	Frio, sequía	Baker et al., Plant Mol Biol. 24: 701-713, 1994
rd29	Sal, sequía, frio	Kasuga et al., Nature Biotechnology 18:287-291, 1999
Proteínas de choque calorífico, incluyendo promotores artificiales que contiene el elemento de choque por calor (HSE)	Calor	Barros et al., Plant Mol Biol 19: 665-75, 1992. Marrs et al., Dev Genet.14: 27-41, 1993. Schoffl et al., Mol Gen Gent, 217: 246-53, 1989.
smHSP (proteínas de choque por calor pequeñas)	Calor	Waters et al, J Experimental Botany 47:325-338, 1996
wcs 120	Frío	Ouellet et al., FEBS Lett. 423: 324-328,1998
ci7	Frío	Kirch et al., Plant Mol Biol 33: 897-909, 1997

(continuación)

III: PROMOTORES DE EJEMPLO INDUCIBLES POR ESTRÉS		
NOMBRE	ESTRÉS	REFERENCIA
Adh	Frío, sequía, hipoxia	Dolferus et al., Plant Physiol 105: 1075-87, 1994
ppsi 18	agua: sal y sequía	Joshee et al., Plant Cell Physiol 39: 64-72, 1998
ci21A	Frío	Schneider et al., Plant Physiol 113: 335-45, 1997
Trg-31	Sequía	Chaudhary et al., Plant Mol Biol 30: 1247-57, 1996
Osmotina	Osmótica	Raghothama et al., Plant Mol Biol 23: 1117-28, 1993
Rab17	Osmótica, ABA	Vilardell et al., Plant Mol Biol 17: 985-93, 1991
LapA	Lesiones, ambiental	WO99/03977 University of California/ INRA
IV: PROMOTORES DE EJEMPLO, INDUCIBLES POR PATÓGENOS		
NOMBRE	PATÓGENO	REFERENCIA
RB7	Nemátodos en nódulos radiculares (Meloidogyne spp.)	US5760386 - North Carolina State University; Opperman et al (1994) Science 263: 221-23.
PR-1, 2, 3, 4, 5, 8, 11	Fúngico, viral, bacteriano	Ward et al (1991) Plant Cell 3: 1085-1094; Reiss et al 1996; Lebel et al (1998), Plant J, 16(2):223-33;
		Melchers et al (1994), Plant J, 5(4): 469-80; Lawton et al (1992), Plant Mol Biol, 19(5):735-43.
HMG2	Nemátodos	WO9503690 - Virginia Tech Intellectual Properties Inc.
Abi3	Nemátodos CIST(Heterodera spp.)	Unpublished
ARM1	Nemátodos	Barthels et al., (1997) The Plant Cell 9, 2119-2134. WO 98/31822 - Plant Genetic Systems
Att0728	Nemátodos	Barthels et al., (1997) The Plant Cell 9, 2119-2134. PCT/EP98/07761
Att1712	Nemátodos	Barthels et al., (1997) The Plant Cell 9, 2119-2134. PCT/EP98/07761
Gst1	Diferentes tipo de patógenos	Strittmatter et al (1996) Mol. Plant-Microbe Interact. 9, 68-73.

(continuación)

IV: PROMOTORES DE EJEMPLO, INDUCIBLES POR PATÓGENOS		
NOMBRE	PATÓGENO	REFERENCIA
LEMMI	Nemátodos	WO 92/21757-Plant Genetic Systems
CLE	geminivirus	PCT/EP99/03445 - CINESTAV
PDF1.2	Fúngico incluyendo <i>Alternaria brassicicola</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	Manners et al (1998), Plant Mol Biol, 38(6):1071-80.
Thi2.1	Fúngico - <i>Fusarium oxisporum</i> f sp. <i>mattiolae</i>	Vignutelli et al (1998) Plant J;14(3): 285-95
DB#226	Nemátodos	Bird and Wilson (1994) Mol. Plant-Microbe Interact., 7, 419-42 WO 95.322888
DB#280	Nemátodos	Bird and Wilson (1994) Mol. Plant-Microbe Interact., 7,419-42 WO 95.322888
Cat2	Nemátodos	Niebel et al (1995) Mol Plant Microbe Interact 1995 May-Jun;8(3):371-8
hTub	Nemátodos	Aristizabal et al (1996), 8th International Congress on Plant-Microbe Interaction, Knoxville US B-29
SHSP	Nemátodos	Fenoll et al (1997) In: Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. Kluwer Academic, C. Fenoll, F.M.W. Grundler and S.A. Ohl (Eds.),
Tsw12	Nemátodos	Fenoll et al (1997) In: Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. Kluwer Academic, C. Fenoll, F.M.W. Grundler and S.A. Ohl (Eds.)
Hs1(pro1)	Nemátodos	WO 98/122335 - Jung
NsLTP	viral, fúngico, bacteriano	Molina & Garcia-Olmedo (1993) FEBS Lett. 316(2):119-22
RIP	viral, fúngico	Turner et al (1997) Proc Natl Acad Sci U S A, 94(8):3866-71

5 Ejemplos de terminadores particularmente adecuados para uso en los constructos de gen divulgados incluyen el terminador de gen de nopalina sintasa (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens*, la secuencia terminadora del gen de octopina sintasa (OCS) de *Agrobacterium tumefaciens*, la secuencia terminadora del gen (CaMV) 35S del virus mosaico de la coliflor, la secuencia (t3'Bt2) terminadora de la ADP-glucosa pirrofosforilasa de *Oriza sativa*, la secuencia terminadora del gen de zeína de *Zea mays*, el terminador del gen rbcS-1A, y las secuencias terminadoras del gen rbcS-3A, entre otros.

10 Secuencias promotoras preferidas de la invención incluyen promotores específicos para raíces y promotores específicos para semillas tales como pero no limitándose a los que aparecen en lista en la Tabla 5, Tabla 4, y tal como se delineó en los Ejemplos.

Tabla 5. Promotores de ejemplo específicos para raíces para uso en la ejecución de la presente especificación

NOMBRE	ORIGEN	REFERENCIA
SbPRP1	Soja	Suzuki et al., Plant Mol Biol, 21: 109-119, 1993
636 bp fragmento de TobRB7	Tabaco	Yamamoto et al., Plant Cell 3:371-382, 1991
GGPS3	Arabidopsis	Okada et al., Plant Physiol 122: 1045-1056, 2000
580 bp fragmento de prxEa	Arabidopsis	Wanapu and Shinmyo, Ann N Y Acad Sci 782: 107-114, 1996
Promotor Ids2	Cebada	Okumura et al., Plant Mol Biol 25: 705-719, 1994
AtPRP3	Arabidopsis	Fowler et al., Plant Physiol 121: 1081-1092, 1999

Los experimentados en la técnica conocerán secuencias promotoras y secuencias terminadoras adicionales que pueden ser adecuadas para uso en la ejecución de la invención. Tales secuencias pueden ser utilizadas fácilmente sin experimentación indebida.

5 En el contexto de la presente invención, "expresión ectópica" o "sobrexpresión ectópica" de un gen o una proteína se refieren a los patrones de expresión y/o niveles de expresión de dicho gen o proteína que no se presentan normalmente bajo condiciones naturales, más específicamente se entiende que incrementan los niveles de expresión y/o expresión incrementada. La expresión ectópica puede lograrse de diferentes maneras incluyendo el

10 enlazamiento operativo de una secuencia de codificación que codifica dicha proteína a un promotor homólogo o heterólogo o aislado con el fin de crear un gen quimérico y/o enlazando de manera operativa dicha secuencia de codificación a su propio promotor aislado (esto es, el promotor aislado de forma natural que conduce la expresión de dicha proteína) con el fin de crear una duplicación de gen recombinante o un efecto de multiplicación de genes. Con

15 "coexpresión ectópica" se entiende la expresión ectópica o sobrexpresión ectópica de dos o más genes o proteínas. El mismo o, más preferiblemente, diferentes promotores se usan para conferir expresión ectópica de dichos genes o proteínas.

Preferiblemente, la secuencia de promotor utilizada en el contexto de la presente invención está enlazada operativamente a una secuencia de codificación o un marco de lectura abierta (ORF) que codifica una proteína citoquinina oxidasa o un homólogo, derivado o un fragmento inmunológicamente activo y/o funcional de la misma como se definió anteriormente.

"Subregulación de la expresión" tal como se utiliza aquí indica hacer disminuir los niveles de la expresión genética y/o los niveles de producto genético activo y/o los niveles de actividad del producto genético. Los descensos en la expresión pueden ser logrados por ejemplo mediante la adición de secuencias codificadoras o partes de las mismas en una orientación de sentido (si no da como resultado la cosupresión) o en una orientación antisentido con respecto a una secuencia promotora y adicionalmente por ejemplo mutagénesis por inserción (por ejemplo, inserción de T-ADN o inserción por transposición), o por estrategias de silenciamiento de genes tal como lo describe por ejemplo Angell y Baulcombe ((1998 WO9836083), Lowe et al. (1989 - WO9853083), Lederer et al. (1999 - WO9915682) or Wang et al. (1999 - WO9953050). Los constructos genéticos como objetivo en la expresión del gen silenciador pueden tener la secuencia de nucleótidos de dicho gen (o una o más partes de la misma) contenidas en una orientación en sentido y/o antisentido con respecto a la secuencia de promotor. Otro método para subregular la expresión de los genes comprende el uso de Ribozimas.

La modulación, incluyendo la disminución, del nivel de productos genéticos activos o de la actividad de un producto genético puede lograrse administrando o exponiendo células, tejidos, órganos y organismos a dicho producto genético, un homólogo, derivado y/o fragmento inmunológicamente activo del mismo. La inmunomodulación es otro ejemplo de técnica capaz de subregular los niveles de producto genético activo y/o de actividad del producto genético y comprende la administración de o la exposición a o la expresión de anticuerpos a dicho producto genético a o en células, tejidos, órganos u organismos en donde los niveles de dicho producto genético y/o de actividad del producto genético deben ser modulados. Tales anticuerpos comprenden "planticuerpos", anticuerpos de cadena individual, anticuerpos IgG y anticuerpos de camello de cadena pesada así como fragmentos de los mismos.

40 La modulación, incluyendo la disminución, el nivel de productos genéticos activos o la actividad de productos genéticos pueden adicionalmente lograrse mediante la administración o exposición de células, tejidos, órganos u organismos a un antagonista de dicho producto genético o la actividad del mismo. Tales agonistas incluyen proteínas (que comprenden, por ejemplo, quinasas y proteinasas) y compuestos químicos identificados de acuerdo con la presente especificación como se describió anteriormente.

- En el contexto de la presente especificación se prevé la subregulación de la expresión de un gen de citoquinina oxidasa como se definió anteriormente. Preferiblemente dicho gen de citoquinina oxidasa es un gen de citoquinina oxidasa vegetal, más específicamente un AtCKX. La especificación divulga adicionalmente las subregulación de los niveles de una proteína citoquinina oxidasa o de una actividad de citoquinina oxidasa mediante la cual dicha proteína de citoquinina oxidasa ha sido definida anteriormente. Preferiblemente dicha proteína de citoquinina oxidasa es una citoquinina oxidasa vegetal, más específicamente una AtCKX.
- Por “modificar el destino de una célula y/o el desarrollo y/o la morfología de la planta y/o la bioquímica y/o la fisiología” se entiende que una o más características de desarrollo y/o morfológicas y/o bioquímicas y/o fisiológicas de una planta se alteran por la ejecución de una o más etapas que son pertinentes a la invención aquí descritas.
- “Destino de las células” se refiere a las características de tipo celular o celulares de una célula en particular que son producidas durante el desarrollo de una planta o de un proceso celular de la misma, en particular durante el ciclo celular o como una consecuencia de un proceso del ciclo celular.
- “Desarrollo de la planta” o el término “característica de desarrollo de la planta” o un término similar, cuando se utiliza aquí, se entenderá como cualquier proceso celular de una planta que está involucrado en la determinación del destino en el desarrollo de una célula vegetal, en particular el tipo de tejido u órgano específico en el cual se desarrollará una célula del progenitor. Procesos celulares relevantes para el desarrollo de las plantas serán conocidos para los experimentados en la técnica. Tales procesos incluyen, por ejemplo, morfogénesis, fotomorfogénesis, desarrollo de brotes, desarrollo de raíces, desarrollo vegetativo, desarrollo reproductivo, elongación del tallo, floración y mecanismos reguladores involucrados en la determinación del destino celular, en particular un proceso o proceso regulatorio que involucra el ciclo celular.
- “Morfología de la planta” o el término “característica morfológica de la planta” o un término similar, tal como se utilizan aquí, se entenderán por los expertos en la técnica como haciendo referencia a la apariencia externa de una planta, incluyendo una cualquiera o más características estructurales o combinación de características estructurales de la misma. Tales características estructurales incluyen la forma, tamaño, número, posición, color, textura, disposición y patronamiento de cualquier célula, tejido u órgano o grupos de células, tejidos u órganos de una planta, incluyendo raíz, tallo, hoja, brotes, peciolo, tricoma, flor, pétalo, estigma, estilo, estamen, polen, ovulo, semilla, embrión, endospermo, recubrimiento de la semilla, alebrona, fibra, fruto, cambium, madera, madera interna, parénquima, aerenquima, elemento de tamizaje, floema o tejido vascular, entre otros.
- “Bioquímica de la planta” o el término “característica de la bioquímica de la planta” o similar o término similar, tal como se utiliza aquí, se entenderá por los experimentados en la técnica como referencia a los procesos metabólicos y catalíticos de una planta, incluyendo metabolismo primario y secundario y los productos de los mismos, incluyendo moléculas pequeñas, macromoléculas o compuestos químicos, tales como pero no limitándose a almidones, azúcares, proteínas, péptidos, enzimas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas de ácidos nucleicos, celulosas, hemicelulosas, callosas, lectinas, fibras, pigmentos tales como antocianinas, vitaminas, minerales, micronutrientes o macronutrientes, que son producidos por las plantas.
- “Fisiología de la planta” o el término “característica fisiológica de la planta” o términos similares, cuando se utilicen aquí, se entenderán como referencia a los procesos funcionales de una planta, incluyendo los procesos de desarrollo tales como crecimiento, expansión y diferenciación, desarrollo sexual, reproducción sexual, fijación de semillas, desarrollo de semillas, llenado de granos, reproducción asexual, división celular, hibernación, germinación, adaptación, a la luz, fotosíntesis, expansión de las hojas, producción de fibra, crecimiento secundario o producción de madera, entre otros; respuestas de una planta a factores aplicados externamente tales como metales, agentes químicos, hormonas, factores de crecimiento, factores de estrés del ambiente y ambiental (por ejemplo, anoxia, hipoxia, alta temperatura, baja temperatura, y deshidratación, luz, longitud del día, inundación, sal, metales pesados, entre otros), incluyendo respuestas adaptativas de las plantas a dichos factores aplicados externamente.
- Los medios para introducir ADN recombinante en un tejido o células vegetales incluyen, pero no se limitan a, transformación utilizando CaCl_2 y variaciones del mismo, en particular el método descrito por Hanahan (1983), absorción de ADN directa en los protoplastos (Krens et al., 1982; Paszkowski et al., 1984), toma de protoplastos mediada por PEG (Armstrong et al., 1990), bombardeo con micropartículas, electroporación (Fromm et al., 1985), microinyección de ADN (Crossway et al., 1986), bombardeo con micropartículas de explantes o células de tejidos (Christou et al., 1988), infiltración al vacío de tejidos con ácido nucleico, o en el caso de las plantas, transferencia mediada por T-ADN de *Agrobacterium* al tejido de la planta tal como se describe esencialmente en An et al. 1985 Dodds et al., (1985), Herrera-Estrella et al. (1983a, 1983b, 1985). Métodos para la transformación de plantas monocotiledoneas son bien conocidas en el arte e incluyen la transformación mediada por *Agrobacterium* (Cheng et al., 1997 - WO9748814; Hansen 1998 - WO9854961; Hiei et al., 1994 - WO9400977; Hiei et al., 1998 - WO9817813; Rikiishi et al., 1999 - WO9904618; Saito et al., 1995 - WO9506722), bombardeo con microproyectiles (Adams et al., 1999 - US5969213; Bowen et al., 1998 - US5736369; Chang et al., 1994 - WO9413822; Lundquist et al., 1999 - US5874265/US5990390; Vasil and Vasil, 1995 - US5405765. Walker et al., 1999 - US5955362), consume de ADN

(Eyal et al., 1993 - WO9318168), microinyección de células de *Agrobacterium* (von Holt, 1994 - DE4309203) y sonicación (Finer et al., 1997 - US5693512).

5 Para el bombardeo de células con micropartículas, se impulsa una micropartícula hacia una célula para producir una célula transformada. Puede utilizarse cualquiera metodología y aparato balístico adecuado para la transformación celular en la ejecución de la presente invención. Aparatos y procedimientos de ejemplo son discutidos por Stomp et al. (patente de los Estados Unidos No 5,122,466) y Sanford y Wolf (patente de los Estados Unidos No 4,945,050). Cuando se utilizan procedimientos balísticos de transformación, el constructo del gen puede incorporar un plásmido capaz de replicarse en la célula que se va a transformar. Ejemplos de micropartículas adecuadas para uso en tales sistemas incluyen esferas de oro de 1 a 5 µm. El constructo de ADN puede ser depositado en la micropartícula por cualquier técnica adecuada, tal como precipitación.

10 Una planta entera puede ser regenerada a partir de la célula transformada o transfectada de acuerdo con procedimientos bien conocidos en el arte. El tejido vegetal capaz de propagación clonal subsecuente, bien sea por organogénesis o embriogénesis, puede ser transformado por un constructo del gen divulgado y una planta entera regenerada a partir de la misma. El tejido particular escogido variará dependiendo de los sistemas de propagación de clones disponibles, y más adecuados a las especies en particular que están siendo transformadas. Objetivos de tejidos de ejemplo incluyen discos de hojas, polen, embriones, cotiledones, hipocotiledones, megagametofitos, tejido calloso, tejido meristemático existente (por ejemplo, meristema apical, nódulos axilares y meristemas de raíz), y tejido de meristema inducido (por ejemplo, meristema de cotiledón y meristema de hipocotilo); el término "organogénesis" tal como se utiliza aquí, significa un proceso por el cual se desarrollan brotes y raíces secuencialmente a partir de centros meristemáticos.

15 El término "embriogénesis", tal como se utiliza aquí, significa un proceso mediante el cual brotes y raíces se desarrollan juntos en un forma concertada (no secuencialmente) bien sea de células somáticas o gametos.

20 Preferiblemente, la planta producida de acuerdo con el método de la invención es transfectada o transformada con una secuencia genética o susceptible a la introducción de una proteína, por medios reconocidos en el arte, tales como bombardeo con microproyectiles, microinyección, transformación mediada por *Agrobacterium* (incluyendo transformación in planta), fusión de protoplastos, o electroporación, entre otros. Más preferiblemente dicha planta es producida por transformación mediada por *Agrobacterium*. La transformación mediada por *Agrobacterium* o transformación agrolística de plantas, levaduras, mohos u hongos filamentosos se basa en la transferencia de parte de las secuencias de vector de transformación, llamado T-ADN, al núcleo e integración de dicho T-ADN en el genoma de dicho eucariote.

25 Con "Agrobacterium" se entiende un miembro de las Agrobacteriasceas, más preferiblemente *Agrobacterium* o *Rizobacterium* y lo más preferiblemente *Agrobacterium tumefaciens*.

30 Con "T-ADN" o "ADN transferido", se entiende que parte del vector de transformación flanqueado por bordes de T-ADN, el cual, después de la activación de los genes del *Agrobacterium vir*, es replicado en los bordes de T-ADN y es transferido como un ADN de cadena individual al núcleo de una célula eucariótica.

35 Cuando se usa aquí, con "bordes de T-ADN", "región frontera de T-ADN" o "región frontera" se entienden como frontera derecha de T-ADN (RB) o frontera izquierda de T-ADN (LB). Tal frontera comprende una secuencia de núcleo flanqueada por una región de frontera interna como parte del flanqueamiento de T-ADN de la frontera y/o una región externa a la frontera como parte del esqueleto de vector que plantea la frontera. Las secuencias de núcleo comprenden 22 bp en caso de vectores tipo octopina y 25 bp en caso de vectores tipo nopalina. Las secuencias de núcleo en la región de la frontera derecha y la región de la frontera izquierda forman repeticiones imperfectas. Las secuencias de núcleo de frontera son indispensables para el reconocimiento y procesamiento del complejo de duplicación de *Agrobacterium* que consiste de al menos VirD1 y VirD2. Las secuencias de núcleo que flanquean un T-ADN son suficientes para promover la transferencia de dicho T-ADN. Sin embargo, la eficiencia de la transformación utilizando vectores de transformación que portan dicho T-ADN flanqueado solamente por dichas secuencias de núcleo es baja. La frontera interna y las regiones externas son conocidas por modular la eficiencia de transferencia por T-ADN (Wang et al, 1987). Un elemento que potencia la transferencia de T-ADN ha sido caracterizado y reside en la región externa de la frontera derecha y se denomina sobreconductor (Peralta et al. 1986, van Haaren et al. 1987).

40 Con "vector de transformación de T-ADN" o "vector de T-ADN" se entiende cualquier vector que abarca una secuencia de T-ADN flanqueada por una frontera derecha e izquierda de T-ADN consistente de al menos las secuencias de núcleo de la frontera derecha e izquierda, respectivamente, y se utiliza para transformación de cualquier célula eucariótica.

45 Con "secuencia del esqueleto del vector de T-ADN" o "secuencias del esqueleto de vector de T-ADN" se entienden todos los ADN de un vector que contiene T-ADN el cual yace fuera de las fronteras de T-ADN y, más específicamente, por fuera de los sitios de duplicación de las repeticiones imperfectas del núcleo de la frontera.

- La especificación presente incluye vectores de T-ADN optimizados de tal forma que la integración del esqueleto de vector en el genoma de una célula eucariótica es minimizada o ausente. Con “vector de T-ADN optimizado” se entiende un vector de T-ADN diseñado bien sea para hacer disminuir o abolir la transferencia de las secuencias esqueleto del vector al genoma de la célula eucariótica. Tales vectores de T-ADN son conocidos para la persona familiarizada con la técnica e incluyen los descritos por Hanson et al. (1999) y por Stuver (1999 – W09901563).
- La presente invención claramente considera la inclusión de una secuencia de ADN que codifica una citoquinina oxidasa, homólogo, fragmento o fragmento inmunológicamente activo y/o funcional de la misma tal como se definió anteriormente, en cualquier vector de T-ADN que comprende vectores de transformación binaria, vectores de transformación superbinaria, vectores de transformación cointegrada, vectores de transformación derivada Ri así como en vectores que portan T-ADN utilizados en transformación agrolística. Preferiblemente, dicha citoquinina oxidasa es una citoquinina oxidasa vegetal, más específicamente una *Arabidopsis thaliana* (At)CKX
- Con “vector de transformación binario” se entiende un vector de transformación de T-AND que comprende:
- (a) una región de T-ADN que comprende al menos un gen de interés y/o al menos un marcador seleccionable activo en la célula eucariótica que va ha ser transformada; y
- (b) una región de esqueleto de vector que comprende al menos orígenes de la replicación activa en *E. coli* y *Agrobacterium* y marcadores para la selección en *E. coli* y *Agrobacterium*.
- Las fronteras de T-ADN de un vector de transformación binario pueden derivarse a partir de plásmidos tipo octopina o tipo nopalina Ti o de ambos. El T-ADN de un vector binario se transfiere solamente a una célula eucariótica en conjunción con un plásmido auxiliar.
- Con “plásmido auxiliar” se entiende un plásmido que se mantiene de manera estable en un *Agrobacterium* y al menos porta el conjunto de genes Vir necesarios para permitir la transferencia del T-ADN. Dicho conjunto de genes vir puede derivarse bien sea de los plásmidos tipo octopina o tipo nopalina Ti o de ambos.
- Con “vector de transformación superbinario” se entiende un vector de transformación binaria que porta adicionalmente en la región del esqueleto del vector una región vir del plásmido Ti pTiBo542 de la cepa A281 de *A. Tumefaciens* supervirulenta (EP0604662, EP0687730). Los vectores de conformación superbinaria se utilizan en conjunción con un plásmido auxiliar.
- Con “vector de transformación cointegrados” se entiende un vector de T-ADN el cual comprende al menos:
- (a) una región de T-ADN que comprende al menos un gen de interés y/o al menos un marcador seleccionable activo en plantas; y
- (b) una región de esqueleto de vector que comprende al menos orígenes de la replicación activa en *Escherichia coli* y *Agrobacterium*, y marcadores para la selección en *E. coli* y *Agrobacterium* y un conjunto de genes vir necesarios para potenciar la transferencia del T-ADN.
- Las fronteras de T-ADN y dicho conjunto de genes vir de dicho vector de T-ADN pueden derivarse bien sea de plásmidos tipo octopina o plásmidos tipo neopalina o de ambos.
- Con “vectores de transformación de plantas derivados de Ri” se entiende un vector de transformación binario en el cual las fronteras de T-ADN son derivadas de un plásmido Ti, y dicho vector de transformación binario que se usa junto con un plásmido Ri formando el conjunto necesario de genes vir.
- Tal como se utiliza aquí, el término “gen marcador seleccionable” o “marcador seleccionable” o “marcador para selección” incluye cualquier gen que confía un fenotipo sobre una célula que se exprese para facilitar la identificación y/o selección de células que son transfectadas o transformadas con un constructo de gen divulgado o un derivado del mismo. Genes de marcadores adecuados seleccionables contemplan aquí incluyen la resistencia a la ampicilina (Amp^r), gen de resistencia a la tetraciclina (Tc^r), gen de resistencia de la kanamicina bacteriana Kan^r), gen de resistencia a fosfotricina, gen de neomicina fosfotransferasa (nptII), gen de resistencia a la higromicina, (gen de β glucuronidasa (GUS), gen de cloramfenicol acetiltransferasa (KAT), gen de la proteína verde fluorescente resistente (gfp), (Haseloff et al, 1997) y gen de la luciferasa, entre otros.
- Con “agrolística”, “transformación agrolística” o “transferencia agrolística” se entiende aquí un método de transformación que combina características de transformación mediada por *Agrobacterium* o administración biolística de ADN. Como tal, un plásmido objetivo que contiene T-ADN es coadministrado con ADN/ARN lo que permite la producción de una planta de VirD1 y VirD2 con o sin VirE2 (Hansen y Chilton 1996, Hansen et al. 1997; Hansen y Chilton 1997 – W09712046).

Con “ADN foráneo” se entiende cualquier secuencia de ADN que es introducida en el genoma del huésped mediante técnicas recombinantes. Tal ADN foráneo incluye por ejemplo, una secuencia de T-ADN o una parte de la misma tal como la secuencia de T-ADN que comprende el marcador seleccionable en un formato expresable. El ADN foráneo incluye adicionalmente secuencias de ADN intervinientes tal como se definió anteriormente.

- 5 Con “evento de recombinación” se entiende cualquier evento de recombinación específica en un sitio o un evento de recombinación efectuado por “salto” de transposón.

Con “recombinasa” se entiende cualquier recombinasa específica de un sitio o una transposasa.

Con “sitio de recombinación” se entiende cualquier sitio de recombinación específica del sitio o secuencias de frontera de transposón.

- 10 Con “evento de recombinación específico del sitio” se entiende cualquier evento catalizado por un sistema que consiste generalmente de tres elementos: un par de secuencias de ADN (las secuencias o sitios de recombinación específicos para el sitio) y una enzima específica “la recombinasa específica para el sitio”. La recombinasa específica para el sitio cataliza una reacción de recombinación solamente entre dos secuencias de recombinación específicas para el sitio dependiendo de la orientación de las secuencias de recombinación específicas para el sitio.
- 15 Las secuencias intervinientes entre dos sitios de recombinación específicos para el sitio se invertirán en la presencia de la recombinasa específica para el sitio cuando las secuencias de recombinación específicas para el sitio se orienten en direcciones opuestas una con respecto a la otra (esto es, repeticiones invertidas). Si las secuencias de recombinación específicas del sitio se orientan en la misma dirección una con respecto a la otra (esto es, repeticiones directas), entonces cualquier secuencia interviniente será eliminada por interacción con la recombinasa específica para el sitio. Así, si las secuencias de recombinación específicas para el sitio están presentes como repeticiones directas en ambos extremos de una secuencia de ADN foránea integrada en un genoma eucariótico, tal integración de dichas secuencias puede ser reversada subsecuentemente por interacción de las secuencias de recombinación específicas para el sitio con la correspondiente recombinasa específica para el sitio.
- 20

- 25 Puede utilizarse un cierto número de diferentes sistemas de recombinasa específicos para el sitio incluyendo pero no limitándose al sistema cre/lox del bacteriófago P1, el sistema FLP/FRT de levaduras, la recombinasa Gin del fago Mu, la recombinasa Pin de E. coli, la PinB, PinD y PinF de Shigella, y el sistema R/RS del plásmido pSR1. Las recombinasas en general son integrasas, resolvasas o flipasas. También pueden utilizarse recombinasas de especificidad doble en conjunción con repeticiones directas o indirectas de dos sitios de recombinación específicas para el sitio diferentes correspondientes a la recombinasa de especificidad doble (WO99/25840). Los dos sistemas de recombinasa específica para el sitio preferidos son los sistemas de bacteriófago P1 Cre/lox y de levadura FLP/FRT. Estos sistemas una recombinasa (Cre o FLP) interactúa específicamente con su secuencia de recombinación específica para el sitio (lox o FRT respectivamente) para invertir o escindir las secuencias intervinientes. Las secuencias de recombinación específicas para el sitio para cada uno de estos dos sistemas son relativamente cortas (34 bp para lox y 47 bp para FRT). Algunos de estos sistemas ya han sido usados con alta eficiencia en plantas tales como tabaco (Dale et al. 1990) y Arabidopsis (Osborne et al. 1995). Los sistemas de recombinación específicos para el sitio tiene muchas aplicaciones en la biología molecular de las plantas incluyendo métodos para controlar la recombinación homóloga (por ejemplo US 5527695), para inserción dirigida, apilamiento de genes, etc. (WO99/25821) y para resolución de patrones de integración de T-ADN complejos o para la escisión de un marcador seleccionable (WO99/23202).
- 30
- 35

- 40 Aunque las secuencias de recombinación específicas para el sitio deben estar enlazadas a los extremos del ADN o para ser escindidas o invertidas, el gen que codifica la recombinasa específica para el sitio puede estar localizado en cualquier lugar. Por ejemplo, el gen de recombinasa podría estar presente ya en el ADN de las eucariotas o podría ser suministrado mediante un fragmento posterior de ADN introducido bien sea directamente en las células, a través de cruzamiento o a través de polinización cruzada. Alternativamente, una proteína recombinasa sustancialmente purificada podría ser introducida directamente en la célula eucariótica, por ejemplo, por microinyección o bombardeo con partículas. Típicamente, la región de codificación y la recombinasa específica del sitio estaría enlazada operativamente a secuencias reguladoras que permiten la expresión de la recombinasa específica para el sitio en la célula eucariótica.
- 45

- 50 Con “evento de recombinación afectado por el salto de transposones” o “recombinación mediada por transposasa” se entiende una recombinación catalizada bien sea por un sistema consistente de tres elementos: un par de secuencias de ADN (las secuencias de frontera del transposón) y una enzima específica (la transposasa). La transposasa cataliza una reacción de recombinación solamente entre dos secuencias de frontera de transposones los cuales están dispuestos como repeticiones invertidas.

- 55 Puede utilizarse cierto número de diferentes sistemas transposón/transposasa, incluyendo pero no limitándose al sistema Ds/Ac, el sistema Spm y el sistema Mu. Estos sistemas se originan a partir de maíz, pero han demostrado que al menos los sistemas Ds/Ac y el Spm también funcionan en otras plantas (Fedoroff et al. 1993, Schlappi et al.

1993, Van Sluys et al. 1987). Se prefieren los transposones tipo Ds- y SPM- los cuales son delineados por secuencias de frontera de 11 bp- y 13 bp-, respectivamente.

5 Aunque las secuencias de frontera del transposón deben estar enlazadas a los extremos del ADN que se va a escindir, el gen que codifica la transposasa puede estar localizado en cualquier lugar. Por ejemplo, el gen de recombinasa podría ya estar presente en el ADN de eucariotas o podría ser suministrado por un fragmento de ADN introducido posteriormente bien sea introducido directamente en las células, a través de cruzamiento o a través de polinización cruzada. Alternativamente, una proteína transposasa sustancialmente purificada podría ser introducida directamente en las células, por ejemplo por microinyección o por bombardeo con partículas.

10 Como parte de la especificación presente, las secuencias de frontera de transposón se incluyen en una secuencia de ADN foráneo tal que caen por fuera de dicha secuencia de ADN y transforman dicho ADN en una entidad similar a un transposón que puede moverse por la acción de una transposasa.

15 Puesto que los transposones se reintegran frecuentemente en otra localización del genoma del huésped, podría ser necesaria la segregación de la progenie del huésped en el cual se permitió que la transposasa actúe para separar huéspedes transformados que contienen, por ejemplo, solamente la huella del transposón y huéspedes transformados que contienen aún el ADN foráneo.

20 Al llevar a cabo la presente invención, el elemento genético es preferiblemente inducido a movilizarse tal como, por ejemplo, mediante la expresión de una proteína recombinasa en la célula la cual entra en contacto con el sitio de integración del elemento genético y facilita un evento de recombinación en el mismo, escindiendo el elemento genético completamente, o alternativamente, dejando una "huella", generalmente de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud o mayor, en el sitio de integración original. Estos huéspedes y partes del huésped que han sido producidos de acuerdo con el método de la invención pueden ser identificados por hibridación estándar de ácidos nucleicos y/o técnicas de amplificación para detectar la presencia del elemento genético movilizable o un constructo de gen que comprende el mismo. Alternativamente, en el caso de células huésped transformadas, tejidos y huéspedes en donde el elemento genético movilizable ha sido escindido, es posible detectar una huella en el genoma del huésped al que se ha dejado seguir el evento de escisión, utilizando tales técnicas. Tal como se utiliza aquí, el término "huella" debe tomarse como referencia a cualquier derivado de un elemento genético movilizable o constructo de gen que comprende el mismo tal como se describe aquí el cual es producido por escisión, eliminación u otra eliminación del elemento genético movilizable del genoma de una célula transformada previamente con dicho constructo de gen. Una huella comprende generalmente al menos una copia sencilla de los lugares de recombinación o transposón utilizados para promover la escisión. Sin embargo, una huella puede comprender secuencias adicionales derivadas del constructo del gen, por ejemplo secuencias de nucleótidos derivadas de la secuencia de frontera izquierda, secuencia de frontera derecha, origen de la replicación, secuencia de codificación de recombinasa o de codificación de transposasa si se usa, o las secuencias de nucleótidos derivadas del vector. De acuerdo con lo anterior, una huella es identificable de acuerdo con la secuencia de nucleótidos del lugar de recombinación o transposón del constructo de gen usado, tal como, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que corresponden o son complementarios a un sitio lox o un sitio frt.

40 El término "ciclo celular" significa los eventos bioquímicos y estructurales cíclicos asociados con el crecimiento y con la división de las células, y en particular con la regulación de la replicación del ADN y la mitosis. El ciclo celular incluye fases denominadas: G0, Gap1 (G1), síntesis de ADN (S), Gap2 (G2) y mitosis (M). Normalmente estas cuatro fases ocurren secuencialmente, sin embargo el ciclo celular también incluye ciclos modificados en donde una o más fases están ausentes dando como resultado un ciclo celular modificado tal como endomitosis, acitoquinesis, poliploide, politenia, y endoreduplicación.

45 El término " progresión del ciclo celular" se refiere al proceso de pasar a través de las diferentes fases del ciclo celular. El término "rata de progresión del ciclo celular" de acuerdo con lo anterior se refiere a la velocidad a la cual dichas fases del ciclo celular trascurren o los lapsos de tiempo requeridos para completar dichas fases de ciclo celular.

50 Con "ensayo de dos híbridos" se entiende un ensayo que se basa en la observación de muchos factores de transcripción eucariótica que comprenden dos dominios, un dominio enlazante a ADN (DB) y un dominio de activación (AD) los cuales, cuando se separan físicamente (esto es, perturbación en enlace covalente) no efectúan la expresión genética objetivo. Dos proteínas capaces de interactuar físicamente con una de dichas proteínas fusionadas a DB y la otra de dichas proteínas fusionadas a AD reunirán los dominios DB y AD del factor de transcripción dando como resultando la expresión del gen objetivo. El gen objetivo en el ensayo de dos híbridos en levaduras es usualmente un gen informador tal como el gen de β -galactosidasa. La interacción entre asociados de proteína en el ensayo de dos híbridos en levadura puede cuantificarse midiendo la actividad del producto del gen informador (Bartel y Fields, 1997). Alternativamente, puede utilizarse un sistema de dos híbridos de mamífero el cual incluye por ejemplo una proteína fluorescente verde quimérica que codifica el gen informador (Shioda et al., 2000).

Adicionalmente las simulaciones de plegamiento y el rediseño por ordenador de los motivos estructurales de la proteína divulgada pueden ejecutarse utilizando programas de ordenador apropiados (Olszewski, *Proteins* 25 (1996), 286-299; Hoffman, *Comput Appl Biosci* 1 (1995), 675-679). La modelación por ordenador del plegamiento de las proteínas puede utilizarse para el análisis conformacional y energético del péptido y modelos de proteína detallados (Monge, *J. Mol Biol.* 247 (1995), 995-1012; Renouf, *Adv Exp Med Biol.* 376 (1995), 37-45). En particular, pueden utilizarse programas apropiados para la identificación de sitios interactivos de las citoquinina oxidasas, sus ligandos u otras proteínas interactuantes mediante búsquedas asistidas por ordenador para secuencias de péptidos complementarias (Fassina, *Immunomethods* 5 (1994), 114-120). Sistemas de ordenador apropiados adicionales para el diseño de proteínas y péptidos se describen en la técnica anterior, por ejemplo en Berry, *Biochem. Soc. Trans.* 22 (1994), 1033-1036; Wodak, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 501 (1987), 1-13; Pabo, *Biochemistry* 25 (1986), 5987-5991. Los resultados obtenidos a partir de los análisis por ordenador antes descritos pueden ser utilizados para, por ejemplo, la preparación de peptidomiméticos de la proteína divulgada o fragmentos de la misma. Tales análogos pseudopeptídicos de la secuencia natural de aminoácidos de la proteína pueden imitar muy eficientemente la proteína original (Benkirane, *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 33.218 a 33224). 33224). Por ejemplo, la incorporación de residuos de Ω -aminoácidos acquirales fácilmente disponibles en una proteína divulgada o en un fragmento de la misma da como resultado la sustitución de enlaces amino por unidades polimetileno de una cadena alifática, proveyendo por lo tanto una estrategia conveniente para construir un peptidomimético (Banerjee, *Biopolymers* 39 (1996), 769-777). Los análogos peptidomiméticos superactivos de hormonas peptídicas pequeñas en otros sistemas están descritos en la técnica anterior (Zhang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224 (1996), 327-331). Los peptidomiméticos apropiados de la proteína divulgada en la invención también pueden ser identificados mediante la síntesis de bibliotecas combinacionales peptidomiméticas a través de alquilación amínica sucesiva y prueba de los compuestos resultantes, por ejemplo, en cuanto a sus propiedades de enlazamiento, inhibidoras de la quinasa y/o inmunológicas. En la técnica se describen métodos para la generación y uso de bibliotecas combinacionales peptidomiméticas, por ejemplo en Ostresh, *Methods in Enzymology* 267 (1996), 220-234 y Dorner, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996), 709-715.

Adicionalmente, puede utilizarse una estructura tridimensional y/o cristalográfica de la proteína divulgada en la invención para el diseño de inhibidores peptidomiméticos de la actividad biológica de la proteína divulgada (Rose, *Biochemistry*, 35 (1996), 12933-12944; Ruterber, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996), 1545-1558).

Los compuestos que se van a obtener o identificar en los métodos de la especificación pueden ser compuestos que son capaces de enlazarse a cualquiera de los ácidos nucleicos, péptidos o proteínas divulgados. Otros compuestos interesantes para ser identificados son compuestos que modulan la expresión de los genes o las proteínas de la especificación de tal manera que la expresión de dicho gen o proteína es potenciada o disminuida por la acción de dicho compuesto. Alternativamente el compuesto puede ejercer su acción potenciando o haciendo disminuir la actividad de cualquiera de las proteínas de la especificación. Aquí, las proteínas preferidas son citoquinin oxidasas novedosas.

Dicho compuesto o pluralidad de compuestos puede estar comprendido en, por ejemplo, muestras, por ejemplo extractos celulares de, por ejemplo, plantas, animales o microorganismos. Adicionalmente, dichos compuestos pueden ser conocidos en el arte pero hasta ahora no conocidos como capaces de suprimir o activar las proteínas interactuantes con la citoquinina oxidasa. La mezcla de reacción puede ser un extracto libre de células o puede comprender un cultivo de células o tejidos. Configuraciones adecuadas del método divulgado son conocidas para la persona experimentada en la técnica y están descritas, por ejemplo, de manera general en Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, third edition (1994), en particular en el Capítulo 17. La pluralidad de los compuestos puede ser agregada, por ejemplo, a la mezcla de reacción, medio de cultivo o inyectada en la célula.

Si una muestra que contiene un compuesto o una pluralidad de compuestos es identificada en el método de la especificación, es posible entonces aislar el compuesto de la muestra original identificada por contener el compuesto capaz de actuar como agonista, o puede adicionalmente subdividir la muestra original, por ejemplo, si consiste de una pluralidad de compuestos diferentes, de tal manera que se reduzca el número de sustancias diferentes por muestra y repetir el método con las subdivisiones de la muestra original. Dependiendo de la complejidad de las muestras, las etapas descritas anteriormente pueden llevarse a cabo varias veces, preferiblemente hasta que la muestra identificada de acuerdo con el método divulgado comprenda solamente un número limitado de o solamente una sustancia (s). Preferiblemente dicha muestra comprende sustancias o propiedades químicas y/o físicas similares, y lo más preferiblemente dichas sustancias son idénticas. Preferiblemente, el compuesto identificado con el método antes descrito o su derivado se formula adicionalmente en una forma adecuada para la aplicación en cultivo de la plantas o en cultivo de células y tejidos de plantas.

El término "vigor temprano" se refiere a la capacidad de una planta para crecer rápidamente durante un desarrollo temprano, y se relaciona con el establecimiento exitoso, después de la germinación, de un sistema de raíces bien desarrollado y un aparato fotosintético bien desarrollado.

El término "resistencia al alojamiento" o "verticalidad" se refiere a la capacidad de una planta para fijarse por si misma al suelo. Para plantas con un hábito de crecimiento erecto o semierecto este término también se refiere a la

capacidad de mantener una posición vertical bajo condiciones (ambientales) adversas. Esta característica se relaciona con el tamaño, profundidad y morfología del sistema radicular.

5 El término "injerto" tal como se utiliza aquí, se refiere a la unión entre sí de las partes de dos plantas diferentes de tal manera que se unan entre sí y la savia pueda fluir, formando así una nueva planta individual que puede crecer y desarrollarse. Un injerto consiste por lo tanto de dos partes: (i) la parte inferior es la raíz tal como se denomina aquí y consiste esencialmente del sistema radicular y una porción del tallo, y (ii) la parte superior, el injerto, el cual da lugar a las partes aéreas de la planta.

10 Tal como se utiliza aquí, tblastn se refiere a una herramienta de alineamiento que es parte de la familia de programas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). BLAST tiene como objetivo identificar regiones de alineamiento local óptimo, esto es, el alineamiento de una porción de dos secuencias de ácidos nucleicos o proteínas, para detectar relaciones entre secuencias que comparten solamente regiones aisladas de similitud (Altschul et al., 1990). En la presente invención, el tblastn del paquete de programas BLAST 2.0 fue utilizado para comparar la secuencia de proteína citoquinina oxidasa de maíz contra una base de datos de secuencias de nucleótidos traducida dinámicamente en todos los marcos de lectura (Altschul et al, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)).

15 Los siguientes ejemplos se dan a manera de ilustración de la presente invención y de ninguna manera son limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1. Breve descripción de las secuencias de la especificación

20

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
1	<i>AtCKX1</i> genómico
2	<i>AtCKX1</i> de proteína
3	<i>AtCKX2</i> genómico
4	<i>AtCKX2</i> de proteína
5	<i>AtCKX3</i> genómico
6	<i>AtCKX3</i> de proteína
7	<i>AtCKX4</i> genómico
8	<i>AtCKX4</i> de proteína
9	<i>AtCKX5</i> genómico (versión corta)
10	<i>AtCKX5</i> de proteína (versión corta)
11	<i>AtCKX6</i> genómico
12	<i>AtCKX6</i> de proteína
13	Cebador 5' de <i>AtCKX1</i>
14	Cebador 3' de <i>AtCKX1</i>
15	Cebador 5' de <i>AtCKX2</i>
16	Cebador 3' de <i>AtCKX2</i>
17	Cebador 5' de <i>AtCKX3</i>
18	Cebador 3' de <i>AtCKX3</i>
19	Cebador 5' de <i>AtCKX4</i>
20	Cebador 3' de <i>AtCKX4</i>
21	Cebador 5' de <i>AtCKX5</i>

(continuación)

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
22	Cebador 3' de <i>AtCKX5</i>
23	Cebador 5' de <i>AtCKX6</i>
24	Cebador 3' de <i>AtCKX6</i>
25	<i>ADNc de AtCKX1</i>
26	<i>ADNc de AtCKX2</i>
27	<i>ADNc de AtCKX3</i>
28	<i>ADNc de AtCKX4</i>
29	<i>ADNc de AtCKX5</i> (versión corta)
30	<i>ADNc de AtCKX6</i>
31	<i>Fragmento de ADNc de AtCKX2</i>
32	<i>Fragmento de péptido de AtCKX2</i>
33	<i>AtCKX5</i> genómico (versión larga)
34	<i>ADNc de AtCKX5</i> (versión larga)
35	<i>Proteína de AtCKX5</i> (versión larga)
36	Promotor homólogo de raíz de <i>clavata</i>

Ejemplo 2. Identificación de genes candidatos que codifican citoquinina oxidasa de *Arabidopsis thaliana*

5 Se identificaron seis genes diferentes de *Arabidopsis thaliana* que portan similitud de secuencia a un gen de citoquinina oxidasa de maíz (Morris et al, Biochem Biophys Res Comm 255:328-333, 1999; Houda-Herlin et al Plant J 17: 615-626; WO99/06571). Estos genes fueron encontrados por selección de traducciones de marco 6 de secuencias de nucleótidos a partir de bases de datos genómicas públicas con la secuencia de proteínas del maíz, empleando el programa TBLASTN. Estas secuencias fueron designadas como genes similares a oxidasa de citoquinina de *Arabidopsis thaliana* o *AtCKX*. Fueron numerados arbitrariamente como *AtCKX1* hasta *AtCKX6*. La lista que sigue resume la información sobre estos genes. Las fronteras ORF predichas y las secuencias de proteínas son indicativas, con el fin de ilustrar la aproximación de la divergencia en las secuencia de proteínas entre las citoquinina oxidasas de *Arabidopsis* y maíz, así como entre las diferentes citoquinina oxidasas de *Arabidopsis*. Las fronteras ORF y las secuencias de proteínas mostradas no deberían tomarse como evidencia concluyente para el modo de acción de estos genes de *AtCKX*. Para secuencias de ADN y proteína se usaron comparaciones del programa MegAlign de DNASTar. Este programa utiliza el método Clustal para alineamientos.

10 Para alineamientos múltiples de secuencias de proteínas y ADNc, la penalidad por brecha y la penalidad de longitud de brecha se fijaron en 10 cada uno. Para alineamientos apareados de proteínas los parámetros son como sigue: Ktuple en 1; penalidad por brecha en 3; ventana en 5; diagonales salvadas en 5. Para alineamientos apareados de ADNc los parámetros son como sigue: Ktuple en 2; penalidad por brecha en 5; ventana en 4; diagonales salvadas en 4. Los grupos de similitud para alineamientos de proteínas fueron: (M,I,L,V), (F,W,Y), (G,A), (S,T), (R,K,H), (E,D), (N,Q). Los valores que son indicados entre las secuencias de *Arabidopsis* ADNc y proteína presentan los valores más bajos y más altos encontrados en todas las combinaciones.

A. Nombre del gen: *AtCKX1* (*proteína de Arabidopsis thaliana* similar a citoquinina oxidasa 1 SEQ ID NO: 1)

25 Localización en la base de datos (número de acceso, localización bac): AC002510, *Cromosoma II de Arabidopsis thaliana* sección 225 de 255 de la secuencia completa. Secuencia de los clones T32G6.

ORF predicho en la base de datos:

15517..16183, 16415..16542, 16631..16891, 16995..17257, 17344..17752

La secuencia de *AtCKX1* ADNc se lista como SEQ ID NO: 25

Secuencia predicha de proteína: SEQ ID NO: 2:

Homologías

% identidad con ADNc de *Z. mays*:

5 31.5% (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

% similitud con Proteína de *Z. mays*:

32.2% (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

% identidad con otros (rangos de) ADNc de *Arabidopsis*):

38.2 % (*AtCKX2*) - 54.1 % (*AtCKX6*) (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

10 % similitud con otras proteínas (rango) de *Arabidopsis*:

37.1 % (*AtCKX2*) - 58.1 % (*AtCKX6*) (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

B. Nombre del gen: *AtCKX2* (proteína 2 similar a citoquinina oxidasa de *Arabidopsis thaliana*, SEQ ID NO: 3)

Localización en la base de datos (número de acceso, localización bac): AC005917, *Cromosoma II de Arabidopsis thaliana* sección 113 of 255 de la secuencia completa. Secuencia de los clones F27F23, F3P11.

15 ORF predicho en la base de datos:

complemento, 40721..41012, 41054..41364, 41513..41770, 42535..42662, 43153..43711

Nótese, por favor: La secuencia de ADNc identificada por el inventor usando el programa de predicción de genes NetPlantGene (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) fue diferente a la anotada en la base de datos. Con base en la nueva secuencia de ADNc del ORF predicho en la base de datos se revisó:

20 complemento, 40721..41012, 41095..41364, 41513..41770, 42535..42662, 43153..43711

La secuencia de proteína codificada por este ADNc se lista como SEQ ID NO: 4. El ADNc de *AtCKX2* fue clonado por RT-PCR del ARN total de tejido de planta transgénica con el kit de una etapa de RT-PCR (Qiagen, Hilden, Germany) y secuenciado usando un kit de reacción de secuenciamiento en ciclo ABI PRISM Big Dye Terminator (Perkin Elmer Applied Biosystems Division). Esto confirmó que la secuencia de ADNc identificada y predicha por el inventor era correcta. La nueva secuencia de *AtCKX2* cDNA se lista como SEQ ID NO: 26. Un fragmento de 84-bp correspondiente a los nucleótidos 1171 a 1254 del ADNc de *AtCKX2* se lista como SEQ ID NO: 31. La correspondiente secuencia de péptidos de esta secuencia de ADNc de 84-bp se lista como SEQ ID NO: 32.

25

Homologías

% identidad con ADNc de *Z. mays*:

30 38.4% (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

% similitud con Proteína de *Z. mays*:

37.5% (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

% identidad con otros (rangos de) ADNc de *Arabidopsis*):

34.9% (*AtCKX6*) - 64.5% (*AtCKX4*) (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

35 % similitud con otras proteínas (rango) de *Arabidopsis*:

36.5% (*AtCKX6*) - 66.1 % (*AtCKX4*) (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

C. Nombre del gen: *AtCKX3* (proteína 3 de *Arabidopsis thaliana* similar a citoquinina oxidasa, SEQ ID NO: 5)

Localización en la base de datos (número de acceso, localización bac): AB024035, AND genómico de *Arabidopsis thaliana*, cromosoma 5, P1 clone: MHM17, secuencia completa.

Sin predicción del ORF en la base de datos.

5 El gen fue identificado por el inventor usando varios programas de predicción de genes incluyendo GRAIL (<ftp://arthur.epm.ornl.gov/pub/xgrail>), Genscan (<http://CCR-081.mit.edu/GENSCAN.html>) y NetPlantGene (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>):

complemento, 29415..29718, 29813..30081, 30183..30443, 30529..30656, 32107..32716

La nueva secuencia de ADNc de *AtCKX3* identificada por el inventor se lista como SEQ ID NO: 27

Secuencia predicha de proteína, basada en la propia predicción de ORF: SEQ ID NO: 6

10 Homologías

% identidad con ADNc de *Z. mays*:

38.7% (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

% similitud con Proteína de *Z. mays*:

39.2% (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

15 % identidad con otros (rangos de) ADNc de *Arabidopsis*:

38.8% (*AtCKX6*) - 51.0% (*AtCKX2*) (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

% similitud con otras proteínas (rango) de *Arabidopsis*:

39.9% (*AtCKX6*) - 46.7% (*AtCKX2*) (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

D. Nombre del gen: *AtCKX4* (Proteína 4 de *Arabidopsis thaliana* similar a citoquinina oxidasa, SEQ ID NO: 7)

20 Localización en la base de datos (número de acceso, localización bac):

1) AL079344, AND de *Arabidopsis thaliana* DNA cromosoma 4, BAC clon T16L4 (proyecto ESSA)

2) AL161575, ADN de *Arabidopsis thaliana* cromosoma 4, fragmento contiguo No. 71.

ORF predicho en la base de datos:

1) 76187..76814, 77189..77316, 77823..78080, 78318..78586, 78677..78968

25 2) 101002..101629, 102004..102131, 102638..102895, 103133..103401, 103492..103783

La secuencia de ADNc de *AtCKX4* cDNA se lista como SEQ ID NO: 28

Secuencia predicha de proteína: SEQ ID NO: 8

Homologías

% identidad con ADNc de *Z. mays*:

30 41.0% (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

% similitud con Proteína de *Z. mays*:

41.0% (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

% identidad con otros (rangos de) ADNc de *Arabidopsis*:

35.2% (*AtCKX6*) - 64.5% (*AtCKX2*) (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

35 % similitud con otras proteínas (rango) de *Arabidopsis*:

35.1 % (*AtCKX6*) - 66.1 % (*AtCKX2*) (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

E. Nombre del gen: *AtCKX5* (*Proteína 5 de Arabidopsis thaliana* similar a citoquinina oxidasa, SEQ ID NO: 9)

Localización en la base de datos (número de acceso, localización bac): AC023754, F1B16, secuencia completa, cromosome 1

5 Sin predicción del ORF en la base de datos.

El gen fue identificado por los inventores usando varios programas de predicción de genes que incluyen GRAIL (<ftp://arthur.epm.ornl.gov/pub/xgrail>), Genscan ([http://CCR-081.mit.edu/ GEN_SCAN.html](http://CCR-081.mit.edu/GEN_SCAN.html)) and NetPlantGene (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>).

43756..44347, 44435..44562, 44700..44966, 45493..45755, 46200..46560

10 La nueva secuencia de ADNc de *AtCKX5* cDNA identificada y predicha por los inventores se lista como SEQ ID NO: 29. La secuencia predicha de proteína para este ADNc se lista como SEQ ID NO: 10. Un segundo codón potencial de inicio ATG está presente 9 nucleótidos más corriente arriba en la secuencia genómica. No está claro cuál de estos dos codones de inicio codifica el primer aminoácido de la proteína. Por lo tanto, un segundo ADNc potencial de inicio de *AtCKX5* cDNA en este codón de inicio corriente arriba es listado también en esta invención como SEQ ID NO: 34. La secuencia genómica correspondiente está listada como SEQ ID NO: 33 y la proteína codificada como SEQ ID NO: 35.

Homologías

% identidad con ADNc de *Z. mays*:

39.1% (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

20 % similitud con Proteína de *Z. mays*:

36.6% (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

% identidad con otros (rangos de) ADNc de *Arabidopsis*:

40.1 % (*AtCKX2*) - 44.0% (*AtCKX3*) (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

% similitud con otras proteínas (rango) de *Arabidopsis*:

25 41.6% (*AtCKX4*) - 46.4% (*AtCKX6*) (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

F. Nombre del gen: *AtCKX6* (*Proteína 6 de Arabidopsis thaliana* similar a citoquinina oxidasa, SEQ ID NO: 11)

Localización en la base de datos (número de acceso, localización bac): AL163818, ADN de *Arabidopsis thaliana* cromosoma 3, P1 clon MAA21 (proyecto ESSA).

ORF predicho en la base de datos:

30 46630..47215, 47343..47470, 47591..47806, 47899..48161, 48244..48565

La secuencia *AtCKX6* cDNA está listada como SEQ ID NO: 30

Secuencia predicha de proteína: SEQ ID NO: 12

Homologías

% identidad con ADNc de *Z. mays*:

35 37.3% (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

% similitud con Proteína de *Z. mays*:

36.1% (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

% identidad con otros (rangos de) ADNc de *Arabidopsis*:

34.9% (*AtCKX2*) - 54.1 % (*AtCKX1*) (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

% similitud con otras proteínas (rango) de *Arabidopsis*:

35. 1 % (*AtCKX4*) - 58.1 % (*AtCKX1*) (Dnastar/MegAlign - Método Clustal)

- 5 Los genes *AtCKX3* y *AtCKX5* no fueron anotados como citoquinina oxidasas putativas en la base de datos y no se dieron los ORF para estos genes. Adicionalmente, los ORF (y consecuentemente las estructuras proteínicas) predichas para *AtCKX2* fueron diferentes de nuestra propia predicción y nuestra predicción fue confirmada por secuenciamiento del ADNc *AtCKX2*.

En la Figura 1 se muestra una comparación de la estructura genética de los genes de *Arabidopsis AtCKX 1 a 4* y el gen de maíz CKX.

- 10 Las proteínas predichas codificadas por los genes de *Arabidopsis AtCKX* muestran entre 32% y 41% de similitud en secuencia con la proteína de maíz, mientras que muestran entre 35% y 66% de similitud en secuencias uno con otro. Debido a esta conservación de secuencias reducida, no es claro a priori si los genes de *Arabidopsis AtCKX* codifican proteínas con actividad de citoquinina oxidasas. En la Figura 2 se muestra un alineamiento de las proteínas predichas de *Arabidopsis AtCKX 1 a 4* y del gen de maíz CKX.

15 **Ejemplo 3. Plantas transgénicas que sobreexpresan *AtCKX1* mostraron actividad de citoquinina oxidasas incrementada y morfología de la planta alterada**

1. Descripción de los procesos de clonación

Se utilizaron los siguientes cebadores para amplificar por PCR el gen *AtCKX1* de *Arabidopsis thaliana*, acceso Columbia (las secuencias no homólogas para clonar están en letras minúsculas):

- 20 Secuencia del cebador 5': cggtcgacATGGGATTGACCTCATCCTTACG (SEQ ID NO:13)

Secuencia del cebador 3': cggtcgacTTATACAGTTCTAGGTTTCGGCAGTAT (SEQ ID NO: 14)

- 25 Un fragmento de PCR de 2235-bp, amplificado por estos cebadores, fue insertado en el sitio Sal I de pUC19. El inserto fue secuenciado y confirmó que el producto de amplificación por PCR no contenía ninguna mutación. El fragmento Sall/Sall de este vector fue subclonado en el sitio Sall corriente abajo de un promotor CaMV 35S modificado (que porta tres secuencias operadoras de tetraciclina) en el vector binario pBinHyg-Tx (Gatz et al., 1992). El constructo resultante fue introducido en tabaco y *Arabidopsis thaliana* a través de transformación mediada por *Agrobacterium*, utilizando protocolos de transformación estándar.

2. Análisis molecular de las líneas transgénicas

- 30 Se identificaron varias líneas transgénicas que sintetizan el transcripto de *AtCKX1* a altos niveles (Figura 3). Las líneas transgénicas que expresan el transcripto de *AtCKX1* también mostraron una actividad incrementada de citoquinina oxidasas según se determinó mediante una prueba estándar para citoquinina oxidasas con base en la conversión de [2-³H]iP a adenina tal como se describe (Motyka et al., 1996). Esto es ejemplificado para 2 líneas de tabaco y 2 de *Arabidopsis* en la Tabla 6. Este resultado prueba que el gen *AtCKX1* codifica una proteína con actividad de citoquinina oxidasas.

- 35 Tabla 6. Actividad de citoquinina oxidasas en tejidos de plantas transgénicas *AtCKX1*

Muestra de hojas		
Especie de plantas	Línea de planta	Actividad de citoquininas oxidasas (nmol Ade/mg proteína.h)
<i>Arabidopsis</i>	Col-0 Tipo Silvestre	0.009
	CKX1-11	0.024
	CKX1-22	0.026
	CKX1-22	0.027
Tabaco	SNN Tipo Silvestre	0.004
	CKX1-SNN-8	0.016
	CKX1-SNN-28	0.021

3. Descripción fenotípica de las líneas transgénicas

3.1 En tabaco:

Las plantas tienen un fenotipo enanificado con dominio apical reducido (Figura 7 A, B y C) y producción radicular incrementada (Figura 8).

5 Cinco categorías de fenotipo:

- 1) fuerte - 2 clones
- 2) intermedio - 3 clones
- 3) débil - 4 clones
- 4) plantas altas (como WT) con gran inflorescencia - 5 clones

10 5) similar a WT, 9 clones

Altura (véase Figura 7 B y C)

- WT: entre 100-150 cm

- Débil: aproximadamente 75 cm

15 - Intermedio: aproximadamente 40-45 cm (tallo principal de aproximadamente 25 cm pero con sobrecrecimiento mediante ramificaciones laterales.

- Fuerte: aproximadamente 10 cm

Los AtCKX1-48 y AtCKX1-50 transgénicos desplegaron un fenotipo fuerte. Abajo están las mediciones para elongación del tallo en comparación con plantas WT:

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-48	AtCKX1-50
Días después de la germinación	Altura (cm)	Altura (cm)	Altura (cm)
47	9.5 ± 0.5	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.2
58	22.4 ± 2.3	2.2 ± 0.3	2.3 ± 0.3
68	35.3 ± 2.6	3.1 ± 0.5	2.6 ± 0.5
100	113.3 ± 9.8	7.1 ± 0.8	4.8 ± 0.9
117	138.6 ± 8.1	9.7 ± 0.7	3.6 ± 0.9
131	39.0 ± 9.3	9.3 ± 0.7	3.6 ± 1.0
152	136.6 ± 10.4	10.9 ± 1.1	10.0 ± 1.0
165		11.8 ± 1.9	11.4 ± 1.4
181		16.5 ± 1.7	14.9 ± 1.2
198		19.5 ± 1.5	18.1 ± 1.3

20 Parte experimental: Las plantas fueron cultivadas en suelo en un invernadero. Los datos fueron recolectados a partir de al menos diez plantas por línea.

Hojas (véase Figura 7 D y E)

25 La forma de las hojas de los expresadores transgénicos de AtCKX1 fue lanceoladas (largas y estrechas): la relación anchura a longitud de las hojas maduras se redujo de 1:2 en plantas tipo salvaje a 1:3 en transgénicos de AtCKX1 (Figura 7 E). El número de hojas y la superficie de las hojas se redujo en comparación con WT (véase Figura 7 D). También se notó una diferencia prominente en la progresión de la senescencia de las hojas. En el tabaco WT, la senescencia de las hojas comienza en las hojas más basales y lleva a una reducción uniforme del pigmento de las

hojas (Figura 7 E). En contraste, las hojas en envejecimiento de plantas que expresan fuertemente AtCKX1 permanecieron verdes a lo largo de las venas de las hojas y tomaron un color amarillo en las regiones intercostales, indicando una senescencia alterada de las hojas. La textura de las hojas más viejas era más rígida.

Raíces

- 5 Las plantas en crecimiento in vitro que expresaban altamente el gen fueron distinguibles fácilmente de las WT por su capacidad para formar más raíces que son más gruesas (más fuertes) (Figura 8 A), así como por la formación de raíces aéreas a lo largo del tallo.

La raíz primaria fue más larga y el número de raíces laterales y adventicias fue más alto como se ilustra en la figura 8C para plántones que sobreexpresaban AtCKX1-50 (véase también Ejemplo 9).

- 10 La curva de respuesta a la dosis de inhibición de crecimiento de raíces por citoquinina exógena mostró que las raíces de los plántones transgénicos son más resistentes a la citoquinina que las raíces WT (Figura 8 D). La resistencia de los transgénicos de AtCKX1 al iPR fue menos marcada que para AtCKX2, lo cual es consistente con los cambios menores en las citoquininas tipo IP en este último (véase Tabla 10).

- 15 Se observó un gran incremento en la biomasa de la raíz para plantas adultas cultivadas en suelo (véase Figura 8B para un crecimiento de planta en suelo de 4 a 5 meses), a pesar del hecho de que el crecimiento de las partes aéreas de las plantas se redujo altamente.

Distancia internodos

- fenotipo intermedio: el internodo 5^o por debajo de la inflorescencia tiene aproximadamente 2.5 cm de longitud y el internodo 9^o tenía aproximadamente 0.5 cm de longitud en comparación con 5 cm y 2 cm para longitud del 5^o y 9^o internodos respectivamente, en plantas WT.
- 20

- fenotipo fuerte: la planta AtCKX1-50 La longitud del 20^o internodo desde abajo medido en el día 131 después de la germinación tenía 1.3 ± 0.4 mm en comparación con 39.2 ± 3.8 mm para WT.

Dominio apical y ramificación

- 25 Se formaron más ramificaciones laterales indicando un dominio apical reducido en comparación con plantas W durante el crecimiento vegetativo (véase Figura 9). Las ramificaciones laterales sobrecrecieron al tallo principal, alcanzando una altura de 40-45 cm para expresadores intermedios de AtCKX1. Incluso aparecieron ramificaciones secundarias. Sin embargo, las yemas no se libraron completamente del dominio apical, esto es, los brotes laterales no continuaron realmente su desarrollo. El dominio apical reducido puede deberse a una producción reducida de auxina por parte del meristema apical de brote más reducido (véase Ejemplo 10).

- 30 Desarrollo reproductivo

La aparición de la floración en transgénicos de AtCKX1 fue retardada, siendo reducido el número de flores y de semillas producidas por cápsula. El tamaño de las flores no se alteró en las plantas transgénicas y el peso de las semillas individuales fue comparable al peso de las semillas de las plantas tipo silvestre. Se resumen más abajo los datos para dos transgénicos AtCKX1 no representativos:

- 35 A. Aparición de la floración

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-48	AtCKX1-50
Tiempo de floración (DAG)	106.2 ± 3.3	193.3 ± 4.3	191.8 ± 3.8

Parte experimental: Datos recolectados para al menos diez plantas por línea. La elongación completa de la primera flor fue definida como la aparición de la floración. DAG = días después de la germinación.

B. Número de cápsulas de semilla por planta

Línea	Tipo salvaje	AtCKX1-48	AtCKX1-50
Número de cápsulas	83.33 ± 5.13	2.00 ± 1.00	2.60 ± 1.67

- 40 Parte experimental: El número de cápsulas de semillas fue determinado al menos a partir de 5 plantas diferentes. Nótese por favor que estas plantas fueron cultivadas bajo condiciones de invernadero durante tiempo de invierno.

Esto afecta negativamente el número de flores que se forman, en particular en los clones transgénicos. Sin embargo, el dibujo general de que forman un número reducido de flores es correcto. n.d., no determinado.

C. Rendimiento de semillas/cápsula (mg)

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-48	AtCKX1-50
Semilla/cápsula (mg)	87.41 ± 28.75	23.83 ± 13.36	61.8 ± 40.66

- 5 Parte experimental: El rendimiento de semillas fue determinado para al menos 12 cápsulas de semillas. El tamaño de las cápsulas de semillas fue muy variable, por lo tanto la desviación estándar fue grande. n.d., no determinado.

D. Peso de 100 semillas (mg)

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-48	AtCKX1-50
Peso de semillas (mg)	9.73 ± 0.44	10.70 ± 1.60	9.54 ± 0.94

- 10 Parte experimental: Se determinó la biomasa de semillas como el peso de 100 semillas a partir de al menos 5 diferentes cápsulas de semillas. n.d., no determinado.

3.2 En Arabidopsis

- La aparición de la germinación fue la misma que para WT

- El sistema radicular total fue agrandado y el número de raíces laterales y adventicias se incrementó (véase Figura 4A a D)

- 15 - El crecimiento de los órganos aéreos fue reducido dando como resultando un fenotipo enanificado (véase Figura 4E y F) y se redujo la biomasa de hojas. Se retarda la formación de hojas y flores.

- El ciclo vital fue más largo en comparación con WT y el rendimiento en semillas fue más bajo en comparación con WT

Los siguientes datos morfométricos ilustran estos fenotipos:

20 Desarrollo de raíces

A. Longitud total del sistema radicular

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-11	AtCKX1-15
Longitud(mm)	32.5	76.5	68.4

B. Longitud raíces primarias

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-11	AtCKX1-15
Longitud (mm)	32.3 ± 3.8	52.3 ± 4.8	39.9 ± 4.2

25 C. Longitud de raíces laterales (LR)

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-11	AtCKX1-15
Longitud (mm)	0.2 ± 0.4	15.6 ± 11.0	10.4 ± 7.6

D. Longitud de las raíces adventicias

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-11	AtCKX1-15
Longitud (mm)	0.03 ± 0.18	8.6 ± 8.5	19.1 ± 11.0

E. Número de raíces laterales (LR)

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-11	AtCKX1-15
Número de LR	0.3 ± 0.5	10.4 ± 5.4	2.6 ± 1.1

5 F. Número de raíces adventicias (AR)

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-11	AtCKX1-15
Número de AR	3.03 ± 0.18	1.6 ± 1.1	2.6 ± 1.1

Parte experimental: Las mediciones fueron llevadas a cabo en plantas 8 días después de la germinación in vitro sobre medio MS. Se calificaron al menos 17 plantas por línea.

Desarrollo de brotes

10 A. Superficie de hojas

Línea	Tipo silvestre	Plantas homocigotas T3 AtCKX1-11-7 T3	Plantas homocigotas T3 AtCKX1-11-12	Plantas homocigotas AtCKX1-15-1
Superficie de hojas (cm ²)	21.16 ± 1.73	2.28 ± 0.58	2.62 ± 0.28	1.66 ± 0.22

Parte experimental: Se midió el área superficial de las hojas de hojas roseta principales formadas después de 30 días después de la germinación. Se analizaron 3 plantas por clon.

Desarrollo reproductivo

15 Aparición de la floración

Línea	Tipo silvestre	Plantas heterocigotas AtCKX1-11 T3	Plantas heterocigotas AtCKX2-2 T2	Plantas heterocigotas AtCKX2-5 T2
Tiempo de floración (DAG)	43.6 ± 5.8	69.7 ± 9.4	51.2 ± 4.1	45.1 ± 6.9

Parte experimental: Las plantas fueron cultivadas bajo condiciones de invernadero. Se analizaron al menos 13 plantas por clon.

DAG= días después de la germinación

20 Conclusión: El análisis de las plantas de Arabidopsis transgénicas de AtCKX1 confirmó ampliamente los resultados obtenidos a partir del tabaco e indica la naturaleza general de las consecuencias de un contenido reducido de citoquinina. El sistema radicular total creció (la longitud radicular total se incrementó aproximadamente 110-140% en transgénicos de AtCKX1), el brote se desarrolló más lentamente (floración retardada) y se redujo la biomasa de hojas. El rendimiento de semillas fue inferior en las transgénicas también.

25

Ejemplo 4. Sobreexpresión de AtCKX2 en plantas transgénicas mostró actividad incrementada de citoquinina oxidasa y morfología de la planta alterada

1. Descripción del proceso de clonación

5 Los siguientes cebadores fueron utilizados para amplificar por PCR el gen AtCKX2 de *Arabidopsis thaliana*, acceso Columbia (las secuencias no homólogas usadas para la clonación están en letras minúsculas):

Secuencia de cebador 5': gcggtaccAGAGAGAGAAACATAAACAAATGGC (SEQ ID NO:15)

Secuencia de cebador 3': gcggtaccCAATTTTACTTCCACCAAATGC (SEQ ID NO:16)

10 Un fragmento por PCR de 3104-bp, amplificado por estos cebadores, fue insertado en el sitio KpnI de pUC19. El inserto fue secuenciado para verificar que no se introdujeron diferencias en la secuencia publicada por el procedimiento de PCR. El fragmento KpnI/KpnI de este vector fue subclonado en el sitio KpnI corriente abajo de un promotor CaMV 35S modificado (que porta tres secuencias del operador de tetraciclina) en el vector binario pBinHyg-Tx (Gatz et al., 1992). El constructo resultante fue introducido en tabaco y *Arabidopsis thaliana* a través de transformación mediada por *Agrobacterium*, utilizando protocolos de transformación estándar.

2. Análisis molecular de las líneas transgénicas

15 Se identificaron varias líneas transgénicas que sintetizaban el transcripto AtCKX2 a niveles altos (Figura 6). Las líneas transgénicas que expresan el transcripto AtCKX2 también mostraron actividad incrementada de citoquinina oxidasa. Esto se ejemplifica por 2 líneas de tabaco y 3 de *Arabidopsis* en la Tabla 7. Este resultado prueba que el gen AtCKX2 codifica una proteína con actividad de citoquinina oxidasa.

Tabla 7. Actividad de citoquinina oxidasa en tejidos de plantas transgénicas con AtCKX2

Muestra		
Especie de planta y tejido	Línea de planta	Actividad de citoquinina oxidasa (nmol Ade/mg proteína.h)
<i>Arabidopsis</i> callo	Col-0 tipo silvestre	0.037
	CKX2-15	0.351
	CKX2-17	0.380
Tabaco hojas	CKX2-55	0.265
	SNN tipo silvestre	0.009
	CKX2-SNN-18	0.091
	CKX2-SNN-19	0.091

20

3. Descripción fenotípica de las líneas transgénicas

3.1 En tabaco (véase Figura 7 a 10):

Tres categorías de fenotipo:

1) fuerte - 15 clones (similar al fenotipo intermedio de AtCKX1)

25 2) débil - 6 clones

3) otros - similar a plantas WT, 7 clones

Partes de plantas aéreas

30 Las observaciones concernientes a altura de la planta, distancia internodal, ramificación, forma de hojas y amarillamiento fueron similares que para las transgénicas con AtCKX1 con diferencias cuantitativas generalmente menores en que las características de enanificación fueron más severas en transgénicos con AtCKX1 que en transgénicos con AtCKX2 (compárense las plantas con AtCKX1 con plantas AtCKX2 en la Figura 7A y B). Esto es ilustrado más abajo por las mediciones de elongación de tallo y distancia internodal de clones con un fenotipo fuerte AtCKX2-38 y AtCKX2-40:

Elongación de tallo

Línea	Tipo silvestre	AtCKX2-38	AtCKX2-40
Días después de la germinación	Altura (cm)	Altura (cm)	Altura (cm)
47	9.5 ± 0.5	2.4 ± 0.1	2.6 ± 0.2
58	22.4 ± 2.3	5.5 ± 0.7	5.3 ± 0.5
68	35.3 ± 2.6	7.1 ± 0.8	7.0 ± 0.7
100	113.3 ± 9.8	15.5 ± 2.5	20.3 ± 6.4
117	138.6 ± 8.1	19.8 ± 3.8	29.5 ± 6.0
131	139.0 ± 9.3	26.5 ± 7.0	33.4 ± 5.8
152	136.6 ± 10.4	33.7 ± 6.3	33.9 ± 6.4
165		36.2 ± 4.3	

Parte experimental: Las plantas fueron cultivadas en suelo en un invernadero

Los datos fueron recolectados a partir de al menos diez plantas por línea.

5 Distancia internodal

Línea	Tipo silvestre	AtCKX2-38
Distancia Internodal (mm)	39.2 ± 3.8	7.2 ± 1.6

Parte experimental: La longitud del 20º internodo de la parte inferior fue medida en el día 131 después de la germinación.

Raíces

- 10 Las plantas cultivadas in vitro con alta expresión del gen fueron fácilmente distinguibles de las plantas WT por su capacidad para formar más raíces que son más gruesas (más fuertes), así como por la formación de raíces aéreas a lo largo del tallo.

La raíz primaria fue más larga y el número de raíces laterales y adventicias fue más alto como se ilustra en la figura 8C para plantones que sobreexpresan AtCKX2-38 (véase también Ejemplo 9).

- 15 Esta curva de respuesta a la dosis de la inhibición de crecimiento por citoquinina exógena mostró que las raíces de los plantones transgénicos eran más resistentes a la citoquinina que las raíces WT (Figura 8 D). La resistencia de los transgénicos de AtCKX1-28 al iPR fue menos marcada que para AtCKX2-38, lo cual es consistente con los cambios más pequeños en la citoquinina tipo iP en esta última (véase Tabla 10).

- 20 Un incremento en el peso fresco y seco de la biomasa de raíces de las líneas T0 de plantas transgénicas con AtCKX2 en comparación con WT se observó para el crecimiento de plantas en suelo, tal como lo ilustra la siguiente tabla:

Línea	Tipo silvestre	AtCKX2 (T0)
Peso fresco(g)	45.2 ± 15.4	77.1 ± 21.3
Peso seco (g)	6.3 ± 1.9	9.6 ± 2.2

Parte experimental: Se cultivaron seis plantas WT y seis líneas independientes T0 del clon 35S::AtCKX2 en suelo. Después de la floración el sistema radicular fue lavado con agua, el suelo fue retirado tanto como fue posible y se midieron el peso fresco y el peso seco.

25

Un incremento en el peso fresco y seco y en la biomasa de la raíces también fue observado para la progenie F1 de transgénicos de AtCKX2 cultivados en hidropónicos en comparación con WT, tal como lo ilustra la siguiente tabla:

Línea	Tipo silvestre	AtCKX2-38	AtCKX2-40
Peso fresco RAÍZ (g)	19.76 ± 6.79	33.38 ± 7.76	50.04 ± 15.59
Peso seco RAÍZ (g)	2.36 ± 0.43	2.61 ± 0.39	3.52 ± 1.06
Peso fresco BROTE (g)	159.8 ± 44.53	33.66 ± 2.67	48.84 ± 11.83
Relación peso fresco BROTE/RAÍZ	8.24 ± 0.63	1.04 ± 0.18	1.08 ± 0.51

5 Parte experimental: Las plantas cultivadas en el suelo fueron transferidas 60 días después de la germinación a un sistema hidropónico (solución de Hoagland) y cultivadas durante 60 días adicionales. La solución hidropónica fue aireada continuamente y reemplazada por solución fresca cada tercer día.

10 En resumen, las plantas transgénicas cultivadas en solución hidropónica formaron aproximadamente 65-150% más de biomasa de raíz (peso fresco) que las plantas tipo silvestre. El incremento en peso seco fue 10-50%. Esta diferencia en parte posiblemente se debe al mayor volumen celular de los transgénicos. Esto reduce la porción relativa de paredes celulares, las cuales forman el volumen del material de materia seca. La biomasa de brotes fue reducida a 20% - 70% frente a los brotes tipo silvestre. La diferencia en peso fresco lleva a un desplazamiento en la relación brote/raíz, que fue aproximadamente 8 en tipo silvestre, pero aproximadamente 1 en los clones transgénicos.

Conclusión:

15 Un incremento en el crecimiento de la raíz y la biomasa se observó para paltones transgénicos de AtCKX2 y el crecimiento de plantas adultas bajo diferentes condiciones en comparación con los controles de WT a pesar del hecho de que el crecimiento de las partes aéreas de las plantas se reduce. Se observaron diferencias cuantitativas entre diferentes plantas transgénicas: Se observaron incrementos más altos en biomasa de raíces para los clones de expresión más fuerte.

20 Desarrollo reproductivo

25 La aparición de la floración en transgénicos de AtCKX2 fue retardada, reduciéndose el número de flores y el rendimiento en semillas por cápsula. Estos efectos fueron muy similares a los observados en plantas transgénicas con AtCKX1 pero fueron menos prominentes en transgénicos con AtCKX2, tal como se indica en las tablas más abajo. El tamaño de las flores no se alteró en las plantas transgénicas y el peso de las semillas individuales fue comparable al peso de las semillas de las plantas tipo silvestre.

A. Aparición de la floración

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-48	AtCKX1-50	AtCKX2-38	AtCKX2-40
Tiempo de floración(DAG)	106.2 ± 3.3	193.3 ± 4.3	191.8 ± 3.8	140.6 ± 6.5	121.9 ± 9.8

Parte experimental: Se recolectaron los datos para al menos diez plantas por línea. La elongación completa de la primera flor fue definida como la aparición de la floración. DAG = días después de la germinación.

30 B. Número de cápsulas de semillas por planta

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-48	AtCKX1-50	AtCKX2-38	AtCKX2-40
Número de cápsulas	83.33 ± 5.13	2.00 ± 1.00	2.60 ± 1.67	4.30 ± 2.58	n.d.

35 Parte experimental: El número de cápsulas de semillas fue determinado en al menos 5 plantas diferentes. Por favor nótese que estas plantas fueron cultivadas bajo condiciones de invernadero durante tiempo de invierno. Esto afecta negativamente el número de flores que se forman, en particular en los clones transgénicos. Sin embargo, la imagen general de que forman un número reducido de flores es correcta. n.d., no determinada

C. Rendimiento de semilla/cápsula (mg)

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-48	AtCKX1-50	AtCKX2-38	AtCKX2-40
Semilla/cápsula (mg)	87.41 ± 28.75	23.83 ± 13.36	61.8 ± 40.66	46.98 ± 29.30	n.d.

Parte experimental: El rendimiento de semillas fue determinado para al menos 12 cápsulas de semillas. El tamaño de las cápsulas de semillas fue muy variable, por lo tanto las desviaciones estándar fueron grandes. n.d., no determinado

5

D. Peso de 100 semillas (mg)

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-48	AtCKX1-50	AtCKX2-38	AtCKX2-40
Peso de semillas (mg)	9.73 ± 0.44	10.70 ± 1.60	9.54 ± 0.94	10.16 ± 0.47	n.d.

Parte experimental: Se determinó la biomasa en semillas como peso de 100 semillas de al menos 5 cápsulas de semillas diferentes. n.d., no determinado

10 3.2 En Arabidopsis:

Se obtuvieron los siguientes datos morfométricos para transgénicos con AtCKX2:

Desarrollo de raíces

A. Longitud total del sistema radicular

Línea	Tipo silvestre	AtCKX2-2	AtCKX2-5
Longitud (mm)	32.5	50.6	48.5

15 B. Longitud de raíz primaria

Línea	Tipo silvestre	AtCKX2-2	AtCKX2-5
Longitud (mm)	32.3 6 3.8	30.7 6 4.8	31.6 6 6.8

C. Longitud de raíces laterales

Línea	Tipo silvestre	AtCKX2-2	AtCKX2-5
Longitud (mm)	0.2 6 0.4	5.5 6 9.0	1.9 6 2.5

D. Longitud raíces adventicias

Línea	Tipo silvestre	AtCKX2-2	AtCKX2-5
Longitud (mm)	0.03 6 0.18	14.4 6 10.2	14.9 6 9.1

E. Número de raíces laterales (LR)

Línea	Tipo silvestre	AtCKX2-2	AtCKX2-5
Número de LR	0.3 6 0.5	2.9 62.3	1.9 61.0

F. Número de raíces adventicias (AR)

Línea	Tipo silvestre	AtCKX2-2	AtCKX2-5
Número de AR	3.03 6 0.18	1.8 60.9	1.8 61.0

- 5 Parte experimental: Las mediciones fueron llevadas a cabo en plantas 8 días después de la germinación, in vitro sobre medio MS. Se calificaron al menos 17 plantas por línea.

Desarrollo de brotes

Superficie de hojas

Línea	Tipo silvestre	Plantas heterocigotas AtCKX2-2 T2	Plantas heterocigotas AtCKX2-5 T2	Plantas heterocigotas AtCKX2-9 T2
Superficie de hoja (cm ²)	21.16 ± 1.73	8.20 ± 2.35	8.22 ± 0.55	7.72 ± 0.85

- 10 Parte experimental: Se midió el área superficial de las hojas de hojas roseta principales formadas después de 30 días de la germinación. Se analizaron 3 plantas por clon.

Desarrollo reproductivo

Aparición de la floración

Línea	Heterocigota tipo silvestre	plantas [AtCKX1-11 T3	Plantas heterocigotas AtCKX2-2 T2	Plantas heterocigotas AtCKX2-5 T2
Tiempo de floración (DAG)	43.6 ± 5.8	69.7 ± 9.4	51.2 ± 4.1	45.1 ± 6.9

- 15 Parte experimental: las plantas fueron cultivadas bajo condiciones de invernadero. Se analizaron al menos 13 plantas por clon. DAG = días después de la germinación.

Conclusión: los transgénicos de AtCKX2 de Arabidopsis habían reducido la biomasa de hojas y de un fenotipo de enanificación similar a los transgénicos de AtCKX1 (compárese Figura 5 con Figura 4F). El sistema radicular total también se agrandó en Arabidopsis transgénica de AtCKX2. La longitud total de las raíces se incrementó aproximadamente en 50% en transgénicos de AtCKX2. Los transgénicos de AtCKX1 tiene raíces primarias más largas, más raíces laterales y forman más raíces adventicias. Los transgénicos de AtCKX2 carecen del crecimiento potenciado de la raíz primaria pero forman más raíces laterales y crecen las raíces laterales más que en WT.

Resumen:

- 25 Los fenotipos observados para los transgénicos AtCKX2 fueron muy similares pero no idénticos a los transgénicos de AtCKX1, los cuales a su vez fueron muy similares pero no idénticos a los resultados obtenidos para los transgénicos de tabaco. Esto confirma la naturaleza general de las consecuencias de un contenido reducido de citoquinina en estas dos especies de plantas y por lo tanto, pueden esperarse fenotipos similares en otras especies de plantas también. La diferencia principal entre tabaco y Arabidopsis es la carencia de crecimiento de raíz primaria potenciado en plantas que sobreexpresan AtCKX2.

30

Ejemplo 5. Plantas transgénicas que sobreexpresan AtCKX3 mostraron actividad incrementada de citoquinina oxidasa y morfología alterada de la planta.

1. Descripción del proceso de clonación.

5 Se usaron los siguientes cebadores para amplificar por PCR el gen AtCKX3 de Arabidopsis thaliana, acceso Columbia (las secuencias no homólogas usadas para la clonación están en letras minúsculas):

Secuencia del cebador 5': gcggtaccTTCATTGATAAGAATCAAGCTATTCA (SEQ ID NO:17)

Secuencia del cebador 3': gcggtaccCAAAGTGGTGAGAACGACTAACA (SEQ ID NO:18)

10 Se insertó un fragmento de PCR de 3397 bp, producido por esta amplificación de PCR en el sitio KpnI de pBluescript. El inserto fue secuenciado para confirmar que el producto de PCR no tenía cambios de secuencia en comparación con el gen. El fragmento KpnI/KpnI de este vector fue subclonado en el sitio KpnI corriente debajo de un promotor CaMV35S modificado (que porta 3 secuencias de operador de tetraciclina) en el vector binario pBinHyg-Tx (Gatz et al, 1992). El constructo resultante fue introducido en tabaco y Arabidopsis thaliana a través de transformación mediada por Agrobacterium, utilizando protocolos de transformación estándar.

2. Análisis molecular de las líneas transgénicas

15 Se identificaron varias líneas transgénicas de tabaco que sintetizan el transcrito AtCKX3 a altos niveles (Figura 11A). Las líneas transgénicas de tabaco que expresan el transcrito de AtCKX3 mostraron también actividad incrementada de citoquinina oxidasa. Esto se ejemplifica para 3 plantas en la Tabla 8. Esto demuestra que el gen AtCKX3 codifica una proteína con actividad de citoquinina oxidasa.

Tabla 8. Actividad citoquinina oxidasa en tejidos de plantas transgénicas con AtCKX4

Ejemplo		
Especies y tejidos de plantas	Línea de planta	Actividad de citoquinina oxidasa (nmol Ade/mg proteína.h)
Hojas de tabaco	SNN tipo silvestre	0.011
	CKX3-SNN-3	0.049
	CKX3-SNN-6	0.053
	CKX3-SNN-21	0.05

20

3. Análisis fenotípicos de las plantas

25 Los fenotipos generados por sobreexpresión del gen AtCKX3 en tabaco y Arabidopsis fueron similares básicamente a los de las plantas que expresan AtCKX1 y AtCKX2, esto es, formación y enanificación potenciadas. Sin embargo, la sobreexpresión del gen AtCKX3 en tabaco dio como resultado un fenotipo más fuerte en comparación con AtCKX2. En este sentido la sobreexpresión de AtCKX3 fue más similar a la sobreexpresión de AtCKX1.

Ejemplo 6. Plantas transgénicas que sobreexpresan AtCKX4 muestran actividad incrementada de citoquinina oxidasa y morfología alterada de la planta

1. Descripción del proceso de clonación

30 Se usaron los siguientes cebadores para amplificar por PCR el gen AtCKX4 de Arabidopsis thaliana, acceso Columbia (las secuencias no homólogas utilizadas para la clonación están en letras minúsculas):

Secuencia del cebador 5': gcggtaccCCCATTAACCTACCCGTTTG (SEQ ID NO:19)

Secuencia del cebador 3': gcggtaccAGACGATGAACGTACTTGTCTGTA (SEQ ID NO:20)

35 Un fragmento de PCR de 2890 bp producido por esta amplificación de PCR, fue insertado en el sitio KpnI de pBluescript. El inserto fue secuenciado para confirmar que el producto de PCR no tenía cambios de secuencia en comparación con el gen. El fragmento KpnI/KpnI de este vector fue subclonado en el sitio KpnI corriente abajo de un promotor CaMV35S (que porta 3 secuencias de operador de tetraciclina) en el vector binario pBinHyg-Tx (Gatz et al., 1992). El constructor resultante fue introducido en tabaco y Arabidopsis thaliana a través de transformación mediada por Agrobacterium, utilizando protocolos de transformación estándar.

2. Análisis molecular de las líneas transgénicas

Varias líneas transgénicas de tabaco sintetizaron el transcrito de ArCKX4 a altos niveles (Figura 11B). Las líneas transgénicas que expresan el transcrito de AtCKX4 también mostraron actividad incrementada de citoquinina oxidasa. Esto es ejemplificado por 3 líneas de Arabidopsis y 3 de tabaco en la Tabla 9. Este resultado prueba que el gen AtCKX4 codifica una proteína con actividad de citoquinina oxidasa.

Tabla 9. Actividad de citoquinina oxidasa en tejidos de plantas transgénicas con AtCKX4

Muestra		
Especie y tejido de plantas	Línea de planta	Actividad de citoquinina oxidasa (nmol Ade/mg proteína.h)
Arabidopsis callo	Col-0 tipo silvestre	0.037
	CKX4-37	0.244
	CKX4-40	0.258
	CKX4-41	0.320
Tabaco hojas	SNN tipo silvestre	0.011
	CKX4-SNN-3	0.089
	CKX4-SNN-18	0.085
	CKX4-SNN-27	0.096

Globalmente, los datos mostraron que los valores aparentes de K_m para las cuatro oxidosas de citoquinina estaban en el rango de 0.2 a 9.5 μM con iP como sustrato, lo cual demuestra adicionalmente que las proteínas codificadas por AtCKX1 hasta 4 son en efecto enzimas de citoquinina oxidasa tal como se divulga aquí.

3. Análisis fenotípico de plantas

Los fenotipos generados por sobreexpresión del gen de AtCKX4 en tabaco y Arabidopsis fueron básicamente similares a los de las plantas que expresan AtCKX1 y AtCKX2, esto es, formación de raíces potenciada, dominio apical reducido, enanificación y amarillamiento de las regiones intercostales en hojas más viejas de tabaco. Un fenotipo adicional en el tabaco fue el de hojas lanceoladas (relación alterada de longitud a anchura).

Observaciones generales de las plantas de tabaco que sobreexpresan AtCKX.

En general, el análisis fenotípico demostró que la sobreexpresión del gen de AtCKX produce alteraciones de desarrollo drásticas en el brote de las plantas y en el sistema de raíces en tabaco, incluyendo un desarrollo potenciador sistema radicular y enanificación de la parte aérea de la planta. Otros efectos tales como senescencia alterada de las hojas, formación de raíces adventicias en los tallos, y otros también fueron observados tal como se divulga aquí. Las alteraciones fueron muy similares, pero no idénticas, para los diferentes genes. En el tabaco, los sobreexpresadores de AtCKX1 y AtCKX3 fueron similares a lo que fueron AtCKX2 y AtCKX4. En general, los dos primeros mostraron una expresión más alta de las características, particularmente en el brote. Por lo tanto, un gen de citoquinina oxidasa en particular puede ser preferido para alcanzar los fenotipos que se describen en las realizaciones de esta invención.

Ejemplo 7. Clonación del gen AtCKX5

Los siguientes cebadores fueron utilizados para amplificar por PCR el gen de AtCKX5 de Arabidopsis thaliana, acceso Columbia (las secuencias no homólogas usadas para la clonación están en letras minúsculas):

Secuencia del cebador 5': ggggtaccTTGATGAATCGTGAAATGAC (SEQ ID NO:21)

Secuencia del cebador 3': ggggtaccCTTTCCTCTTGGTTTTGTCCTGT (SEQ ID NO:22)

La secuencia del cebador 5' incluye los dos codones de partida potenciales de la proteína de AtCKX5, el codón 5' más iniciador está subrayado y un segundo ATG está indicado en itálicas.

Un fragmento de PCR de 2843 bp, producido por esta amplificación de PCR, fue insertado en un producto con extremo bloqueado en un vector de clonación pCR-Blunt-II-TOPO (Invitrogen).

Ejemplo 8. Clonación del gen AtCKX6

Se usaron los siguientes cebadores para amplificar por PCR el gen AtCKX6 de Arabidopsis thaliana, acceso Columbia (las secuencias no homólogas usadas para clonación están en letras minúsculas):

Secuencia del cebador 5': gctctagaTCAGGAAAAGAACCATGCTTATAG (SEQ ID NO:23)

5 Secuencia del cebador 3': gctctagaTCATGAGTATGAGACTGCCTTTTG (SEQ ID NO:24)

Un fragmento de PCR de 1949 bp, producido por esta amplificación por PCR, fue insertado en un producto bloqueado en el vector de clonación pCR-Blunt-II-TOPO (Invitrogen).

Ejemplo 9. Pruebas de crecimiento de plántones de tabaco demostraron un vigor temprano de transgénicos de AtCKX

10 Semillas de los transgénicos sobreexpresantes AtCKX1-50 y AtCKX2-38 y tabaco WT fueron sembrados in vitro sobre medio MS, cultivados durante 4 días después del tratamiento en frío y germinados después de 6 días. Las observaciones sobre el crecimiento de los plántones se hicieron 10 días después de la germinación (véase también Figura 8C) y se resumen abajo. Al menos se calificaron 20 individuos por clon. Se obtuvieron datos similares en otros dos experimentos.

15 A. Longitud total del sistema de raíces

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-50	AtCKX2-38
Longitud (mm)	61.1	122.0	106.5

B. Longitud de raíces primarias

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-50	AtCKX2-38
Longitud (mm)	32.3 ± 2.6	50.8 ± 4.5	52.4 ± 4.8

C. Longitud de raíces laterales

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-50	AtCKX2-38
Longitud (mm)	9.8 ± 5.5	18.0 ± 8.1	13.0 ± 6.0

20

D. Longitud de raíces adventicias

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-50	AtCKX2-38
Línea (mm)	19.0 ± 5.0	53.0 ± 12.0	42.0 ± 9.8

E. Número de raíces laterales (LR)

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-50	AtCKX2-38
Longitud (mm)	19.0 ± 5.0	53.0 ± 12.0	42.0 ± 9.8

25 F. Número de raíces adventicias AR

Línea	Tipo silvestre	AtCKX1-50	AtCKX2-38
Número de AR	2.2 ± 0.6	3.5 ± 0.9	3.6 ± 1.3

Plantas con AtCKX1 y AtCKX2, observaciones generales:

5 Los plantones de plantas de tabaco que sobreexpresan AtCKX1 y AtCKX2 tienen 60% más de raíces adventicias y tres veces más raíces laterales que las plantas no transformadas 10 días después de la germinación. La longitud de la raíz primaria se incrementó en aproximadamente 70%. Esto – junto con más y más largas raíces laterales y raíces secundarias – dio como resultado un 70-100% de incremento en la longitud total de las raíces. Estos resultados muestran que la sobreexpresión de la citoquinina oxidasa potencia el crecimiento y desarrollo tanto de la raíz principal como de las raíces adventicias, dando como resultado un vigor temprano.

Ejemplo 10. Análisis histológico de morfología de plantas alteradas en plantas de tabaco con sobreexpresión de AtCKX1

10 Los análisis microscópicos de los diferentes tejidos revelaron que los cambios morfológicos en los transgénicos de AtCKX se reflejan mediante cambios distintos en número de células y velocidad de formación de células (véase Figura 10). El meristema apical de brote (SAM) de los transgénicos de AtCKX1 fue más pequeño que en el tipo silvestre y menos células ocupan el espacio entre la zona central y la zona periférica de la formación de órganos laterales, pero las células eran del mismo tamaño (Figura 10A). El número reducido de células y el tamaño del SAM como consecuencia del contenido reducido de citoquinina indica que la citoquinina tiene un papel en el control de la proliferación de SAM. No ocurrieron cambios obvios en el patrón de diferenciación, sugiriendo que la organización espacial de las zonas de diferenciación en SAM es fundamentalmente independiente del número de células y de la concentración de citoquinina local. El patrón de tejidos generales de las hojas sobreexpresado de las de citoquinina oxidasa permaneció sin cambios. Sin embargo, el tamaño del floema y xilema se redujo significativamente (Figura 10B). En contraste, el tamaño de células promedio del parénquima de las hojas y las células epidérmicas se incrementó de 4 a 5 veces (Figura 10C, D). Se forman nuevas células de transgénicos de AtCKX1 a 3-4% de la rata de hojas tipo silvestre y el número de células de hojas final se estimó en el rango de 5-6% del tipo silvestre. Esto indica un requerimiento absoluto para las citoquininas en hojas con el fin de mantener el ciclo de división celular. Ni el tamaño de las células ni la forma de las células de los órganos florales se alteró y el rendimiento de semillas por cápsula fue similar en el tipo silvestre y en las plantas transgénicas con AtCKX. La población celular de los meristemas de raíz de plantas transgénicas con AtCKX1 se incrementó aproximadamente cuatro veces y el número de células tanto en la columna central como en la lateral se potenció (Figura 10E, F). El diámetro final de la raíz se incrementó en un 60% debido a un diámetro incrementado en todos los tipos de células de raíces. Los patrones de raíces radiales fueron idénticos en el tipo silvestre y en los transgénicos, con la excepción de que se notó frecuentemente una cuarta capa de células de córtex en las raíces transgénicas (Figura 10G). El número de células incrementado y la longitud celular ligeramente reducida indican que el crecimiento potenciado de las raíces es debido al número incrementado de células en ciclo más que al incremento en el crecimiento celular. En la presencia de un contenido disminuido de citoquinina, las células del meristema de las raíces deben sufrir rondas adicionales de mitosis antes de que salgan del meristema y comiencen a elongarse. La salida del meristema está regulada por lo tanto por un mecanismo que es sensible a las citoquininas. Aparentemente, las citoquininas tienen un efecto regulador negativo en el meristema de la raíz y concentraciones de citoquinina tipo silvestre son inhibitorias para el desarrollo de un sistema de raíces máximo. Por lo tanto, la reducción del nivel de citoquininas activas por la sobreexpresión de la citoquinina oxidasa estimula el desarrollo de la raíz, lo cual da como resultado un incremento en el tamaño de la raíz con más raíces laterales y adventicias en comparación con plantas WT.

40 **Ejemplo 11. Plantas de tabaco con sobreexpresión de AtCKX1 y AtCKX2 tienen un contenido reducido de citoquinina.**

Entre los 16 diferentes metabolitos de la citoquinina que fueron medidos, el cambio más grande ocurrió en las citoquininas tipo iP en sobreexpresadores de AtCKX2 (Tabla 10): el descenso global en el contenido de citoquininas tipo iP es más pronunciado en plantas que expresan AtCKX2 que en transgénicos de AtCKX1. Los transgénicos de AtCKX1 mostraron un fenotipo más fuerte en el brote. No se sabe cual metabolito de citoquinina es relevante para las características diferentes que fueron analizadas. Puede ser que las diferentes formas de citoquinina juegan papeles diferentes en los diversos procesos del desarrollo. Se notaron alteraciones más pequeñas para citoquininas tipo Z, lo cual podría deberse a una accesibilidad diferente del sustrato o una especificidad de sustrato inferior de la proteína. El contenido total de iP y metabolitos Z en clones transgénicos individuales estaba entre 31% y 63% del tipo silvestre. La reserva general de citoquinina de los O-glucósidos también disminuyó en los transgénicos (Tabla 10). La concentración de N-glucósidos y citoquininas tipo DHZ fue muy baja y no se alteró o solo se alteró maquinaalmente en plantones transgénicos (datos no mostrados).

Tabla 10. Contenido de citoquinina de plantas transgénicas de AtCKX. Extracción, inmunopurificación, separación por HPLC y cuantificación de la citoquinina por métodos de ELISA llevados a cabo tal como se describe en Faiss et al., 1997. Se analizaron tres muestras reservadas independientemente de plántones de aproximadamente 100 semanas de edad (2.5 g por muestra) para cada clon. Las concentraciones están en pmol por gramo de peso fresco⁻¹. Abreviaturas: iP, N⁶- Δ^2 isopentenil)adenina; iPR, N⁶- Δ^2 isopentenil)adenina ribósido; iPRP, N⁶- Δ^2 isopentenil)adenina ribósido 5'-monofosfato; Z, *trans*-zeatina; ZR, zeatina ribósido; ZRP, zeatina ribósido 5'-monofosfato; ZOG, zeatina O-glucósido; ZROG, zeatina ribósido O-glucósido.

Línea	WT	AtCKX1-2	AtCKX1-28	AtCKX2-38	AtCKX2-40				
Metabolito de citoquinina	Concentración	Concentración	% de WT	Concentración	% de WT	Concentración	% de WT	Concentración	% de WT
iP	5.90	± 4.76	± 81	4.94	± 84	1.82	± 31	2.85	± 48
	1.80	0.82		2.62		0.44		0.62	
IPR	2.36	± 1.53	± 65	0.75	± 32	0.55	± 23	0.89	± 38
	0.74	0.14		0.27		0.39		0.07	
IPRP	3.32	± 0.87	± 26	1.12	± 34	0.80	± 24	1.68	± 51
	0.73	0.26		0.13		0.48		0.45	
Z	0.24	± 0.17	± 71	0.22	± 92	0.21	± 88	0.22	± 92
	0.06	0.02		0.03		0.06		0.02	
ZR	0.60	± 0.32	± 53	0.34	± 57	0.34	± 57	0.32	± 53
	0.13	0.12		0.03		0.15		0.05	
ZRP	0.39	± 0.42	± 107	0.28	± 72	0.06	± 15	0.17	± 44
	0.17	0.11		0.15		0.01		0.06	
ZOG	0.46	± 0.32	± 70	0.26	± 57	0.20	± 43	0.12	± 26
	0.20	0.09		0.13		0.07		0.02	
ZROG	0.48	± 0.30	± 63	0.47	± 98	0.23	± 48	0.30	± 63
	0.17	0.06		0.02		0.05		0.13	
Total	13.75	8.69	63	8.38	61	4.21	31	6.55	48

Ejemplo 12. Experimentos de injerto mostraron que la enanificación y el desarrollo potenciado de raíces debido a la sobreexpresión de AtCKX es confinado a tejidos transgénicos.

Para investigar cuáles efectos genotípicos de la sobreexpresión de citoquinina oxidasa están restringidos a los tejidos de expresión, esto es, son características autónomas de la célula o el órgano, se llevaron a cabo experimentos de injertos. Se hicieron injertos recíprocos entre una planta de tabaco transgénico con AtCKX2 y un tabaco WT. La planta transgénica utilizada en este experimento fue AtCKX2-38, la cual presentaba un fenotipo fuerte caracterizado por un crecimiento radicular potenciado y desarrollo reducido de las partes aéreas de la planta. Tal como se describe en el ejemplo 3 hasta 6, estos fueron dos fenotipos importantes que resultaron de la sobreexpresión de la citoquinina oxidasa en tabaco y Arabidopsis.

Las plantas tenían aproximadamente 15 cm de altura cuando fueron injertadas y la unión del injerto fue aproximadamente 10 cm por encima del suelo. La Figura 12 muestra las plantas 15 semanas después del injerto. Los resultados principales fueron que: (i) el fenotipo aéreo de un injerto WT injertado sobre una raíz de reserva transgénica fue similar al injerto de control WT (=injerto WT o raíz de reserva WT). De forma importante, esto muestra que la sobreexpresión del transgén de AtCKX2 en la raíz de reserva no incluye la enanificación de las partes aéreas no transgénicas de la planta (véase Figura 12A). El crecimiento mejorado de la raíz de la reserva de raíces transgénicas fue mantenido, indicando que el crecimiento mejorado de la raíz de los transgénicos de AtCKX es autónomo y no depende del brote transgénico de AtCKX (Figura 12C). De forma interesante, los injertos WT injertados sobre las reservas de raíces transgénicas aparecían más saludables y se desarrollaron mejor. De forma notable, la senescencia de las hojas basales fue retardada en estas plantas (véase Figura 12A); (ii) el injerto transgénico injertado sobre la raíz de reserva WT aparecía similar a la parte aérea de la planta transgénica de la cual se derivó, esto es, el fenotipo de enanificación del brote es también autónomo y no depende del crecimiento mejorado de la raíz (véase Figura 12B). Además de la mejor apariencia antes mencionada de los brotes WT injertados sobre una raíz de reserva transgénica, se notó la formación de raíces adventicias en la parte basal de los brotes WT (Figura 12D, planta de la derecha). La formación de raíces adventicias también se presentó en el tallo de transgénicos con AtCKX pero no en tallos de los injertos de control WT (Figura 12D, planta de la izquierda) y por lo tanto parece ser una característica no autónoma.

En resumen, se divulga en esta invención que la formación de raíces y enanificación potenciadas del brote en tabaco con sobreexpresión de AtCKX son características autónomas que pueden ser desacopladas por procedimientos de injerto. Sorprendentemente, el injerto de un injerto WT sobre una raíz de reserva transgénica con AtCKX dio como resultado un crecimiento más vigoroso en las plantas y un retardo de la senescencia de las hojas.

Como alternativa al injerto, podrían ser usados promotores específicos para tejidos para desacoplar los efectos fenotípicos autónomos de la sobreexpresión de citoquinina. Por lo tanto, se divulga en esta invención que la sobreexpresión de citoquinina oxidasa en una manera específica para un tejido puede ser utilizada para alterar la morfología de una planta tal como el brote o el sistema radicular.

Ejemplo 13. Expresión de un gen de AtCKX bajo un promotor específico para raíz en plantas transgénicas lleva a una producción incrementada de raíces

Un gen de AtCKX (véase Ejemplo 4) se clona bajo control del promotor homólogo de raíz de clavata de Arabidopsis (SEQ ID NO:36), el cual es un promotor que conduce a la expresión específica para raíces. Pueden utilizarse también otros promotores específicos para raíces para el propósito de esta invención. Véase la Tabla 5 para promotores específicos para raíces de ejemplo.

Las plantas transgénicas que expresan el gen de AtCKX específicamente en las raíces muestran una producción incrementada de raíces sin afectar negativamente el crecimiento y desarrollo de las partes aéreas de la planta. Se observan efectos positivos en la senescencia de las hojas y el crecimiento de las partes aéreas de la planta.

Ejemplo 14. Supresión de un gen de AtCKX bajo un promotor inducido por senescencia en plantas transgénicas lleva a una senescencia retardada de las hojas y a un rendimiento potenciado en semillas.

Un constructo de gen quimérico derivado de un gen de AtCKX y diseñado para suprimir la expresión de un gen o genes endógenos de citoquinina oxidasa se clona bajo el control de un promotor inducido por senescencia. Por ejemplo, pueden utilizarse promotores derivados de genes asociados con la senescencia (SAG) tal como el promotor SAG12. (Quirino et al., 2000). Las plantas transgénicas que suprimen los genes endógenos de citoquinina oxidasa específicamente en hojas senescentes muestran senescencia retardada de las hojas y un rendimiento incrementado en semillas sin afectar negativamente la morfología y crecimiento del desarrollo de la planta.

Ejemplo 15. Sobreexpresión de un gen de AtCKX en los órganos reproductores femeninos lleva a un desarrollo de un fruto partenocárpico

El marco de lectura abierta de un gen de AtCKX es clonado bajo control de un promotor que confiere sobreexpresión en los órganos reproductores femeninos tales como por ejemplo el promotor de DefH9 para Antirrhinum majus o uno

de sus homólogos, los cuales tienen alta especificidad de expresión en la placenta y óvulos. Las plantas transgénicas con actividad de citoquinina oxidasa incrementada en estos tejidos muestran un desarrollo de frutos partenocárpicos.

5 **Ejemplo 16. La sobreexpresión de genes de AtCKX da como resultado un incremento en el tamaño de las semillas y los cotiledones**

10 Plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan genes de citoquinina oxidasa (AtCKX) bajo el control del promotor 35S tal como se describieron anteriormente. Plantas transgénicas en particular aquellas que expresan los genes de AtCKX1 y AtCKX3, desarrollaron semillas con tamaño incrementado lo que se debió casi completamente a un embrión agrandado. Detalles de las semillas, embriones y fenotipos tempranos postembrionarios se muestran en las Figuras 13 A a 13E. La Tabla 11 muestra el peso en semillas de tipo silvestre y dos clones independientes para cada uno de los cuatro genes AtCKX investigados. El peso promedio fue obtenido analizando cinco lotes diferentes de 200 semillas para cada clon. Una evaluación cuantitativa mostró que el peso en semillas de los clones que expresan AtCKX1 y AtCKX3 fue aproximadamente 1.8-2.3 veces más alto que en el tipo silvestre. La ganancia de peso para las semillas de las líneas de expresión de AtCKX2 y AtCKX4 estuvo en el rango de 10-25% (Tablas 11 y Figura 14).

15 Los incrementos en tamaño y peso para semillas, embriones y cotiledones son inesperados puesto que se esperaba que un contenido reducido de citoquinina estuviera asociado con un crecimiento reducido de los órganos. Una razón posible para el incremento en el tamaño de semillas, embrión y cotiledones es una función reguladora negativa desconocida previamente de las citoquininas en estos órganos de almacenamiento. Una función reguladora negativa de las citoquininas en el control del crecimiento de los órganos es hasta ahora conocida solamente en raíces (Werner et al., 2001). Proponemos, por lo tanto, que la expresión localizada de genes de citoquinina oxidasa en tejidos donde el crecimiento es regulado negativamente por citoquininas lleva a un crecimiento potenciado de ese tejido. Por ejemplo, la expresión localizada de genes de CKX durante el desarrollo del cotiledón probablemente lleva a un crecimiento potenciado de los cotiledones y en especies con cotiledones como órganos de almacenamiento, a un rendimiento potenciado y a un desempeño de crecimiento potenciado de los plantones. El número total de semillas disminuye con los expresadores de AtCKX1 y AtCKX3. No ha habido reportes previos sin embargo, de números inferiores de semillas en *Arabidopsis* ligados a un incremento en tamaño.

20 **Ejemplo 17.**

30 Explantes de hoja de *Nicotiana glauca* L. cv. Samsun NN fueron transformados con el vector Bin-Hyg-Tx que porta el gen AtCKX1 o AtCKX2 bajo control del promotor CaMV 35 S. Se cultivaron varias líneas originadas a partir de estas plantas transformadas y se analizó el tamaño de sus semillas (Tabla 12).

La planta de tabaco que tenía el transgén CKX1 y el CKX2 mostraron todas un incremento en el área de semillas, un parámetro para el tamaño de las semillas.

Tabla 11

	WT	CKX1-11-7	CKX1-15-1	CKX2-2-4	CKX2-9-3	CKX3-9-4	CKX3-12-13	CKX4-37-2	CKX4-41-7
Peso de Semilla	0.0158 ± 0.0009	0.0372 ± 0.0015	0.0352 ± 0.0023	0.0201 ± 0.0017	0.0180 ± 0.0001	0.0340 ± 0.0027	0.0280 ± 0.0027	0.0185 ± 0.0004	0.0179 ± 0.0007
% de WT	100	235.5	222.6	126.7	113.7	215.0	176.7	116.8	112.7

Tabla 12

Planta de tabaco	Descripción	Transgén	Área promedio de semilla
2	T1 38 nulizigote		0
3	T1 38 nulizigote		0.279
4	T1 38 nulizigote		0.297
5	WT		0.248
6	WT		0.243
7	WT		0.264
8	WT		0.277
1	T1 38 transgénico	CKX2	0.353
9	T1 38 transgénico	CKX2	0.281
10	T1 38 transgénico	CKX2	0.293
11	T1 38 transgénico	CKX2	0.329
12	T1 38 transgénico	CKX2	0.282
13	T1 8 transgénico	CKX1	0.278
14	T1 8 transgénico	CKX1	0.315
15	T1 8 transgénico	CKX1	0.322
16	T1 8 transgénico	CKX1	0.312

Listado de secuencias

- 5 <110> SCHMULLING, Thomas WERNER, Tomas
- <120> Método para modificar la morfología, bioquímica y fisiología de plantas que comprende la expresión de citoquinina oxidasa de plantas
- <130> CROP-005-EP2-DIV1
- <150> US 10/014,101
- 10 <151> 2001-10-12
- <160> 36
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 2236
- 15 <212> ADN
- <213> Arabidopsis thaliana
- <400> 1

ES 2 392 190 T3

atgggattga	cctcatcctt	acggttccat	agacaaaaca	acaagacttt	cctcggaatc	60
ttcatgatct	tagttctaag	ctgtatacca	ggtagaacca	atctttgttc	caatcattct	120
gtagtagacc	caaaagaatt	accttcttca	aatccttcag	atattcgttc	ctcattagtt	180
tcactagatt	tggagggtta	tataagcttc	gacgatgtcc	acaatgtggc	caaggacttt	240
ggcaacagat	accagttacc	acctttggca	attctacatc	caaggtcagt	ttttgatatt	300
tcacatgatga	tgaagcatat	agtacatctg	ggctccacct	caaactttac	agtagcagct	360
agaggccatg	gtcactcgtc	tcaaggacaa	gctctagctc	atcaagggtg	tgtcatcaaa	420
atggagtcac	ttcgaagtcc	tgatatcagg	atttataagg	ggaagcaacc	atatgttgat	480
gtctcaggtg	gtgaaatag	gataaacatt	ctacgcgaga	ctctaaaata	cggtctttca	540
ccaaagtcct	ggacagacta	ccttcatttg	accgttggag	gtacactatc	taatgctgga	600
atcagcggtc	aagcattcaa	gcatggacct	caaactcaaca	acgtctacca	gctagagatt	660
gttacaggta	tttcattcat	gctttatctc	tgcggtagtc	tcaaaaaaat	atgcacctgt	720
aaagaatatc	catctcttca	tgagcaaaaa	cactgacgac	tttaataaat	ttttgactat	780
aaaacaagag	tgcataggca	caaagtgtgaa	atatgcaaca	cacaattgta	acttgcacca	840
agaaaaaagt	tataaaaaca	aacaactgat	aagcaatata	ttccaatat	ttaatcaggg	900
aaaggagaag	tcgtaacctg	ttctgagaag	cgggaattctg	aacttttctt	cagtgttctt	960
ggcgggcttg	gacagtttgg	cataatcacc	cgggcacgga	tctctcttga	accagcaccg	1020
catatggtaa	agttctatct	tgaacaaagt	tcaaacaata	tacgctatga	ttctaagaac	1080
cactttcctg	acacagtcaa	ataactttta	ataggttaaa	tggatcaggg	tactctactc	1140
tgacttttct	gcattttcaa	gggaccaaga	atatctgatt	tcgaaggaga	aaacttttga	1200
ttacgttgaa	ggatttgtga	taatcaatag	aacagacctt	ctcaataatt	ggcgatcgtc	1260
attcagtccc	aacgattcca	cacaggcaag	cagattcaag	tcagatggga	aaactcttta	1320
ttgcctagaa	gtggtcaaat	atttcaacct	agaagaagct	agctctatgg	atcaggtaag	1380

ES 2 392 190 T3

atgtgaaagc aatatataac tagacttagt ttccacagag agctccaaat caaccgttgg	1440
ctactagcct actaacataa tgaatgggtg ccggtgcagga aactggcaag ttactttcag	1500
agttaaatta tattccatcc actttgtttt catctgaagt gccatataac gagtttctgg	1560
atcgcgtgca tatcgcagag agaaaactaa gagcaaaggg tttatgggag gttccacatc	1620
cctggctgaa tctcctgatt cctaagagca gcatatacca atttgctaca gaagttttca	1680
acaacattct cacaagcaac aacaacggtc ctatccttat ttatccagtc aatcaatcca	1740
agtaagtgag caaaatgcca aaagcaaagc cgtccagtga ttctgaaaca taaattacta	1800
accatatcca acattttgtg gtttcaggtg gaagaaacat acatctttga taactccaaa	1860
tgaagatata ttctatctcg tagcctttct cccctctgca gtgccaaatt cctcagggaa	1920
aaacgatcta gagtaccttt tgaaacaaaa ccaaagagtt atgaacttct gcgcagcagc	1980
aaacctcaac gtgaagcagt atttgcccc aatgaaact caaaaagagt ggaaatcaca	2040
ctttggcaaa agatgggaaa catttgaca gaggaacaa gcctacgacc ctctagcgat	2100
tctagcacct ggccaaagaa tattccaaaa gacaacagga aaattatctc ccatccaact	2160
cgcaaagtca aaggcaacag gaagtcctca aaggtacat tacgcatcaa tactgccgaa	2220
acctagaact gtataa	2236

<210> 2

<211> 575

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

ES 2 392 190 T3

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

ES 2 392 190 T3

Gly Gln Ala Leu Ala His Gln Gly Val Val Ile Lys Met Glu Ser Leu
 130 135 140
 Arg Ser Pro Asp Ile Arg Ile Tyr Lys Gly Lys Gln Pro Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Val Ser Gly Gly Glu Ile Trp Ile Asn Ile Leu Arg Glu Thr Leu Lys
 165 170 175
 Tyr Gly Leu Ser Pro Lys Ser Trp Thr Asp Tyr Leu His Leu Thr Val
 180 185 190
 Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile Ser Gly Gln Ala Phe Lys His
 195 200 205
 Gly Pro Gln Ile Asn Asn Val Tyr Gln Leu Glu Ile Val Thr Gly Lys
 210 215 220
 Gly Glu Val Val Thr Cys Ser Glu Lys Arg Asn Ser Glu Leu Phe Phe
 225 230 235 240
 Ser Val Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg
 245 250 255
 Ile Ser Leu Glu Pro Ala Pro His Met Val Lys Trp Ile Arg Val Leu
 260 265 270
 Tyr Ser Asp Phe Ser Ala Phe Ser Arg Asp Gln Glu Tyr Leu Ile Ser
 275 280 285
 Lys Glu Lys Thr Phe Asp Tyr Val Glu Gly Phe Val Ile Ile Asn Arg
 290 295 300
 Thr Asp Leu Leu Asn Asn Trp Arg Ser Ser Phe Ser Pro Asn Asp Ser
 305 310 315 320
 Thr Gln Ala Ser Arg Phe Lys Ser Asp Gly Lys Thr Leu Tyr Cys Leu
 325 330 335
 Glu Val Val Lys Tyr Phe Asn Pro Glu Glu Ala Ser Ser Met Asp Gln
 340 345 350
 Glu Thr Gly Lys Leu Leu Ser Glu Leu Asn Tyr Ile Pro Ser Thr Leu
 355 360 365
 Phe Ser Ser Glu Val Pro Tyr Ile Glu Phe Leu Asp Arg Val His Ile
 370 375 380
 Ala Glu Arg Lys Leu Arg Ala Lys Gly Leu Trp Glu Val Pro His Pro
 385 390 395 400

ES 2 392 190 T3

Trp Leu Asn Leu Leu Ile Pro Lys Ser Ser Ile Tyr Gln Phe Ala Thr
 405 410 415

Glu Val Phe Asn Asn Ile Leu Thr Ser Asn Asn Asn Gly Pro Ile Leu
 420 425 430

Ile Tyr Pro Val Asn Gln Ser Lys Trp Lys Lys His Thr Ser Leu Ile
 435 440 445

Thr Pro Asn Glu Asp Ile Phe Tyr Leu Val Ala Phe Leu Pro Ser Ala
 450 455 460

Val Pro Asn Ser Ser Gly Lys Asn Asp Leu Glu Tyr Leu Leu Lys Gln
 465 470 475 480

Asn Gln Arg Val Met Asn Phe Cys Ala Ala Ala Asn Leu Asn Val Lys
 485 490 495

Gln Tyr Leu Pro His Tyr Glu Thr Gln Lys Glu Trp Lys Ser His Phe
 500 505 510

Gly Lys Arg Trp Glu Thr Phe Ala Gln Arg Lys Gln Ala Tyr Asp Pro
 515 520 525

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

Lys Leu Ser Pro Ile Gln Leu Ala Lys Ser Lys Ala Thr Gly Ser Pro
 545 550 555 560

Gln Arg Tyr His Tyr Ala Ser Ile Leu Pro Lys Pro Arg Thr Val
 565 570 575

<210> 3

<211> 2991

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

ES 2 392 190 T3

atggctaac	ttcgttta	gatcacttta	atcacggttt	taatgatcac	caaatcatca	60
aacggtatta	aaattgattt	acctaaatcc	cttaacctca	ccctctctac	cgatccttcc	120
atcatctccg	cagcctctca	tgacttcgga	aacataacca	ccgtgacccc	cggcggcgta	180
atctgcccc	cctccaccgc	tgatatctct	cgtctcctcc	aatacgccgc	aaacggaaaa	240
agtacattcc	aagtagcggc	tcgtggccaa	ggccactcct	taaacggcca	agcctcggtc	300
tccggcggag	taatcgtaa	catgacgtgt	atcactgacg	tggtggtttc	aaaagacaag	360
aagtacgctg	acgtggcggc	cgggacgta	tgggtggatg	tgcttaagaa	gacggcggag	420
aaaggggtgt	cgccggtttc	ttggacggat	tatttgcata	taaccgctcg	aggaacgttg	480
tcgaatggtg	gaattggtgg	tcaagtgtt	cgaaacggtc	ctcttgtag	taacgtcctt	540
gaattggacg	ttattactgg	tacgcatctt	ctaaactttg	atgtacatac	aacaacaaaa	600

actgtttttg	ttttatagta	tttttcattt	tttgtacat	aggttttatg	ttttatagtt	660
gtgctaaact	tcttgcacca	cacgtaagtc	ttcgaaacac	aaaatgcgta	acgcatctat	720
atgttttttg	tacatatgga	atgttgttca	tgagaaataa	agtaattaca	tatacacaca	780
tttattgtcg	tacatatata	aataattaa	gacaaatttt	cacaattggt	agcgtgttaa	840
tttgggattt	ttgtaatgta	catgcatgac	gcatgcatat	ggagcttttc	ggttttctta	900
gatttgtgta	gtatttcaaa	tatatcattt	attttctttc	gaataaagag	gtggtatatt	960
tttaaaatag	caacatttca	gaatttttct	ttgaatttac	actttttaaa	ttgttattgt	1020
taatatggat	tttgaataaa	taatttcagg	gaaagggtgaa	atgttgacat	gctcgcgaca	1080
gctaaacca	gaattgttct	atggagtgtt	aggaggtttg	ggtcaatttg	gaattataac	1140
gagagccaga	attgttttgg	accatgcacc	taaacgggta	cgatcatca	tattttacca	1200
tttgttttag	tcagcattca	tttttcatta	gtaattccgt	ttcaatttct	aaattttttt	1260
agtcaataga	aatgatttct	tatgtcagag	cttgattatt	tagtgatttt	tattgagata	1320
aaataaaata	taacctaacg	gaaataatta	ttttactaat	cggataatgt	ctgattaaaa	1380
cattttatga	tattacacta	agagagttag	agacgtatgg	atcacaaaac	atgaagcttt	1440
cttagatggg	atcctaaaac	taaagttagg	tacaagtttg	gaatttaggt	caaagtctta	1500
agttgcatta	atttgaacaa	aatctatgca	ttgaataaaa	aaaagatatg	gattatttta	1560
taaagtatag	tccttghta	cctaggactt	gttgtcta	cttgtcttat	gcgtgcaaat	1620
ctttttgatg	tcaatatata	atccttgttt	attagagtca	agctctttca	ttagtcaact	1680
actcaaata	actccaaagt	ttagaatata	gtcttctgac	taattagaat	cttacaaccg	1740
ataaacgta	caatttgggt	atcattttta	aaaacagatt	tggtcataat	atacgatgac	1800
gttctgtttt	agtttcatct	atccacaaat	tttatataat	tattttcaag	aaaatattga	1860
aatactatac	tgtaatatgg	tttctttata	tatgtgtgta	taaattaaat	gggattgttt	1920
tctctaaatg	aaattgtgta	ggccaaatgg	tttcggatgc	tctacagtga	ttcacaact	1980
tttacaagg	accaagaacg	tttgatatca	atggcaaacg	atattggagt	cgactattta	2040
gaaggtaaaa	tatttctatc	aaacggtgtc	gttgacacct	cttttttccc	acctcagat	2100
caatctaaag	tcgctgatct	agtcaagcaa	cacggtatca	tctatgttct	tgaagtagcc	2160
aagtattatg	atgatcccaa	tctccccatc	atcagcaagg	tactacacat	ttacattttc	2220
atcatcgttt	ttatcatacc	ataagatatt	taaagtattc	atcattgcac	cacattaaga	2280
tattcatcat	catcatcggt	acattttttt	ttgcatctta	tgcttctcat	aatctactat	2340
tgtgtagggt	attgacacat	taacgaaaac	attaagttac	ttgcccgggt	tcatatcaat	2400
gcacgacgtg	gcctacttcg	atttcttgaa	ccgtgtacat	gtcgaagaaa	ataaactcag	2460
atctttggga	ttatgggaac	ttcctcatcc	ttggcttaac	ctctacgttc	ctaaatctcg	2520
gatttctgat	tttcataacg	gtgttgtaaa	agacatttct	cttaagcaaa	aatcagcttc	2580
gggactcgct	cttctctatc	caacaaaccg	gaataagtac	atacttctct	tcattcatat	2640

ES 2 392 190 T3

ttatcttcaa gaaccaaagt aaataaattt ctatgaactg attatgctgt tattgttaga 2700
 tgggacaatc gtatgtcggc gatgatacca gagatcgatg aagatgttat atatattatc 2760
 ggactactac aatccgctac cccaaaggat cttccagaag tggagagcgt taacgagaag 2820
 ataattaggt tttgcaagga ttcaggattt aagattaagc aatatctaata gcattatact 2880
 agtaaagaag attggattga gcatttttga tcaaaatggg atgatttttc gaagaggaaa 2940
 gatctatttg atcccaagaa actgttatct ccagggcaag acatcttttg a 2991

<210> 4

<211> 501

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

Met Ala Asn Leu Arg Leu Met Ile Thr Leu Ile Thr Val Leu Met Ile
 1 5 10 15
 Thr Lys Ser Ser Asn Gly Ile Lys Ile Asp Leu Pro Lys Ser Leu Asn
 20 25 30
 Leu Thr Leu Ser Thr Asp Pro Ser Ile Ile Ser Ala Ala Ser His Asp
 35 40 45
 Phe Gly Asn Ile Thr Thr Val Thr Pro Gly Gly Val Ile Cys Pro Ser
 50 55 60
 Ser Thr Ala Asp Ile Ser Arg Leu Leu Gln Tyr Ala Ala Asn Gly Lys
 65 70 75 80
 Ser Thr Phe Gln Val Ala Ala Arg Gly Gln Gly His Ser Leu Asn Gly
 85 90 95
 Gln Ala Ser Val Ser Gly Gly Val Ile Val Asn Met Thr Cys Ile Thr
 100 105 110
 Asp Val Val Val Ser Lys Asp Lys Lys Tyr Ala Asp Val Ala Ala Gly
 115 120 125
 Thr Leu Trp Val Asp Val Leu Lys Lys Thr Ala Glu Lys Gly Val Ser
 130 135 140
 Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu His Ile Thr Val Gly Gly Thr Leu
 145 150 155 160
 Ser Asn Gly Gly Ile Gly Gly Gln Val Phe Arg Asn Gly Pro Leu Val
 165 170 175
 Ser Asn Val Leu Glu Leu Asp Val Ile Thr Gly Lys Gly Glu Met Leu
 180 185 190
 Thr Cys Ser Arg Gln Leu Asn Pro Glu Leu Phe Tyr Gly Val Leu Gly

ES 2 392 190 T3

Phe Ser Lys Arg Lys Asp Leu Phe Asp Pro Lys Lys Leu Leu Ser Pro
 485 490 495

Gly Gln Asp Ile Phe
 500

<210> 5

<211> 3302

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 5

```

atggcgagtt ataatcttcg ttcacaagtt cgtcttatag caataacaat agtaatcatc      60
attactctct caactccgat cacaaccaac acatcaccac aaccatggaa taccctttca      120
cacaacgaat tcgccggaaa actcacctcc tcctcctcct ccgctcgaatc agccgccaca      180
gatttcggcc acgtcaccaa aatcttcctt tccgccgtct taatcccttc ctccgttgaa      240
gacatcacag atctcataaa actctctttt gactctcaac tgtcttttcc tttagccgct      300
cgtggtcacg gacacagcca ccgtggccaa gcctcggcta aagacggagt tgtggtcaac      360
atgcggtcca tggtaaaccg ggatcgaggt atcaagggtg ctaggacctg tttatatggt      420
gacgtggacg ctgctgggct atggattgag gtgttgaata aaactttgga gttagggtta      480
acgccggttt cttggacgga ttatttgtat ttaacagtcg gtgggacggt atcaaacggc      540
ggaattagtg gacaaacggt tcggtagcgt ccacagatca ctaatgttct agagatggat      600
gttattactg gtacgtacca cgatcttttt cacacagaga ttaaaaaaaaa cagtaatagt      660
gattttaact tcgtacgttt ctgatagaca acaaagaact tcgtacgttt ttcgaagttt      720
tttcgtcttt ttcatttttag atctgcgcgg ccatttttgg ttatgctatt gtttgtttgt      780
attgtttgtc tctgtttatt tatttctcga acttgttgat agcttttctt cttttcacac      840
atcaatctaa tcaccttttt tggctttaag attagaaaga agatacggac taggtaaaaa      900
taggtggttg taaacgtaga cgcattaaaa aaatattggt ttttttattt tttgataagc      960
aaaattggtg gttggtctaa gattataaac ttgatattaa tgcaaaggtc gatctagcaa     1020
tagaagatta atcaatattc ttggtgtttt aacaacagat tatttcatca ttaaaatcgt     1080
gaaacaaaga aattttggtg gtatacatta cgtgtagttt tgttagtta ttaaaaaaaaa     1140
tagtatatag ttttgtaaaa acgcgattta tttagtaaca cattagtata ttacacgttt     1200
aaccaactaa actttttttt ttgaataatt atgttctata tttcttactc aaattatgca     1260
aatttcgtgg attcgaagtc aaatttctgc gaaatttaca tggatcatata ttataaaact     1320
gttcatataa cccggtgaac aaacagacaa ttaagggttt gaatggttac ggcggttggg     1380
gcgacacaaa ccgtcaatag atcagaccgt tttttattta ccattcatca attatattcc     1440
gcagtggttt ggggtaaaaa aaatagaaga aaaccgcagc ggaccaattc cataccgttt     1500
ttacatacaa ataaacatgg tgcgcaacgg tttattgtcc gcctcaaaaa tgaaatggac     1560
taaaccgcag ataaattaga ccgctttgtc cgctgcctcc attcatagac taaaaaaaaa     1620
    
```

ES 2 392 190 T3

caaccaaaaa aaaaatggtc ccacgcccac gattttacac gaggtttctt gtggcgtaag 1680
gacaaaactc aaaagttcat aacgtttggc cctaaccagg tgtaatggat taagtaacag 1740
tcaattttct tattatagct gtatccatta tgtccacata tgcatccata tacattacac 1800
tgttggcttc aagtgtagtt agattacgaa gactttcaag ttccattttt tggtaggag 1860
ataaacataa tttaatgata ccgactttag cactctaggc tcaaaaacaag tacagaagag 1920
aatagtttta tttcaaactc gttgcattgt tgtatcaatt aattgtgta gtctttgat 1980
attcttacat aacgggtcaa gtttgttgaa atagtttact tactaaactt ttcctaattg 2040
ggtcaaattt tattttatag gaaaaggaga gattgcaact tgttccaagg acatgaactc 2100
ggatcttttc ttcgcggtgt taggaggtt gggtaattc ggcattataa caagagccag 2160
aattaaactt gaagtagctc cgaaaagggt atgttaaatt tgtaaattat gcaactacag 2220
aaaattctat gaaatttatg aatgaacata tatgcatttt tggatttttg taggccaagt 2280
ggttaagggt tctatacata gatttctccg aattcacaag agatcaagaa cgagtgatat 2340
cgaaaacgga cgggtgtagat ttcttagaag gttccattat ggtggacat ggcccaccgg 2400
ataactggag atccacgtat tatccaccgt ccgatcactt gaggatcgcc tcaatggta 2460
aacgacatcg tgtcatctac tgccttgaag tcgtcaagta ttacgacgaa acttctcaat 2520
acacagtcaa cgaggtccgt acatacatac aatcataaat catacatgta taattgggag 2580
atctttatgc attattcaat tatattaatt tacttttagtt atttaactta tgcaggaaat 2640
ggaggagtta agcgatagtt taaaccatgt aagagggttt atgtacgaga aagatgtgac 2700
gtatatggat ttctaaacc gagttcgaac cggagagcta aacctgaaat ccaaaggcca 2760
atgggatggt ccacatccat ggcttaatct ctctgtagca aaaactcaaa tctccaaatt 2820
tgatgatggt gtttttaagg gtattatcct aagaaataac atcactagcg gtcctgttct 2880
tgtttatcct atgaatcgca acaagtaagt ttaactcgat attgcaaaat ttactatcta 2940
cattttcggt ttggaatccg aaatattcct acaagctaat tttatgctgc gtttttaggt 3000
ggaatgatcg gatgtctgcc gctatacccg aggaagatgt attttatgcg gtagggtttt 3060
taagatccgc gggttttgac aattgggagg cttttgatca agaaaacatg gaaatactga 3120
agttttgtga ggatgcta atgggggtta tacaatatct tccttatcat tcatcacaag 3180
aaggatgggt tagacatttt ggtccgaggt ggaatatttt cgtagagaga aaatataaat 3240
atgatcccaa aatgatatta tcaccgggac aaaatatatt tcaaaaaata aactcgagtt 3300
ag 3302

<210> 6

<211> 523

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

Met Ala Ser Tyr Asn Leu Arg Ser Gln Val Arg Leu Ile Ala Ile Thr
1 5 10 15

ES 2 392 190 T3

Ile Val Ile Ile Ile Thr Leu Ser Thr Pro Ile Thr Thr Asn Thr Ser
 20 25 30

Pro Gln Pro Trp Asn Ile Leu Ser His Asn Glu Phe Ala Gly Lys Leu
 35 40 45

Thr Ser Ser Ser Ser Ser Val Glu Ser Ala Ala Thr Asp Phe Gly His
 50 55 60

Val Thr Lys Ile Phe Pro Ser Ala Val Leu Ile Pro Ser Ser Val Glu
 65 70 75 80

Asp Ile Thr Asp Leu Ile Lys Leu Ser Phe Asp Ser Gln Leu Ser Phe
 85 90 95

Pro Leu Ala Ala Arg Gly His Gly His Ser His Arg Gly Gln Ala Ser
 100 105 110

Ala Lys Asp Gly Val Val Val Asn Met Arg Ser Met Val Asn Arg Asp
 115 120 125

Arg Gly Ile Lys Val Ser Arg Thr Cys Leu Tyr Val Asp Val Asp Ala
 130 135 140

Ala Trp Leu Trp Ile Glu Val Leu Asn Lys Thr Leu Glu Leu Gly Leu
 145 150 155 160

Thr Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Val Gly Gly Thr
 165 170 175

Leu Ser Asn Gly Gly Ile Ser Gly Gln Thr Phe Arg Tyr Gly Pro Gln
 180 185 190

Ile Thr Asn Val Leu Glu Met Asp Val Ile Thr Gly Lys Gly Glu Ile
 195 200 205

Ala Thr Cys Ser Lys Asp Met Asn Ser Asp Leu Phe Phe Ala Val Leu
 210 215 220

Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Lys Leu
 225 230 235 240

Glu Val Ala Pro Lys Arg Ala Lys Trp Leu Arg Phe Leu Tyr Ile Asp
 245 250 255

Phe Ser Glu Phe Thr Arg Asp Gln Glu Arg Val Ile Ser Lys Thr Asp
 260 265 270

Gly Val Asp Phe Leu Glu Gly Ser Ile Met Val Asp His Gly Pro Pro
 275 280 285

ES 2 392 190 T3

Asp Asn Trp Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Pro Ser Asp His Leu Arg Ile
 290 295 300

Ala Ser Met Val Lys Arg His Arg Val Ile Tyr Cys Leu Glu Val Val
 305 310 315 320

Lys Tyr Tyr Asp Glu Thr Ser Gln Tyr Thr Val Asn Glu Glu Met Glu
 325 330 335

Glu Leu Ser Asp Ser Leu Asn His Val Arg Gly Phe Met Tyr Glu Lys
 340 345 350

Asp Val Thr Tyr Met Asp Phe Leu Asn Arg Val Arg Thr Gly Glu Leu
 355 360 365

Asn Leu Lys Ser Lys Gly Gln Trp Asp Val Pro His Pro Trp Leu Asn
 370 375 380

Leu Phe Val Pro Lys Thr Gln Ile Ser Lys Phe Asp Asp Gly Val Phe
 385 390 395 400

Lys Gly Ile Ile Leu Arg Asn Asn Ile Thr Ser Gly Pro Val Leu Val
 405 410 415

Tyr Pro Met Asn Arg Asn Lys Trp Asn Asp Arg Met Ser Ala Ala Ile
 420 425 430

Pro Glu Glu Asp Val Phe Tyr Ala Val Gly Phe Leu Arg Ser Ala Gly
 435 440 445

Phe Asp Asn Trp Glu Ala Phe Asp Gln Glu Asn Met Glu Ile Leu Lys
 450 455 460

Phe Cys Glu Asp Ala Asn Met Gly Val Ile Gln Tyr Leu Pro Tyr His
 465 470 475 480

Ser Ser Gln Glu Gly Trp Val Arg His Phe Gly Pro Arg Trp Asn Ile
 485 490 495

Phe Val Glu Arg Lys Tyr Lys Tyr Asp Pro Lys Met Ile Leu Ser Pro
 500 505 510

Gly Gln Asn Ile Phe Gln Lys Ile Asn Ser Ser
 515 520

<210> 7

<211> 2782

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 7

atgactaata ctctctgttt aagcctcatc accctaataa cgctttttat aagttaacc 60

ES 2 392 190 T3

ccaaccttaa	tcaaatcaga	tgagggcatt	gatgttttct	tacccatatac	actcaacctt	120
acggtcctaa	ccgatccctt	ctccatctct	gccgcttctc	acgacttcgg	taacataacc	180
gacgaaaatc	ccggcgccgt	cctctgccct	tctccacca	cggagggtggc	tcgtctctc	240
cgtttcgcta	acggaggatt	ctcttacaat	aaaggctcaa	ccagccccgc	gtctactttc	300
aaagtggctg	ctcagggcca	aggccactcc	ctccgtggcc	aagcctctgc	acccggagggt	360
gtcgtcgtga	acatgacgtg	tctcgcctatg	gcggctaaac	cagcggcgggt	tgttatctcg	420
gcagacggga	cttacgctga	cgtggctgcc	gggacgatgt	gggtggatgt	tctgaaggcg	480
gcgggtggata	gaggcgtctc	gccggttaca	tggacggatt	atgtgtatct	cagcgtcggc	540
gggacgttgt	cgaacgctgg	aatcgggtgt	cagacgttta	gacacggccc	tcagattagt	600
aacgttcatg	agcttgacgt	tattaccgggt	acgtaaatac	caaaacttca	ctaatctcgt	660
tacaattttt	taattttttg	gtaataataa	ttttgtacgg	ctcaactctt	aattaagaat	720
gaaacagtat	ctatgatctt	ctagatgctc	ttttttgtc	tgcaagcttt	aattgtagta	780
acatcagcga	tatatatac	acatgcatgt	gtattattga	tgataatata	taatgtttta	840
gttacaaatt	tgattctcaa	ggtaaaactc	acacgccata	accagtataa	aactccaaaa	900
atcacgtttt	ggtcagaaat	acatatacctt	cattaacagt	agttatgcta	taatttgta	960
ttataaataa	ctccggagtt	tgttcacaat	actaaatttc	aggaaaaggt	gaaatgatga	1020
cttgctctcc	aaagttaaac	cctgaattgt	tctatggagt	tttaggaggt	ttgggtcaat	1080
tcggtattat	aacgagggcc	aggattgctg	tggtatcatgc	accacaagg	gtatgtatca	1140
tgcatctata	gtgtaatcaa	tttataat	taatgtagtg	gtcctaaatc	caaaatttga	1200
tttgatttgg	ttggaacgta	cgtatatata	ataagtcaa	aggctgattt	tgaagacgaa	1260
tttatatact	ttgttgaat	taaactgat	tttgcttacg	ttttattaga	ttctgcgtaa	1320
taaactctag	gacttgctcg	agtgtaactct	tgtcttatgc	ttgcaaatct	tgttgatgct	1380
aatatcta	cttttttatt	atatttcctt	acgtaagttt	tagatatagt	tattttaaac	1440
tgctataaat	tgtgtacgta	tagactttag	ataaaaagtt	gtggctcgctt	gcacctattt	1500
gtttatcgct	atagtgattc	aaaggctctat	atatgattct	tggttttctt	ttttgaaaaa	1560
aatagaccat	acaatccaag	gaagatgatc	ttaaattggac	taatttatgg	atataaattg	1620
atatacaaat	ctgcaggtga	aatggctctg	catactctac	agtgacttct	cggcttttaa	1680
aagagaccaa	gagcgtttta	tatcaatgac	caatgatctc	ggagttgact	ttttggaagg	1740
tcaacttatg	atgtcaaatg	gcttcgtaga	cacctcttct	ttcccactct	ccgatcaaac	1800
aagagtcgca	tctcttgtga	atgaccaccg	gatcatctat	gttctcgaag	tagccaagta	1860
ttatgacaga	accacccttc	ccattattga	ccaggtaacta	aaatccatta	ttcatgatga	1920
ttatcttcac	acaatcagta	tcatcaccaa	ttaccatcat	cacttgtcat	atatgatcca	1980
aagtaaata	atcacatgat	ataaataaat	cgttcaaatc	ttttttttta	agaataaaaa	2040
gaatcatttt	caagcattac	tcatacacat	ctacgaatca	ccgtgaccat	atataacat	2100
acgcttatta	aataatcatt	tttgtttgta	ggtgattgac	acgttaagta	gaactctagg	2160

ES 2 392 190 T3

```

tttcgctcca gggtttatgt tcgtacaaga tgttccgtat ttcgatttct tgaaccgtgt 2220
ccgaaacgaa gaagataaac tcagatcttt aggactatgg gaagttcctc atccatggct 2280
taacatcttt gtcccgggggt ctcgaatcca agattttcat gatggtgta ttaatggcct 2340
tcttctaaac caaacctcaa cttctggtgt tactctcttc tatcccacaa accgaaacaa 2400
gtaaataatt actttttgat tttgttttat ttgaaagtat atccaataa tgotatgtaa 2460
attgtaaca agaatttatt ttattaatag atggaacaac cgcatgtcaa cgatgacacc 2520
ggacgaagat gttttttatg tgatcggatt actgcaatca gctggtggat ctcaaaattg 2580
gcaagaactt gaaaatctca acgacaaggt tattcagttt tgtgaaaact cgggaattaa 2640
gattaaggaa tatttgatgc actatacaag aaaagaagat tgggttaaac attttgacc 2700
aaaatgggat gattttttaa gaaagaaaat tatgtttgat cccaaaagac tattgtctcc 2760
aggacaagac atatttaatt aa 2782

```

<210> 8

<211> 524

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

```

Met Thr Asn Thr Leu Cys Leu Ser Leu Ile Thr Leu Ile Thr Leu Phe
1          5          10          15
Ile Ser Leu Thr Pro Thr Leu Ile Lys Ser Asp Glu Gly Ile Asp Val
20          25          30
Phe Leu Pro Ile Ser Leu Asn Leu Thr Val Leu Thr Asp Pro Phe Ser
35          40          45
Ile Ser Ala Ala Ser His Asp Phe Gly Asn Ile Thr Asp Glu Asn Pro
50          55          60
Gly Ala Val Leu Cys Pro Ser Ser Thr Thr Glu Val Ala Arg Leu Leu
65          70          75          80
Arg Phe Ala Asn Gly Gly Phe Ser Tyr Asn Lys Gly Ser Thr Ser Pro
85          90          95
Ala Ser Thr Phe Lys Val Ala Ala Arg Gly Gln Gly His Ser Leu Arg
100          105          110
Gly Gln Ala Ser Ala Pro Gly Gly Val Val Val Asn Met Thr Cys Leu
115          120          125
Ala Met Ala Ala Lys Pro Ala Ala Val Val Ile Ser Ala Asp Gly Thr
130          135          140
Tyr Ala Asp Val Ala Ala Gly Thr Met Trp Val Asp Val Leu Lys Ala
145          150          155          160

```

Ala Val Asp Arg Gly Val Ser Pro Val Thr Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr
 165 170 175

Leu Ser Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile Gly Gly Gln Thr
 180 185 190

Phe Arg His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val His Glu Leu Asp Val Ile
 195 200 205

Thr Gly Lys Gly Glu Met Met Thr Cys Ser Pro Lys Leu Asn Pro Glu
 210 215 220

Leu Phe Tyr Gly Val Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr
 225 230 235 240

Arg Ala Arg Ile Ala Leu Asp His Ala Pro Thr Arg Val Lys Trp Ser
 245 250 255

Arg Ile Leu Tyr Ser Asp Phe Ser Ala Phe Lys Arg Asp Gln Glu Arg
 260 265 270

Leu Ile Ser Met Thr Asn Asp Leu Gly Val Asp Phe Leu Glu Gly Gln
 275 280 285

Leu Met Met Ser Asn Gly Phe Val Asp Thr Ser Phe Phe Pro Leu Ser
 290 295 300

Asp Gln Thr Arg Val Ala Ser Leu Val Asn Asp His Arg Ile Ile Tyr
 305 310 315 320

Val Leu Glu Val Ala Lys Tyr Tyr Asp Arg Thr Thr Leu Pro Ile Ile
 325 330 335

Asp Gln Val Ile Asp Thr Leu Ser Arg Thr Leu Gly Phe Ala Pro Gly
 340 345 350

Phe Met Phe Val Gln Asp Val Pro Tyr Phe Asp Phe Leu Asn Arg Val
 355 360 365

Arg Asn Glu Glu Asp Lys Leu Arg Ser Leu Gly Leu Trp Glu Val Pro
 370 375 380

His Pro Trp Leu Asn Ile Phe Val Pro Gly Ser Arg Ile Gln Asp Phe
 385 390 395 400

His Asp Gly Val Ile Asn Gly Leu Leu Leu Asn Gln Thr Ser Thr Ser
 405 410 415

Gly Val Thr Leu Phe Tyr Pro Thr Asn Arg Asn Lys Trp Asn Asn Arg
 420 425 430

ES 2 392 190 T3

Met Ser Thr Met Thr Pro Asp Glu Asp Val Phe Tyr Val Ile Gly Leu
 435 440 445

Leu Gln Ser Ala Gly Gly Ser Gln Asn Trp Gln Glu Leu Glu Asn Leu
 450 455 460

Asn Asp Lys Val Ile Gln Phe Cys Glu Asn Ser Gly Ile Lys Ile Lys
 465 470 475 480

Glu Tyr Leu Met His Tyr Thr Arg Lys Glu Asp Trp Val Lys His Phe
 485 490 495

Gly Pro Lys Trp Asp Asp Phe Leu Arg Lys Lys Ile Met Phe Asp Pro
 500 505 510

Lys Arg Leu Leu Ser Pro Gly Gln Asp Ile Phe Asn
 515 520

<210> 9

<211> 2805

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 9

```

atgacgtcaa gctttcttct cctgacgttc gccatatgta aactgatcat agccgtgggt 60
ctaaacgtgg gccccagtga gctcctccgc atcggagcca tagatgtcga cggccacttc 120
accgtccacc cttccgactt agcctccgtc tcctcagact tcggtatgct gaagtcacct 180
gaagagccat tggccgtgct tcatccatca tcggccgaag acgtggcacg actcgtcaga 240
acagcttacg gtccagccac ggcgtttccg gtctcagccc gaggccacgg ccattccata 300
aacggacaag ccgcggcggg gaggaacggt gtgggtggtg aaatgaacca cggcgtaac 360
gggacgcccc agccactcgt ccgaccggat gaaatgtatg tggatgtatg ggggtggagag 420
ttatgggtcg atgtgttgaa gaaaacggtg gagcatggct tagcaccaaa atcatggacg 480
gattacttgt atctaaccgt tggaggtaca ctctccaatg caggaatcag tggtaagct 540
tttcaccatg gtcctcaaat tagtaacgtc cttgagctcg acgttgtaac tggtagtat 600
taaaacattc aagttcatat attttaaatg cttttgtctg aagttttact aataacaaga 660
aattgatacc aaaaagtagg gaaaggagag gtgatgagat gctcagaaga agagaacaca 720
aggctattcc atggagttct tgggtgatta ggtcaatttg ggatcatcac tcgagcacga 780
atctctctcg aaccagctcc ccaaagggta atatTTTTT aatgactagc tatcaaaaat 840
ccctggcggg tccatacgtt gtaatctttt tagtttttac tgttgatggt attttttata 900
tattttggat aataaaaccc taaaatggta tattgtgatg acaggtgaga tggatacggg 960
tattgtattc gagcttcaaa gtgtttacgg aggaccaaga gtacttaatc tcaatgcatg 1020
gtcaattaa gtttgattac gtggaaggtt ttgtgattgt ggacgaagga ctcgtcaaca 1080
attggagatc ttctttcttc tctccacgta accccgtaa gatctcctct gttagttcca 1140
    
```

ES 2 392 190 T3

acggctctgt tttgtattgc cttgagatca ccaagaacta ccacgactcc gactccgaaa 1200
 tcggtgatca ggtcactttc attattcact tagaaaaaag cgatattttc attttttata 1260
 ttgatgaata tctggaagga tttaacgcta tgcgactatt gggaaatcat tatgaaaaaa 1320
 tatttagttt atatgattga aagtggcttc catagtattt ttgtttgtgc gactttatta 1380
 taacttaa at ttggaagagg acatgaagaa gaagccagag aggatctaca gagatctagc 1440
 ttttccacct gaacttaata atgcacattt atataattat ttttcttctt ctaaagttta 1500
 gtttatcact agcgaattaa tcatggttac taattaagta gtggacaggg tcatggacca 1560
 ctcactcacc aaataatgat tcctctttac tcttaagttt aattttaata aaaccaactc 1620
 tactggaatc ttaacttadc cttggttttg gtaggccttt atagcaacac ggttttttta 1680
 attttctat tccagatttt gtatattaa tgcgatttt ttttctttt gtttcaggaa 1740
 gttgagattc tgatgaagaa attgaatttc ataccgacat cggctcttac aacggattta 1800
 caatatgtgg actttctcga ccgggtacac aaggccgaat tgaagctccg gtccaagaat 1860
 ttatgggagg ttccacacc atggctcaac ctcttcgtgc caaatcaag aatctctgac 1920
 ttcgataaag gcgttttcaa gggcattttg ggaaataaaa caagtggccc tattcttadc 1980
 taccatga acaaagacaa gtaagtcttg acattacat tgattactac ttctaaattt 2040
 cttctctaga aaaaagaata aaacgagttt tgcattgcat gcatgcaaag ttacacttgt 2100
 ggggattaat tagtggcca agaaaaaag tttgtcaaaa ttgaaaaaaa ctgacacgt 2160
 ggtacatggg attgtccgaa aaacggtgtc cacatgtgca tcgaaccagc taagattgac 2220
 aacaacactt cgctggctcg ttttctctt tttgtttgt gaccaaatcc gatggctcag 2280
 attgggttta tttgttttta agttcctaga actcatggg ggtgggtccc aatcagattc 2340
 tcctagacca aaccgatctc aacgaacct ccgcacatca ttgattatta cattaatata 2400
 gatattgtcg ttgctgacgt gtcgtaattt gatgttattg tcagatggga cgagaggagc 2460
 tcagccgtga cgccgatga ggaagtttc tatctgggtg ctctattgag atcagcttta 2520
 acggacggtg aagagacaca gaagctagag tatctgaaag atcagaaccg tcggatcttg 2580
 gagttctgtg aacaagcaa gatcaatgtg aagcagtatc ttctcacca cgcaacacag 2640
 gaagagtggg tggctcattt tggggacaag tgggatcggc tcagaagctt aaaggctgag 2700
 tttgatccgc gacacatact cgctactggt cagagaatct ttcaaaacc atctttgtct 2760
 ttgtttctc cgctcgtcgc ttcttcgtca gcggcttcat ggtga 2805

<210> 10

<211> 536

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

ES 2 392 190 T3

Met Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ile Cys Lys Leu Ile
1 5 10 15
Ile Ala Val Gly Leu Asn Val Gly Pro Ser Glu Leu Leu Arg Ile Gly

ES 2 392 190 T3

Ser Asn Gly Ser Val Leu Tyr Cys Leu Glu Ile Thr Lys Asn Tyr His
 305 310 315 320

Asp Ser Asp Ser Glu Ile Val Asp Gln Glu Val Glu Ile Leu Met Lys
 325 330 335

Lys Leu Asn Phe Ile Pro Thr Ser Val Phe Thr Thr Asp Leu Gln Tyr
 340 345 350

Val Asp Phe Leu Asp Arg Val His Lys Ala Glu Leu Lys Leu Arg Ser
 355 360 365

Lys Asn Leu Trp Glu Val Pro His Pro Trp Leu Asn Leu Phe Val Pro
 370 375 380

Lys Ser Arg Ile Ser Asp Phe Asp Lys Gly Val Phe Lys Gly Ile Leu
 385 390 395 400

Gly Asn Lys Thr Ser Gly Pro Ile Leu Ile Tyr Pro Met Asn Lys Asp
 405 410 415

Lys Trp Asp Glu Arg Ser Ser Ala Val Thr Pro Asp Glu Glu Val Phe
 420 425 430

Tyr Leu Val Ala Leu Leu Arg Ser Ala Leu Thr Asp Gly Glu Glu Thr
 435 440 445

Gln Lys Leu Glu Tyr Leu Lys Asp Gln Asn Arg Arg Ile Leu Glu Phe
 450 455 460

Cys Glu Gln Ala Lys Ile Asn Val Lys Gln Tyr Leu Pro His His Ala
 465 470 475 480

Thr Gln Glu Glu Trp Val Ala His Phe Gly Asp Lys Trp Asp Arg Phe
 485 490 495

Arg Ser Leu Lys Ala Glu Phe Asp Pro Arg His Ile Leu Ala Thr Gly
 500 505 510

Gln Arg Ile Phe Gln Asn Pro Ser Leu Ser Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 515 520 525

Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ser Trp
 530 535

<210> 11

<211> 1936

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 11

atgcttatag taagaagttt caccatcttg cttctcagct gcatagcctt taagttggct 60

ES 2 392 190 T3

tgctgcttct cttagcagcat ttcttctttg aaggcgcttc ccctagtagg ccatttggag 120
 tttgaacatg tccatcacgc ctccaaagat tttggaaatc gataccagtt gatccctttg 180
 gcggtcttac atcccaaadc ggtaagcgac atcgctcaa cgatcgcaca catctggatg 240
 atgggcactc attcacagct tacagtggca gcgagaggtc gtggacattc actccaaggc 300
 caagctcaaa caagacatgg aattgttata cacatggaat cactccatcc ccagaagctg 360
 caggtctaca gtgtggattc ccctgctcca tatgttgatg tgtctggtgg tgagctgtgg 420
 ataaacattt tgcatgagac cctcaagtac gggcttgac caaatcatg gacggattac 480
 ctgcatttaa ctgtagggtg tactctgtcc aatgctggaa taagcggcca ggattccga 540
 catggaccac agatcagcaa tgttcatcaa ctggagattg tcacaggta gttcagagtt 600
 gcagtattcg tgtttgaaa gcatagactc tatatggttg gtgactatta acaacatgaa 660
 gagattcccg agaatagcta cccactaatg tcatgcctat ttattgactg caggaaaagg 720
 cgagatccta aactgtacaa agaggcagaa cagcgactta tttaatggtg ttcttgggtg 780
 tttagggtcag tttggcatca taacgcgggc aagaatagca ttggaaccag caccaacct 840
 ggtaaacat aaataaataa aaaacttaa aactgaacac gcgtgtgtcc tcctaactct 900
 gtataatgga caggtaaaat ggataagagt gttatacctg gattttgcag cttttgccaa 960
 ggaccaagag caactaatat ctgcccaggc ccacaaattc gattacatag aagggtttgt 1020
 gataataaac aggacaggcc tcctgaacag ctggaggttg tctttcaccg cagaagagcc 1080
 tttagaagca agccaattca agtttgatgg aaggactctg tattgtctgg agctagccaa 1140
 gtatttgaag caagataaca aagacgtaat caaccagggt agaaaacaga gtagaagcaa 1200
 tcggtagaat cttctttggt agatgacatt cattggaact gaaaatatat atatatttgt 1260
 ccaatccagg aagtgaagaa aacattatca gagctaagct acgtgacgtc gacactgttt 1320
 acaacggagg tagcatatga agcattcttg gacagggtag atgtgtctga ggtaaaactc 1380
 cgatcgaag ggagtgagg ggtgccacat ccatggctga acctcctggt accaagaagc 1440
 aaaatcaatg aatttgcaag aggtgtattt ggaaacatac taacggatac aagcaacggc 1500
 ccagtcatcg tctaccagt gaacaaatca aagtaagaaa gaaagaaaga aagagctagt 1560
 catgattttg tttcttttca cttgttgaca aaacaaaagc atgttggtga gcaggtgga 1620
 caatcaaaac tcagcagtaa caccggagga agaggtattc tacctggtgg cgatcctaac 1680
 atcggcatct ccagggtcgg caggaaagga tggagtagaa gagatcttga ggcggaacag 1740
 aagaatactg gaattcagtg aagaagcagg gatagggttg aagcagtatc tgccacatta 1800
 cacgacaaga gaagagtgga gatcccattt cggggacaag tggggagaat ttgtgaggag 1860
 gaaatccaga tatgatccat tggcaattct tgcgcctggc caccgaattt ttcaaaaggc 1920
 agtctcatac tcatga 1936

<210> 12

<211> 504

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 12

Met Leu Ile Val Arg Ser Phe Thr Ile Leu Leu Leu Ser Cys Ile Ala
 1 5 10 15
 Phe Lys Leu Ala Cys Cys Phe Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Lys Ala
 20 25 30
 Leu Pro Leu Val Gly His Leu Glu Phe Glu His Val His His Ala Ser
 35 40 45
 Lys Asp Phe Gly Asn Arg Tyr Gln Leu Ile Pro Leu Ala Val Leu His
 50 55 60
 Pro Lys Ser Val Ser Asp Ile Ala Ser Thr Ile Arg His Ile Trp Met
 65 70 75 80
 Met Gly Thr His Ser Gln Leu Thr Val Ala Ala Arg Gly Arg Gly His
 85 90 95
 Ser Leu Gln Gly Gln Ala Gln Thr Arg His Gly Ile Val Ile His Met
 100 105 110
 Glu Ser Leu His Pro Gln Lys Leu Gln Val Tyr Ser Val Asp Ser Pro
 115 120 125
 Ala Pro Tyr Val Asp Val Ser Gly Gly Glu Leu Trp Ile Asn Ile Leu
 130 135 140
 His Glu Thr Leu Lys Tyr Gly Leu Ala Pro Lys Ser Trp Thr Asp Tyr
 145 150 155 160
 Leu His Leu Thr Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile Ser Gly
 165 170 175
 Gln Ala Phe Arg His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val His Gln Leu Glu
 180 185 190
 Ile Val Thr Gly Lys Gly Glu Ile Leu Asn Cys Thr Lys Arg Gln Asn
 195 200 205
 Ser Asp Leu Phe Asn Gly Val Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile
 210 215 220
 Ile Thr Arg Ala Arg Ile Ala Leu Glu Pro Ala Pro Thr Met Asp Gln
 225 230 235 240
 Glu Gln Leu Ile Ser Ala Gln Gly His Lys Phe Asp Tyr Ile Glu Gly
 245 250 255
 Phe Val Ile Ile Asn Arg Thr Gly Leu Leu Asn Ser Trp Arg Leu Ser

ES 2 392 190 T3

	260		265		270	
Phe Thr	Ala 275	Glu Glu	Pro Leu	Glu 280	Ala Ser Gln Phe Lys 285	Phe Asp Gly
Arg Thr	Leu Tyr Cys	Leu 295	Glu Leu	Ala Lys Tyr	Leu 300	Lys Gln Asp Asn
Lys Asp	Val Ile Asn	Gln 310	Glu Val	Lys Glu Thr	Leu Ser Glu Leu Ser 320	
Tyr Val	Thr Ser	Thr 325	Leu Phe Thr Thr	Glu 330	Val Ala Tyr Glu Ala Phe 335	
Leu Asp	Arg Val	His Val Ser	Glu Val	Lys Leu Arg Ser	Lys 350	Gly Gln
Trp Glu	Val Pro His	Pro Trp	Leu Asn	Leu Val	Pro Arg Ser Lys 365	
Ile Asn	Glu Phe Ala Arg	Gly 375	Val Phe Gly	Asn Ile	Leu Thr Asp Thr 380	
Ser Asn	Gly Pro Val	Ile 390	Val Tyr Pro Val	Asn Lys Ser Lys Trp Asp 400		
Asn Gln	Thr Ser	Ala 405	Val Thr Pro Glu	Glu 410	Glu Val Phe Tyr Leu Val 415	
Ala Ile	Leu Thr Ser	Ala Ser Pro	Gly 425	Ser Ala Gly Lys Asp Gly Val 430		
Glu Glu	Ile Leu Arg Arg	Asn Arg Arg	Ile Leu Glu	Phe Ser Glu Glu 445		
Ala Gly	Ile Gly Leu Lys	Gln 455	Tyr Leu Pro His Tyr Thr Thr Arg Glu 460			
Glu Trp	Arg Ser His Phe	Gly 470	Asp Lys Trp Gly	Glu Phe Val Arg Arg 480		
Lys Ser	Arg Tyr Asp	Pro Leu Ala Ile	Leu 490	Ala Pro Gly His Arg Ile 495		
Phe Gln	Lys Ala Val Ser Tyr Ser					
	500					

<210> 13

<211> 31

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencias Artificiales: oligonucleótidos: cebadores o sondas

- <400> 13
 cggtcgacat gggattgacc tcacacctac g 31
- <210> 14
 <211> 35
- 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencias Artificiales: oligonucleótidos: cebadores o sondas
 <400> 14
- 10 gcgtcgactt atacagtct aggttcggc agtat 35
 <210> 15
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 15 <220>
 <223> Descripción de Secuencias Artificiales: oligonucleótidos: cebadores o sondas
 <400> 15
 gcggtaccag agagagaaac ataaacaaat ggc 33
 <210> 16
- 20 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencias Artificiales: oligonucleótidos: cebadores o sondas
- 25 <400> 16
 gcggtaccca atttacttc caccaaaatg c 31
 <210> 17
 <211> 34
 <212> ADN
- 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencias Artificiales: oligonucleótidos: cebadores o sondas
 <400> 17

- gcggtacctt cattgataag aatcaagcta ttca 34
 <210> 18
 <211> 31
 <212> ADN
- 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencias Artificiales: oligonucleótidos: cebadores o sondas
 <400> 18
- gcggtaccca aagtggtgag aacgactaac a 31
 10 <210> 19
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 15 <223> Descripción de Secuencias Artificiales: oligonucleótidos: cebadores o sondas
 <400> 19
- gcggtacccc cattaaccta cccgtttg 28
 <210> 20
 <211> 32
- 20 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencias Artificiales: oligonucleótidos: cebadores o sondas
 <400> 20
- 25 gcggtaccag acgatgaacg tactgtctg ta 32
 <210> 21
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
 <223> Descripción de Secuencias Artificiales: oligonucleótidos: cebadores o sondas
 <400> 21
- gggtacctt gatgaatcgt gaaatgac 28

- <210> 22
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
<223> Descripción de Secuencias Artificiales: oligonucleótidos: cebadores o sondas
<400> 22
ggggtaccct ttctcttgg tttgtcctg t 31
<210> 23
- 10 <211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencias Artificiales: oligonucleótidos: cebadores o sondas
- 15 <400> 23
gctctagatc aggaaaagaa ccatgcttat ag 32
<210> 24
<211> 32
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencias Artificiales: oligonucleótidos: cebadores o sondas
<400> 24
gctctagatc atgagtatga gactgccttt tg 32
- 25 <210> 25
<211> 1728
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 25

ES 2 392 190 T3

atgggattga ccteatcctt acggttccat agacaaaaca acaagacttt cctcggaatc	60
ttcatgatct tagttctaag ctgtatacca ggtagaacca atctttgttc caatcattct	120
gttagtacc caaaagaatt accttcttca aatccttcag atattcgttc ctcattagtt	180
tcactagatt tggaggggta tataagcttc gacgatgtcc acaatgtggc caaggacttt	240
ggcaacagat accagttacc acctttggca attctacatc caaggtcagt ttttgatatt	300
tcacgatga tgaagcatat agtacatctg ggctccacct caaatcttac agtagcagct	360
agaggccatg gtcactcgct tcaaggacaa gctctagctc atcaagggtg tgatcatcaa	420
atggagtac ttcgaagtc tgatatacagg atttataagg ggaagcaacc atatgttgat	480
gtctcaggtg gtgaaatatg gataaacatt ctacgcgaga ctctaaaata cggctcttca	540
ccaaagtcct ggacagacta ccttcatttg accggtggag gtacactatc taatgctgga	600
atcagcggtc aagcattcaa gcattggacc caaatcaaca acgtctacca gctagagatt	660
gttacagga aaggagaagt cgtaacctgt tctgagaagc ggaattctga acttttcttc	720
agtgttcttg gcggtcttg acagtttggc ataactcacc gggcacggat ctctcttgaa	780
ccagcaccgc atatggttaa atggatcagg gtactctact ctgacttttc tgcatttca	840
agggaccaag aatatctgat ttcgaaggag aaaacttttg attacgttga aggatttgtg	900
ataatcaata gaacagacct tctcaataat tggcgatcgt cattcagtcc caacgattcc	960
acacaggcaa gcagattcaa gtcagatggg aaaactcttt attgcctaga agtgggtcaa	1020
tatttcaacc cagaagaagc tagctctatg gatcaggaaa ctggcaagtt actttcagag	1080
ttaaattata ttccatccac tttgttttca tctgaagtgc catatatcga gtttctggat	1140
cgcgtgcata tcgcagagag aaaactaaga gcaaaggggt tatgggaggt tccacatccc	1200
tggctgaatc tcctgattcc taagagcagc atataccaat ttgctacaga agttttcaac	1260
aacatttca caagcaacaa caacggtcct atccttattt atccagtcaa tcaatccaag	1320
tggaagaaac atacatcttt gataactcca aatgaagata tattctatct cgtagccttt	1380
ctcccctctg cagtgcctaaa ttcctcaggg aaaaacgatc tagagtacct tttgaaacaa	1440
aaccaaagag ttatgaactt ctgctcagca gcaaacctca acgtgaagca gtatttgccc	1500
cattatgaaa ctcaaaaaga gtggaatca cactttggca aaagatggga aacatttgca	1560
cagaggaaac aagcctacga ccctctagcg attctagcac ctggccaaag aatattccaa	1620
aagacaacag gaaaattatc tcccattcaa ctgcgaaagt caaaggcaac aggaagtcct	1680
caaaggtacc attacgatc aatactgccg aaacctagaa ctgtataa	1728

<210> 26

<211> 1506

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 26

ES 2 392 190 T3

atggctaatc ttcgtttaat gatcacttta atcacggttt taatgatcac caaatcatca 60
aacggtatta aaattgattt acctaaatcc cttaacctca ccctctctac cgatccttcc 120
atcatctccg cagcctctca tgacttcgga aacataacca ccgtgacccc cggcggcgta 180
atctgccccct cctccaccgc tgatatctct cgtctcctcc aatacgccgc aaacggaaaa 240
agtacattcc aagtagcggc tcgtggccaa ggccactcct taaacggcca agcctcggtc 300
tccggcggag taatcgtcaa catgacgtgt atcactgacg tggtggtttc aaaagacaag 360
aagtacgctg acgtggcggc cgggacgtta tgggtggatg tgcttaagaa gacggcggag 420
aaaggggtgt cgcgggtttc ttggacggat tatttgcata taaccgtcgg aggaacgttg 480
tcgaatggtg gaattggtg tcaagtgttt cgaacggtc ctcttgtag taacgtcctt 540
gaattggacg ttattactgg gaaaggtgaa atgttgacat gctcgcgaca gctaaaccca 600
gaattgttct atggagtgtt aggaggtttg ggtcaatttg gaattataac gagagccaga 660
attgttttg accatgcacc taaacgggcc aaatggtttc ggatgctcta cagtgatttc 720
acaactttta caaaggacca agaacgtttg atatcaatgg caaacgatat tggagtcgac 780
tatttagaag gtcaaatatt tctatcaaac ggtgtcgttg acacctcttt tttccacct 840
tcagatcaat ctaaagtcgc tgatctagtc aagcaacacg gtatcatcta tgttcttgaa 900
gtagccaagt attatgatga tcccaatctc cccatcatca gcaaggttat tgacacatta 960
acgaaaacat taagttactt gcccggttc atatcaatgc acgacgtggc ctacttcgat 1020
ttcttgaacc gtgtacatgt cgaagaaaat aaactcagat ctttgggatt atgggaactt 1080
cctcatcctt ggcttaacct ctacgttctt aaatctcgga ttctcgattt tcataacggt 1140
gtgtcaaaag acattcttct taagcaaaaa tcagcttcgg gactcgtctt tctctatcca 1200
acaaaccgga ataaatggga caatcgtatg tcggcgatga taccagagat cgatgaagat 1260
gttatatata ttatcggact actacaatcc gctaccccaa aggatcttcc agaagtggag 1320
agcgttaacg agaagataat taggttttgc aaggattcag gtattaagat taagcaatat 1380
ctaatgcatt atactagtaa agaagattgg attgagcatt ttggatcaaa atgggatgat 1440
ttttcgaaga ggaaagatct atttgatccc aagaaactgt tatctccagg gcaagacatc 1500
ttttga 1506

<210> 27

<211> 1572

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 27

ES 2 392 190 T3

atggcgagtt ataatcttcg ttcacaagtt cgtcttatag caataacaat agtaatcatc 60
attactctct caactccgat cacaaccaac acatcaccac aaccatggaa tatcctttca 120
cacaacgaat tcgccgaaa actcacctcc tcctcctcct ccgtcgaatc agccgccaca 180
gatttcggcc acgtcaccaa aatcttcctt tccgccgtct taatcccttc ctccggtgaa 240
gacatcacag atctcataaa actctctttt gactctcaac tgtcttttcc tttagccgct 300
cgtggtcacg gacacagcca ccgtggccaa gcctcggcta aagacggagt tgtggtcaac 360
atgCGGTCCA TGTAACCGG GGATCGAGGT ATCAAGGTGT CTAGGACCTG TTTATATGTT 420
gacgtggacg ctgCGTGGCT ATGGATTGAG GTGTTGAATA AAACCTTGGA GTTAGGGTTA 480
acgccggttt cttggacgga ttattttgat ttaacagtcg gtgggacggt atcaaacggc 540
ggaattagtg gacaaacggt tcggtacggt ccacagatca ctaatgttct agagatggat 600
gttattactg gaaaaggaga gattgcaact tgttccaagg acatgaactc ggatcttttc 660
ttcgcggtgt taggagggtt gggTCAATTC GGCATTATAA CAAGAGCCAG AATTAACCTT 720
gaagtagctc cGAAAAGGGC CAAGTGGTTA AGGTTTCTAT ACATAGATTT CTCCGAATTC 780
acaagagatc aagaacgagt gatatcgaaa acggacggtg tagatttctt agaaggttcc 840
attatggtgg accatggccc accggataac tggagatcca cgtattatcc accgtccgat 900
cacttgagga tcgcctcaat ggtcaaacga catcgtgtca tctactgcct tgaagtcgtc 960
aagtattacg acgaaacttc tcaatacaca gtcaacgagg aaatggagga gttAAGCGAT 1020
agtttaaac atgtaagagg gtttatgtac gagaaagatg tgacgtatat ggatttccta 1080
aaccgagttc gaaccggaga gctaaacctg aaatccaaag gccaatggga tgttccacat 1140
ccatggctta atctcttcgt accaaaaact caaatctcca aatttgatga tgggtgtttt 1200
aagggtatta tcctaagaaa taacatcact agcggtcctg ttcttgttta tcctatgaat 1260
cgcaacaagt ggaatgatcg gatgtctgcc gctatacccg aggaagatgt attttatgcg 1320
gtagggtttt taagatccgc gggttttgac aattgggagg cttttgatca agaaaacatg 1380
gaaatactga agttttgtga ggatgcta atgggggtta tacaatatct tccttatcat 1440
tcatcacaag aaggatgggt tagacatttt ggtccgaggt ggaatatttt cgtagagaga 1500
aaatataaat atgatcccaa aatgatatta tcaccgggac aaaatatatt tcaaaaaata 1560
aactcgagtt ag 1572

<210> 28

<211> 1575

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 28

atgactaata ctctctgttt aagcctcatc accctaataa cgctttttat aagttaacc 60
ccaaccttaa tcaaatcaga tgagggcatt gatgttttct tacccatatc actcaacctt 120

ES 2 392 190 T3

```

acggtcctaa ccgatccctt ctccatctct gccgcttctc acgacttcgg taacataacc 180
gacgaaaatc ccggcgccgt cctctgccct tcctccacca cggaggtggc tcgtctctc 240
cgtttcgcta acggaggatt ctcttacaat aaaggtctca ccagccccgc gtctactttc 300
aaagtggctg ctcgaggcca aggccactcc ctccgtggcc aagcctctgc acccgagggt 360
gtcgtcgtga acatgacgtg tctcgccatg gcggctaaac cagcggcggg tgttatctcg 420
gcagacggga cttacgctga cgtggctgcc gggacgatgt ggggtgatgt tctgaaggcg 480
gcggtgata gaggcgtctc gccggttaca tggacggatt atttgtatct cagcgtcggc 540
gggacgttgt cgaacgctgg aatcgggtgg cagacgttta gacacggccc tcagattagt 600
aacgttcgat agcttgacgt tattaccgga aaaggtgaaa tgatgacttg ctctccaaag 660
ttaaacctg aattgttcta tggagtttta ggaggtttgg gtcaattcgg tattataacg 720
agggccagga ttgcttggga tcatgcaccc acaaggggta aatggtctcg catactctac 780
agtgacttct cggcttttaa aagagaccaa gagcgtttaa tatcaatgac caatgatctc 840
ggagttgact ttttgaagg tcaacttatg atgtcaaatg gcttcgtaga cacctcttct 900
ttcccactct ccgatcaaac aagagtcgca tctcttgtga atgaccaccg gatcatctat 960
gttctcgaag tagccaagta ttatgacaga accacccttc ccattattga ccaggtgatt 1020
gacacgttaa gtagaactct aggtttcgct ccagggttta tgttcgtaga agatgttccg 1080
tatttcgatt tcttgaaccg tgtccgaaac gaagaagata aactcagatc tttaggacta 1140
tggaagttc ctcatccatg gcttaacatc tttgtcccgg ggtctcgaat ccaagatttt 1200
catgatggtg ttattaatgg ctttcttcta aaccaaact caacttctgg tgttactctc 1260
ttctatccca caaacgaaa caaatggaac aaccgatgt caacgatgac accggacgaa 1320
gatgtttttt atgtgatcgg attactgcaa tcagctggtg gatctcaaaa ttggcaagaa 1380
cttgaaaatc tcaacgacaa ggttattcag ttttgtgaaa actcgggaat taagattaag 1440
gaatatttga tgcactatac aagaaaagaa gattgggtta aacattttgg accaaaatgg 1500
gatgattttt taagaaagaa aattatggtt gatcccaaaa gactattgtc tccaggacaa 1560
gacatattta attaa 1575

```

<210> 29

<211> 1611

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 29

ES 2 392 190 T3

atgacgtcaa gctttcttct cctgacgttc gccatatgta aactgatcat agccgtgggt 60
ctaaacgtgg gccccagtga gctcctccgc atcggagcca tagatgtcga cggccacttc 120
accgtccacc cttccgactt agcctccgtc tcctcagact tcggtatgct gaagtcacct 180
gaagagccat tggccgtgct tcatccatca tcggccgaag acgtggcacg actcgtcaga 240
acagcttacg gttcagccac ggcgtttccg gtctcagccc gaggccacgg ccattccata 300
aacggacaag ccgcggcggg gaggaacggt gtggtggttg aatgaacca cggcgtaacc 360

gggacgcca agccactcgt ccgaccgat gaaatgtatg tggatgtatg gggaggagag 420
ttatgggtcg atgtgtttaa gaaaacgttg gagcatggct tagcaccaa atcatggacg 480
gattacttgt atctaaccgt tggaggta ca ctctccaatg caggaatcag tggtaagct 540
ttcaccatg gtctcaaat tagtaacgtc cttgagctcg acgttgtaac tgggaaagga 600
gaggtgatga gatgctcaga agaagagaac acaaggctat tccatggagt tcttgggtga 660
ttaggtcaat ttgggatcat cactcgagca cgaatctctc tcgaaccagc tcccaaagg 720
gtgagatgga tacgggtatt gtattcgagc ttcaaagtgt ttacggagga ccaagagtac 780
ttaatctcaa tgcattgtca attaaagttt gattacgtgg aaggttttgt gattgtggac 840
gaaggactcg tcaacaattg gagatcttct ttcttctctc cacgtaacc cgtcaagatc 900
tcctctgtta gttccaacgg ctctgttttg tattgccttg agatcaccaa gaactaccac 960
gactccgact ccgaaatcgt tgatcaggaa gttgagattc tgatgaagaa attgaatttc 1020
ataccgacat cggctctttac aacggattta caatatgtgg actttctcga ccgggtacac 1080
aaggccgaat tgaagctccg gtccaagaat ttatgggagg ttccacacc atggctcaac 1140
ctcttcgtgc caaaatcaag aatctctgac ttcgataaag gcgttttcaa gggcattttg 1200
ggaaataaaa caagtggccc tattcttattc taccatga acaaagacaa atgggacgag 1260
aggagctcag ccgtgacgcc ggatgaggaa gttttctatc tgggtggctct attgagatca 1320
gctttaacgg acggtgaaga gacacagaag ctagagtatc tgaaagatca gaaccgtcgg 1380
atcttggagt tctgtgaaca agccaagatc aatgtgaagc agtatcttcc tcaccacgca 1440
acacaggaag agtgggtggc tcattttggg gacaagtggg atcggttcag aagcttaaag 1500
gctgagtttg atccgcgaca catactcgtc actggtcaga gaatctttca aaaccatct 1560
ttgtctttgt ttctccgtc gtcgtcttct tcgtcagcgg cttcatggtg a 1611

<210> 30

<211> 1515

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 30

ES 2 392 190 T3

atgcttatag taagaagttt caccatcttg cttctcagct gcatagcctt taagttggct 60
 tgctgcttct cttagcagcat ttcttctttg aaggcgcttc ccctagtagg ccatttggag 120
 tttgaacatg tccatcacgc ctccaaagat tttggaaatc gataccagtt gatccctttg 180
 gcggtcttac atcccaaatc ggtaagcgac atcgccctca cgatacgaca catctggatg 240
 atgggcactc attcacagct tacagtggca gcgagaggtc gtggacattc actccaaggc 300
 caagctcaaa caagacatgg aattgttata cacatggaat cactccatcc ccagaagctg 360
 caggcttaca gtgtggattc ccctgctcca tatgttgatg tgtctggtgg tgagctgtgg 420
 ataaacattt tgcattgagac cctcaagtac gggcttgac caaaatcatg gacggattac 480
 ctgcatttaa ctgtaggtgg tactctgtcc aatgctggaa taagcggcca ggcattccga 540
 catggaccac agatcagcaa tgttcatcaa ctggagattg tcacaggaaa aggcgagatc 600

 ctaaactgta caaagaggca gaacagcgac ttatttaatg gtgttcttgg tggtttaggt 660
 cagtttggca tcataacgcg ggcaagaata gatttggaa cagcaccaac catggacca 720
 gagcaactaa tatctgcca gggccacaaa ttcgattaca tagaagggtt tgtgataata 780
 aacaggacag gcctcctgaa cagctggagg ttgtctttca ccgcagaaga gcctttagaa 840
 gcaagccaat tcaagtttga tggaggact ctgtattgtc tggagctagc caagtatttg 900
 aagcaagata acaaagacgt aatcaaccag gaagtgaag aaacattatc agagctaagc 960
 tacgtgacgt cgacactgtt tacaacggag gtagcatatg aagcattctt ggacagggt 1020
 catgtgtctg aggtaaaact ccgatcgaaa gggcagtggt aggtgccaca tccatggctg 1080
 aacctcctgg taccaagaag caaaatcaat gaatttgcaa gaggtgtatt tggaaacata 1140
 ctaacggata caagcaacgg cccagtcacg gtctaccag tgaacaaatc aaagtgggac 1200
 aatcaaacat cagcagtaac accggaggaa gaggtattct acctggtggc gatcctaaca 1260
 tcggcatctc cagggtcggc aggaaaggat ggagtagaag agatcttgag gcggaacaga 1320
 agaatactgg aattcagtga agaagcagg atagggttga agcagtatct gccacattac 1380
 acgacaagag aagagtggag atcccatttc ggggacaagt ggggagaatt tgtgaggagg 1440
 aaatccagat atgatccatt ggcaattctt gcgcctggcc accgaatttt tcaaaaggca 1500
 gtctcatact catga 1515

<210> 31

<211> 84

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 31

tcagcttcgg gactcgtct tctctatcca acaaaccgga ataaatggga caatcgtatg 60
 tcggcgatga taccagat cgat 84

<210> 32

<211> 28

10 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

ES 2 392 190 T3

<400> 32

Ser Ala Ser Gly Leu Ala Leu Leu Tyr Pro Thr Asn Arg Asn Lys Trp
1 5 10 15
Asp Asn Arg Met Ser Ala Met Ile Pro Glu Ile Asp
20 25

<210> 33

<211> 2814

5 <212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 33

atgaatcgta tgacgtcaag ctttcttctc ctgacgttcg ccatatgtaa actgatcata 60
gccgtggggtc taaacgtggg cccagtgag.ctcctccgca tcggagccat agatgtcgac 120

ES 2 392 190 T3

ggccacttca	ccgtccaccc	ttccgactta	gcctccgtct	cctcagactt	cggtatgctg	180
aagtccacctg	aagagccatt	ggccgtgctt	catccatcat	cggccgaaga	cgtggcacga	240
ctcgtcagaa	cagcttacgg	ttcagccacg	gcgtttccgg	tctcagcccc	aggccacggc	300
cattccataa	acggacaagc	cgcggcgggg	aggaacggtg	tggtggttga	aatgaaccac	360
ggcgtaacccg	ggacgccccaa	gccactcgtc	cgaccggatg	aaatgtatgt	ggatgtatgg	420
ggtggagagt	tatgggtcga	tgtgttgaag	aaaacgttgg	agcatggcct	agcaccaaaa	480
tcatggacgg	attacttcta	tctaaccggt	ggaggtagac	tctccaatgc	aggaatcagt	540
ggtcaagctt	ttcaccatgg	tcctcaaatt	agtaacgtcc	ttgagctcga	cgttgtaact	600
ggttagtatt	aaaacattca	agttcatata	ttttaaattgc	ttttgtctga	agttttacta	660
ataacaagaa	attgatacca	aaaagtaggg	aaaggagagg	tgatgagatg	ctcagaagaa	720
gagaacacaa	ggctattcca	tggagttctt	ggtggattag	gtcaatttgg	gatcatcact	780
cgagcacgaa	tctctctcga	accagctccc	caaagggtaa	tatTTTTTTA	atgactagct	840
atcaaaaatc	cctggcgggt	ccatacgttg	taatcttttt	agtttttact	gttgatggta	900
TTTTTatat	atTTTggata	ataaaaccct	aaaatggtat	attgtgatga	caggtgagat	960
ggatacgggt	attgtattcg	agcttcaaag	tgtttacgga	ggaccaagag	tacttaatct	1020
caatgcatgg	tcaattaaag	tttgattacg	tggaaaggtt	tgtgattgtg	gacgaaggac	1080
tcgtcaacaa	ttggagatct	tctttcttct	ctccacgtaa	ccccgtcaag	atctcctctg	1140
ttagttccaa	cggctctggt	ttgtattgcc	ttgagatcac	caagaactac	cacgactccg	1200
actccgaaat	cgttgatcag	gtcactttca	ttattcactt	agaaaaaagc	gatattttca	1260
TTTTTatat	tgatgaatat	ctggaaggat	ttaacgctat	gcgactattg	ggaaatcatt	1320
atgaaaaaat	atTTtagTTta	tatgattgaa	agtgtctccc	atagtatttt	tgttgtgtcg	1380
actttattat	aacttaaatt	tggaagagga	catgaagaag	aagccagaga	ggatctacag	1440
agatctagct	tttccacctg	aacttaataa	tgcacattta	tataattatt	tttcttcttc	1500
taaagtttag	tttatcacta	gcgaattaat	catggttact	aattaagtag	tggacagggt	1560
catggaccac	tactcacca	aataatgatt	cctctttact	cttaagttta	attttaataa	1620
aaccaactct	actggaatct	taacttatcc	ttggttttgg	taggctttta	tagcaacacg	1680
gttttttaa	ttttctatt	ccagattttg	tatattaaat	gtcgattttt	tttctttttg	1740
tttcaggaag	ttgagattct	gatgaagaaa	ttgaatttca	taccgacatc	ggtctttaca	1800
acggatttac	aatatgtgga	ctttctcgac	cgggtacaca	aggccgaatt	gaagctccgg	1860
tccaagaatt	tatgggaggt	tccacaccca	tggctcaacc	tcttcgtgcc	aaaatcaaga	1920
atctctgact	tcgataaagg	cgttttcaag	ggcattttgg	gaaataaaac	aagtggccct	1980
attcttatct	accccatgaa	caaagacaag	taagtcttga	cattaccatt	gattactact	2040
tctaaatttc	ttctctagaa	aaaagaataa	aacgagtttt	gcattgcatg	catgcaaagt	2100
tacacttgtg	gggattaatt	agtgggtccaa	gaaaaaaagt	ttgtcaaaat	tgaaaaaaac	2160
tagacacgtg	gtacatggga	ttgtccgaaa	aacgttgtcc	acatgtgcat	cgaaccagct	2220

ES 2 392 190 T3

aagattgaca acaacacttc gtcggctcgt atttctcttt ttgttttggtg accaaatccg 2280
atggtccaga ttgggtttat ttgtttttaa gttcctagaa ctcatggtgg gtgggtccca 2340
atcagattct cctagaccaa accgatctca acgaaccctc cgcacatcat tgattattac 2400
attaatatag atattgtcgt tgctgacgtg tcgtaatttg atgttattgt cagatgggac 2460
gagaggagct cagccgtgac gccggatgag gaagttttct atctggtggc tctattgaga 2520
tcagctttaa cggacggtga agagacacag aagctagagt atctgaaaga tcagaaccgt 2580
cggatcttgg agttctgtga acaagccaag atcaatgtga agcagtatct tcctcaccac 2640
gcaacacagg aagagtgggt ggctcatttt ggggacaagt gggatcggtt cagaagctta 2700
aaggctgagt ttgatccgcg acacatactc gctactggtc agagaatctt tcaaaacca 2760
tctttgtctt tgtttcctcc gtcgctcgtc tcttcgtcag cggcttcagt gtga 2814

<210> 34

<211> 1620

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 34

ES 2 392 190 T3

atgaatcgta tgacgtcaag ctttcttctc ctgacgttcg ccatatgtaa actgatcata 60
 gccgtgggtc taaacgtggg ccccagtgag ctctccgca tcggagccat agatgtcgac 120
 ggccacttca cgtccaccc ttccgactta gcctccgtct cctcagactt cggtatgctg 180
 aagtcacctg aagagccatt ggccgtgctt catccatcat cggccgaaga cgtggcacga 240
 ctctgcagaa cagcttacgg ttcagccacg gcgtttccgg tctcagcccg aggccacggc 300
 cattccataa acggacaagc cgcggcgggg aggaacggtg tggtggttga aatgaaccac 360
 ggcgtaaccg ggacgccccaa gccactcgtc cgaccggatg aaatgtatgt ggatgtatgg 420
 ggtggagagt tatgggtcga tgtggtgaag aaaacgttgg agcatggctt agcaccaaaa 480
 tcatggacgg attacttgta tctaaccggt ggaggtacac tctccaatgc aggaatcagt 540
 ggtcaagctt ttcaccatgg tcctcaaatt agtaacgtcc ttgagctcga cgttgtaact 600
 gggaaaggag aggtgatgag atgctcagaa gaagagaaca caaggctatt ccatggagtt 660
 cttggtggat taggtcaatt tgggatcatc actcagcac gaatctctct cgaaccagct 720
 ccccaaaggg tgagatggat acgggtattg tattcgagct tcaaagtgtt tacggaggac 780
 caagagtact taatctcaat gcatggtcaa ttaaagttg attacgtgga aggttttgtg 840
 attgtggacg aaggactcgt caacaattgg agatcttctt tcttctctcc acgtaacccc 900
 gtcaagatct cctctgtag ttccaacggc tctgttttgt attgccttga gatcaccaag 960
 aactaccacg actccgactc cgaaatcggt gatcaggaag ttgagattct gatgaagaaa 1020
 ttgaatttca taccgacatc ggtctttaca acggatttac aatatgtgga ctttctcgac 1080
 cgggtacaca aggccgaatt gaagctccgg tccaagaatt tatgggaggt tccacacca 1140
 tggctcaacc tctctgtgcc aaaatcaaga atctctgact tcgataaagg cgttttcaag 1200
 ggcatttttg gaaataaaac aagtggccct attcttatct accccatgaa caaagacaaa 1260

 tgggacgaga ggagctcagc cgtgacgccg gatgaggaag ttttctatct ggtggctcta 1320
 ttgagatcag cttaacgga cgggtgaagag acacagaagc tagagtatct gaaagatcag 1380
 aaccgtcggg tcttgaggt ctgtgaacaa gccaagatca atgtgaagca gtatcttctc 1440
 caccacgcaa cacaggaaga gtgggtggct cttttgggg acaagtggga tcggttcaga 1500
 agcttaaagg ctgagtttga tccgcgacac atactcgtc ctggtcagag aatctttcaa 1560
 aacctatctt tgtctttggt tcctccgtcg tcgtcttctt cgtcagcggc ttcatggtga 1620

<210> 35

<211> 539

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 35

ES 2 392 190 T3

Met Asn Arg Met Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ile Cys
 1 5 10 15
 Lys Leu Ile Ile Ala Val Gly Leu Asn Val Gly Pro Ser Glu Leu Leu
 20 25 30
 Arg Ile Gly Ala Ile Asp Val Asp Gly His Phe Thr Val His Pro Ser
 35 40 45
 Asp Leu Ala Ser Val Ser Ser Asp Phe Gly Met Leu Lys Ser Pro Glu
 50 55 60
 Glu Pro Leu Ala Val Leu His Pro Ser Ser Ala Glu Asp Val Ala Arg
 65 70 75 80
 Leu Val Arg Thr Ala Tyr Gly Ser Ala Thr Ala Phe Pro Val Ser Ala
 85 90 95
 Arg Gly His Gly His Ser Ile Asn Gly Gln Ala Ala Ala Gly Arg Asn
 100 105 110
 Gly Val Val Val Glu Met Asn His Gly Val Thr Gly Thr Pro Lys Pro
 115 120 125
 Leu Val Arg Pro Asp Glu Met Tyr Val Asp Val Trp Gly Gly Glu Leu
 130 135 140
 Trp Val Asp Val Leu Lys Lys Thr Leu Glu His Gly Leu Ala Pro Lys
 145 150 155 160
 Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn
 165 170 175
 Ala Gly Ile Ser Gly Gln Ala Phe His His Gly Pro Gln Ile Ser Asn
 180 185 190

ES 2 392 190 T3

Val Leu Glu Leu Asp Val Val Thr Gly Lys Gly Glu Val Met Arg Cys
 195 200 205
 Ser Glu Glu Glu Asn Thr Arg Leu Phe His Gly Val Leu Gly Gly Leu
 210 215 220
 Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Ser Leu Glu Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Gln Arg Val Arg Trp Ile Arg Val Leu Tyr Ser Ser Phe Lys Val
 245 250 255
 Phe Thr Glu Asp Gln Glu Tyr Leu Ile Ser Met His Gly Gln Leu Lys
 260 265 270
 Phe Asp Tyr Val Glu Gly Phe Val Ile Val Asp Glu Gly Leu Val Asn
 275 280 285
 Asn Trp Arg Ser Ser Phe Phe Ser Pro Arg Asn Pro Val Lys Ile Ser
 290 295 300
 Ser Val Ser Ser Asn Gly Ser Val Leu Tyr Cys Leu Glu Ile Thr Lys
 305 310 315 320
 Asn Tyr His Asp Ser Asp Ser Glu Ile Val Asp Gln Glu Val Glu Ile
 325 330 335
 Leu Met Lys Lys Leu Asn Phe Ile Pro Thr Ser Val Phe Thr Thr Asp
 340 345 350
 Leu Gln Tyr Val Asp Phe Leu Asp Arg Val His Lys Ala Glu Leu Lys
 355 360 365
 Leu Arg Ser Lys Asn Leu Trp Glu Val Pro His Pro Trp Leu Asn Leu
 370 375 380
 Phe Val Pro Lys Ser Arg Ile Ser Asp Phe Asp Lys Gly Val Phe Lys
 385 390 395 400
 Gly Ile Leu Gly Asn Lys Thr Ser Gly Pro Ile Leu Ile Tyr Pro Met
 405 410 415
 Asn Lys Asp Lys Trp Asp Glu Arg Ser Ser Ala Val Thr Pro Asp Glu
 420 425 430
 Glu Val Phe Tyr Leu Val Ala Leu Leu Arg Ser Ala Leu Thr Asp Gly
 435 440 445
 Glu Glu Thr Gln Lys Leu Glu Tyr Leu Lys Asp Gln Asn Arg Arg Ile
 450 455 460
 Leu Glu Phe Cys Glu Gln Ala Lys Ile Asn Val Lys Gln Tyr Leu Pro

Referencias

WO0105985. Method to modulate the expression of genes inducing the parthenocarpic trait in plants.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (1994). "Molecular Biology of the Cell." Garland Publishing Inc.

- 5 Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucl. Acids Res.* 25, 3389-3402.

Armstrong, D.J. (1994) in *Cytokinins: Chemistry, Activity and Functions*, eds. Mok, D.W.S & Mok, M.C. (CRC Boca Raton, FL), pp. 139-154.

- 10 An, G., Watson, B. D., Stachel, S., Gordon, M. P., and Nester, E. W. (1985). New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.* 4, 277-284.

Armstrong, C. L., Petersen, W. P., Buchholz, W. G., Bowen, B. A., and Sulc, S. L. (1990). Factors affecting PEG-mediated stable transformation of maize protoplasts. *Plant Cell Reports* 9, 335-339.

Banerjee, A., Pramanik, A., Bhattacharjya, S., and Balaram, P. (1996). Omega amino acids in peptide design: incorporation into helices. *Biopolymers* 39, 769-777.

- 15 Baron, M. H. and Baltimore, D. (1982). Antibodies against the chemically synthesized genome-linked protein of poliovirus react with native virus-specific proteins. *Cell* 28, 395-404.

Bartel, P. L. and Fields, S. (1997). "The Yeast Two-Hybrid System." Oxford University Press.

- 20 Benkirane, N., Guichard, G., Briand, J. P., and Muller, S. (1996). Exploration of requirements for peptidomimetic immune recognition. Antigenic and immunogenic properties of reduced peptide bond pseudopeptide analogues of a histone hexapeptide. *J. Biol Chem.* 271, 33218-33224.

Berry, A. and Brenner, S. E. (1994). A prototype computer system for de novo protein design. *Biochem.Soc. Trans.* 22, 1033-1036.

Christou, P., McCabe, D. E., and Swain, W. F. (1988). Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. *Plant Physiol.* 87, 671-674.

- 25 Crossway, A., Oakes, J. V., Irvine, J. M., Ward, B., Knauf, V. C., and Shewmaker, C. K. (1986). Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 202, 179-185.

Dale, E. C. and Ow, D. W. (1990). Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene* 91, 79-85.

Dodds, J. H. (1985). "Plant genetic engineering." Cambridge University Press.

- 30 Doerner, P., Jorgensen, J. E., You, R., Steppuhn, J., and Lamb, C. (1996). Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* 380, 520-523.

Dorner, B., Husar, G. M., Ostresh, J. M., and Houghten, R. A. (1996). The synthesis of peptidomimetic combinatorial libraries through successive amide alkylations. *Bioorg.Med.Chem.* 4, 709-715.

- 35 Ellis, J. G., Llewellyn, D. J., Dennis, E. S., and Peacock, W. J. (1987). Maize Adh-1 promoter sequences control anaerobic regulation: addition of upstream promoter elements from constitutive genes is necessary for expression in tobacco. *EMBO J.* 6, 11-16.

Faiss, M., Zalubilová, J., Strnad, M., Schmölling, T. (1997). Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant J.* 12, 401-415.

- 40 Fassina, G. and Melli, M. (1994). Identification of interactive sites of proteins and protein receptors by computer-assisted searches for complementary peptide sequences. *Immunomethods.* 5, 114-120.

Fedoroff, N. V. and Smith, D. L. (1993). A versatile system for detecting transposition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 3, 273-289.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol* 166, 557-580.

- Hansen, G. and Chilton, M. D. (1996). "Agrolistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated in planta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 14978-14983.
- Hansen, G., Shillito, R. D., and Chilton, M. D. (1997). T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 11726-11730.
- 5 Hanson, B., Engler, D., Moy, Y., Newman, B., Ralston, E., and Gutterson, N. (1999). A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *Plant J.* 19, 727-734.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). "Antibodies: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Herrera-Estrella, L., De Block, M., Messens, E. H. J. P., Van Montagu, M., and Schell, J. (1983). Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2, 987-995.
- 10 Hoffman, D. L., Laiter, S., Singh, R. K., Vaisman, I. I., and Tropsha, A. (1995). Rapid protein structure classification using one-dimensional structure profiles on the bioSCAN parallel computer. *Comput.Appl.Biosci.* 11, 675-679.
- Hooykens, P.J.J., Hall, M.A. & Libbeuga, K.R., eds. (1999) *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones* (Elsevier, Amsterdam).
- Houba-Heria, N., Pethe, C. d'Alayer, J & Lelouc, M. (1999) *Plant J.* 17:615-626.
- 15 Klee, H.J. & Lanehon, M.B. (1995) in *Plant Hormones: Physiology, Biochemisry and Molecular Biology*, ed. Davies, P.J. (Kluwer, Dorddrocht, the Netherlands), pp. 340-353.
- Krens, F. A., Molendijk, L., Wullems, G. J., and Schilperoort, R. A. (1982). In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* 296, 72-74.
- 20 Lerner, R. A. (1982). Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity. *Nature* 299, 593-596. Lerner, R. A., Green, N., Alexander, H., Liu, F. T., Sutcliffe, J. G., and Shinnick, T. M. (1981). Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78, 3403-3407.
- Liddle, J. E. and Cryer, A. (1991). "A Practical Guide to Monoclonal Antibodies." Wiley New York.
- 25 Loffler, J., Langui, D., Probst, A., and Huber, G. (1994). Accumulation of a 50 kDa N-terminal fragment of beta-APP695 in Alzheimer's disease hippocampus and neocortex. *Neurochem.Int.* 24, 281-288.
- Mok M.C. (1994) in *Cytokines: Chemistry, Activity and Function*, eds., Mok, D.W.S. & Mok, M.C. (CRC Boca Raton, FL), pp.155-166.
- Monge, A., Lathrop, E. J., Gunn, J. R., Shenkin, P. S., and Friesner, R. A. (1995). Computer modeling of protein folding: conformational and energetic analysis of reduced and detailed protein models. *J.Mol.Biol* 247, 995-1012.
- 30 Morris, R.O. et al. (1999). Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 328-333
- Motyka, V., Faiss, M., Strnad, M., Kaminek, M. and Schmuelling, T. (1996). Changes in cytokinin content and cytokinin oxidase activity in response to derepression of ipt gene transcription in transgenic tobacco calli and plants. *Plant Physiol.* 112, 1035-1043.
- 35 Murakami, T., Simonds, W. F., and Spiegel, A. M. (1992). Site-specific antibodies directed against G protein beta and gamma subunits: effects on alpha and beta gamma subunit interaction. *Biochemistry* 31, 2905-2911.
- Olszewski, K. A., Kolinski, A., and Skolnick, J. (1996). Folding simulations and computer redesign of protein A threehelix bundle motifs. *Proteins* 25, 286-299.
- 40 Osborne, B. I., Wirtz, U., and Baker, B. (1995). A system for insertional mutagenesis and chromosomal rearrangement using the Ds transposon and Cre-lox. *Plant J.* 7, 687-701.
- Ostresh, J. M., Blondelle, S. E., Dorner, B., and Houghten, R. A. (1996). Generation and use of nonsupport-bound peptide and peptidomimetic combinatorial libraries. *Methods Enzymol.* 267, 220-234.
- Pabo, C. O. and Suchanek, E. G. (1986). Computer-aided model-building strategies for protein design. *Biochemistry* 25, 5987-5991.

- Paszowski, J., Shillito, R. D., Saul, M., Mandak, V., and Hohn, T. H. B. P. I. (1984). Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* 3, 2717-2722.
- Peralta, E. G., Hellmiss, R., and Ream, W. (1986). Overdrive, a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumour-inducing plasmid. *EMBO J.* 5, 1137-1142.
- 5 Quirino, B.F., Noh, Y.-S., Himelbau, E., and Amasino, R.M. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* 5, 278-282.
- Renouf, D. V. and Hounsell, E. F. (1995). Molecular modelling of glycoproteins by homology with non-glycosylated protein domains, computer simulated glycosylation and molecular dynamics. *Adv.Exp.Med.Biol* 376, 37-45.
- Rinaldi, A.C. and Comandini, O. (1999). Cytokinin oxidase strikes again. *Trends in Plant Sc.* 4, 300.
- 10 Rose, R. B., Craik, C. S., Douglas, N. L., and Stroud, R. M. (1996). Three-dimensional structures of HIV-1 and SIV protease product complexes. *Biochemistry* 35, 12933-12944.
- Rutenber, E. E., McPhee, F., Kaplan, A. P., Gallion, S. L., Hogan, J. C., Jr., Craik, C. S., and Stroud, R. M. (1996). A new class of HIV-1 protease inhibitor: the crystallographic structure, inhibition and chemical synthesis of an aminimide peptide isostere. *Bioorg.Med.Chem.* 4, 1545-1558.
- 15 Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schlappi, M., Smith, D., and Fedoroff, N. (1993). TnpA trans-activates methylated maize Suppressor-mutator transposable elements in transgenic tobacco. *Genetics* 133, 1009-1021.
- 20 Shioda, T., Andriole, S., Yahata, T., and Isselbacher, K. J. (2000). A green fluorescent protein-reporter mammalian two-hybrid system with extracromosomal maintenance of a prey expression plasmid: Application to interaction screening. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 5220-5224.
- Smulling, T., Rupp, H.M. Frank, M&Schafer, S.. (1999) in *Advances in Regulation of Plant Growth and Development*, eds. Surnad, M. Pac P. & Beck, E. (Peres, Prague), pp. 85-96.
- 25 Tamura, R. N., Cooper, H. M., Collo, G., and Quaranta, V. (1991). Cell type-specific integrin variants with alternative alpha chain cytoplasmic domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 10183-10187.
- Werner, T., Vadau Motyka, Miroslav Strnad, and Thomas Schmülling (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 58 (18) 10487-10492.
- Van Haaren, M. J., Sedee, N. J., Schilperoort, R. A., and Hooykaas, P. J. (1987). Overdrive is a T-region transfer enhancer which stimulates T-strand production in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucleic Acids Res.* 15, 8983-8997.
- 30 Van Sluys, M. A., Tempe, J., and Fedoroff, N. (1987). Studies on the introduction and mobility of the maize Activator element in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota*. *EMBO J.* 6, 3881-3889.
- Wang, K., Genetello, C., Van Montagu, M., and Zambryski, P. C. (1987). Sequence context of the T-DNA border repeat element determines its relative activity during T-DNA transfer to plant cells. *Mol. Gen. Genet.* 210, 338-346.
- 35 Woulfe, J., Lafortune, L., de Nadai, F., Kitabgi, P., and Beaudet, A. (1994). Post-translational processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in the central nervous system of the rat-II. Immunohistochemical localization of maturation products. *Neuroscience* 60, 167-181.
- Zhang, Y. L., Dawe, A. L., Jiang, Y., Becker, J. M., and Naider, F. (1996). A superactive peptidomimetic analog of a farnesylated dodecapeptide yeast pheromone. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 224, 327-331.

REIVINDICACIONES

1. Un método para incrementar el tamaño o peso de las semillas que comprende incrementar el nivel o actividad de una citoquinina oxidasa en las semillas en una planta.
- 5 2. Un método para incrementar el tamaño o peso de los embriones que comprende incrementar el nivel o actividad de una citoquinina oxidasa en semillas en una planta, preferiblemente en embriones.
3. Un método para incrementar el tamaño de los cotiledones que comprende incrementar el nivel o actividad de una citoquinina oxidasa en cotiledones en una planta.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 para incrementar el tamaño o peso de una semilla que comprende la expresión de un ácido nucleico seleccionado del grupo consistente de:
 - 10 (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 26, 3, 1, 7, 11, 25, 28, 30, 29, 5, 9, 27, 31, 33 o 34,
 - (b) un ácido nucleico que comprende las secuencias de ARN correspondientes a cualquiera de SEQ ID NOs: 26, 3, 1, 7, 11, 25, 28, 30, 29, 5, 9, 27, 31, 33 o 34,
 - 15 (c) un ácido nucleico que hibrida específicamente al complemento de un ácido nucleico tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 26, 3, 1, 7, 11, 25, 28, 30, 29, 5, 9, 27, 31, 33 o 34,
 - (d) un ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos que comprende el polipéptido como se da en SEQ ID NO: 32 y el cual es al menos 70% similar a la secuencia de aminoácidos tal como se da en SEQ ID NO: 4,
 - 20 (e) un ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos la cual es al menos 47% similar a la secuencia de aminoácidos tal como se da en SEQ ID NO: 6,
 - (f) un ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos la cual es al menos 47% similar a la secuencia de aminoácidos tal como se da en SEQ ID NO: 10 o 35,
 - (g) un ácido nucleico que codifica una proteína que comprende o consiste de la secuencia de aminoácidos tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 4, 2, 6, 8, 10, 12, 32 o 35,
 - 25 (h) un ácido nucleico el cual es degenerado a un ácido nucleico tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 26, 3, 1, 7, 11, 25, 28, 30, 29, 5, 9, 27, 33 o 34 o el cual es degenerado a un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) a (g) como resultado del código genético,
 - (i) un ácido nucleico el cual es divergente de un ácido nucleico que codifica una proteína tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 4, 2, 6, 8, 10, 12 o 35 o el cual es divergente de un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) a (g) debido a las diferencias en la utilización de codones entre los organismos,
 - 30 (j) un ácido nucleico que codifica una proteína como se da en SEQ ID NOs: 4, 2, 6, 8, 10, 12 o 35, o un ácido nucleico como se define en (a) a (g) el cual es divergente debido a las diferencias entre alelos,
 - (k) un ácido nucleico que codifica un fragmento funcional de una citoquinina oxidasa codificada por un ácido nucleico tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 26, 3, 1, 7, 11, 25, 28, 30, 29, 5, 9, 27, 31, 33 o 34, o un fragmento funcional de un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) a (j), en donde dicho fragmento tiene la actividad biológica de una citoquinina oxidasa,
 - 35 (l) un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) a (k) **caracterizado porque dicho ácido nucleico es** ADn, ADNc, ADN genómico o ADN sintético, o ARN donde T es reemplazado por U.
- 40 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 para incrementar el tamaño o peso de un embrión el cual comprende la expresión de un ácido nucleico seleccionado del grupo consistente de.
 - (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 26, 3, 1, 7, 11, 25, 28, 30, 29, 5, 9, 27, 31, 33 o 34,
 - (b) un ácido nucleico que comprende las secuencias de ARN correspondientes a cualquiera de SEQ ID NOs: 26, 3, 1, 7, 11, 25, 28, 30, 29, 5, 9, 27, 31, 33 o 34,
 - 45 (c) un ácido nucleico que hibrida específicamente al complemento de un ácido nucleico tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 26, 3, 1, 7, 11, 25, 28, 30, 29, 5, 9, 27, 31, 33 o 34,

- (d) un ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos que comprende el polipéptido como se da en SEQ ID NO: 32 y el cual es al menos 70% similar a la secuencia de aminoácidos tal como se da en SEQ ID NO: 4,
- 5 (e) un ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos la cual es al menos 47% similar a la secuencia de aminoácidos tal como se da en SEQ ID NO: 6,
- (f) un ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos la cual es al menos 47% similar a la secuencia de aminoácidos tal como se da en SEQ ID NO: 10 o 35,
- (g) un ácido nucleico que codifica una proteína que comprende o consiste de la secuencia de aminoácidos tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 4, 2, 6, 8, 10, 12, 32 o 35,
- 10 (h) un ácido nucleico el cual es degenerado a un ácido nucleico tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 26, 3, 1, 7, 11, 25, 28, 30, 29, 5, 9, 27, 33 o 34 o el cual es degenerado a un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) a (g) como resultado del código genético,
- (i) un ácido nucleico el cual es divergente de un ácido nucleico que codifica una proteína tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 4, 2, 6, 8, 10, 12 o 35 o el cual es divergente de un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) a (g) debido a las diferencias en la utilización de codones entre los organismos,
- 15 (j) un ácido nucleico que codifica una proteína como se da en SEQ ID NOs: 4, 2, 6, 8, 10, 12 o 35, o un ácido nucleico como se define en (a) a (g) el cual es divergente debido a las diferencias entre alelos,
- (k) un ácido nucleico que codifica un fragmento funcional de una citoquinina oxidasa codificada por un ácido nucleico tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 26, 3, 1, 7, 11, 25, 28, 30, 29, 5, 9, 27, 31, 33 o 34, o un fragmento funcional de un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) a (j), en donde dicho fragmento tiene la actividad biológica de una citoquinina oxidasa,
- 20 (l) un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) a (k) caracterizado porque dicho ácido nucleico es ADN, ADNc, ADN genómico o ADN sintético, o ARN donde T es reemplazado por U.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 3 para incrementar el tamaño de un cotiledón el cual comprende la expresión de un ácido nucleico seleccionado de acuerdo con el grupo consistente de:
- 25 (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 26, 3, 1, 7, 11, 25, 28, 30, 29, 5, 9, 27, 31, 33 o 34,
- (b) un ácido nucleico que comprende las secuencias de ARN correspondientes a cualquiera de SEQ ID NOs: 26, 3, 1, 7, 11, 25, 28, 30, 29, 5, 9, 27, 31, 33 o 34,
- 30 (c) un ácido nucleico que hibrida específicamente al complemento de un ácido nucleico tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 26, 3, 1, 7, 11, 25, 28, 30, 29, 5, 9, 27, 31, 33 o 34,
- (d) un ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos que comprende el polipéptido como se da en SEQ ID NO: 32 y el cual es al menos 70% similar a la secuencia de aminoácidos tal como se da en SEQ ID NO: 4,
- 35 (e) un ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos la cual es al menos 47% similar a la secuencia de aminoácidos tal como se da en SEQ ID NO: 6,
- (f) un ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos la cual es al menos 47% similar a la secuencia de aminoácidos tal como se da en SEQ ID NO: 10 o 35,
- 40 (g) un ácido nucleico que codifica una proteína que comprende o consiste de la secuencia de aminoácidos tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 4, 2, 6, 8, 10, 12, 32 o 35,
- (h) un ácido nucleico el cual es degenerado a un ácido nucleico tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 26, 3, 1, 7, 11, 25, 28, 30, 29, 5, 9, 27, 33 o 34 o el cual es degenerado a un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) a (g) como resultado del código genético,
- 45 (i) un ácido nucleico el cual es divergente de un ácido nucleico que codifica una proteína tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 4, 2, 6, 8, 10, 12 o 35 o el cual es divergente de un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) a (g) debido a las diferencias en la utilización de codones entre los organismos,

- (j) un ácido nucleico que codifica una proteína como se da en SEQ ID NOs: 4, 2, 6, 8, 10, 12 o 35, o un ácido nucleico como se define en (a) a (g) el cual es divergente debido a las diferencias entre alelos,
- (k) un ácido nucleico que codifica un fragmento funcional de una citoquinina oxidasa codificada por un ácido nucleico tal como se da en cualquiera de SEQ ID NOs: 26, 3, 1, 7, 11, 25, 28, 30, 29, 5, 9, 27, 31, 33 o 34, o un fragmento funcional de un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) a (j), en donde dicho fragmento tiene la actividad biológica de una citoquinina oxidasa,
- 5 (l) un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de (a) a (k) caracterizado porque dicho ácido nucleico es ADn, ADNc, ADN genómico o ADN sintético, o ARN donde T es reemplazado por U.
- 10 7. El método de la reivindicación 4 en donde el ácido nucleico está bajo control de un promotor que controla la expresión preferencialmente en semillas.
8. El método de la reivindicación 5 en donde el ácido nucleico está bajo el control de un promotor que controla la expresión preferencialmente en embriones.
9. El método de la reivindicación 6 en donde el ácido nucleico está bajo el control de un promotor que controla la expresión preferencialmente en cotiledones.
- 15 10. El método de la reivindicación 7 en donde el promotor es específico adicionalmente al endosperma o aleurona.
11. El método de la reivindicación 4 donde dicho método lleva a un incremento en crecimiento de plántones o un incremento en el vigor temprano.
12. El método de la reivindicación 5 en donde dicho método lleva a un incremento en el crecimiento de los plántones o a un incremento en el vigor temprano.
- 20 13. El método de la reivindicación 6 en donde dicho método lleva a un incremento en crecimiento de plántones o un incremento en el vigor temprano.
14. El método de la reivindicación 11 en donde el incremento en el crecimiento de los plántones o el vigor temprano está asociado con una tolerancia incrementada al estrés.
- 25 15. El método de la reivindicación 12 en donde el incremento en crecimiento de los plántones o el vigor temprano está asociado con el incremento en la tolerancia al estrés.
16. El método de la reivindicación 13 en donde el incremento en crecimiento de los plántones o el vigor temprano está asociado con un incremento en la tolerancia al estrés.
- 30 17. El método de acuerdo con la reivindicación 4, el cual comprende la expresión en una planta de un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 5, 25, o 27 o un ortólogo de dicho ácido nucleico, en donde dicho ortólogo es específico para la especie de la planta.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 5, el cual comprende la expresión en una planta de un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de SEC ID NOs: 1, 5, 25, o 27 o un ortólogo de dicho ácido nucleico, en donde dicho ortólogo es específico para la especie de la planta.
- 35 19. El método de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende la expresión en una planta de un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de SEC ID NOs: 1, 5, 25, o 27 o un ortólogo de dicho ácido nucleico, en donde dicho ortólogo es específico para la especie de la planta.
20. El método de la reivindicación 17 en donde el ácido nucleico está bajo control de un promotor que controla la expresión preferencialmente en semillas.
- 40 21. El método de la reivindicación 18 en donde el ácido nucleico está bajo el control de un promotor que controla la expresión preferencialmente en embriones.
22. El método de la reivindicación 19 donde el ácido nucleico está bajo el control de un promotor que controla la expresión preferiblemente en cotiledones.
23. El método de la reivindicación 20 en donde el promotor es específico adicionalmente al endosperma o aleurona.
- 45 24. El método de la reivindicación 17 en donde dicho método lleva a un incremento en el crecimiento de plántones o un incremento en el vigor temprano.

25. El método de la reivindicación 18 en donde dicho método lleva a un incremento en el crecimiento de plantones o a un incremento en el vigor temprano.
26. El método de la reivindicación 19 donde dicho método lleva a un incremento en el crecimiento de plantones o a un incremento en el vigor temprano.
- 5 27. El método de la reivindicación 24 en donde el incremento en el crecimiento de los plantones o el vigor temprano está asociado con tolerancia incrementada al estrés.
28. El método de la reivindicación 25 en donde el incremento en crecimiento de plantones o vigor temprano está asociado con tolerancia incrementada al estrés.
- 10 29. El método de la reivindicación 26 donde el incremento en el crecimiento de plantones o el vigor temprano está asociado con tolerancia incrementada al estrés.

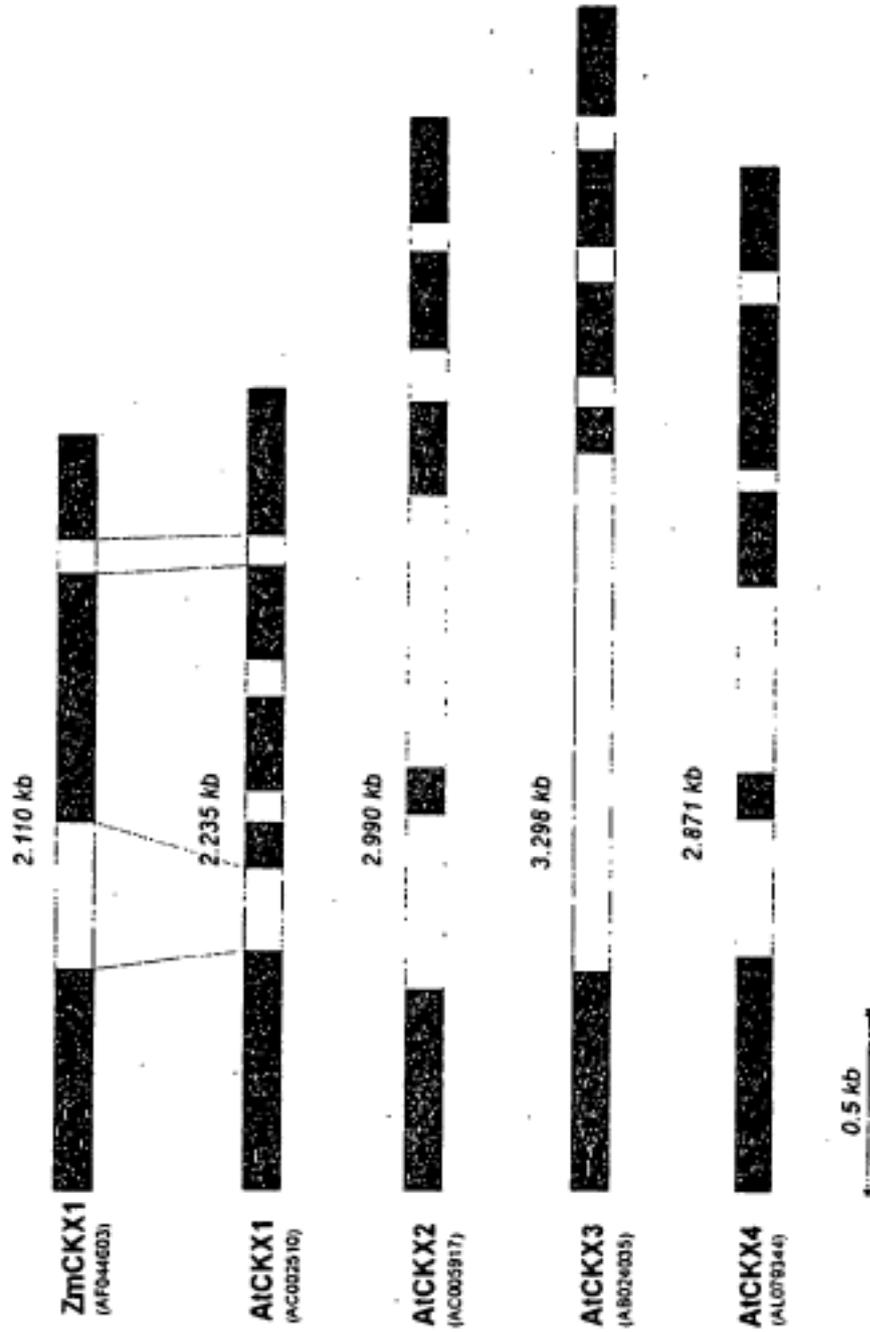


Figura 1

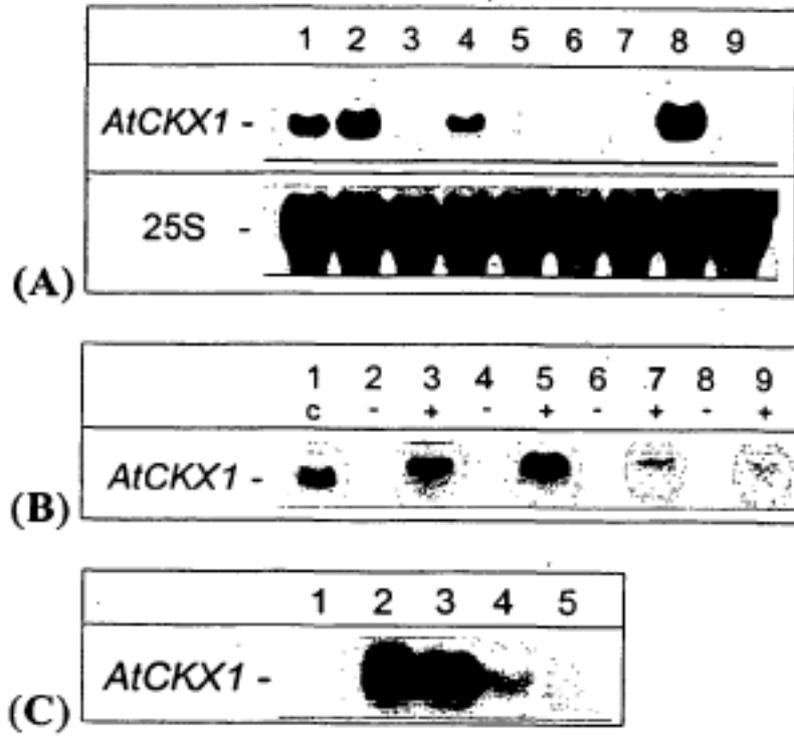


Figura 3

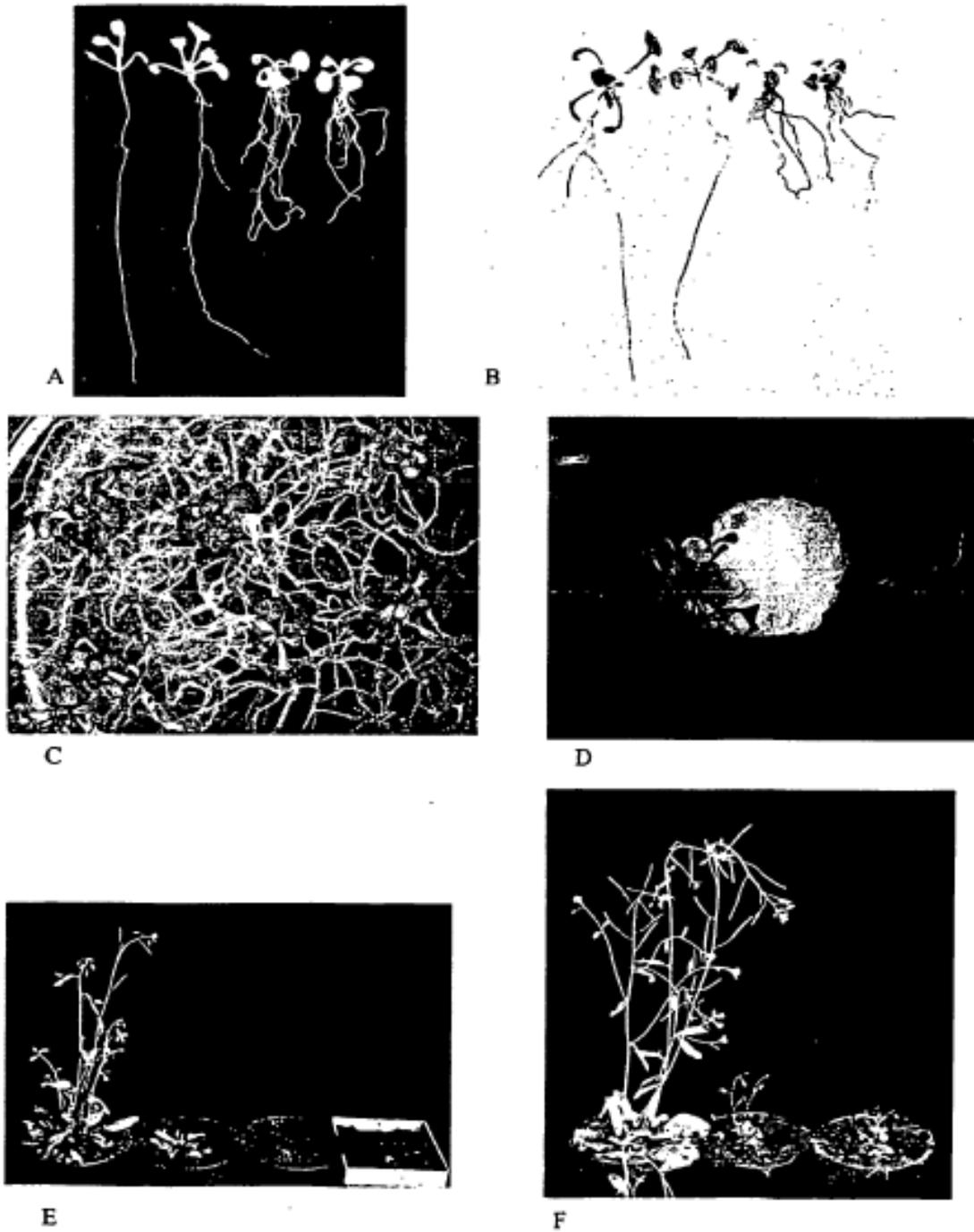


Figura 4

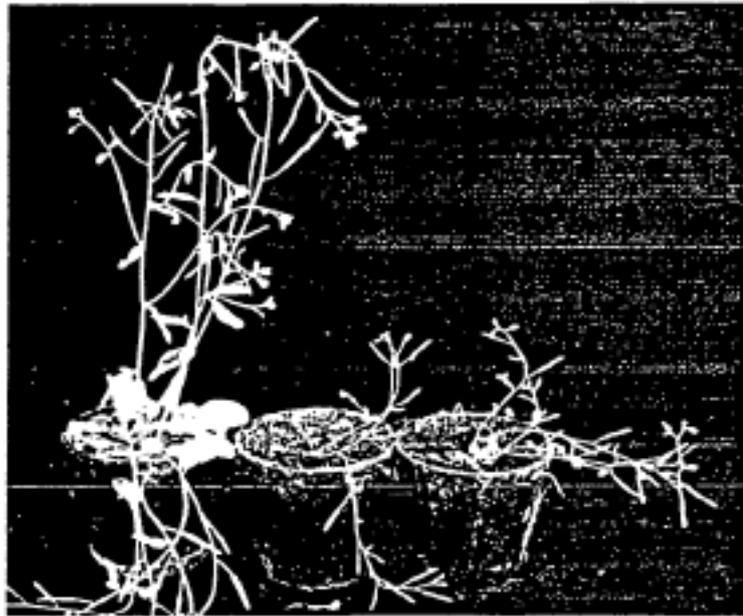


Figura 5

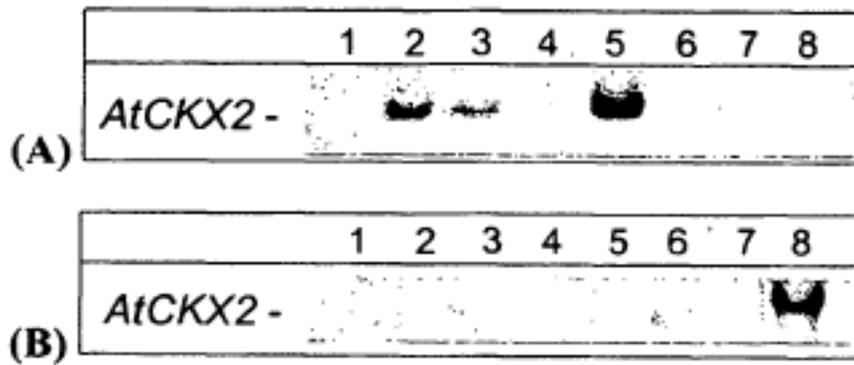


Figura 6

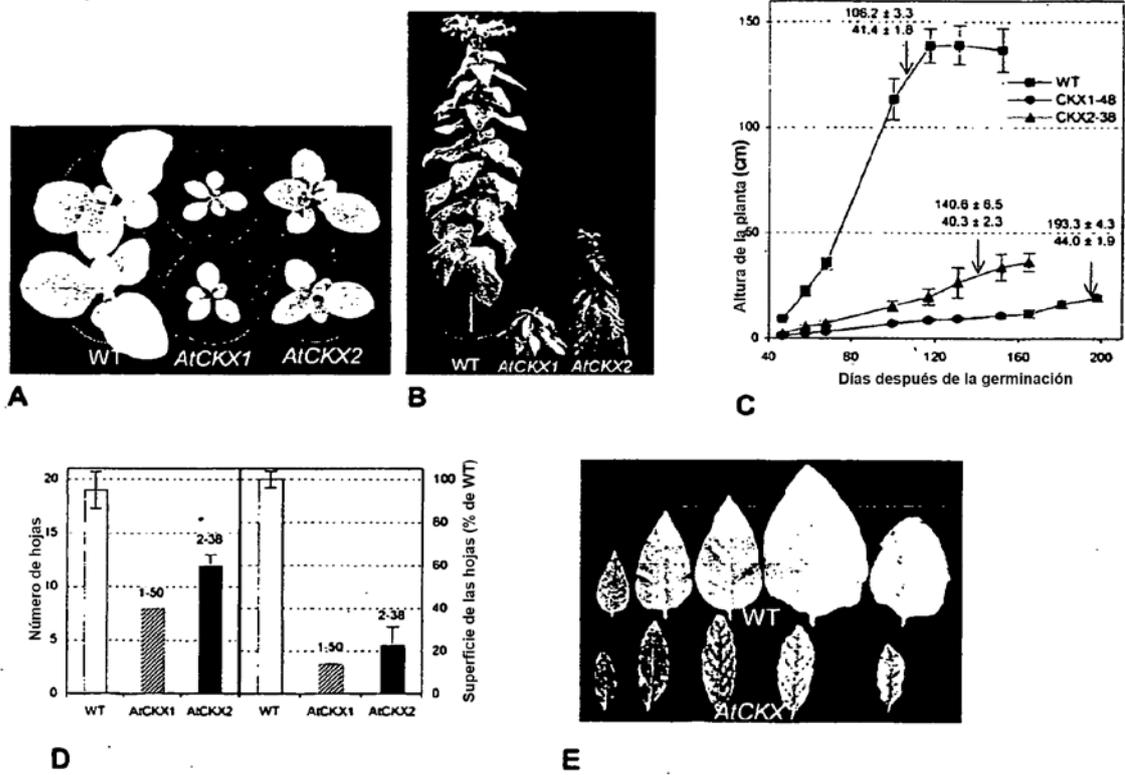


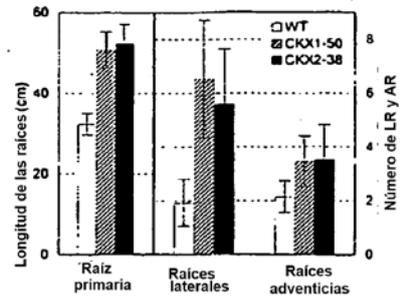
Figura 7



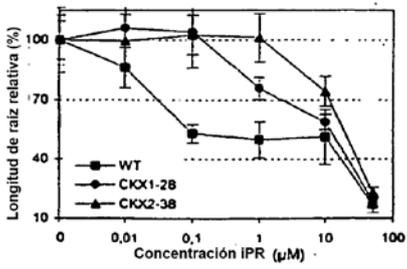
A



B



C



D

Figura 8



Figura 9

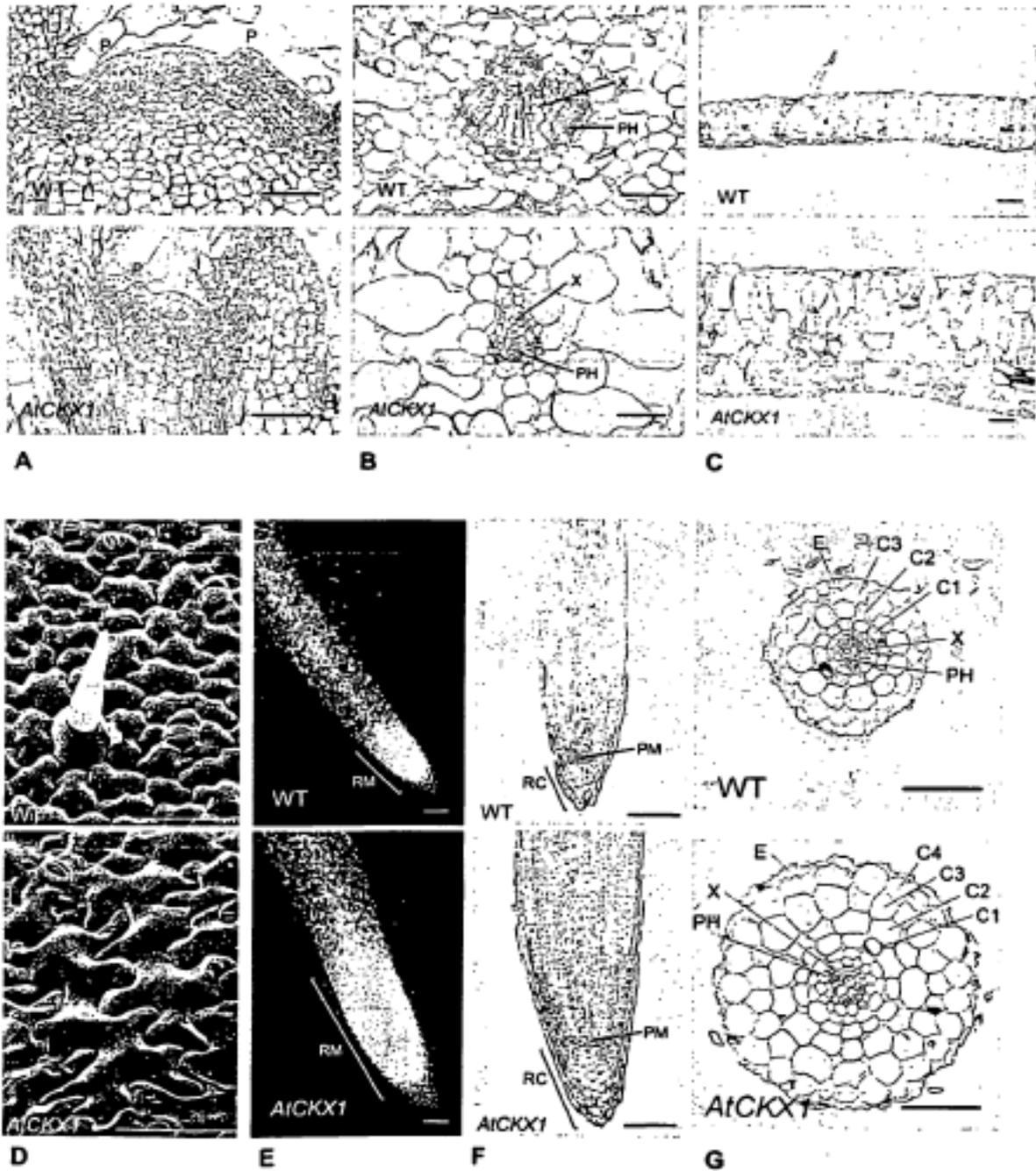


Figura 10

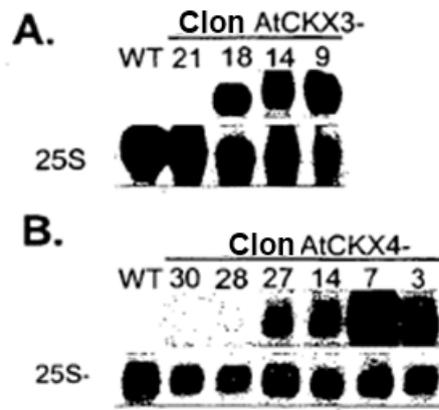


Figura 11

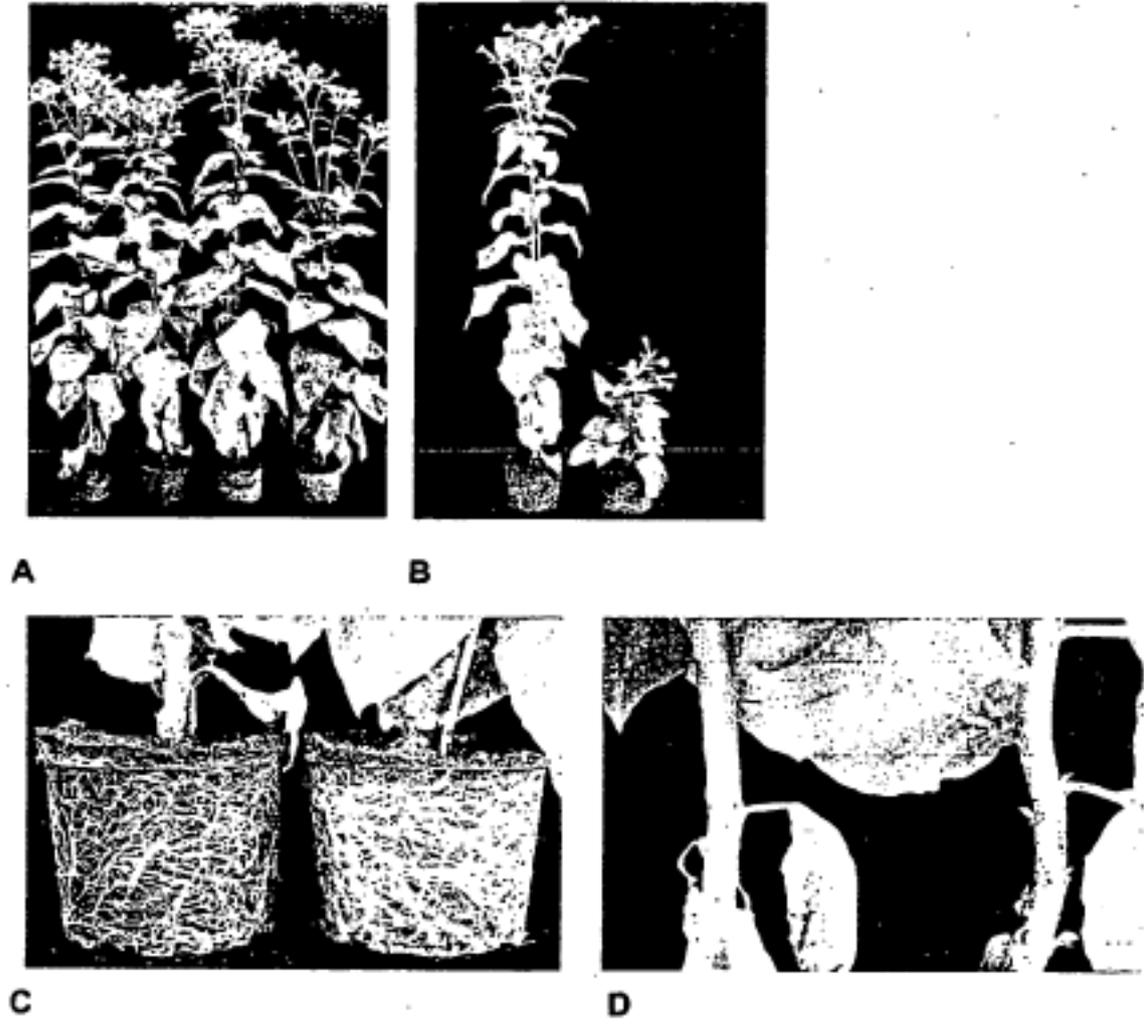


Figura 12

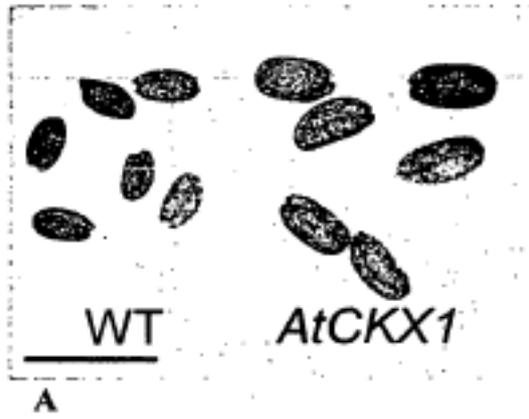


Figura 13A



Figura 13B

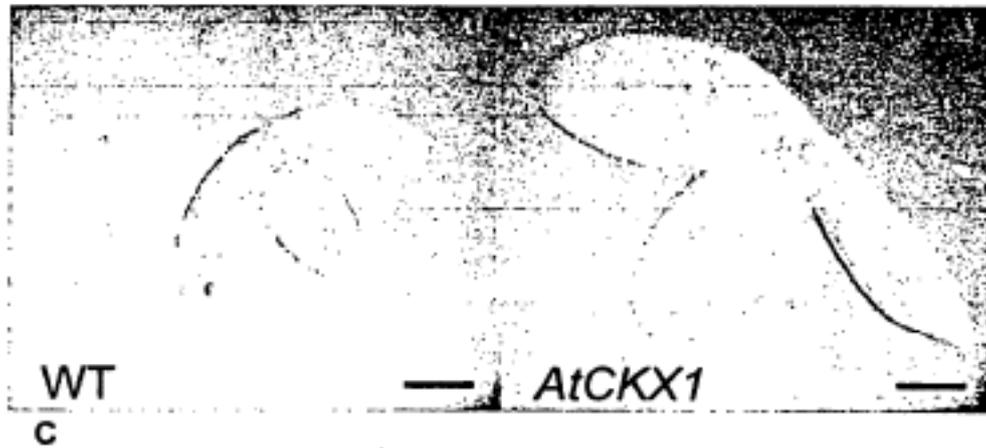


Figura 13C

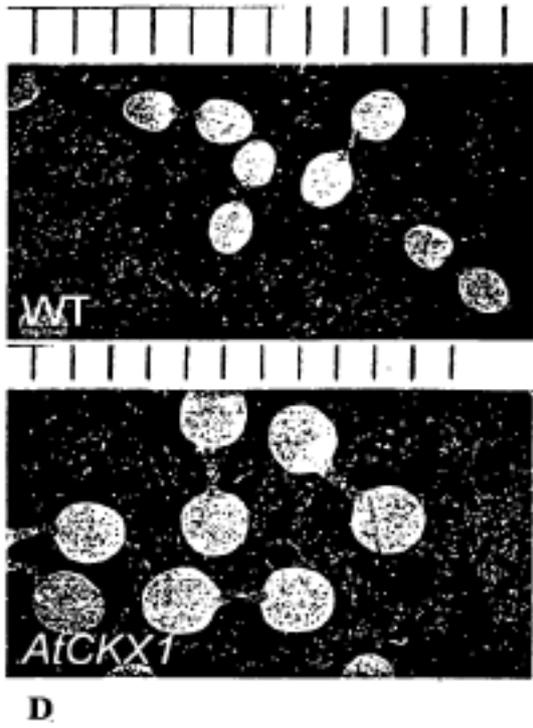


Figura 13D

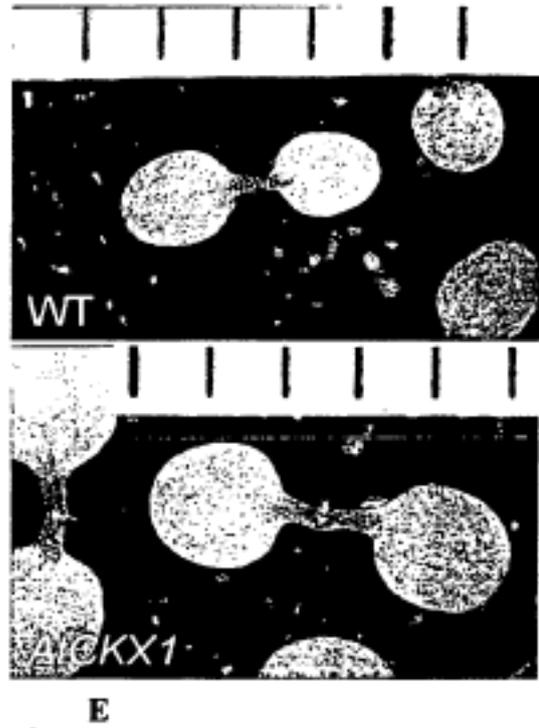


Figura 13E

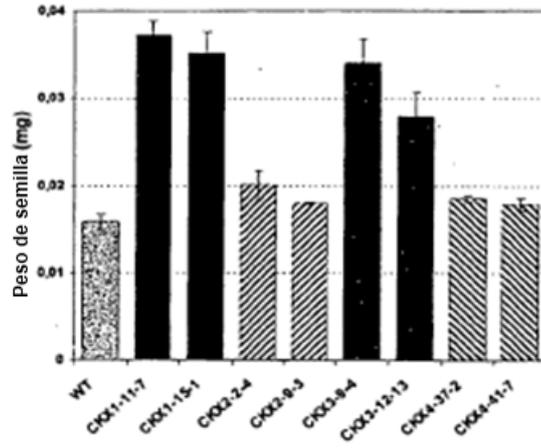


Figura 14