

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 414 054**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2001** **E 01993617 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013** **EP 1334121**

54 Título: **Un gen que regula el desarrollo de una planta y sus usos**

30 Prioridad:

13.11.2000 EP 00870271
30.11.2000 US 250402 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2013

73 Titular/es:

UNIVERSITEIT UTRECHT (100.0%)
HEIDELBERGLAAN 8
3584 CS UTRECHT, NL

72 Inventor/es:

SCHERES, BEN J. G.;
BLILOU, IKRAM y
FOLMER, SASKIA D. H.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 414 054 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

Un gen que regula el desarrollo de una planta y sus usos

Campo de la invención

- 5 La presente invención se sitúa en el campo del desarrollo de plantas. Más específicamente se hace referencia a un gen aislado y caracterizado requerido para el desarrollo correcto de una planta así como también con mutantes del mismo y con el uso de dichos genes mutantes o del tipo natural para modificar el desarrollo de la planta. Dichos genes se pueden utilizar adicionalmente para imitar o modificar los efectos relacionados con auxina.

Antecedentes de la invención

- 10 En años recientes se ha caracterizado un gran número de genes que están implicados en diferentes aspectos de desarrollo de la planta y/o en el establecimiento de patrones celulares que subyacen de los diferentes tejidos de planta y órganos. La identificación de dichos genes se basa usualmente en el aislamiento de plantas *Arabidopsis thaliana* mutagenizadas que exhiben aberraciones fenotípicas extremas o menos extremas en órganos tal como flores, hojas o raíces o que exhiben defectos más tempranos, por ejemplo durante el desarrollo del embrión. Sin ser exhaustivo, los genes implicados en el establecimiento temprano de meristema de flor y la identidad de órgano
- 15 incluyen *LEAFY* (*LFY*), *APETALA1* (*AP1*) y *APETALA2* (*AP2*). Los genes implicados en las últimas etapas de patrón de identidad de órgano de flor incluyen *APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*) y *AGAMOUS* (*AG*). Los genes que controlan el número de órganos de flor incluyen *CLAVATA1* (*CLV1*), *CLAVATA3* (*CLV3*), *ETTIN* (*ETT*), *PERIANTH* (*PAN*) y *TOUSLED* (*TSL*). *TOUSLED* también regula el tamaño de órgano de flor. El meristema de flor e identificación de órgano se basa adicionalmente en el gen de *INUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*) y el tiempo de
- 20 florecimiento está regulado mediante por ejemplo los genes *CONSTANS* (*CO*) y *LUMINIDEPENDENS* (*LD*). El meristema de inflorescencia se puede mantener en un estado indeterminado mediante por ejemplo el gen de *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL*). Muchos de los genes que desarrollan flor mencionados codifican los factores de transcripción de por ejemplo la clase secuencia *MADS* (por ejemplo *AG*), la clase *ARF* (por ejemplo *ETT*); o las proteínas quinasas del receptor tipo repetición rico en leucina (por ejemplo *CLV1* y *CLV2*); o las proteínas quinasas
- 25 (por ejemplo *TSL*) (Nemhauser et al. 1998, Sessions et al. 1997 y referencias citadas en ambos; Aukerman et al. 1999, Pnueli et al. 1998). Se forma inflorescencia con forma de pin, sin envoltura en plantas *A. thaliana* mutadas en el gen *PIN-FORMED1* (*PIN1*) (Palme and Gälweiler 1999).

- El desarrollo del meristema apical de brote (que es la fuente de hoja y primordia de flor) que se basa en por ejemplo *WUSCHEL* (*WUS*) mientras que su mantenimiento depende de por ejemplo el gen de factor de transcripción homeosecuencia similar a *KNOTTED SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) y, durante el desarrollo embrionario, en el gen *ZWILLE* (*ZLL*). El tamaño de meristema se regula en el desarrollo temprano mediante por ejemplo el gen *PRIMORDIA TIMING* (*PT*) y en etapas posteriores mediante por ejemplo *CLV1*. El índice de formación de hoja se
- 30 aumenta en mutantes clavata. La separación de órganos que emanan del meristema apical de brote y la separación de órganos entre sí se basa en por lo menos los genes *CUP-SHAPED COTYLEDON* (*CUC1* y *CUC2*) y en *AINTEGUMENTA* (*ANT*). El inicio de formación de órgano lateral del meristema apical de brote requiere los genes *MGOUN* (*MGO*). El desarrollo de hoja se controla por un número de genes que incluyen *ARGONAUTE1* (*AGO1*), *PHABULOSA* (*PHB*) y *PHANTASTICA* (*PHAN*). La formación de Tricoma de células epidérmicas de hoja implica por ejemplo genes *GLABROUS1* (*GL1*), *GLABRA2* (*GL2*), *TRANSPARENT TESTA GLABRA* (*TTG*), *TRIPTYCHON* (*TRY*) y *ZWICHEL* (*ZWI*). El patrón de estomas se basa por ejemplo en *GL2* y *TTG* (Benfey et al. 1999, Bowman and
- 35 Eshed 2000, Doerner 1999, Langdale 1998, Lenhard and Laux 1999, McSteen and Hake 1998 y referencias citadas en todos).

El destino de las células epidérmicas de raíz está controlado por genes tal como *GL2*, *TTG* y *CAPRICE* (*CPC*). El *GL2* y *TTG* reprime la formación de capilares de raíz mientras que *CPC*, un factor de transcripción tipo *MYB*, es un regulador positivo del destino celular de capilares de raíz.

- 45 El establecimiento de la corteza de raíz y la endodermis de raíz de tejido del suelo involucran los genes *SCARECROW* (*SCR*) que codifican un regulador transcripcional putativo y el *SHORT-ROOT* relacionado (*SHR*). El *SCR* y *SHR* también pueden estabilizar la identidad de célula endodérmica. El gen *MONOPTEROS* (*MP*) se requiere para el inicio de raíz e hipocotilo. Dependiendo de la resistencia del alelo mutante *mp* faltan ya sea la raíz o la raíz y el hipocotilo. (Benfey 1999, Helariutta et al. 2000, Scheres and Berleth 1998 y referencias citadas allí).
- 50 Se muestra que un locus de gen identificado como *HOBBIT* (*HBT*), está implicado en la formación de meristema de raíz (Willemsen et al. 1998). Los alelos mutantes *hbt* fuertes resultan en actividad de meristema de raíz deteriorada. Otros defectos en raíces de plántula mutante *hbt* se unen a la falta de establecimiento de columna e identidades de células de calíptro de raíz lateral. Los fenotipos mutantes *hbt* se pueden rastrear para defectos tempranos en el desarrollo de la región de células hipofisiarias embrionarias. También se ha descrito la formación ectópica de
- 55 primordia de raíz lateral y las raíces laterales en plántula mutante *hbt* (Willemsen et al. 1998). De acuerdo con el

último artículo se describe que la producción de auxina o la percepción de auxina no son defectuosas de manera general en mutantes hbt, sin embargo, la función de gen HBT queda por esclarecer.

- 5 Uno de los problemas que destacan la presente invención es proporcionar el gen HBT aislado y sus funciones junto con aplicaciones particularmente útiles de dicho gen en agricultura, horticultura, y cultivos de tejidos y células de planta. Se logra una solución al proporcionar las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Resumen de la invención

- 10 El desarrollo de planta se caracteriza por el control integrado de división celular y procesos de especificación de identidad celular. El gen Arabidopsis HOBBIT (HBT) parece tener una función en el control del ciclo celular y la especificación del destino celular de los tipos específicos de célula. Esta es la primera vez que se ha demostrado a nivel molecular que un gen de planta conecta la progresión del ciclo celular y la percepción de señales de patrones.

La presente invención se relaciona con un método para aumentar la producción de semilla en una planta o para formar más raíces laterales en una planta, comparado con una planta tipo natural, que comprende la expresión ectópica de la proteína cdc27B de planta en células, dominios, tejidos u órganos de una planta, en donde dicha proteína cdc27B de planta se selecciona del grupo que consiste de:

- 15 (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se da en cualquiera de la SEQ ID NO: 8 o 9,
(b) un polipéptido con una secuencia como se da en cualquiera de la SEQ ID NO: 8 o 9, y
(c) un polipéptido con una secuencia que es por lo menos 90 % o 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos como se da en cualquiera de la SEQ ID NO: 8 o 9.

- 20 La presente invención también se relaciona con una proteína que regula el desarrollo de la planta aislada que comprende uno de los polipéptidos seleccionados del grupo que consiste de:

- (a) un polipéptido con una secuencia como se da en cualquiera de la SEQ ID NO: 8 o 9, y
(b) un polipéptido con una secuencia que es por lo menos 90 % o 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos como se da en cualquiera de la SEQ ID NO: 8 o 9.

- 25 La presente invención se relaciona adicionalmente con un mutante funcionalmente inactivo de la proteína como se definió anteriormente que comprende una secuencia de aminoácidos como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 24 a 30 o se codifica por cualquiera de los ácidos nucleicos como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 10 a 23.

La presente invención también se relaciona con un ácido nucleico aislado que codifica una proteína que regula el desarrollo de la planta o un mutante funcionalmente inactivo del mismo como se definió anteriormente seleccionado del grupo que consiste de:

- 30 (a) un ácido nucleico que consiste de la secuencia de ADN como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 2 a 3 o 10 a 23, o el complemento del mismo,
(b) un ácido nucleico que consiste de las secuencias de ARN que corresponden a cualquiera de las SEQ ID NOs 2 a 3 o 17 a 23, o el complemento del mismo,

- 35 (c) un ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 8, 9, o 24 a 30,

(d) un ácido nucleico que se degenera como resultado del código genético con relación a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 8, 9 o 24 a 30 o con relación a una secuencia de ácidos nucleicos como se define en (a) a (c),

- 40 (e) un ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90 % o 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos como se da en la SEQ ID NO: 8, 9 o 24 a 30, y

(f) un ácido nucleico que diverge debido a las diferencias en el uso de codón entre los organismos con relación a las secuencias de nucleótidos que codifica una proteína como se da en cualquiera de la SEQ ID NO: 8 o 9 o con relación a una secuencia de ácidos nucleicos como se define en (a) a (e).

La presente invención también se relaciona con un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos como se definió anteriormente.

5 La presente invención también se relaciona con un vector como se definió anteriormente que es un vector de expresión en donde dicha secuencia de ácidos nucleicos se vincula funcionalmente a una o más secuencias de control que permiten la expresión en células anfitrionas procarióticas y/o eucarióticas.

La presente invención se relaciona con una célula anfitriona que contiene una molécula de ácido nucleico como se definió anteriormente, o que contiene un vector como se definió anteriormente.

La presente invención se relaciona adicionalmente con una célula anfitriona como se definió anteriormente, en donde dicha célula anfitriona es una célula bacteriana, de insecto, fúngica, de planta o animal.

10 La presente invención se relaciona con un método para producir un polipéptido como se definió anteriormente que comprende cultivar una célula anfitriona como se definió anteriormente bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido y recuperar dicho polipéptido producido del cultivo.

15 La presente invención se relaciona adicionalmente con un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína que regula el desarrollo de la planta o un mutante funcionalmente inactivo de la misma como se definió anteriormente o que reconoce inmunológicamente partes activas o epítomos específicos de la misma.

La presente invención se relaciona con un método para efectuar la expresión de una proteína que regula el desarrollo de la planta como se definió anteriormente que comprende la introducción de un ácido nucleico que codifica un polipéptido como se definió anteriormente directamente en una célula, un tejido o un órgano de una planta.

20 La presente invención también se relaciona con un método para la producción de plantas transgénicas, células de planta o tejidos de planta que comprende la introducción de una molécula de ácido nucleico como se definió anteriormente en un formato que se puede expresar o un vector como se definió anteriormente en dicha planta, célula de planta o tejido de planta.

25 La presente invención se relaciona con un método para efectuar la expresión de una proteína que regula el desarrollo de la planta como se definió anteriormente que comprende la introducción de un ácido nucleico como se definió anteriormente vinculado funcionalmente a una o más secuencias de control o un vector como se definió anteriormente, y en donde dicho ácido nucleico se integra establemente dentro del genoma de una célula de planta.

La presente invención se relaciona con un método como se definió anteriormente que comprende adicionalmente regenerar una planta de dicha célula de planta.

30 La presente invención también se relaciona con una célula de planta transgénica que comprende una secuencia de ácidos nucleicos como se definió anteriormente, que se vincula funcionalmente a elementos reguladores que permiten la transcripción y la expresión de dicho ácido nucleico en células de planta y en donde dicho ácido nucleico se integra establemente dentro del genoma de dicha célula de planta.

35 La presente invención se relaciona con una planta transgénica o tejido de planta que comprende una célula de planta transgénica como se definió anteriormente.

La presente invención también se relaciona con una parte que se puede cosechar o un propágulo de una planta como se definió anteriormente en donde dicha parte que se puede cosechar o dichos propágulos comprenden una célula de planta transgénica como se definió anteriormente.

40 La presente invención también se relaciona con una parte que se puede cosechar como se definió anteriormente que se selecciona del grupo que consiste de semillas, hojas, frutos, cultivos de tallo, rizomas, tubérculos y bulbos.

La presente invención también se relaciona con la progenie derivada de una planta o partes de planta o propágulos como se definió anteriormente, que comprende un ácido nucleico como se definió anteriormente.

Fenotipos del mutante hbt

45 Antes que fuera revelada la identidad y la función del gen HOBBIT, los fenotipos de las plántulas mutantes hobbit de Arabidopsis fueron descritos por Willemsen et al. 1998. Las características embrionarias y post-embrionarias del fenotipo hbt se pueden subdividir en dos clases, una relacionada con la división celular y una relacionada con el destino celular. Post-embrionariamente, el gen HBT se requiere para actividad meristemática tanto de meristemas de

raíz como de brote. Esta necesidad se extiende a la formación de raíces laterales y adventicias y raíces regeneradas de tejido de callo. La progenie de la célula hipofisiaria (el centro inactivo y la columnela) junto con el capilar de raíz natural e inicial adyacente muestra defectos más allá de divisiones alteradas. Post-embriónicamente estos muestran defectos de diferenciación, tal como la ausencia de respuesta a la gravedad que media los gránulos de almidón en la columnela de los alelos hbt fuertes.

Las características fenotípicas generales de plántulas *A. thaliana* del mutante hbt son una apariencia 'gruesa', con cotiledóneas e hipocotiledóneas presentes aunque retrasa el crecimiento y reduce severamente el sistema de raíz (Figura 1).

En la presente invención, dichas plántulas mutantes hbt se caracterizan adicionalmente (ejemplo 1 y 2) y el gen HBT se aísla (ejemplo 8) y sus funciones se caracterizan.

En las raíces, se sabe que el marcador calíptro de raíz de columnela específica de región 35S::B2 se expresa mucho menos y el marcador calíptro de raíz lateral LRC244 no se expresa en el alelo hbt2311 fuerte (figura 2). Esto demuestra que la actividad del gen HBT se requiere para la especificación del destino celular en las puntas distales de raíz.

Adicionalmente, en células de no raíz de mutantes hbt, los inventores encuentran de forma sorprendente la expresión del marcador específico de raíz (figura 3). Como plántulas de *A. thaliana* del mutante hbt exhiben la expresión ectópica del marcador específico calíptro de raíz 35S::B2 vinculado funcionalmente a GUS en las hipocotiledóneas y en las cotiledóneas, los inventores concluyen que la determinación estable de destino celular en células de no raíz también requiere la actividad HBT funcional. También la formación ectópica de los capilares de raíz en las partes aéreas de planta del mutante hbt confirma este nuevo hallazgo (Figura 3).

La Figura 4 muestra adicionalmente que el establecimiento de la identidad de las células que forma el centro inactivo de puntas de raíz se pierde en plántulas *A. thaliana* de mutante hbt. El patrón de expresión del promotor QC46 se fusiona a GUS (pQC46::GUS), que es un marcador específico de región para el centro inactivo ha desaparecido totalmente en el mutante hbt comparado con el centro inactivo tipo natural. El promotor SCARECROW (SCR) ligado a GUS (pSCR::GUS), que es un marcador específico para la endodermis de raíz se limita a la parte distal. Debido a que solo el centro inactivo de plántulas *A. thaliana* de mutante hbt se altera (Figura 4), existe una especificidad basal del defecto de especificación hbt. Estos resultados aplican la función del gen HBT en establecer la región de meristema de raíz distal como se discute en Willemsen et al. (1998).

Otro defecto vinculado a mutaciones en el gen HBT se relaciona con morfología celular. La elongación de las células epidérmicas nuevamente formadas parece ser deteriorada por plántulas *A. thaliana* de mutante hbt y el cultivo de dichas células resulta en su hinchazón. Este fenotipo hinchado se ilustra en la Figura 5.

Función de HOBBIT

La presente especificación muestra por primera vez que HOBBIT está implicado en la regulación del ciclo celular y también en los efectos relacionados con auxina. Estas dos características funcionales del gen HOBBIT son muy únicas, debido a que no se identifica otro factor biológico hasta ahora que esté implicado en ambos procesos y que forme un enlace entre ambos procesos. Por lo tanto, el gen de la presente invención se considera como una molécula clave en los procesos biológicos en la célula.

El genotipo embrionario temprano del mutante hbt muestra notablemente similitudes con tres mutantes implicados en respuestas auxina; monópteros (Hardtke and Berleth, 1998), resistente 6 a auxina (axr6) (Bobbie et al. 2000) y bodenlos (Hamann et al. 1999). En todos estos mutantes los planes de división en la célula hipofisiaria se desvían de lo normal, que resulta en una falla para producir los derivados de esta célula, el centro inactivo, el capilar de raíz y el meristema de raíz. Los inventores pusieron en marcha la idea de que también se pueden alterar las respuestas de auxina mutantes hbt. Las investigaciones tempranas muestran que la adición de auxina exógena no rescata el fenotipo mutante y que la percepción de la auxina todavía es intacta en mutantes hbt (Willemsen et al. 1998). Sin embargo, no se puede establecer relación entre auxina y HOBBIT.

Ahora, en la presente invención, los inventores muestran por primera vez que el HOBBIT participa en los procesos mediados por auxina.

Cuando se determina la función del gen HOBBIT, los inventores hacen observaciones muy sorprendentes cuando se analiza la estabilidad del CYCB1-GUS y las proteínas de fusión AXR3-GUS. Inesperadamente, ambas proteínas, con relación a plántulas *A. thaliana* tipo natural, se estabilizan en plántulas mutantes hbt. Esto se ilustra para CYCB1-GUS en la Figura 6 y para AXR3-GUS en la Figura 7. Con estos experimentos, los inventores muestran por

primera vez una conexión directa entre el gen HOBBIT y sus efectos reguladores en el ciclo celular y su implicación en auxina, señalización, respectivamente.

Por lo tanto la especificación describe el uso de una planta cdc27B para regular el ciclo celular de una célula y el uso de una planta cdc27B para modular o imitar los efectos relacionados con auxina en una planta o célula de planta.

- 5 El CYCB1, es decir ciclina B1, es una ciclina mitótica que se requiere para la activación de quinasas dependientes de ciclina específicas de fase M (CDK; véase Mironov et al. 1999 y Reed 1996 para revisión). El recambio proteolítico de ciclina B1 es un prerrequisito para salir de mitosis y para reconfigurar el ciclo celular a la fase G1. La degradación de ciclina B1 depende del así llamado "motivo de secuencia de destrucción mitótica en las proteínas de ciclina mitótica B1 y se ejecuta por un complejo de ligasa ubiquitina E3 especializado, el complejo/ciclosoma que promueve la anafase (APC/C). El APC/C es solo activo durante la fase M tardía y durante la fase G1 (Brandeis and Hunt 1996, King et al. 1995, Sudakin et al. 1995, Tyers and Jorgensen 2000).

- 15 Se encuentra que el AXR3 es idéntico a IAA17, un miembro de la familia del gen Aux/IAA puede inducir auxina. Los genes Aux/IAA exhiben expresión específica de tejido variado, las cinéticas de inducción de auxina y las relaciones de respuesta de dosis de auxina (Abel et al. 1995, Ainley et al. 1988, Conner et al. 1990, Rouse et al. 1998, Theologis et al. 1985, Yamamoto et al. 1992). Las proteínas nucleares Aux/IAA de vida corta comprenden hasta 4 dominios altamente conservados. La homo- o heterodimerización entre las proteínas Aux/IAA o entre las proteínas Aux/IAA y los factores de respuesta a auxina (ARF, que son los activadores transcripcionales) se efectúa a través de los dominios III y IV (Abel et al. 1994; 1995, Kim et al. 1997, Ulmasov et al. 1997). La degradación de las proteínas Aux/IAA depende del dominio II y es esencial para la señalización normal de auxina (Worley et al. 2000).

- 20 Sin embargo, con la estabilización de CYCB1-GUS así como también de la proteína de fusión AXR3-GUS, los enlaces directos se hacen entre el gen HOBBIT y sus efectos reguladores en el ciclo celular y en la señalización de auxina, respectivamente.

- 25 De manera interesante, por lo menos cuatro otros genes de regulación de desarrollo de planta se han vinculado a la señalización de auxina. Estos PIN1 están implicados en el transporte polar de auxina y su ubicación polar se controla por otro gen de regulación de desarrollo de planta, GNOM (Palme and Gälweiler 1999; Steinmann et al. 1999); el ETT que también se conoce como ARF3 y que se une a los elementos de respuesta a auxina en promotores de genes inducibles por auxina (Nemhauser et al. 1998, Walker and Estelle 1998, y referencias citadas en ambos); y MP, también conocido como IAA24, un miembro de los genes AUX/IAA (Nemhauser et al. 1998, Walker y Estelle 1998, y referencias citadas en ambos).

- 30 En la presente invención, los inventores muestran por primera vez que el desarrollo del gen HOBBIT de planta se liga a la señalización de auxina.

- Otros componentes que se sabe se ligan a la señalización de auxina son parte de un complejo de ligasa de ubiquitinación E3 conocido como SCFTir1 (del Pozo and Estelle 1999, Gray and Estelle 2000). Los complejos SCF pertenecen a una familia diferente de ligasas ubiquitina E3 que describen APC/C y son constitutivamente activas a través del ciclo celular (véase Tyers and Jorgensen 2000 para revisión). Los mutantes *A. thaliana* tir1 son deficientes en la respuesta a auxina. El TIR1 es el componente de proteína secuencia F de SCFTir1. Las proteínas de secuencia F son responsables de la incorporación del sustrato específico para la degradación proteolítica. Otro gen *A. thaliana*, AUXIN-RESISTANT 1 (AXR1) es una enzima que activa la ubiquitina tipo E1 que, en relación con ECR1, activa la proteína relacionada con ubiquitina RUB1. Se ha observado la modificación de RUB1 de un *A. thaliana* cullin/Cdc53, también un componente SCF (del Pozo et al. 1999, Gray and Estelle 2000, Tyers and Jorgensen 2000).

- 45 El gen HOBBIT, que se identifica por medio de un mapa con base en el método de clonación, codifica un homólogo Arabidopsis de un componente APC que parece conectar los procesos biológicos importantes implicados en el desarrollo de planta al acoplar la competencia para responder a la progresión del ciclo celular a auxina. Esto es particularmente importante debido a que el Hobbit, como un factor de competencia a través de la hormona de auxina, restringe la formación del patrón solo para desviar las células. Esta invención está soportada por los siguientes datos experimentales.

- El complejo que promueve la anafase multisubunitaria (APC) regula la progresión del ciclo celular en levaduras y en animales, al mediar la estabilidad de los reguladores del ciclo celular. En la presente invención se muestra que el gen Arabidopsis HOBBIT codifica un homólogo de uno de los componentes del APC, CDC27/NUC2 (figura 8). El gen HBT también puede funcionar como un componente APC, que puede complementar parcialmente la división que detiene el fenotipo en nuc2ts del mutante *Schizosaccharomyces pombe* (ejemplo 6, figura 15). Diversos otros componentes del APC que tiene los homólogos Arabidopsis y estos se expresan continuamente en todas las células divididas. Los transcritos HBT sin embargo, se acumulan solo en el límite G2/M (ejemplo 7, figura 16). Estos resultados demuestran que aunque existe evidencia de que el HBT participa en un complejo como APC, existe una

distinción clara entre el HOBbit identificado novedoso y otros componentes del APC (como cdc27A y cdc26) ya conocidos en la técnica.

Tres tipos de célula de raíz distal son dependientes de la señalización de auxina para su correcta diferenciación y es la respuesta a auxina que se altera en las plántulas hbt. Proporcionamos evidencia de que este defecto depende de la acumulación de la proteína AXR3/IAA17, un represor inestable de respuestas de auxina (ejemplo 3, ejemplo 9, ejemplo 10, ejemplo 11). Estos datos sugieren que la actividad del gen HBT actúa como un factor de competencia regulado por el ciclo celular para respuestas de patrón mediadas por auxina, ligando así la progresión del ciclo celular de nivel molecular y la percepción de las señales de patrones.

Los inventores dilucidaron un mecanismo mediante el cual la competencia para responder a las señales de diferenciación es dependiente de la estabilidad mediada por HBT de la clase Aux/IAA de los reguladores transcripcionales de respuestas de auxina. Este modelo puede explicar la correlación observada entre la división celular y la capacidad de las células para responder a señales de patrón en plantas. Adicionalmente, se sugiere que el APC de planta ha evolucionado para adquirir nuevas funciones en el desarrollo multicelular, que difieren de las funciones descritas hasta ahora en el control del ciclo celular.

En la calíptra de raíz de columna de las raíces tipo natural se presenta una acumulación de auxina, que se puede visualizar por tinción DR5::GUS en estas células (ejemplo 9, figura 17). En plántulas hbt este pico DR5 está ausente, y exhiben una sensibilidad de auxina alterada con respecto a la inducción de actividad DR5::GUS. Esto sugiere que la acción HBT puede implicar la proteólisis de proteínas que regulan las respuestas de auxina. La estabilidad de las proteínas Aux/IAA, para mediar las respuestas de auxina, se regula mediante la ruta de ubiquitina, de tal manera que probablemente fueron candidatos (Guilfoyle et al., 1998; Ulmasov et al., 1999b). En la presente invención se muestra que el hbt interactúa genéricamente con un alelo nulo de un miembro de la familia Aux/IAA, axr3-1T (ejemplo 10, figura 18), que sugiere que el HBT tiene una función en el ajuste de las respuestas de auxina. La auxina tiene una función importante en el patrón de meristema de raíz y esto probablemente depende de la distribución correcta de los miembros de la red de ajuste fino de reguladores positivos y negativos de las respuestas de auxina. Si la destrucción de los factores de respuesta de auxina está mediada por el ciclo celular que regula la disponibilidad de la proteína HBT, la competencia de las células para responder al patrón de auxina de molécula se restringe al sitio en donde se producen células, los meristemas. En este escenario, el gen HBT es crucial para la interacción entre la formación de patrón y la división celular en los meristemas de la planta desarrollada. Para nuestro conocimiento este es el primer momento en que se ha reportado que un gen de planta conecta la progresión del ciclo celular y la percepción de las señales de patrón en un nivel molecular. Sin embargo, en sistemas de animales se han descrito algunos ejemplos de conexiones similares, tal como el acoplamiento de la capacidad de las células precursoras vulvares de *C. elegans* para responder a señales que median la selección entre los destinos celulares vulvares a diferentes fases del ciclo celular. La función descrita aquí para el gen HBT también es única cuando se extiende a la función CDC27 como un componente del APC.

Aislamiento del gen HOBbit

Una forma eficiente con la cual se identifican nuevos genes y posteriormente se estudian es al introducir mutaciones de punto con agentes mutagenizantes químicos, tal como sulfonato de etil metano (EMS). El método más confiable y directo para luego aislar el gen implicado es por medio de un método de clonación con base en mapa. Este método se utiliza para aislar el gen HOBbit (ejemplo 1 y 2).

El gen HBT se mapea en el cromosoma 2 de *A. thaliana* en el intervalo entre los marcadores m246 y GPA1 que se confirma por mapeo fino RFLP. En la presente invención, se sigue un método de clonación basado en mapeo laborioso para aislar el gen HBT. El marco de lectura abierto que contiene mutaciones de sustitución de nucleótido se identifica y se aísla el cADN correspondiente (ejemplos 1 y 2).

El cADN HBT tipo natural se identifica mediante RT-PCR y se identifica aquí como SEQ ID Nr. 2 (ejemplo 8). Un clon que contiene este cADN se deposita en la colección "Belgian Coordinated Collections of Microorganisms", BCCM-LMBP, en Octubre 11, 2000 y se da el número de acceso LMBP4265 por la Autoridad Depositaria Internacional. El análisis de secuencia revela que el gen HBT codifica inesperadamente un homólogo CDC27. Está presente en la base de datos GenBank como parte de la secuencia bajo el número de acceso AC006081, más específicamente con el complemento inverso de los nucleótidos 16314-20890. La parte relevante de esta secuencia genómica se define en la SEQ ID NO 1. El cADN HBT se identifica en la presente invención como la SEQ ID NO 2 y otra variante de división de los genes HBT se caracteriza e identifica aquí como la SEQ ID NO 3 (ambas de *A. thaliana* ecotipo Col-0, Columbia). Ambas variantes de división HBT codifican, sin embargo, los homólogos CDC27 que se extienden por 162 y 166 aminoácidos de terminal amino, respectivamente, (definido como la SEQ ID NO 6 y como la SEQ ID NO 7 respectivamente) con relación a la secuencia de proteína predicha anotada en GenBank (AC006081; ID de proteína AAD24396.1). Las secuencias de nucleótidos que corresponden a la SEQ ID NOs 6 y 7 se definen en SEQ ID NOs 4 y 5, respectivamente. Las proteínas HBT de longitud completa se dan por la SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9 respectivamente. Las proteínas HBT son ~47 % idénticas a otro homólogo *A. thaliana* CDC27 con el número de

acceso GenBank AC001645 (ID de proteína AAB63645.1). Para propósitos de claridad, los términos HOBbit, HBT y AtCDC27B se refieren a las mismas proteínas como se define por la SEQ ID NO 8 (también denominado como CDC27B1) y por la SEQ ID NO 9 (también denominado como CDC27B2). Dicho otro homólogo *A. thaliana* CDC27 (GenBank AC001645; ID de proteína AAB63645.1) se denomina como AtCDC27A. Se da una alineación de AtCDC27A y HBT/AtCDC27B2 en la Figura 8.

Se conocen en la técnica proteínas CDC27 cuando es parte de un complejo de proteína grande denominado APC/C (cfr. supra). En la levadura, el APC/C consiste de por lo menos 8 proteínas de las cuales tres, CDC16, CDC23 y CDC27 contienen repeticiones de tetratricopéptido (TPR; Peters et al. 1996, Small and Peeters 2000).

Los datos experimentales presentados en la presente solicitud son la primera demostración de que *cdc27B* en levadura puede ser parte del APC (Figura 15) y que las plantas que carecen de actividad HOBbit funcional tienen contenido de ADN anormal en la fase S del ciclo celular (es decir entre la fase G1 y G2).

En el proceso para aclarar la función del gen HBT, se generan diversos mutantes *hbt*. Estos mutantes *hbt* se identifican y caracterizan por los inventores en el nivel genómico y en el nivel de cADN, en las Figuras 9 y 10 se proporciona una visión general de los mismos:

1. *hbt*⁵⁴²¹: una mutación de punto del nucleótido adenosina en la posición 62 (cADN resultante: SEQ ID NO 17; Fig. 9) o posición 62 (clon genómico resultante: SEQ ID NO 10; Fig. 10) en una timidina, que resulta en una sustitución de la alanina natural en la valina mutante en la posición 21 (que resulta en la SEQ ID NO 24; Fig. 9).

2. *hbt*⁵⁴²²/*hbt*⁵⁴²³/*hbt*⁵⁸⁵⁹/*hbt*⁹⁶²⁴: Cuatro mutantes aislados independientemente que llevan la misma mutación de punto del nucleótido guanosina en la posición 1503 (clon genómico resultante: SEQ ID NO 11; Fig. 10) en una adenosina, que resulta en la inserción de nucleótidos 434-511 del cADN (que resulta en SEQ ID NO 18) y los aminoácidos correspondientes 145-171 de la proteína (que resulta en SEQ ID NO 25).

3. *hbt*¹⁶¹¹: una mutación de punto del nucleótido guanosina en la posición 1261 (cADN resultante: SEQ ID NO 19; Fig. 9) o en la posición 2913 (clon genómico resultante: SEQ ID NO 12; Fig. 10) en una adenosina, que resulta en una sustitución de la glicina natural en la arginina mutante en la posición 421 (que resulta en SEQ ID NO 26; Fig. 9).

4. *hbt*⁹⁶²⁰: una mutación de punto del nucleótido guanosina en la posición 3042 (clon genómico resultante: SEQ ID NO 13; Fig. 10) en una adenosina, que resulta en una eliminación de nucleótidos 1300 a 1365 (cADN resultante: SEQ ID NO 20; Fig. 9) y los aminoácidos correspondientes 434-455 (que resulta en SEQ ID NO 27; Fig. 9).

5. *hbt*⁷²¹: una mutación de punto del nucleótido guanosina en la posición 3360 (clon genómico resultante: SEQ ID NO 14; Fig. 10) en una adenosina, que resulta en una eliminación de nucleótidos 1366 a 1485 (cADN resultante: SEQ ID NO 21; Fig. 9) y los aminoácidos correspondientes 456-495 (que resulta en SEQ ID NO 28; Fig. 9).

6. *hbt*²³¹¹: una mutación de punto del nucleótido citosina en la posición 1555 (cADN resultante: SEQ ID NO: 22; Fig. 9) o position 3530 (clon genómico resultante: SEQ ID NO 15; Fig. 10) en una timidina, que resulta en la formación de un codón de parada en la posición de la glutamina natural en la posición 519 (Fig. 9) y, sin embargo, la eliminación de los aminoácidos 520 a 744 (que resulta en SEQ ID NO 29; Fig. 9).

7. *hbt*⁸⁰⁵²: una mutación de punto del nucleótido citosina en la posición 1610 (cADN resultante: SEQ ID NO 23; Fig. 9) o en la posición 3667 (clon genómico resultante: SEQ ID NO 16; Fig. 10) en una timidina, que resulta en una sustitución de la alanina natural en la valina mutante en la posición 537 (que resulta en SEQ ID NO 30; Fig. 9).

Como dos mutaciones inactivas funcionales, *hbt*⁵⁴²¹ y *hbt*⁵⁴²²/*hbt*⁵⁴²³/*hbt*⁵⁸⁵⁹/*hbt*⁹⁶²⁴ ocurren en el dominio de terminal amino CDC27B novedoso de la presente invención (SEQ ID NO 7), se considera que este dominio es esencial para la actividad de la proteína *cdc27B* y por lo tanto se considera fuertemente que la proteína anotada con el número de acceso GenBank AC006081 (ID de proteína AAD24396.1) no es activo y no es funcional.

Con el fin de demostrar la distinción funcional entre el gen identificado novedoso de la presente invención y otros genes que muestran homología, la transcripción de los genes HOBbit, AtCDC16 (GenBank AC005679; ID de proteína AAC83033.1) y AtCDC27A se analiza en embriones *A. thaliana* (Figura 11) y raíces de plántula de *A. thaliana* (Figura 12). Los transcriptos AtCDC16 se dispersan homogéneamente en todas menos las células suspensoras para desarrollar embriones *A. thaliana* así como también en todas menos las células calíptra de raíz en raíces de plántula *A. thaliana*. Los transcriptos AtCDC27A también se encuentran en muchas células de raíz de plántula *A. thaliana*. La expresión de gen HBT, sin embargo, exhibe un patrón de expresión inesperado irregular en el desarrollo de embriones así como también en tejidos de raíz de plántula. Dichos patrones de expresión irregulares son indicadores de una transcripción de gen específica de etapa de ciclo celular. Sin embargo, aunque los

homólogos en el nivel de aminoácido, las funciones biológicas de AtCDC27A y HBT son casi con seguridad muy diferentes con base en sus patrones de expresión.

En resumen, los inventores muestran por primera vez que el cdc27B/HOBBIT está implicado en respuestas relacionadas con auxina, que la expresión HOBBIT se acopla al ciclo celular y que tiene una función posible en el APC. Los inventores encuentran que HOBBIT es un factor de competencia a través de la hormona auxina. Los inventores también encuentran que el HOBBIT restringe la formación del patrón para dividir solo las células.

Dichos aspectos de la invención conducen a la formulación de las siguientes realizaciones preferidas de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

10 Aislamiento de cADN cdc27B y secuencias de proteína codificadas

El gen HBT codifica un homólogo CDC27/NUC2.

El gen HBT se ubica en el cromosoma 2 cerca al marcador molecular mi148. La identificación de ORF T2G17.20 como el gen HBT se determina por secuenciamiento de los alelos mutantes y se verifica mediante la terminación de homocigotos hbt2311 utilizando un fragmento genómico de 9 kb que abarca el locus HBT (ejemplos 1 y 2).

15 Para confirmar la división predicha del cADN HBT, se aíslan dos clones de una colección de cADN Col-0 (Giraudat et al., 1992). Adicionalmente, el ARN se aísla de raíces Col-0 y se realiza un RT-PCR. El secuenciamiento de los cADN confirma las desviaciones en anotación que observamos entre estos tres cADN y el ORF publicado (ID de proteína AC006081). Adicionalmente estos experimentos de secuencia revelan por lo menos dos variantes de división. Una fracción pequeña de los cADN carece de 12 pares base, que resulta en un primer dominio TPR con 30 a diferencia de 34 aminoácidos genéricos. La mayor parte de los cADN representan la versión larga. La significancia funcional de las versiones de división alternativas del mRNA HBT no es clara. El tamaño del transcripto, 2.5 kb, se confirma mediante análisis Northernblot. El análisis de Protección RNasa revela dos inicios transcripcionales potenciales, con las cajas TATA y CAAT en la dirección 5' putativa (ejemplo 8).

25 La comparación de las secuencias de cADN y genómicas revela que el gen HBT contiene 15 exones y 14 intrones, que resulta en una proteína predicha de 745 residuos. La característica más sobresaliente de la proteína HBT es la presencia de 10 dominios con los residuos consensus de Repeticiones de Péptido Tetrátrico (TPR), uno en la mitad del terminal amino de la proteína y un estiramiento de nueve dominios en la mitad del terminal carboxilo. Estos dominios TPR están implicados en las interacciones proteína-proteína. La comparación de la secuencia de proteína HBT con otras revela que la proteína HBT comparte la mayor homología con las proteínas CDC27/BIMA/NUC2 de organismos distantes evolutivos tal como levadura, mamíferos y Drosophila. Adicionalmente, la distribución de los dominios TPR en la proteína HBT, el dominio de repetición conservada 5 y 7, y la repetición aberrante TPR en el dominio 4 son típicos para ortólogos CDC27. Se ha mostrado que las proteínas CDC27 son un componente del Complejo que Promueve Anafase (APC) o Cicleosoma, implicadas en la progresión del ciclo celular mediante objetivos de proteína ubicuos (Lamb et al., 1994; King et al., 1995). Está presente una secuencia relacionada con HBT en el genoma Arabidopsis. La proteína AtCDC27a deducida (ACC no.: BAB01271) comparte una homología general de 41 % con HBT. La homología en la región que contiene los dominios TPR es 65 % (véase figura 8). Con base en la secuencia de proteína y la homología con proteínas CDC27, hipotetizamos que la proteína HBT puede regular la estabilidad de las proteínas objetivo por medio de la ruta de ubiquitinación.

40 De acuerdo con lo anterior la invención representa una secuencia de ADN aislada con la secuencia de nucleótidos como se da en la SEQ ID NOS 2 a 3, que codifica una proteína que regula el desarrollo de la planta con la secuencia de aminoácidos como se da en la SEQ ID NOS 8 o 9, que comprende una secuencia de aminoácidos novedosa requerida para la función de la proteína como se da en la SEQ ID NOS 6 y 7, respectivamente. Más específicamente, dicha secuencia de ADN aislada codifica las proteínas HOBBIT tipo natural que son homólogo CDC27.

45 El término "proteína que regula el desarrollo de la planta" como se utiliza adelante se refiere a una proteína de planta CDC27. Ejemplos específicos de las proteínas de planta CDC27 son las proteínas cdc27b identificadas y descritas aquí.

Se incorpora adicionalmente en la presente invención las secuencias de ADN aisladas con la secuencia de nucleótidos como se da en la SEQ ID NOS 10 a 23 que codifica funcionalmente mutantes inactivos de dicha proteína que regula el desarrollo de la planta con la secuencia de aminoácidos como se da en la SEQ ID NOS 24 a 30.

50 La presente especificación describe un ácido nucleico aislado que codifica por lo menos parte de una proteína novedosa que regula el desarrollo de la planta o que codifica un fragmento inmunológico y/o funcional de dicha

proteína o que codifica funcionalmente mutantes inactivos de dicha proteína que regula el desarrollo de la planta, seleccionados del grupo que consiste de:

- (a) un ácido nucleico que comprende por lo menos parte de la secuencia de ADN como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 1 a 5, 10-23, o el complemento del mismo,
- 5 (b) un ácido nucleico que consiste de la secuencia de ADN como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 1 a 5, 10 a 23, o el complemento del mismo,
- (c) un ácido nucleico que comprende las secuencias de ARN que corresponden a cualquiera de las SEQ ID NOs 1-5, 10-23, o el complemento de las mismas,
- 10 (d) un ácido nucleico que hibrida, preferiblemente que hibrida específicamente, con la secuencia de nucleótidos como se define en (a) (b) o (c),
- (e) un ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50 % idéntica, preferiblemente 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 % idéntica, más preferiblemente 80 %, 85 % o 90 % idéntica, mucho más preferiblemente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 8, 9 o 24 a 30,
- 15 (f) un ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 6, 7, 8, 9, o 24 a 30,
- (g) un ácido nucleico que se degenera como resultado del código genético con relación a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 8, 9 o 24 a 30, o con relación a una secuencia de ácidos nucleicos como se define en (a) a (f),
- 20 (h) un ácido nucleico que diverge debido a las diferencias en el uso de codón entre los organismos con relación a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 8, 9 o 24 a 30, o con relación a una secuencia de ácidos nucleicos como se define en (a) a (f),
- (i) un ácido nucleico que diverge debido a las diferencias entre los alelos con relación a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 8, 9 o 24 a 30 o con relación a una secuencia de ácidos nucleicos como se define en (a) a (f),
- 25 (j) un ácido nucleico que codifica un fragmento o un fragmento funcional y/o un fragmento inmunológicamente activo de una proteína se codifica por una secuencia de ADN como se da en la SEQ ID NOs 1 a 5 o 10 a 23 o como se define en uno cualquiera de (a) a (i),
- (k) un ácido nucleico que hibrida específicamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido como se da en la SEQ ID NO 6 o 7, y,
- 30 (l) un ácido nucleico que codifica una proteína como se define en cualquiera de la SEQ ID NOs 6 a 9 o 24 a 30 o como se define en uno cualquiera de (a) a (k) interrumpido al intervenir las secuencias de ADN, dado que dicho ácido nucleico no es el ácido nucleico como se deposita bajo el número de acceso GenBank AC006081.
- 35 La presente especificación describe secuencias de ácidos nucleicos que hibridan con secuencias únicas de los ácidos nucleicos que codifican la proteína que regula el desarrollo de la planta de la invención. Debe quedar claro que la persona experta en la técnica puede identificar fácilmente y seleccionar los tramos de secuencias que son únicos para la proteína de la invención cuando se compara por ejemplo en la figura 8 de la secuencia de aminoácidos de Cdc27A y HBT/Cdc27B. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican estas partes únicas se pueden deducir fácilmente de esto.
- 40 La presente especificación describe ácidos nucleicos aislados como se mencionó anteriormente bajo (a) a (l) que son ADN, cADN, ADN genómico o ADN sintético, o ARN en donde T se reemplaza por U.
- También parte de la especificación son moléculas de ácido nucleico de por lo menos 15 nucleótidos de longitud que hibridan específicamente con por lo menos una de las moléculas de ácido nucleico de la invención como se definió anteriormente o amplificando específicamente las moléculas de ácido nucleico definidas anteriormente.
- 45 De acuerdo con otra realización, la invención se relaciona con un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la invención. Este vector puede ser un vector de expresión en donde dicha secuencia de ácidos

nucleicos se vincula funcionalmente a una o más secuencias de control que permite la expresión en células anfitrionas procarióticas y/o eucarióticas.

También las células anfitrionas que contienen una molécula de ácido nucleico de la invención son parte de la presente invención. Las células anfitrionas preferidas de acuerdo con la invención son células bacterianas, de insecto, fúngica, de planta o animales.

La presente especificación describe adicionalmente una proteína que regula el desarrollo de la planta aislada que comprende uno de los polipéptidos seleccionados del grupo que consiste de:

(a) un polipéptido como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 6 a 9,

(b) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50 % idéntica, preferiblemente 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 % idéntica, más preferiblemente 80 %, 85 % o 90 % idéntica, mucho más preferiblemente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 6 a 9, y

(c) un polipéptido se codifica por un ácido nucleico como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 1 a 3.

La presente especificación describe adicionalmente una proteína que regula el desarrollo de la planta aislada que consiste de una secuencia de aminoácidos como se da en la SEQ ID NO 8 o 9. De acuerdo con otra realización, las proteínas de acuerdo con la invención son proteínas CDC27, tal como la proteína cdc27B de plantas, u homólogos funcionales de los mismos. De acuerdo con otra realización, la invención se relaciona con la proteína cdc27B de plantas de *A. thaliana*, tal como la proteína AtCDC27B.

La especificación se relaciona adicionalmente con proteínas con una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50 % idéntica, preferiblemente 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 % idéntica, más preferiblemente 80 %, 85 % o 90 % idéntica, mucho más preferiblemente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos como se da.

La especificación describe también homólogos, derivados y/o fragmentos inmunológicamente activos de la proteína que regula el desarrollo de la plantas de acuerdo con la invención, fragmentos de los mismos y proteínas que comprenden dichos homólogos, derivados y/o fragmentos inmunológicamente activos de dicha proteína que regula el desarrollo de la planta o fragmentos de los mismos.

Como tal, la presente invención también se relaciona con un polipéptido aislado que se puede codificar por una molécula de ácido nucleico de la invención como se define en las reivindicaciones.

Análisis de alelos mutantes.

El ADN genómico de mutantes hbt homocigotos (ejemplo 1) se amplifica en el locus HBT y se secuencia. Esto conduce a la identificación de cambios de par base únicos en diez alelos mutantes. Para el alelo débil e56, que no complementa otros alelos hbt (Willemsen et al., 1998), no se puede identificar mutación en la región genómica que incluye 1070 bp de la región promotora en la dirección 5' y 230 bp en la dirección 3' de la señal de poliadenilación (datos no mostrados). Aunque la lesión molecular en hbt56 permanece no identificada, el análisis RT-PCR muestra que los mutantes e56 tienen niveles de transcripto HBT fuertemente reducidos, que sugieren efectos epigenéticos en la transcripción HBT.

En el alelo Col-0, 2311, se introduce un codón de parada en la posición 519. Las proteínas truncadas resultantes carecen de parte principal de los dominios TPR, lo que puede indicar que estos alelos son nulos; en el mutante nuc2-663 *S. pombe* sensible a temperatura, un cambio de aminoácidos en uno de los dominios TPR resulta en letalidad de esporas en tétradas como un mutante nulo y construcciones que llevan versiones de la proteína NUC2 con truncaciones en los dominios TPR no pueden complementar nuc2-663 (Hirano et al., 1988, 1990). A pesar de la ausencia de muchos dominios TPR en estos tres alelos hbt, no se observan letalidad gametofítica y disminución metafase. Adicionalmente, todos los alelos Col (excepto el alelo débil e56) provocan fenotipos similares a pesar de diferentes defectos moleculares, consistente con la noción que todos son nulos.

De acuerdo con lo anterior, en otra realización, la invención se relaciona con mutantes funcionalmente inactivos de la proteína que regula el desarrollo de la plantas de la invención, que consiste de una secuencia de aminoácidos como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 24 a 30, o se codifica por un ácido nucleico como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 10 a 23. La expresión "fragmento funcional" se relaciona con un fragmento de la proteína mutante que comprende la mutación.

La invención se relaciona adicionalmente con los polipéptidos como se define en las reivindicaciones que tienen la capacidad de regula el desarrollo de planta.

Cualquiera de dichas proteínas se puede producir en un sistema biológico, por ejemplo un cultivo celular. Alternativamente cualquiera de dichas proteínas se fabrica químicamente por ejemplo mediante síntesis de péptido de fase sólida. Dichas proteínas o fragmentos de las mismas pueden ser parte de una proteína de fusión como en el caso de por ejemplo un ensayo de dos híbridos que permite por ejemplo la identificación de proteínas que interactúan con la proteína que regula el desarrollo de la planta de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, de acuerdo con otra realización, la invención también se relaciona con un método para producir un polipéptido de la invención que comprende cultivar una célula anfitriona especificada anteriormente adicionalmente bajo condiciones que permiten la expresión del polipéptido y recuperar el polipéptido producido del cultivo.

Las proteínas o fragmentos de los mismos que se pueden obtener mediante un método como se describe aquí son adicionalmente útiles por ejemplo para modular la interacción entre una proteína que regula el desarrollo de la planta como se define en la invención e interactuar patrones de proteína identificados de acuerdo con la invención. Los péptidos químicamente sintetizados son particularmente útiles por ejemplo como una fuente de antígenos para la producción de antisuero y/o anticuerpos.

La presente invención así adicionalmente abarca antisuero y/o anticuerpos que reconocen específicamente la proteína que regula el desarrollo de la planta de acuerdo con la invención o partes inmunológicamente activas o epítomos de las mismas. Said antisuero y/o anticuerpos son útiles en muchas áreas relacionadas con la invención que incluyen: (i) identificación de cualquier organismo, preferiblemente plantas, de otra proteína que regula el desarrollo de la plantas y sus genes de acuerdo con la invención; (ii) cuantificación de la síntesis en organismos y/o organismos recombinantes de la proteína que regula el desarrollo de la planta de acuerdo con la invención; (iii) purificación de la proteína que regula el desarrollo de la planta de acuerdo con la invención; (iv) inmunoprecipitación de la proteína que regula el desarrollo de la planta de acuerdo con la invención por ejemplo como una forma de identificar otros patrones de proteína que se complejan con dicha proteína que regula el desarrollo de la planta; (v) inmunoubicación de la proteína que regula el desarrollo de la planta de acuerdo con la invención que se expresa en un organismo o un organismo recombinante.

Uso de cdc27B en plantas

Durante las diferentes etapas del desarrollo de planta se integra la acción de la formación de patrón y la morfogenia luego de las posiciones de órganos, tejidos y tipos celulares individuales en posiciones apropiadas. En contraste con sistemas de animal en donde el movimiento de las células contribuye al desarrollo, las plantas están rodeadas por una pared celular rígida que permite poco movimiento. Por estas razones, la formación de patrón y la morfogenia de la planta tienen lugar en los sitios de producción de células, los meristemas. En estos meristemas, las señales de patrones pueden proporcionar la información necesaria para crear las diferencias en los índices de división y planes y el alargamiento directo de células cuando dejan el meristema. La diferenciación de las células inicia como células que dejan el meristema. Con todos estos procesos diferentes que ocurren en el mismo lugar y al mismo tiempo es importante conectar la división celular y la formación de patrones.

De forma interesante, la formación de patrones y la división celular comparte mecanismos reguladores comunes. Un mecanismo importante para controlar la progresión del ciclo celular es la destrucción de las proteínas reguladoras por medio de la ruta ubiqua. En esta ruta, las moléculas ubicuas se unen a las proteínas objetivo mediante ligasas ubicuas como SKP1, CDC53/CULLIN y el complejo de proteína secuencia F (SCF) y el Complejo que Promueve Anafase (APC). Después de esto las ahora proteínas 'marcadas' se destruyen por el Proteasoma 26S. Esta ruta ubiqua también sirve como una función crucial que balancea las moléculas de respuesta positiva y negativa de una molécula importante para desarrollo de planta, auxina. En la presente invención, los homólogos de Arabidopsis de componentes de la ruta proteolítica mediada por ubiquitina en la progresión del ciclo celular y la respuesta de auxina se ha identificado y las mutaciones en los genes correspondientes confieren un amplio rango de defectos de crecimiento, que muestran la función central de estos procesos en el desarrollo de planta.

¿Una función para el gen HBT en ajuste con las respuestas de auxina?

La idea básica de que HBT está implicado en las respuestas de auxina se origina a partir de tres observaciones diferentes. Primero, los tipos celulares defectuosos en Hobbit también son dependientes de auxina y también son defectuosos en respuesta a auxina (véase Figura 17(i): la maquinaria de respuesta a auxina de la célula es intacta, pero la respuesta a auxina se altera y la Figura 17(j): las hipocotiledóneas en mutantes hbt han ganado sensibilidad, en donde no responde normalmente a auxina. Segundo, el mutante ARX3 "ganancia de función" de plantas mutantes, muestran las mismas características fenotípicas como los mutantes hbt y tercero, las respuesta de auxina implica las proteínas que regulan auxina o ubiquinación.

Cuando se evalúa un elemento de respuesta a auxina sintético, las plántulas hbt muestran una sensibilidad a auxina alterada para la auxina sintética, 2,4 D, y para la auxina endógena, IAA (ejemplo 9, figura 17). Aunque pueden codificar la auxina, es necesaria una concentración mucho mayor para inducir una respuesta transcripcional.

También observamos una restauración parcial del genotipo mutante hbt en mutantes dobles hbt axr3-1T. El gen AXR3/IAA17 es un regulador de percepción de auxina y mutaciones semi-dominantes en este gen confieren defectos de crecimiento pleiotrópico, todos relacionados con una respuesta de auxina elevada (Ouellet et al., 2001). El involucramiento de auxina en diversos procesos de crecimiento y órganos implica que en cada tejido puede hacer un balance específico de los reguladores positivos y negativos de las respuestas de auxina. Diversas observaciones sugieren que el HBT puede tener una función en el control de este balance en el meristema. Primero, la sensibilidad de auxina se altera en plántulas hbt (ejemplo 9, figura 17). Segundo, existe una interacción genética con el alelo axr3-1T (ejemplo 10, figura 18). y tercero, la expresión del gen HBT se confina a la población de células divididas en las meristemas y es por lo tanto dependiente de la progresión del ciclo celular (ejemplos 4 y 7, figuras 11, 12 y 16). Sin embargo, la presencia de la proteína HBT solo en la fase G2/M en el ciclo celular, puede proporcionar un único mecanismo regulador en las plantas, de tal manera que media el retiro de los reguladores de auxina, en una fase específica del ciclo celular. Para nuestro conocimiento este es el primer ejemplo en plantas en donde un componente regulado por el ciclo celular confina la competencia para responder a una señal de patrón al meristema. En animales existen pocos ejemplos de una conexión directa entre la progresión del ciclo celular y la capacidad de las células para responder a las rutas de transducción de señal. Por ejemplo, la capacidad de células precursoras vulvares C. elegans para responder a señales que median la selección entre destinos celulares vulvares se acopla a diferentes fases del ciclo celular (Wang and Sternberg, 1999).

Sin embargo, se puede utilizar la regulación de la estabilidad de proteína en sistemas de desarrollo ampliamente diferentes para regular la competencia.

La especificación describe el uso de una planta cdc27B caracterizada en que la modificación o imitación de los efectos relacionados con auxina se basa en la modulación de la estabilidad de proteínas reguladoras de señales de patrón.

La especificación describe el uso de una planta cdc27B en donde dicha modulación o imitación de los efectos relacionados con auxina resulta en destino celular alterado de una célula y/o formación de patrones alterados en una planta o célula de planta, por ejemplo un aumento en el número de meristemas de planta o un aumento en el tamaño de meristemas de planta que ocurren en forma natural.

Combinado con la división celular post-embriónica que disminuye esto se puede tomar para sugerir una función del gen HBT en la regulación del ciclo celular. No obstante, favorecemos la hipótesis que el gen HBT tiene una función más especializada que ha divergido de la función que las proteínas CDC27 de componentes APC sirven en la progresión del ciclo celular. Esta preferencia se basa en diversas observaciones. Primero, los embriones hbt pueden llevar numerosas rondas de división celular sin problemas severos, que sugiere que el APC Arabidopsis puede mediar la progresión del ciclo celular en la ausencia de la actividad de gen HBT. Segundo, la división celular disminuye solo cuando también existen diversos problemas de diferenciación celular, que resulta entre otros en la pérdida de identidad de ciertos tipos de células. Tercero, las mutaciones nuc2 en S. pombe resultan en una disminución de metafase. Aunque la división celular post-embriónica cesa en plántulas hbt esto no está acompañado por una disminución de metafase (Hirano et al., 1988, 1990). y finalmente, otros componentes APC con una estructura de proteína similar en Arabidopsis, AtCDC16, AtCDC23 y AtCDC27a todos muestran patrones de expresión similares. Sus transcritos están presentes en un alto nivel en todas las células divididas. En contraste, el gen HBT se expresa a un bajo nivel y se acumula solo en la transición G2/M. Sin embargo consideramos si los defectos provocados por mutaciones en el gen HBT se pueden deber al establecimiento de los objetivos APC no relacionados con la división celular.

Se han identificado los homólogos de Arabidopsis de componentes de la ruta proteolítica mediada por ubiquitina en la progresión del ciclo celular y la respuesta de auxina y mutaciones en los genes correspondientes que confieren un amplio rango de defectos de crecimiento, que muestran la función central de estos procesos en el desarrollo de planta.

El gen HOBBIT codifica un homólogo de un componente APC que parece conectar estos procesos al acoplar la competencia para responder a auxina a la progresión del ciclo celular. Esto es particularmente importante debido a que Hobbit, como un factor de competencia a través de la hormona de auxina, se restringe a la formación de patrones solo para dividir las células.

Esta invención está soportada por los siguientes datos experimentales.

Resultados experimentales

Mutantes hbt que exhiben diversos defectos de diferenciación celular en la etapa post-embriónica.

En un estudio previo, el primer defecto morfológico detectado en embriones mutantes hbt se muestra que es una interrupción de la orientación invariante de planos de división celular en una célula fundadora para el meristema de

raíz, la célula hipofísea (Willemsen et al., 1998). Esto conduce a defectos morfológicos en los tipos de células que surgen de esta célula fundadora; el centro inactivo y la columnela. Estos defectos morfológicos están acompañados por defectos de diferenciación, debido a que diversos marcadores que se expresan normalmente en estos tipos de células, no están expresados en plántulas hbt (Willemsen et al., 1998).

- 5 Esto se determina si los defectos de diferenciación celular se confinan en estos tipos de células distales, o si otras regiones de la raíz también tienen defectos de diferenciación. Por lo tanto, analizamos la actividad del promotor de gen SCARECROW (SCR), visualizado por una construcción que lleva el gen b-glucuronidasa (GUS) fusionado al promotor SCR, en el fondo de mutante hbt (ejemplo 3). EL gen SCR se expresa normalmente en la capa de tejido de suelo de regiones más próximas de la raíz y en la endodermis (Figura 4B). Como se ilustra en la Figura 4D, existe expresión SCR::GUS en la raíz de plántula hbt, pero solo en la parte distal. En la posición en donde estaría el centro inactivo de raíces tipo natural (demostrado por la construcción QC46::GUS en la figura 4 A), no existe tinción GUS en el fondo de mutante hbt (Figura 4 C). Por lo tanto concluimos que el defecto de diferenciación celular distal post-embriónico es específico de región, consistente con un requerimiento específico para la función del gen HBT en la diferenciación celular dentro del dominio distal del meristema de raíz.
- 10
- 15 Mientras que los defectos de raíz distal en el mutante hbt ocurren en la región con defectos embrionarios tempranos, otras regiones de la plántula desarrollan defectos de diferenciación celular post-embriónicamente. La estatura reducida de plántulas hbt sugiere que los defectos de expansión celular ocurren en los mutantes. Las inspección más cercana de los tamaños de células y formas de células en mutantes hbt revela de hecho las diferencia dramáticas con el tipo natural como se ve por ejemplo en la Figura 5, en donde la exploración de los EM muestran la superficie irregular de las hipocotiledóneas de plántulas hbt comparado con una plántula tipo natural. Las células mutantes tienen tamaño reducido y se hinchan. El meristema apical de brote (SAM) en mutantes hbt contiene un domo de células de forma irregular que se dividen inicialmente para dar una cantidad significativa de células de progenie. Aunque una zona central única da primordia de órgano cuando flanquea en SAM tipo natural, se inician primordia de órgano en posiciones variables en mutantes hbt y esta primordia frecuentemente falla en crecer para dar hojas. Después de inicio repetido de primordia de órgano aberrante, cesa la actividad SAM. En experimentos tempranos se prueba si el fenotipo mutante hbt se puede rescatar mediante tratamiento con diversas hormonas de planta. No se detecta dicho rescate (Willemsen et al., 1998), sin embargo se observa una re-especificación dramática de células epidérmicas en hipocotiledóneas de plántulas hbt que se tratan con etileno. En las hipocotiledóneas de estas plántulas hbt se induce un gran número de crecimientos ectotópicos, que son fuertemente similares a los capilares de raíz. Con plántulas germinadas en la oscuridad, se obtienen resultados similares.
- 20
- 25
- 30

- Los defectos en la regulación epidérmica del destino celular no solo se observan después de inducción (por ejemplo con etileno), pero la separación de los sitios tricoblasto y atricoblasto en archivos de células en la epidermis de raíz también se altera en los mutantes hbt. Una construcción que lleva el promotor del gen GLABRA2 (GL2), implicado en especificación de atricoblasto, fusionado al gen GUS (Masucci et al., 1996) se cruza en el alelo hbt2311 y en la progenie de este cruce muestra la actividad ectotópica en la epidermis de plántulas hbt. El GL2 codifica una proteína de homeodominio requerida para diferenciación de atricoblasto, y la expresión se restringe a aquellos archivos de células que contienen atricoblastos en la raíz tipo natural. Sin embargo, aunque el patrón de expresión es más o menos similar al patrón tipo natural, las células de capilares de raíz en mutantes hbt también muestran alta actividad del promotor GL2. Nuestros datos sugieren que el gen HBT se requiere para el mantenimiento de la elección de diferenciación celular en las células epidérmicas.
- 35
- 40

Aunque los defectos hbt durante embriogenia se confinan regionalmente, los fenotipos post-embriónicos en mutantes hbt son más diversos, que sugiere que HBT se requiere para diversos procesos de desarrollo.

El gen HBT complementa parcialmente los mutantes nuc2 de levadura.

- Para investigar si el HBT y AtCDC27a puede funcionar como un componente del APC, se clonan los cADN de longitud completa en un vector de levadura con un promotor represible tiamina y se transforman en una cepa S. pombe nuc2ts. El cADN HBT parcialmente rescata el fenotipo nuc2 en la temperatura restrictiva, restaurando en forma reproducible el crecimiento a aproximadamente 4 veces mayor densidad comparado con el control de vector vacío (figura 15). La complementación no se completa como índices de crecimiento y la densidad final son respectivamente 5 y 10 veces menor comparado con la temperatura permisiva (compare Figura 15A y 15B).
- 45
- 50 Concluimos que la proteína HBT tiene la capacidad de interactuar con y puede reemplazar el S. pombe nuc2 en el APC de levadura, consistente con su interacción propuesta con el complejo de planta de homólogo. En contraste, en la inducción de temperatura permisiva de expresión de gen AtCDC27a parece ser tóxico en S. pombe (Figura 15A).

Este resultado es una prueba indirecta que el HBT puede ser parte de un complejo APC en levadura.

El HOBBIT es parte del complejo APC en plantas.

La evidencia que cdc27B/HBT es parte del complejo APC en plantas o que es parte de un complejo similar que aún no se ha caracterizado, se genera por inmunoprecipitación y experimentos de coimmunoubicación. Estos experimentos se realizan con protocolos estándar (Sambrook and Russel, 2001) y con anticuerpos que reconocen específicamente la proteína Hobbit y proteínas del complejo APC. Con el fin de mejorar la detección de la proteína HBT en la coimmunoprecipitación, se utiliza una proteína HBT marcada con el epítipo y de acuerdo con lo anterior, un anticuerpo que reconoce específicamente este epítipo.

Los mutantes Hbt han alterado la fase S.

Como se demuestra en los experimentos del ejemplo 12 y en la figura 20, los inventores encuentran sorprendentemente que los mutantes hbt tienen un defecto en la fase S del ciclo celular. Las células de hipocotiledóneas del mutante hbt tienen un contenido nuclear mayor en los picos 2C y 4C (que corresponde de manera general a la fase G1 y G2 respectivamente) que las células tipo natural y no existe separación clara entre la etapa 2C y la etapa 4C como en las células WT. En esta transición las células parecen tener una variedad de la cantidad de ADN. Estos resultados demuestran claramente que los mutantes hbt tienen problemas con la progresión correcta de la fase S. Por lo tanto los inventores concluyen que el hbt se necesita para una terminación exitosa de la fase S, posiblemente a través de la función en el APC o un complejo similar a APC. Aparentemente la proteína HOBBIT cumple una función como un modulador de progresión de fase S. Este es el primer momento que se demuestra que el cdc27B/ HOBBIT está implicado en la replicación de ADN. Es sorprendente, que los inventores son capaces de demostrar un primer enlace entre la proteína cdc27B/HOBBIT y el APC.

Se conoce bien por la persona experta en la técnica que un contenido de ADN aumentado en células de planta puede ser una indicación para endoreduplicación. Esto ocurre cuando existe replicación de ADN sin mitosis sucesiva y etapa de citoquinasis. La endoreduplicación en semillas es particularmente interesante para la industria de la agrobiotecnología, debido a que es una forma de mejorar el contenido de semilla y por lo tanto calidad de semilla.

Análisis de expresión de gen HBT.

Para evaluar si la distribución del transcripto HBT proporciona claves en sus funciones diversas en el desarrollo, analizamos la distribución del mRNA HBT mediante hibridación in situ (ejemplos 4 y 7). Los transcriptos HBT se detectan en niveles similares en todos los órganos de la planta, también en el meristema de raíz, pero en cantidades más pequeñas.

En los experimentos de hibridación in situ, las sondas sintetizadas de diferentes regiones de cADN (véase ejemplo 7) dan resultados similares. Los datos mostrados en la figura 16 se obtienen de sondas que corresponden a la región 5', que contiene la secuencia única. Las sondas codificantes se toman a lo largo del control y esta señal no se detecta sobre el fondo. La distribución del transcripto HBT varía durante diferentes etapas de embriogenia y también entre las células dentro de un embrión (Figura 16A-D). Hasta la etapa triangular, solo una señal baja es detectable en la mayoría de células embrionarias. A partir del inicio de la etapa clave temprana el nivel de expresión es mayor en células particulares. La distribución puntiforme y estocástica de estas células con mayores niveles de mRNA HBT sugiere que la expresión se eleva en una fase específica del ciclo celular. La co-ubicación de los transcriptos HBT y AtCYCB2 en secciones únicas de embriones en etapa tardía revelan que ocurre acumulación de transcripto HBT pico en las mismas células que acumulan el mensaje AtCYCB2 (Figura 16J-L), que sugiere que la transcripción HBT alcanza niveles máximos de fase G2/M.

Debido a que la secuencia HBT muestra alta homología con AtCDC27, comparamos los patrones de expresión de ambos genes. La abundancia de mRNA AtCDC27 es altamente ubicua durante todas las etapas embrionarias (Figura 16G-I). Este patrón de expresión contrasta con el patrón puntiforme y bajo de HBT. El AtCDC16 exhibe niveles de transcripto ubicuos y altos similares (Figura 11).

También localizamos los transcriptos HBT y AtCDC27 en plántulas jóvenes. Las secciones de raíces que hibridan con HBT muestran de nuevo expresión puntiforme solo en las células activamente divididas (Figura 16M-O). Las hibridaciones in situ con la sonda HBT en otras partes de las plantas, tal como flores y sitios de inicio de raíz lateral que muestra resultados similares (datos no mostrados). Los niveles de transcripto AtCDC27 (Figura 12D, 16P-R) y AtCDC16 (Figura 12 C) son uniformemente altos en todas las células divididas.

En estirpes que segregan el alelo hbt fuerte 2311, no se observa diferencia en el nivel de expresión o patrón entre los embriones mutantes y tipo natural (compare Figura 16D y 6E) que sugiere que durante función HBT de embriogenia no se requiere para la regulación de su propia transcripción.

Sensibilidad de auxina de plántulas hbt

Aunque los experimentos tempranos revelan que las plántulas hbt pueden codificar la auxina (IAA; Willemsen et al., 1998), las pruebas estándar en este momento no pueden revelar cambios en la respuesta de auxina en mutantes hbt. Sin embargo, han emergido nuevos métodos para detectar las respuestas de auxina, por ejemplo con elementos de promotor de respuesta a auxina sintéticos que unen los factores de transcripción ARF, tal como DR5::GUS (Ulmasov et al., 1997). Debido a que también existe una semejanza del fenotipo de embrión temprano hbt a mutantes *axr6*, *bd1* y *mp* (Hardtke and Berleth, 1998; Hamann et al., 1999; Hobbie et al 2000), utilizamos la construcción DR5::GUS para volver a investigar las respuestas de auxina en plántulas hbt. En raíces de plántula tipo natural existe un máximo de tinción DR5::GUS en la parte superior de la columna (Figura 17A). Este pico está ausente en plántulas hbt (Figura 17F) en donde no es visible la tinción GUS. Debido a que la especificación de las células de columna es defectuoso en plántulas hbt, esperamos saber si las células mutantes hbt son capaces de codificar auxina. Por lo tanto, se incuban plántulas hbt durante 3 días en medio que contiene diferentes concentraciones de la auxina sintética 2,4 D, y se analiza la expresión DR5::GUS. En bajas concentraciones de 2,4 D aplicado (5.10-9 M hasta 5.10-8 M; Figura 17B y 17C) existe una expresión ectópica del promotor DR5::GUS en el meristema de las raíces tipo natural. En estas concentraciones no existe tinción observada en plántulas hbt (Figura 17G y H). Solo en una concentración de 5.10-7 M 2,4 D existe un pico DR5 en el polo de raíz de hbt, cuando la expresión en la raíz tipo natural ya es muy intensa y a través de la raíz completa (Figura 17D y 17I). A 5.10-6 M 2,4 D las tinciones DR5::GUS muestran una situación diferente. Aunque nunca observamos ninguna expresión ectópica DR5 en las hipocotiledóneas de plántulas tipo natural, las hipocotiledóneas hbt muestran una expresión DR5 fuerte (Figura 17E y 17J). La aplicación del ácido acético indol (IAA) con las mismas concentraciones da resultados similares. La expresión DR5::GUS en embriones hbt no muestra diferencias comparado con el tipo natural, tampoco después de inducción 2,4 D. Tomados juntos, estos datos sugieren que aunque las células en la plántula hbt pueden codificar la auxina, lo hacen con una eficiencia diferente. Por lo tanto es posible que el gen HBT tenga una función en la percepción de niveles auxina.

hbt y *axr31-T* muestra una interacción genética

Las mutaciones que estabilizan la proteína AXR3 exhiben especificación reducida de columna y baja pero actividad DR5::GUS correctamente localizada (Sabatini et al., 1999). En plántulas hbt la especificación de columna y actividad DR5::GUS también se reducen fuertemente o están ausentes, que sugiere que el AXR3 se puede estabilizar en el fondo de mutante hbt. Para investigar si estos defectos hbt requieren la proteína AXR3 funcional cruzamos el alelo *hbt2311* a un alelo de inserción de *axr3-1*, designado, *axr3-1 T* (ejemplo 10). Aunque este alelo es un alelo presuntamente nulo el transposón se inserta en el primer exón no tiene el fenotipo mutante. En la generación F2 de este cruce, las hipocotiledóneas de los dobles *hbt2311 axr3-1T* tienen una hipocotiledónea mayor comparado con el mutante *hbt2311* único (Figura 18A). Las mediciones de longitud celular epidérmica muestran que las diferencias en longitud de hipocotiledónea entre los mutantes dobles *hbt2311 axr3-1T* y los mutantes únicos *hbt2311* se deben a una elongación de célula aumentada (Figura 18C). Las hipocotiledóneas *axr3-1* mutantes muestran una elongación reducida solo cuando las plántulas se germinan en la oscuridad, provocado por una reducción en el tamaño de la célula (Leyser et al., 1996). Las hipocotiledóneas de plántula mutante única *hbt2311* y las hipocotiledóneas mutantes dobles *hbt2311 axr3-1T* germinados en la oscuridad, sin embargo no muestran una reducción, pero un aumento en la longitud de la hipocotiledónea (Figura 18B). De nuevo, este aumento en la longitud de la hipocotiledónea se debe a un aumento en el tamaño celular (Figura 18C). No se observan diferencias en los tamaños de hipocotiledóneas para el mutante único *axr3-1T*, ni para plántulas con genotipos heterocigotos (datos no mostrados). También observamos evidencia preliminar para el rescate del crecimiento de raíz y especificación del tipo celular de columna en mutantes dobles *hbt2311 axr3-1T* (datos no mostrados). Juntos, estos resultados muestran que el mutante *axr3-1* y el mutante hbt interactúan entre sí en un nivel genético, que restaura parcialmente los defectos de elongación observados para hipocotiledóneas hbt y probablemente diversos otros defectos. Por lo tanto postulamos que el HBT regula la estabilidad de la proteína AXR3.

Los mutantes HBT contienen mayores niveles de proteína ARX3

Los inventores muestran por primera vez existe de hecho una estabilización de la proteína ARX3 en mutantes hbt. Esto se muestra indirectamente por medio de tinción GUS (ejemplo 3, figura 7). Se hacen estudios adicionales con experimentos PT-PCR en plantas mutantes hbt y tipo natural (ejemplo 11). En la figura 19 A se demuestra que en los mutantes hbt el transcripto no se regula por aumento acertadamente comparado con el nivel de transcripto de ARX3 en el WT. Por el contrario, un nivel inferior del transcripto ARX3 se demuestra en el fondo de mutante hbt.

En un segundo experimento (figura 19B y ejemplo 11), el nivel de proteína ARX3 en la planta tipo natural y en tres mutantes hbt diferentes se revela por SDS-PAGE de extractos de planta seguido por Western blot e inmunotinción. Mientras que la planta tipo natural no se detecta la proteína ARX3, está presente una señal clara ARX3 en todos los extractos de los mutantes hbt.

En un tercer experimento (figura 19C, ejemplo 11) se demuestra que la proteína reconocida por el suero anti ARX3 es de hecho la proteína ARX3 correcta. Esto se prueba por el hecho que la señal de ARX3 de los mutantes hbt se puede eliminar de nuevo al cruzar los mutantes con la planta *axr3GT3958*. Esta planta tiene una mutación en el gen

ARX3 y no tiene expresión de la proteína ARX3. En estas plantas cruzadas, no se puede detectar o se detecta poca proteína ARX3 con el antisuero ARX3 (figura 19C).

Identificación de otros objetivos de HOBBIT

5 Por medio de los proteómicos, que comparan el perfil de proteína de plantas *Arbadospis* tipo natural y los mutantes hbt, se pueden identificar manchas de proteína en geles 2-D que difieren entre el tipo natural y el mutante mediante su presencia/ausencia o mediante su intensidad. Estos posibles objetivos se caracterizan adicionalmente mediante espectrofotometría.

10 También se realiza un experimento de dos híbridos, utilizando cdc27B/HOBBIT como una proteína de cebo con el fin de identificar otros objetivos o interactuar con proteínas de HOBBIT. Adicionalmente, también los alelos mutantes hbt se utilizan en la detección de Dos Híbridos con el fin de mapear los dominios funcionales de la proteína HOBBIT y para identificar las regiones en las proteínas en donde los patrones que interactúan de HOBBIT se unen.

15 Sin estar limitado por la teoría o modo de acción, se puede prever fácilmente que el gen HOBBIT/HBT/AtCDC27B que regula el desarrollo de la planta de la invención está implicado en la modulación del destino celular y/o la regulación del patrón de célula en tejidos meristemáticos. Esta declaración se basa en las aberraciones fenotípicas de plántulas *A. thaliana* de mutante hbt y combinación de estos datos con el patrón de expresión irregular del gen HBT y la estabilización de la proteína de fusión AXR3-GUS.

20 Más específicamente, aunque el HBT se expresa probablemente en una forma dependiente del ciclo celular, la modulación del destino celular y/o patrón a través de HBT probablemente se basa en la modulación de los objetivos regulados del ciclo no celular o señal tal como AXR3. Sin embargo, las decisiones de destino celular y/o la formación de los patrones de células se toman probablemente en células divididas. Como tal, las plantas pueden restringir la modulación del destino celular y/o la regulación de la formación de patrones celular para tejidos meristemáticos.

25 Adicionalmente, y de nuevo sin estar limitado por ninguna teoría o modo de acción, la observación de mutaciones en el gen HOBBIT/HBT/AtCDC27B que afecta la estabilidad de las proteínas de control de ciclo celular, como se ejemplifica mediante la estabilización de CYCB1-GUS, es indicador de una función de HOBBIT/HBT/AtCDC27B en la regulación del ciclo celular. El patrón irregular inesperado de la expresión de gen HOBBIT señala adicionalmente una función especializada de HOBBIT en la regulación del ciclo celular.

Otra teoría o modo de acción para el gen HOBBIT/HBT/AtCDC27B, de nuevo sin estar limitado por esto, se relaciona con la estabilización de la proteína de fusión AXR3-GUS. Esta observación destaca la función de HOBBIT en mediar los efectos relacionados con auxina.

30 La especificación describe el uso de cdc27B para modificar el destino celular y/o la formación de patrones y/o desarrollo de planta y/o morfología de planta y/o bioquímica de planta y/o fisiología de planta que comprende la modificación de expresión en células particulares, preferiblemente células cíclicas, en particular dominios, tejidos o órganos de una planta, preferiblemente que comprende células cíclicas, de una secuencia genética que codifica una proteína que regula el desarrollo de la planta, preferiblemente una proteína que regula el desarrollo de la planta se codifica por un ácido nucleico de la invención vinculado funcionalmente a una secuencia promotora operable de planta.

40 Cuando se hace referencia aquí a "el uso de cdc27B" significa el uso de una proteína cdc27B así como también el uso de un que codifica cdc27B. El término proteína cdc27B contempla claramente aquí cualquier homólogo, derivado, fragmento funcional o fragmento inmunológicamente activo de una proteína cdc27B. Adicionalmente en realizaciones particulares, cdc27b es cdc27B de planta. En una realización adicional de la invención, la proteína que regula el desarrollo de la planta es una proteína HOBBIT/ HBT/CDC27B de acuerdo con la invención, tal como por ejemplo, la proteína *A. thaliana* HOBBIT/HBT/AtCOC27B. También se describe un homólogo biológicamente activo o derivado del mismo. La presente especificación contempla claramente el uso de homólogos funcionales de proteína que regula el desarrollo de la plantas de acuerdo con la presente invención. De acuerdo con lo anterior, la presente invención no está limitada en aplicación al uso de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína *A. thaliana* que regula el desarrollo de la planta. Se puede esperar que los genes y proteínas similares a una definido aquí como *A. thaliana* están presentes en otras especies de planta y se pueden aislar por medio de técnicas conocidas en el arte. También mutantes de eliminación, que carecen de uno o más aminoácidos comparado con la secuencia de aminoácidos como se define en la presente solicitud, se consideran como homólogos. Estos genes similares también están dentro del alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones.

Por lo tanto el uso de cdc27B como se indica aquí se puede lograr mediante la modificación del nivel expresión de un gen cdc27B en una célula por ejemplo mediante expresión ectópica, la regulación por disminución de la expresión, que controla la secuencia endógena etc.

Alternativamente el uso de cdc27B como se indica aquí se puede lograr al influenciar el nivel de actividad de proteína en la célula por ejemplo mediante la administración de la proteína cdc27B, al utilizar agentes de bloqueo cdc27B etc.

La modulación de la expresión en una planta de una proteína que regula el desarrollo de la planta o un homólogo o derivado del mismo como se define en la especificación actual tal como una proteína cdc27B puede producir un rango de fenotipos deseables en plantas, tal como, por ejemplo, al modificar una o más características de desarrollo, morfológicas, bioquímicas, o fisiológicas que incluyen: (i) modificar la longitud del G1 y/o S y/o G2 y/o la fase M del ciclo celular de una planta; (ii) modificar la fase G1/S y/o S/G2 y/o G2/M y/o M/G1 de transición de una célula de planta; (iii) modificar el inicio, promoción, estimulación o mejora de la división celular; (iv) modificar el inicio, promoción, estimulación o mejora de replicación de ADN; (v) modificación del tamaño de célula; (vi) modificar el inicio, promoción, estimulación o mejora de semilla y/o tamaño de semilla y/o desarrollo de semilla; (vii) modificar el inicio, promoción, estimulación o mejora de formación de tubérculos; (viii) modificación del número de tubérculos; (ix) modificar el inicio, promoción, estimulación o mejora de la formación de frutos; (x) modificar el número de frutos; (xi) modificar el inicio, promoción, estimulación o mejora de formación de hojas; (xii) modificar el número de hojas; (xiii) modificar el inicio, promoción, estimulación o mejora de inicio y/o desarrollo de brotes; (xiv) modificar el inicio, promoción, estimulación o mejora de inicio y/o desarrollo de raíz; (xv) modificar el inicio, promoción, estimulación o mejora del inicio y/o desarrollo de raíz lateral; (xvi) modificar el inicio, promoción, estimulación o mejora de formación de flores; (xvii) modificar el momento del florecimiento; (xviii) modificar del número de flores; (xix) modificar el inicio, promoción, estimulación o mejora de formación de nódulo y/o función de nódulo; (xx) modificar el inicio, promoción, estimulación o mejora de la frondosidad de la planta; (xxi) modificar el inicio, promoción, estimulación o mejora de enanismo en la planta; (xxii) modificar el inicio, promoción, estimulación o mejora de senescencia; (xxiii) modificar el espesor del tallo y/o las características de resistencia y/o resistencia del tallo al viento y/o longitud del tallo; (xxiv) modificar la tolerancia y/o resistencia al estrés biótico tal como infección por patógenos; (xxv) modificación la tolerancia y/o resistencia al estrés abiótico tal como estrés de sequía o estrés por salinidad; (xxvi) imitar o modificar las respuestas relacionadas con auxina; (xxvii) modular las respuestas trópicas de las plantas; (xxviii) modular la vascularización de las plantas, órganos de planta o tejidos de planta; (xxix) modificar la respuesta de evasión de tono.

Una persona experta en la técnica reconocerá que las auxinas están implicadas entre otros en la formación de patrones. De acuerdo con lo anterior, en otro ejemplo el efecto relacionado con auxina define el destino celular y/o la formación de patrones.

La presente invención también se relaciona con un método para la producción de plantas transgénicas, células de planta o tejidos de planta que comprende la introducción de una molécula de ácido nucleico de la invención en un formato que se puede expresar o un vector como se definió anteriormente en dicha planta, célula de planta o tejido de planta. Se hace referencia al ejemplo 5 y otras partes de la descripción para la descripción del formato que se puede expresar del gen y vector.

Los métodos para efectuar la expresión de una proteína que regula el desarrollo de la planta tal como la proteína cdc27B de planta, o un homólogo o derivado de la misma como se describe en la especificación actual en una célula de planta, tejido u órgano, incluye la introducción de la proteína directamente dentro de dicha célula, tejido u órgano tal como mediante microinyección de medios balísticos o, alternativamente, la introducción estable de una molécula de ácido nucleico aislado que codifica dicha proteína en un formato que se puede expresar dentro del genoma de una célula de planta. Por lo tanto, dicho ácido nucleico se puede ligar funcionalmente a una o más secuencias de control o se puede integrar en un vector de acuerdo con la invención y/o se puede integrar establemente dentro del genoma de una célula de planta.

Los métodos para efectuar la expresión de una proteína que regula el desarrollo de la planta tal como la proteína cdc27B de planta, o un homólogo o derivado de la misma como se define en la especificación actual en plantas completas incluyen la regeneración de las plantas completas de dichas células transformadas en las que se introduce una molécula de ácido nucleico aislado que codifica dicha proteína en un formato que se puede expresar.

La invención también se relaciona con células de planta y plantas que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos o vectores de la presente invención.

Adicionalmente, la presente invención se extiende claramente a cualquier célula de planta o planta producida por cualquiera de los métodos descritos aquí, y a todas las partes de planta y propágulos de los mismos como se define en las reivindicaciones. La presente invención se extiende adicionalmente para abarcar la progenie derivada de una célula primaria transformada o transfectada, tejido, órgano o planta completa que se ha producido por cualquiera de dichos métodos, el único requerimiento es que dicha progenie exhiba las mismas características genotípicas y/o genotípicas como aquellas características que se han producido en el progenitor mediante el desempeño de cualquiera de dichos métodos. La invención también se extiende a partes cosechables de una planta, como se reivindica tal como pero no limitado a semillas, hojas, frutos, cultivos de tallo, rizomas, tubérculos y bulbos.

La especificación comprende métodos para imitar o modular las respuestas relacionadas con auxina mediante el uso de cdc27B. Dentro del alcance de la especificación está el uso de cdc27b para conectar la progresión del ciclo celular y las señales de patrones, más particularmente la competencia para responder a auxina. Sin embargo la especificación comprende el uso de un componente regulado con el ciclo celular, preferiblemente cdc27B, para confinar la competencia para responder a la señal de patrón en el meristema. De acuerdo con lo anterior, el uso de cdc27B es la expresión modificada en células particulares, preferiblemente en células cíclicas, en particular dominios, tejidos o órganos de una planta, preferiblemente que comprende células cíclicas, de un gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen o un homólogo o derivado de la misma como se define en la especificación, ligado a un promotor específico de célula, específico de tejido o un promotor operable de planta específico de órgano. La ventaja de imitar o modular las respuestas relacionadas con auxina por medio de la expresión modificada de dicho gen que regula el desarrollo de la planta o el producto de gen comprende el hecho que imitar o modular la respuesta relacionada con auxina se puede limitar a las células, preferiblemente células cíclicas, en las que se expresa dicho gen o producto de gen. Esto no es verdadero en el caso de aplicación de auxina tópica que provoca los efectos pleiotrópicos debido al transporte de auxina posterior a través de la planta en la dirección basal.

Imitar un efecto relacionado con auxina, significa llevar a cabo un efecto que se puede establecer por auxina. Imitar los efectos relacionados con auxina puede tener lugar en la presencia o ausencia de auxina. Imitar los efectos relacionados con auxina también puede significar modular la competencia de las células que no pueden responder normalmente a auxina, preferiblemente se utiliza para aumentar esta competencia.

La especificación describe adicionalmente la modulación o imitación de un efecto relacionado con auxina se basa en la modulación de la estabilidad de las proteínas reguladoras de señales de patrón. Estas señales de patrón incluyen hormonas de planta tal como auxina, etileno y otras. Más particularmente, depende de la modulación de los reguladores de auxina o incluso más, la modulación de la estabilidad de la clase AUX/IAA de los reguladores transcripcionales de auxina. Adicionalmente, depende de la estabilidad de la proteína reguladora ARX3. Este tipo de proteínas se degradan en una fase particular del ciclo celular, tal como la fase de transición G2-M.

La auxina es una hormona de planta pleiotrópica y por lo tanto el resultado de modular o imitar los efectos relacionados con auxina se ejemplifica, pero no se limita a los siguientes ejemplos. Para otros efectos relacionados con auxina se hace referencia a la literatura científica en el campo y conocida por la persona experta en la técnica.

Una serie de ejemplos de la especificación actual prevé la expresión ectópica de un gen HOBBIT que regula el desarrollo de la planta, por ejemplo un gen de planta cdc27b, por ejemplo como se define en cualquiera de las SEQ ID NOs 1 a 3 o el producto de gen como se define en SEQ ID NO 8 o 9 o un homólogo o derivado del mismo como se define supra en células particulares o específicas, dominios, tejidos o órganos de meristemas de planta que se espere mejore la competencia de dichas células, dominios, tejidos o órganos para responder a señales que definen el destino celular y/o la formación de patrones. La formación de tejidos o órganos novedosos y/o una disposición novedosa (con relación a plantas que exhiben patrones de expresión de gen natural HBT) por lo tanto puede ser el resultado. Ejemplos ilustrativos incluyen alterar el número de flores y la disposición floral como el resultado de la incorporación de células no divididas en el meristema y/o la formación de patrones; alterar los patrones de ramificación de tallo al cambiar el tamaño del grupo celular competente para el crecimiento local; o alterar los patrones de ramificación de raíz al cambiar la distribución y el tamaño de primordia de raíz lateral. Adicionalmente se puede prever que la expresión ectópica de un gen HOBBIT (por ejemplo el gen de planta cdc27) a través del ciclo celular, y así no se restringe en la expresión específica del ciclo celular natural, mejorará adicionalmente las decisiones del destino celular y las respuestas de patrón. Los requerimientos de los promotores operables de planta para lograr las realizaciones mencionadas adelante se pueden determinar fácilmente por el artesano experto quién también será capaz de seleccionar un promotor operable de planta adecuado. Una lista no exhaustiva ilustrativa de promotores operables de planta que posiblemente se puede utilizar se incluye adicionalmente en la presente invención.

La especificación describe un método para alterar, preferiblemente aumenta, el tamaño de meristemas de planta que ocurren en forma natural mediante la expresión ectópica del gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen, tal como un gen cdc27B o producto de gen (o proteína), o un homólogo o derivado del mismo como se define en la descripción. En este caso, los promotores adecuados para controlar la expresión de dicho gen que regula el desarrollo de la planta o el producto de gen incluyen por ejemplo un promotor específico meristema o un promotor activo en célula periférica a dicho meristema. Como resultado de esto, el número de órganos emanado y/o el índice de emanación de órgano de dicho meristema se puede modificar, preferiblemente aumenta. La presente especificación así también describe un método para modificar, preferiblemente aumentar, el número de órganos y/o el índice de emanación de órgano del meristema de planta mediante la expresión ectópica de un gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen o un homólogo o derivado de la misma como se define en la descripción. De nuevo, dicho gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen se puede unir funcionalmente a los promotores tal como de un meristema de promotor específico o un promotor activo en células periféricas para dicho meristema.

Se describe adicionalmente un método para aumentar el número de meristemas de planta mediante expresión ectópica, preferiblemente en células cíclicas, de un gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen o un homólogo o derivado de la misma como se describe bajo el control de un promotor constitutivo, específico de célula, específico de tejido, específico de órgano o promotor operable de planta inducible. Los órganos ectópicos preferiblemente emergerán de células cíclicas.

Como resultado de esto, se puede inducir la formación de órgano ectópico partiendo de todas las partes de planta en el caso de un promotor constitutivo, o de dicha célula, tejido u órgano en donde dicho promotor operable o en una forma aleatorio en el caso de utilizar un promotor operable de planta inducible.

Las aplicaciones útiles de dichos métodos incluyen el aumento del número de flores en una planta que es un rasgo deseable en por ejemplo plantas ornamentales u hortalizas, por ejemplo para aumentar la eficiencia de la producción de flores de corte o para crear variedades de flor abundantes. Una distribución más favorable de flores a lo largo del eje apical-basal de la planta también se puede efectuar. El tiempo de florecimiento acortado en el caso por ejemplo producción de flor de corte puede mejorar adicionalmente la productividad como más rondas de cosecha se permiten en una estación de cultivo única. El aumento del número de flores también puede encontrar su uso en la agricultura como el número de flores y la producción de semilla se correlacionan. El tiempo de florecimiento acortado puede aumentar adicionalmente la producción de semilla al permitir más series de cosecha durante una única estación de siembra.

Otras aplicaciones útiles de dichos métodos incluyen aumentar el número de hojas que es un rasgo particularmente deseado en la producción de por ejemplo forraje o cultivos forrajeros, los cultivos producidos para ser ensilados o de cultivos de leguminosas. El aumento del número de hojas de pastos es deseable para tierras de pasto así como también para céspedes.

La especificación describe el uso de una planta cdc27 para modular o imitar los efectos relacionados con auxina en una planta o célula de planta en donde dicha modulación o imitación resulta en una modificación de, por ejemplo un aumento, en el número de órganos o tejidos, y/o modificación del índice de emanación de órgano o tejido de un meristema de plantas, y/o una modificación de la disposición de órganos y/o tejidos en una planta. Todavía otras aplicaciones útiles de dichos métodos incluyen la activación de meristemas y/o el aumento del número de meristemas que forma por ejemplo frutos, tubérculos o bulbos o la activación de meristemas que forman por ejemplo remolacha, nabo, rábano etc. Sin embargo se pueden obtener más bulbos o tubérculos o frutos más grandes, remolacha, nabos o rábano etc. La especificación actual así claramente también describe un método para aumentar la producción de planta mediante expresión ectópica, preferiblemente en células cíclicas, del gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen o un homólogo o derivado de la misma como se describe en la especificación, ligado a un promotor operable de planta. La producción se define por lo tanto como la cantidad de órganos producidos que incluyen semillas, hojas, bulbos, tubérculos, remolacha, nabos o rábano etc.

Por lo tanto, la especificación describe el uso de una planta cdc27B para imitar o modular los efectos relacionados con auxina que resulta en un aumento de producción de la planta.

La activación de lateral del meristema de raíz y/o el aumento del número de lateral del meristema de raíz bajo condiciones de por ejemplo privación de nutrientes puede ayudar a una planta a explorar activamente el suelo para nuevas fuentes de nutrientes. La especificación describe también un método para mejorar el índice de supervivencia de las plantas bajo condiciones limitantes de nutrientes mediante expresión ectópica, preferiblemente en células cíclicas, de un gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen o a homólogo o derivado del mismo como se describe. Preferiblemente se selecciona un promotor expresable de raíz, preferiblemente inducible por limitación de nutrientes, para lograr dicho índice de supervivencia mejorado.

Otras respuestas relacionadas con auxina incluyen respuestas trópicas tal como gravitropismo y fototropismo. Mejorar la respuesta gravitropica puede ayudar a una planta en dirigir la penetración profunda de sus raíces en el suelo en la búsqueda de agua, por ejemplo bajo condiciones de sequía. Mejorar la respuesta fototrópica puede ayudar a una planta en por ejemplo la emergencia temprana de la plántula por encima del suelo bajo condiciones de luz baja o en por ejemplo re-establecimiento rápido de la capacidad fotosintética al exhibir las hojas por encima de la superficie acuosa de los campos flotantes. Sin embargo se describen métodos para mejorar el índice de supervivencia de las plantas bajo condiciones de sequía mediante expresión ectópica, preferiblemente en células cíclicas, de un gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen o un homólogo o derivado de la misma como se describe y para mejorar la emergencia de plántulas mediante la expresión ectópica de un gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen o un homólogo o derivado de la misma como se describe. Los promotores inducibles de luz o sequía, respectivamente, son buenos candidatos para ser ligados funcionalmente a dicho gen de regulación de desarrollo de planta o producto de gen.

La especificación describe el uso de una planta cdc27B para imitar o modular los efectos relacionados con auxina que resulta en un índice de supervivencia aumentado de plantas, por ejemplo bajo condiciones de sequía.

La formación de raíz inducida por auxina frecuentemente se utiliza en la regeneración de plantas transgénicas también se puede imitar o mejorar mediante una presión ectópica a tiempo, preferiblemente en células cíclicas, de un gen de regulación de desarrollo de planta o producto de gen como se describe. Se describe aquí un método para imitar o mejorar la regeneración de raíz en protocolos de cultivo de tejido mediante expresión ectópica, preferiblemente en células cíclicas, de un gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen o un homólogo o derivado de la misma como se describe en la especificación en la ausencia o presencia, respectivamente, de una fuente exógena de auxina.

La especificación también describe el uso de una planta *cdc27B* para imitar o modular los efectos relacionados con auxina que resulta en la imitación de generación de raíz en plantas.

Otras respuestas relacionadas con auxina incluyen la respuesta de evasión de tono. Los efectos de tono de dosel incluyen conjunto reducido de semillas, desarrollo truncado de frutos y germinabilidad de semilla reducida. La auxina se ha implementado en el establecimiento de respuesta de evasión de tono (Morelli and Ruberti 2000, y referencias citadas allí). Se puede prever un método con el cual la respuesta de evasión de tono se mejora mediante la expresión ectópica, preferiblemente en células cíclicas, de un gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen o un homólogo o derivado de la misma como se describe en la especificación. Preferiblemente, se utiliza un promotor inducible de luz roja lejana (FR) para permitir dicho método e incluso más preferiblemente, un promotor inducido por cambios en la relación de luz roja a FR (R), por ejemplo el promotor del gen *Arabidopsis Athb-2* homeosecuencia (Carabelli et al. 1996).

La especificación describe el uso de una planta *cdc27B* para imitar o modular los efectos relacionados con auxina que resulta en una respuesta de evasión de tono aumentada.

Todavía otra respuesta relacionada con auxina incluye el establecimiento de hebras vasculares continuas basales de fuentes auxina (por ejemplo Worley et al. 2000 y referencias citadas allí). La imitación de efectos de auxina en por ejemplo una forma aleatoria o al aumentar el número de meristemas que inician ramas en por ejemplo tallos de árbol puede establecer un sistema vascular completo. Dichos tallos son de interés para por ejemplo carpinteros para la producción artesanal de muebles que contienen tablas de madera o estantes que muestran el patrón vascular exclusivo. Dichos tallos también son de interés para propósitos de recubrimiento. El establecimiento de una nueva vasculatura es por supuesto también imperativo para el desarrollo apropiado de cualquier nuevo órgano descrito. Sin embargo, se describe un método para la alteración, preferiblemente la estimulación, de la formación de hebras vascular y patrón mediante expresión ectópica, preferiblemente en células cíclicas, de un gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen tal como una planta *cdc27b* gene o producto de gen, o un homólogo o derivado de la misma como se describe.

Otra respuesta relacionada con auxina se relaciona con la producción de frutos partenocárpicos. Las plantas de tabaco, berenjena y tomate que expresan el IAA (ácido indol acético, la auxina de planta principal) del gen biosintético *iaaM* de *Pseudomonas syringae* pv *savastanoi* de hecho produce frutos partenocárpicos comercializables (Ficcadenti et al. 1999, Rotino et al. 1997). Por lo tanto, también se describe un método para producir frutos partenocárpicos mediante expresión ectópica, preferiblemente en células cíclicas, utilizando un gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen, tal como una planta *cdc27b*, o un homólogo o derivado de la misma como se define en la especificación.

Será claro para el artesano experto que muchos, si no todos, de los métodos descritos anteriormente se benefician de y se mejoran mediante la función de HBT en el ciclo celular. Por lo tanto se describe el uso de *cdc27b* en la regulación del ciclo celular. Debido a que se demuestra por los inventores que el gen *HOBbit* participa en un complejo como APC, se describe el uso de *cdc27B* para modular la actividad de un complejo como APC. Con un complejo como Apc significa un complejo de proteína, funcional en una cierta etapa del ciclo celular (por ejemplo en la transición G1/S y/o G2/M) que se involucra en el etiquetado de las proteínas (es decir las proteínas de ciclo celular o proteínas de no ciclo celular) para la degradación de la proteína. El complejo APC se sabe que es activo en ambas fases de transición y está implicado en la degradación de las proteínas de ciclo celular como ciclina B. La expresión de gen HBT muestra un pico en la transición G2/M y la proteína también está implicada en la estabilidad de proteínas de no ciclo celular. Por lo tanto como se describe, el ciclo celular se regula por *cdc27B* en la transición de fase G2/M. A partir de sus datos experimentales, los inventores pueden concluir que *HOBbit* está implicado en la progresión correcta de la fase S del ciclo celular y por lo tanto se describe el uso de *cdc27B* para modular la replicación de ADN. Adicionalmente, se sabe que se reconoce por el artesano que la replicación mejorada de ADN sin mitosis consecuente y citoquinesis puede resultar en endoreduplicación. La mitosis se puede bloquear al prolongar la vida útil de las proteínas de ciclo celular como ciclina B. El uso de *cdc27b* para modular la endoreduplicación en una planta se describe aquí. Finalmente, cuando la replicación de ADN se bloquea en tejidos específicos, por ejemplo en los gamatocitos una persona experta en la técnica puede inducir esterilidad en plantas. De acuerdo con lo anterior, se describe el uso de *cdc27B* para modular, por ejemplo inducir esterilidad en plantas.

- Al afectar negativamente la vida útil de por ejemplo ciclinas mitóticas tal como ciclina B1, es claro que por lo menos la transición de la fase M a una fase G1 posterior se acorta. Sin embargo, el índice de división celular se afecta positivamente mediante expresión HBT ectópica que contribuye, como se mencionó, a muchos de los métodos descritos supra. De acuerdo con lo anterior, la especificación describe un método para mejorar o aumentar el ciclo celular o el índice de división celular mediante expresión ectópica, preferiblemente en células cíclicas, de un gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen, por ejemplo un gen de planta cdc27B o producto de gen, o un homólogo o derivado de la misma como se describe. La mejora o aumento del ciclo celular significa empujar las células en el ciclo celular o aumentar la población de células que se dividen.
- 5 Cuando se afecta la actividad del meristema apical por ejemplo es posible efectuar una reducción en el número de órganos laterales que emanan de dicho meristema y/o reducir el índice de formación de órgano lateral.
- 10 Por lo tanto, la especificación describe el uso de una planta cdc27B para la regulación del ciclo celular que resulta en una activación o alteración, por ejemplo un aumento en el tamaño, de meristemas de planta que ocurren en forma natural, o que resulta en un aumento en el número de órganos o tejidos, y/o modificación del índice de emanación de órgano o tejido del meristema, y/o una modificación de la disposición de órganos, y/o tejidos en una planta.
- 15 Las aplicaciones útiles incluyen la creación de variedades de planta enanas. Otra aplicación se relaciona con la abrogación de por ejemplo adaptabilidad de meristema de brote lateral de tomate. Como resultado no se forman brotes adventicios y no se requiere más poda manual.
- 20 Sin embargo, se describe un método para reducir la adaptabilidad o actividad de meristemas de planta naturales mediante la regulación por disminución de la expresión, preferiblemente en células cíclicas, de un gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen, tal como un gen de planta cdc27B o producto de gen, o un homólogo o derivado de la misma como se describe o mediante expresión ectópica, preferiblemente en células cíclicas, de mutantes de dicho gen de regulación de desarrollo de planta o producto de gen. Ejemplos de dichos mutantes se describen en la invención y sus secuencias se representan en la SEQ ID NOs 10 a 23 (secuencias de ácidos nucleicos) y SEQ ID NOs 24 a 30 (secuencia de aminoácidos).
- 25 El fenotipo de hinchazón de células epidérmicas en plántulas *A. thaliana* de mutante hbt también se puede explotar. Los tejidos de planta o órganos que consiste de pocas células grandes tienen la ventaja de que contiene menos material de pared celular que un tejido de planta u órgano del mismo tamaño pero que consiste de más células pequeñas. Esto tiene la ventaja potencial de aumentar la digestibilidad de dichos tejidos de planta u órganos que consiste de dichas células grandes. Una expresión deteriorada en el tiempo, preferiblemente en células cíclicas, del gen HBT o producto de gen o una expresión ectópica a tiempo, preferiblemente en células cíclicas, de un gen mutante hbt o producto de gen así puede resultar en por ejemplo hojas o frutos de tamaño normal pero con células grandes con dichas hojas o frutos que exhiben una digestibilidad mejorada. También se presenta un método para aumentar el tamaño de células de planta en un tejido u órgano y así para mejorar la digestibilidad de dicho tejido de planta u órgano mediante la regulación por disminución de la expresión, preferiblemente en células cíclicas, de un gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen, tal como un gen de planta cdc27b o producto de gen, o un homólogo o derivado de la misma como se describe.
- 30 o mediante expresión ectópica, preferiblemente en células cíclicas, de mutantes de dicho gen de regulación de desarrollo de planta o producto de gen de acuerdo con la descripción.
- 35 Una serie de patógenos de planta explotan la maquinaria de ciclo celular del anfitrión que resulta en crecimiento neoplásico inducido por patógeno visible como por ejemplo agallas. Los tejidos de planta nuevamente formados frecuentemente se requieren para la supervivencia del patógeno y provocan en muchos casos problemas con el comercio de plantas infectadas o partes de las mismas tal como frutos o flores. Dichos patógenos incluyen bacterias patógenas de planta que incluyen *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodococcus fascians*, *Pseudomonas syringae* pv *savastanoi*, *Xanthomonas campestris* pv *citri* y *Erwinia herbicola*, hongos patógenos de plantas que incluyen *Plasmodiophora brassicae*, *Crinipellis perniciosus*, *Pucciniastrum geopertianum*, *Taphrina wiesneri*, *Ustilago maydis*, *Exobasidium vaccinii*, *E. camelliae*, *Entorrhiza casparyana* y *Apiosporina morbosum* e insectos que inducen agallas patógenas de plantas que incluyen los ácaros *Mayetiola poae*. La tolerancia del anfitrión o resistencia contra el ataque por dichos patógenos se puede aumentar al reprimir el crecimiento neoplásico inducido por patógeno. Debido a su función en la regulación del ciclo celular y la señalización de auxina, la abrogación de la función HBT durante el ataque por patógenos puede contribuir a la represión del crecimiento de planta neoplásica y sin embargo con el establecimiento de resistencia de patógeno aumentada.
- 40 Se describe un método para aumentar la resistencia de una planta contra el crecimiento de planta neoplásico inducido por patógenos mediante la regulación por disminución de la expresión, preferiblemente en células cíclicas, de un gen que regula el desarrollo de la planta o producto de gen, tal como un gen de planta cdc27b o producto de gen, o un homólogo o derivado de la misma como se describe o mediante la expresión ectópica, preferiblemente en
- 45
- 50
- 55

células cíclicas, de mutantes de dicho gen de regulación de desarrollo de planta o producto de gen como se describe.

La presente invención es aplicable a cualquier planta, en particular plantas monocotiledóneas y plantas dicotiledóneas que incluyen un forraje o legumbre forrajera, planta ornamental, cultivo de alimento, árbol, o arbusto seleccionado de la lista que comprende *Acacia* spp., *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Aesculus* spp., *Agathis australis*, *Albizia amara*, *Alsophila tricolor*, *yropogon* spp., *Arachis* spp, *Areca catechu*, *Astelia fragrans*, *Astragalus cicer*, *Baikiaea plurijuga*, *Betula* spp., *Brassica* spp., *Bruguiera gymnorrhiza*, *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*, *Coronillia varia*, *Cotoneaster serotina*, *Crataegus* spp., *Cucumis* spp., *Cupressus* spp., *Cyathea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Cryptomeria japonica*, *Cymbopogon* spp., *Cynthea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Dalbergia monetaria*, *Davellia divaricata*, *Desmodium* spp., *Dicksonia squarosa*, *Diheteropogon amplexens*, *Dioclea* spp, *Dolichos* spp., *Dorycnium rectum*, *Echinochloa pyramidalis*, *Ehrartia* spp., *Eleusine coracana*, *Eragrestis* spp., *Erythrina* spp., *Eucalyptus* spp., *Euclea schimperi*, *Eulalia villosa*, *Fagopyrum* spp., *Feijoa sellowiana*, *Fragaria* spp., *Flemingia* spp, *Freyinetia banksii*, *Geranium thunbergii*, *Ginkgo biloba*, *Glycine javanica*, *Gliricidia* spp, *Gossypium hirsutum*, *Grevillea* spp., *Guibourtia coleosperma*, *Hedysarum* spp., *Hemarthia altissima*, *Heteropogon contortus*, *Hordeum vulgare*, *Hyparrhenia rufa*, *Hypericum erectum*, *Hyperthelia dissoluta*, *Indigo incarnata*, *Iris* spp., *Leptarrhena pyrolifolia*, *Lespediza* spp., *Lettuca* spp., *Leucaena leucocephala*, *Loudestia simplex*, *Lotonus bainesii*, *Lotus* spp., *Macrotyloma 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 squarrosa*, *Populus* spp., *Prosopis cineraria*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pterolobium stellatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Rhaphiolepis umbellata*, *Rhopalostylis 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*, *Stylosanthos humilis*, *Tadehagi* spp, *Taxodium distichum*, *Themeda triandra*, *Trifolium* spp., *Triticum* spp., *Tsuga heterophylla*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp. *Vitis vinifera*, *Watsonia pyramidata*, *Zantedeschia aethiopica*, *Zea mays*, *amaranto*, *alcachofa*, *espárrago*, *brócoli*, *col*, *repollo*, *canola*, *zanahoria*, *coliflor*, *apio*, *col rizada*, *lenteja*, *colza*, *quimbombó*, *cebolla*, *papa*, *arroz*, *soja*, *paja*, *remolacha azucarera*, *caña de azúcar*, *girasol*, *tomate*, *calabaza*, y *té*, entre otros, o las semillas de cualquier planta denominada específicamente anteriormente o un tejido, célula u órgano de cultivo de cualquiera de las especies anteriores.

Se describe un método para identificar y obtener agonistas de una proteína que regulan el desarrollo de la planta o un homólogo o derivado de la misma como se define en la actualidad.

Preferiblemente dichos agonistas son compuestos químicos que pueden encontrar usos como por ejemplo reguladores de crecimiento de plantas o herbicidas. Se expresan los métodos para identificar dichos compuestos que incluyen la adición de dichos compuestos en un sistema de dos híbridos de levadura en donde dicha proteína que regula el desarrollo de la planta y una proteína que interactúa con dicha proteína que regula el desarrollo de la planta como se identifica utilizando un método de la especificación actual. Otro dicho método comprende el uso de por ejemplo el aparato BIACore (Pharmacia) para medición en tiempo real de interacción de cualquiera de dichos compuestos con dicha proteína que regula el desarrollo de la planta o con dicha proteína que regula el desarrollo de la planta complejo con una proteína que interactúa con dicha proteína que regula el desarrollo de la planta como se identifica utilizando un método de la especificación actual.

Dichos agonistas son patrones de proteína capaz de interactuar con dicha proteína que regula el desarrollo de la planta. Como se describe supra, los métodos para identificar dichas proteínas que incluyen por ejemplo un sistema de dos híbridos e inmunoprecipitación.

Por lo tanto, la presente especificación describe un método para identificar y obtener proteínas que interactúan con una proteína que regula el desarrollo de la planta que comprende un ensayo de detección de dos híbridos en donde se utilizan un polipéptido de acuerdo con la invención como un cebo y una colección de cADN de planta como presa.

Adicionalmente, la presente especificación describe un método para modular la interacción entre una proteína que regula el desarrollo de la planta de la invención, tal como la proteína cdc27B de planta, e interactuar los patrones de proteína que se pueden obtener mediante un método como se define.

Un método para identificar y obtener compuestos que interactúan con una proteína que regula el desarrollo de la planta como se describe comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar un sistema de dos híbridos de levadura en donde se expresan un polipéptido de la invención y una proteína que interactúa con dicha proteína que regula el desarrollo de la planta, o una proteína que interactúa se puede obtener mediante el método descrito anteriormente,

b) interactuar dicho compuesto con el complejo formado mediante los polipéptidos expresados como se define en a),

5 c) detectar un segundo complejo, en donde la presencia de dicho segundo complejo identifica un compuesto que se une específicamente a uno de dicho polipéptidos o a dicho segundo complejo, y,

d) identificar el compuesto.

10 Un método para identificar y obtener compuestos que interactúan con una proteína que regula el desarrollo de la planta, tal como una planta *cdc27b* que comprende medición en tiempo real de interacción de dicho compuesto con dicha proteína que regula el desarrollo de la planta o el complejo formado por dicha proteína que regula el desarrollo de la planta y una proteína que interactúa con este, dicha proteína que interactúa opcionalmente se puede obtener mediante el método descrito anteriormente.

También se describe un método para identificar compuestos o mezclas de compuestos que se unen específicamente a un polipéptido de la invención como se definió anteriormente, que comprende:

15 a) combinar un polipéptido de la invención con dicho compuesto o mezclas de compuestos bajo condiciones adecuadas para permitir la formación del complejo,

b) detectar la formación del complejo, en donde la presencia de un complejo identificado, o es indicador de una molécula que se une específicamente a dicho polipéptido, y

c) identificar el compuesto.

20 Como tal, la especificación también describe el uso de una molécula identificada por medio de un método como se describió anteriormente como una planta regulador de crecimiento o herbicida.

En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, una proteína que regula el desarrollo de la planta es una proteína *cdc27B* de planta, preferiblemente la proteína *A.thaliana AtCD27B*, o un homólogo biológicamente activo o derivado del mismo.

25 También se describe un método para la producción de un regulador de crecimiento de planta o composición herbicida que comprende las etapas de los métodos descritos anteriormente y formular los compuestos obtenidos de dichas etapa en una forma adecuada para aplicación en agricultura o célula de planta o cultivo de tejido.

30 La especificación describe el uso de cualquiera de los ácidos nucleicos o moléculas de ácido nucleico, los vectores, los polipéptidos o los anticuerpos de la invención para modificar destino celular, para modificar la formación de patrones, para modificar desarrollo de planta y/o para modificar la morfología de planta y/o para modificar la fisiología de la planta y/o para modificar la bioquímica de la planta.

La especificación también describe una composición diagnóstica que comprende por lo menos un ácido nucleico o molécula de ácido nucleico, un vector, un polipéptido o un anticuerpo de la invención.

35 Diversos otros asuntos que se relacionan con la función del gen *HBT* también se describen. Más elementos del fenotipo mutante *hbt*, diferente a los descritos aquí, se rescatan mediante estabilidad aumentada de la proteína *AXR3*, a pesar del rescate de elongación de hipocotiledóneas parciales. Las células de las plántulas *hbt* tienen forma irregular y muchos se transfieren. Mediante el cruce de la planta con actividad *hbt* alterada con otras plantas, una llega a ser una planta con características deseadas y la forma deseada de la célula. Por ejemplo las hipocotiledóneas de los mutantes dobles *axr3-1T hbt* tienen una forma más regular. El rescate parcial del crecimiento de raíz se acompaña por la presencia de gránulos de almidón y un pico de auxina en las células de columna de la punta de raíz. También el *HBT* tiene funciones relacionadas con auxina en la planta madura. En mutantes *hbt* es difícil determinar estas funciones debido a que el desarrollo se disminuye en la etapa de plántula en mutantes *hbt*. Se sabe de los estudios de mutante, esta auxina es importante pero con funciones aún pobremente definidas, por ejemplo, desarrollo de flores. Las mutaciones en los genes implicados en el transporte de auxina polar, tal como *PIN1*, resulta entre otros en el desarrollo de inflorescencias sin envoltura, con forma de pin (Galweiler et al., 1998). El mutante *hbt* exhibe diversos ciclos celulares y defectos de diferenciación celular.

Los efectos que deciden porqué los planes de división se alteran en el grupo de raíz futuro del embrión también se describe. También se describe el efecto que hace que se detenga la división celular en la plántula *hbt*. También se

describe efecto que decide la expresión que regula el ciclo celular de HBT y que relaciona la expresión en los procesos mencionados anteriormente. Los efectos que deciden porqué la diferenciación celular, los defectos se restringen a áreas específicas en la plántula hbt también se describe.

Definiciones y elaboraciones para las realizaciones

5 Los términos "proteínas", "péptidos" o "oligopéptidos", cuando se utilizan aquí se refiere a aminoácidos en una forma polimérica de cualquier longitud. Dichos términos también incluyen modificaciones de aminoácido conocidas tal como formación de enlace disulfuro, cisteinilación, oxidación, glutationilación, metilación, acetilación, farnesilación, biotinilación, estearoilación, formilación, adición de ácido lipóico, fosforilación, sulfación, ubiquinación, miristoilación, palmitoilación, geranilgeranilación, ciclización (por ejemplo formación de ácido piroglutámico), oxidación, desamidación, deshidratación, glucosilación (por ejemplo pentosas, hexosaminas, N-acetilhexosaminas, deoxihexosas, hexosas, ácido siálico etc.), acilación y radiomarcas (por ejemplo ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^3H) así como también residuos de aminoácido que ocurren en forma no natural, residuos de L-aminoácido y residuos de D-aminoácido.

15 "Homólogos" de una proteína de la invención son aquellos péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que contienen sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de aminoácido con relación a 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 resultante. Por ejemplo, un homólogo de dicha proteína consistirá de una variante de secuencia de aminoácidos bioactiva de dicha proteína. Para producir dichos homólogos, los aminoácidos presentes en dicha proteína se pueden reemplazar por otros aminoácidos que tienen propiedades similares, por ejemplo hidrofobicidad, hidrofili-
20 dad, momento hidrófobo, antigenicidad, propensión a formar o romper las estructuras helicoidales α o estructuras de lámina β , y así sucesivamente. Una revisión de las propiedades físicas y químicas de aminoácidos se da en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades de aminoácidos que ocurren en forma natural.

Propiedades de carga / hidrofobicidad	Grupo lateral	Aminoácido
hidrófobo no polar	alifático alifático, que contiene S aromático imino	ala, ile, leu, val met phe, trp pro
polar no cargado	alifático amida aromático hidroxilo sulfhidrilo	gly asn. gin tyr ser, thr cys
cargado positivamente	básico	arg, his, lys
cargado negativamente	ácido	asp, gly

25 Las variantes sustitucionales de una proteína de la invención son aquellas en las que por lo menos un residuo en dicha secuencia de aminoácidos de proteína se ha retirado y se inserta un residuo diferente insertado en su lugar. Las sustituciones de aminoácidos son normalmente de residuos únicos, pero se pueden agrupar dependiendo de restricciones funcionales puestas en el polipéptido; las inserciones usualmente serán del orden de aproximadamente 1-10 residuos de aminoácido, y las eliminaciones variarán de aproximadamente 1-20 residuos. Preferiblemente, las
30 sustituciones de aminoácido comprenderán sustituciones de aminoácido conservadoras, tal como aquellas descritas supra.

Las variantes de inserción de la secuencia de aminoácidos de una proteína de la invención son aquellas en las que uno o más residuos de aminoácido se introducen en un sitio predeterminado en dicha proteína. Las inserciones pueden comprender las fusiones del terminal amino y/o de terminal carboxi así como también inserciones intra-
35 secuencia de aminoácidos únicos o múltiples. De manera general, las inserciones dentro de la secuencia de

aminoácidos serán más pequeñas que las fusiones de terminal amino o carboxilo, del orden de aproximadamente 1 a 10 residuos. Ejemplos de proteínas o péptidos de fusión de terminal amino o carboxi incluyen el dominio de unión o el dominio de activación del activador transcripcional como se utiliza en el sistema de dos híbridos de levadura, proteínas de cubrimiento de fago, etiqueta (histidina)₆, glutatióna S-transferasa, proteína A, proteína de unión a maltosa, reductasa dihidrofolato, epítipo Tag•100 (EETARFQPGYRS), epítipo c-myc (EQKLISEEDL), epítipo FLAG® (DYKDDDK), lacZ, CMP (péptido de unión a calmodulina), epítipo HA (YPYDVPDYA), epítipo de proteína C (EDQVDPRLIDGK) y epítipo VSV (YTDIEMNRLGK).

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

Las variantes de aminoácido de una proteína de la invención se pueden hacer fácilmente utilizando técnicas sintéticas de péptido bien conocidas en el arte, tal como síntesis de péptido de fase sólida y similares, o mediante manipulaciones de ADN recombinante. La manipulación de las secuencias de ADN para producir proteínas variantes que se manifiestan como variantes de sustitución, de inserción o de eliminación se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, las técnicas para elaborar las mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en ADN que tiene la secuencia conocida se conocen bien por aquellos expertos en el arte, tal como mediante mutagenia M13, equipo de mutagenia in vitro de Gen T7 (USB, Cleveland, OH), equipo de mutagenia Dirigida a Sitio QuickChange (Stratagene, San Diego, CA), mutagenia dirigida a sitio mediada por PCR u otros protocolos de mutagenia dirigida a sitio. Otra alternativa para manipular las secuencias de ADN para producir proteínas variantes, que se manifiestan como variantes de sustitución, de inserción o de eliminación comprenden modificación de gen in vivo objetivo que se puede lograr mediante oligonucleótidos de ARN/ADN quimérico como se describe mediante por ejemplo Palmgren (1997), Trends Genet. 13, 348 y Yoon et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 2071-2076.

"Derivados" de una proteína de la invención son aquellos péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que comprenden por lo menos aproximadamente cinco residuos de aminoácido contiguos de dicho polipéptido pero que retienen la actividad biológica de dicha proteína. Un "derivado" puede comprender adicionalmente residuos de aminoácido que se presentan en forma natural adicionales, glucosilados alterados, que se presentan en forma no natural o acilados comparado con la secuencia de aminoácidos de una forma que se presenta en forma natural de dicho polipéptido. Alternativamente o adicionalmente, un derivado puede comprender uno o más sustituyentes de no aminoácido comparado con la secuencia de aminoácidos de una forma que se presenta en forma natural de dicho polipéptido, por ejemplo una molécula indicadora u otro ligando, unido covalentemente o no covalentemente a la secuencia de aminoácidos tal como, por ejemplo, una molécula indicadora que se une a la misma para facilitar su detección.

Con "inmunológicamente activo" significa que una molécula o fragmentos específicos de los mismos tal como epítopos o haptenos se reconocen por, es decir se unen a los anticuerpos.

En el contexto de la presente invención se incorporan homólogos, derivados y/o fragmentos inmunológicamente activos de cualquier HOBbit de la invención o proteínas mutantes HOBbit como se define supra.

"Anticuerpos" incluyen anticuerpos monoclonales, policlonales, sintéticos o de cadena pesada así como también fragmentos de anticuerpos tal como fragmentos Fab, Fv o scFv. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante las técnicas como se describe en por ejemplo Liddle and Cryer (1991) que comprenden la fusión de células de mieloma de ratón en células de bazo derivadas de animales inmunizados. Adicionalmente, los anticuerpos o fragmentos de los mismos en una molécula o fragmentos de los mismos se pueden obtener al utilizar los métodos como se describe en por ejemplo Harlow and Lane (1988). En el caso de anticuerpos dirigidos contra péptidos pequeños tal como fragmentos de una proteína de la invención, dichos péptidos se acoplan de manera general a una proteína portadora antes de la inmunización de los animales. Dichos portadores de proteína incluyen hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA), ovalbúmina y Tétano toxoide. La proteína portadora mejora la respuesta inmune del animal y proporciona epítopos para sitios de unión del receptor de célula T. El término "anticuerpos" adicionalmente incluye derivados de los mismos tal como anticuerpos marcados. Las marcas de anticuerpo incluyen fosfatasa alcalina, PKH2, PKH26, PKH67, fluoresceína (FITC), Hoechst 33258, R-ficoeritrina (PE), rodamina (TRITC), Quantum Red, Texas Red, Cy3, biotina, agarosa, peroxidasa, esferas doradas y radiomarcas (por ejemplo ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P ³H). Las herramientas en biología molecular se basan en anticuerpos contra una proteína que incluye análisis de transferencia de gel de proteína, detección de colecciones de expresión que permiten identificación de genes, métodos cuantitativos de proteína que incluyen ELISA y, RIA, purificación de inmunoafinidad de proteínas, inmunoprecipitación de proteínas (por ejemplo Magyar et al. 1997) e inmunoubicación (por ejemplo Terras et al. 1995). Otros usos de anticuerpos y especialmente de anticuerpos de péptido incluyen el estudio de procesamiento proteolítico (Loffler et al. 1994, Woulfe et al. 1994), la determinación de los sitios activos de proteína (Lerner 1982), el estudio de precursor y procesamiento post-traducciona (Baron and Baltimore 1982, Lerner et al. 1981, Semler et al. 1982), identificación de los dominios de proteína implicados en las interacciones de proteína-proteína (Murakami et al. 1992) y el estudio de uso de exones en expresión de genes (Tamura et al. 1991).

Se incorporan en la presente invención anticuerpos que reconocen un HOBbit o proteína u homólogo mutante HOBbit, derivado o fragmento del mismo como se define supra.

Los términos "genes", "polinucleótidos", "secuencia de ácidos nucleicos", "secuencia de nucleótidos", "secuencia de ADN" o "molécula de ácido nucleico", cuando se utilizan aquí se refiere a nucleótidos, ribonucleótidos o desoxiribonucleótidos o una combinación de ambos, en una forma polimérica de cualquier longitud. Dichos términos incluyen adicionalmente ADN y ARN de hebra sencilla o de hebra doble. Dichos términos también incluyen modificaciones de nucleótidos conocidas tal como metilación, ciclización y 'caps' y sustitución de uno o más de los nucleótidos que se presentan en forma natural con un análogo tal como inosina. Las modificaciones de nucleótidos incluyen la adición de acridina, amina, biotina, cascada azul, colesterol, Cy3®, Cy5®, Cy5.5® Dabcilo, digoxigenina, dinitrofenilo, Edans, 6-FAM, fluoresceína, 3'-glicerilo, HEX, IRD-700, IRD-800, JOE, psoralen fosfato, rodamina, ROX, tiol (SH), separadores, TAMRA, TET, AMCA-S®, SE, BODIPY®, Marina Blue®, Pacific Blue®, Oregon Green®, Rhodamine Green®, Rhodamine Red®, Rhodol Green® y Texas Red®. Las modificaciones de la estructura principal de polinucleótido incluyen metilfosfonato, ARN de 2'-OMe-metilfosfonato, fosforotiorato, ARN, ARN 2'-OMe. Las modificaciones base incluyen 2-amino-dA, 2-aminopurina, 3'-(ddA), 3'dA(cordicepina), 7-deaza-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-IdC, 5-Me-dC, 5-F-dC, carboxi-dT, dA convertible, dC convertible, dG convertible, dT convertible, dU convertible, 7-deaza-dG, 8-Br-dG, 8-oxo-dG, O6-Me-dG, S6-DNP-dG, 4-metil-indol, 5-nitroindol, 2'-OMe-inosina, 2'-dl, O6-fenildl, 4-metil-indol, 2'-desoxinebularina, 5-nitroindol, 2-aminopurina, dP(análogo purina), dK (análogo 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-I-dU, O4-triazol dU y radiomarcas (por ejemplo ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³H). Dichos términos también abarcan ácidos nucleicos de péptido (PNA), un análogo de ADN en el que la estructura principal es un pseudopéptido que consiste de unidades N-(2-aminoetil)-glicina a diferencia de azúcar. Los PNA imitan el comportamiento del ADN y unen las hebras de ácido nucleico complementarias. La estructura principal neutra de PNA resulta en unión más fuerte y especificidad mayor de lo que se logra normalmente. Adicionalmente, las propiedades químicas únicas, físicas y biológicas de PNA se han explotado para producir herramientas biomoleculares poderosas, agentes anticodificantes y antígeno, sondas moleculares y biosensores.

Una "secuencia codificante" o "marco de lectura abierto" o "ORF" se define como una secuencia de nucleótidos que se puede transcribir en mRNA y/o se traduce en un polipéptido cuando se pone bajo el control de las secuencias reguladoras apropiadas, es decir cuando dicha secuencia codificante u ORF está presente en un formato que se puede expresar. Dicha secuencia codificante de ORF se une mediante un codón de inicio de traducción 5' y un codón de parada de traducción 3'. Una secuencia codificante o ORF puede incluir, pero no se limita a ARN, mRNA, cADN, secuencia de nucleótidos recombinante, secuencia de nucleótidos fabricado sintéticamente o ADN genómico. Dicha secuencia codificante u ORF se puede interrumpir al intervenir las secuencias de ácidos nucleicos. Los genes y secuencias codificantes que codifican esencialmente la misma proteína pero se aísla de diferentes fuentes pueden consistir de secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente divergentes. Recíprocamente, las secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente divergentes se pueden diseñar para efectuar la expresión de esencialmente la misma proteína. Dichas secuencias de ácidos nucleicos son el resultado de por ejemplo la existencia de diferentes alelos de un gen dado, de la degeneración del código genético o de diferencias en el uso de codón. Sin embargo, como se indica en la Tabla 2, los aminoácidos tal como metionina y triptofan se codifican por un codón único mientras que otros aminoácidos tal como arginina, leucina y serina se pueden traducir cada uno de hasta seis diferentes codones. Las diferencias en el uso preferido de codón se ilustran adelante para *Agrobacterium tumefaciens* (una bacteria), *A. thaliana*, *M. sativa* (dos plantas dicotiledóneas) y *Oryza sativa* (una planta monocotiledónea). Estos ejemplos se extraen de (<http://www.kazusa.or.jp/codon>). Para dar un ejemplo, el codón GGC (para glicina) es el codón más frecuentemente utilizado en *A. tumefaciens* (36.2 %), es el segundo codón más frecuentemente utilizado en *O. sativa* pero se utiliza en frecuencias mucho menores en *A. thaliana* y *M. sativa* (9 % y 8.4 %, respectivamente). De los cuatro codones posibles que codifican glicina. (véase Tabla 6), dicho codón GGC se utiliza más preferiblemente en *A. tumefaciens* y *O. sativa*. Sin embargo, en *A. thaliana* este es el codón GGA (y GGU) mientras que en *M. sativa* este es el codón GGU (y GGA).

"Hibridación" es el proceso en donde la secuencia de nucleótidos complementaria sustancialmente homóloga para hibridar entre sí. El proceso de hibridación puede ocurrir completamente en la solución, es decir ácidos nucleicos complementarios están en la solución. Las herramientas en la biología molecular se basan en dichos procesos que incluyen la reacción de cadena polimerasa (PCR; y todos los métodos basados en esto), hibridación sustractiva, extensión del cebador aleatorio, mapeo de nucleasa S1, extensión de cebador, transcripción inversa, síntesis de cADN, exhibición diferencial de ARN, y determinación de la secuencia de ADN. El proceso de hibridación también puede ocurrir con uno de los ácidos nucleicos complementarios inmovilizados en una matriz tal como glóbulos magnéticos, glóbulos de Sefarosa o cualquier otra resina. Las herramientas en la biología molecular que se basan en dicho proceso incluyen el aislamiento de mRNA poli (A+). El proceso de hibridación adicionalmente puede ocurrir con uno de los ácidos nucleicos complementarios inmovilizados en un soporte sólido tal como una nitrocelulosa o membrana de nylon o se inmovilizan mediante por ejemplo fotolitografía para por ejemplo un soporte de vidrio síliceo (el último conocido como disposiciones o microdisposiciones de ácido nucleico o como chips de ácido nucleico). Las herramientas en la biología molecular que se basan en dicho proceso incluyen análisis de transferencia de gel de ARN o ADN, hibridación de colonia, hibridación de placa, hibridación in situ y hibridación de microdisposición. Con el

- fin de permitir que ocurra hibridación, las moléculas de ácido nucleico son de manera general térmicamente o químicamente desnaturizadas para fundir una hebra doble en dos hebras sencillas y/o para retirar horquillas u otras estructuras secundarias de ácidos nucleicos de hebra sencilla. La exigencia de hibridación se influencia por condiciones tal como temperatura, concentración de sal y composición de regulador de hibridación. Las condiciones de alta exigencia para hibridación incluyen alta temperatura y/o baja concentración de sal (las sales incluyen NaCl y citrato Na₃) y/o la inclusión de formamida en el regulador de hibridación y/o disminuir la concentración de compuestos tal como SDS (detergente) en el regulador de hibridación y/o exclusión de compuestos tal como sulfato de dextrano o polietilenglicol (que promueve la aglomeración molecular) del regulador de hibridación. Las condiciones de hibridación convencionales se describen en por ejemplo Sambrook et al. (1989) pero el experto apreciará que numerosas condiciones de hibridación diferentes se pueden diseñar en función de la homología esperada o conocida y/o la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos. Se prefieren particularmente condiciones de hibridación de suficiente baja exigencia para aislar los ácidos nucleicos heterólogos a las secuencias de ADN de la invención definido supra. Los elementos que contribuyen a dicha heterología incluyen alelismo, degeneración del código genético y diferencias en el uso preferido de codón como se discute supra.
- La descripción es el uso de las secuencias de ADN de la invención que codifican un HOBBIT o proteína mutante HOBBIT, homólogo, derivado y/o fragmento inmunológico del mismo como se define en cualquier método de hibridación. Se describen adicionalmente secuencias de ADN que hibridan a dichas secuencias de ADN de la invención. Las secuencias de ADN como se define en la presente invención se pueden interrumpir mediante las secuencias que intervienen. Con "secuencias que intervienen" significa cualquier secuencia de ácidos nucleicos que interrumpe una secuencia codificante que comprende dicha secuencia de ADN de la invención o que interrumpe el formato que se puede expresar de una secuencia de ADN que comprende dicha secuencia de ADN de la invención. El retiro de la secuencia que interviene restaura dicha secuencia codificante o dicho formato que se puede expresar. Ejemplos de las secuencias que intervienen incluyen intrones, las secuencias movilizables de ADN tal como transposones y etiquetas de ADN tal como por ejemplo un T-ADN. Con "secuencia de ADN móvil" significa cualquier secuencia de ADN que se puede movilizar como el resultado de un evento de recombinación.

Tabla 2. Degeneración del código genético.

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra	Codones posibles					
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	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				

(continuación)

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra	Codones posibles					
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Triptofan	Trp	W	UGG					
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU				
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Triptofan	Trp	W	UGG					
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU				
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
			Codones posibles de "PARADA"					
			UAA	UAG	UGA			

5 Para efectuar la expresión de una proteína en una célula, tejido u órgano, preferiblemente de origen de planta, la proteína se puede introducir directamente a dicha célula, tal como mediante microinyección o medios balísticos o alternativamente, una molécula de ácido nucleico aislado que codifica dicha proteína se puede introducir dentro de dicha célula, tejido u órgano en un formato que se puede expresar.

10 Preferiblemente, la secuencia de ADN de la invención comprende una secuencia codificante o marco de lectura abierto (ORF) que codifica un HOBbit o proteína mutante HOBbit o un homólogo o derivado de la misma o un activo inmunológico del mismo como se define supra. La proteína preferida de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de dicho HOBbit o proteína mutante HOBbit.

15 Con "vector" o "secuencia de vector" significa una secuencia de ADN que se puede introducir en un organismo mediante transformación y se puede mantener establemente en dicho organismo. Es posible el mantenimiento del vector en por ejemplo cultivos de *Escherichia coli*, *A. tumefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*. Otros vectores tal como fagémidos y vectores cósmidos se pueden mantener y multiplicar en bacterias y/o virus. Las secuencias de vector comprenden de manera general un conjunto de sitios únicos reconocidos por enzimas de restricción, múltiples sitios de clonación (MCS), en donde se puede insertar una o más secuencias de no vector.

Con "secuencia de no vector" de acuerdo con lo anterior significa una secuencia de ADN que se integra en uno o más de los sitios de MCS están comprendidos dentro de un vector.

20 "Vectores de expresión" forman un subconjunto de vectores que, por virtud de comprender las secuencias reguladoras apropiadas que permite la creación de un formato que se puede expresar de la secuencia de no vector insertada, permitiendo así la expresión de la proteína se codifica por dichas secuencias de no vector. Los vectores de expresión se conocen en la técnica que permite la expresión de la proteína en organismos que incluyen bacterias (por ejemplo *E. coli*, hongos (por ejemplo *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastoris*), células de insecto (por ejemplo vectores de expresión de baculovirus), células de animal (por ejemplo células COS o CHO) y células de planta (por ejemplo vectores de expresión con base en X de virus de papa, véase por ejemplo Vance et al. 1998 -WO9844097).

La especificación actual describe cualquier vector o vector de expresión que comprende una secuencia de ADN de no vector que codifica un HOBbit o proteína mutante HOBbit, homólogo, derivado y/o fragmento inmunológicamente activo del mismo como se define supra.

Como una alternativa para la producción de proteína mediada por el vector de expresión en sistemas biológicos, se puede aplicar síntesis de proteína química. Los péptidos sintéticos se pueden fabricar en fase de solución o en fase sólida. La síntesis de péptido de fase sólida (Merrifield 1963) es, sin embargo, la forma más común e implica la adición secuencial de los aminoácidos para crear una cadena de péptido lineal. La síntesis de péptido de fase sólida incluye ciclos que consisten de tres etapas: (i) inmovilización del aminoácido de terminal carboxi de la cadena de péptido de cultivo en un soporte sólido o resina; (ii) ensamble de cadena, un proceso que consiste de activación, acoplamiento y desprotección del aminoácido que se va a agregar a la cadena de péptido de cultivo; y (iii) división que incluye el retiro de la cadena de péptido completa de la resina y el retiro de los grupos protectores de las cadenas laterales de aminoácido. Los métodos comunes en la síntesis de péptido de fase sólida incluyen Fmoc/tBu (9-fluorenilmetiloxycarbonyl/ t-butil) y Boc (t-butiloxycarbonyl) como los grupos protectores de terminal amino de aminoácidos. Los grupos protectores de cadena lateral de aminoácido incluyen metilo (Me), formilo (CHO), etilo (Et), acetilo (Ac), t-butilo (t-Bu), anisilo, bencilo (Bzl), trifluoroacetilo (Tfa), N-hidroxisuccinimida (ONSu, OSu), benzoilo (Bz), 4-metilbenzilo (Meb), tioanizilo, tiocresilo, benciloximetilo (Bom), 4-nitrofenilo (ONp), benciloxycarbonilo (Z), 2-nitrobenzoilo (NBz), 2-nitrofenilsulfenilo (Nps), 4-toluenosulfonilo (Tosyl, Tos), pentafluorofenilo (Pfp), difenilmetilo (Dpm), 2-clorobenciloxycarbonilo (Cl-Z), 2,4,5-triclorofenilo, 2-bromobenciloxycarbonilo (Br-Z), trifenilmetilo (Tritilo, Trt), y 2,5,7,8-pentametil-croman- 6-sulfonilo (Pmc). Durante el ensamble de cadena, se retiran Fmoc o Boc que resulta en un terminal amino activado del residuo de aminoácido unido a la cadena de cultivo. El terminal carboxi del aminoácido que ingresa se activa mediante conversión en un éster altamente reactivo, por ejemplo mediante HBTU. Con las tecnologías actuales (por ejemplo sintetizador PerSeptive Biosystems 9050, Sintetizador de Péptido Applied Biosystems Modelo 431A), se pueden fabricar péptidos lineales de hasta 50 residuos. Está disponible una serie de directrices para producir péptidos que son adecuados para uso en sistemas biológicos que incluyen (i) limitar el uso de aminoácidos difíciles tal como cys, met, trp (fácilmente oxidado y/o degradado durante la síntesis del péptido) o arg; (ii) minimizar los aminoácidos hidrófobos (puede deteriorar la solubilidad del péptido); y (iii) evitar un ácido glutámico de terminal amino (puede ciclizar a piroglutamato).

"Formato que se puede expresar" significa que la molécula de ácido nucleico aislada está en una forma adecuada para ser transcrito en mRNA y/o ser traducido para producir una proteína, constitutivamente o luego de inducción por una señal intracelular o extracelular, tal como un estímulo ambiental o estrés (mitógenos, anoxia, hipoxia, temperatura, sal, luz, deshidratación, etc.) o un compuesto químico tal como IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosida) o tal como un antibiótico (tetraciclina, ampicilina, rifampicina, canamicina), hormona (por ejemplo gibberelina, auxina, citoquinina, glucocorticoide, brassinosteroides, etileno, ácido abscísico etc.), análogo de hormona (ácido yodoacético (IAA), 2,4-D, etc.), metal (zinc, cobre, hierro, etc.), o dexametasona, entre otros. Como se conocerá por aquellos expertos en la técnica, la expresión de una proteína funcional también puede requerir una o más modificaciones post-traduccionales, tal como glucosilación, fosforilación, desfosforilación, o una o más interacciones de proteína-proteína, entre otros. Todos dichos procesos se incluyen dentro del alcance del término "formato que se puede expresar".

Preferiblemente, la expresión de una proteína en una célula específica, tejido, u órgano, preferiblemente de origen de planta, se efectúa al introducir y expresar una molécula de ácido nucleico aislado que codifica dicha proteína, tal como una molécula de cADN, gen genómico, molécula sintética de oligonucleótido, molécula de mRNA o marco de lectura abierto, a dicha célula, tejido u órgano, en donde dicha molécula de ácido nucleico se pone funcionalmente en conexión con secuencias reguladoras adecuadas que incluyen un promotor, preferiblemente un promotor expresable de planta, y una secuencia terminadora.

La referencia aquí a un "promotor" se toma en su contexto más amplio e incluye las secuencias reguladoras transcripcionales derivadas de un gen genómico eucariótico clásico, que incluye la secuencia TATA que se requiere para el inicio exacto de transcripción, con o sin una secuencia CCAAT y elementos reguladores adicionales (es decir secuencias activantes en la dirección 5', mejoradores e inactivadores) que alteran la expresión de gen en respuesta al estímulo de desarrollo y/o externo, o en una forma específica de tejido.

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

El término "promotor" también se utiliza para describir una molécula de fusión o sintética, o derivado que confiere, activa o mejora 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 mejorar adicionalmente la expresión y/o alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal de una molécula de ácido nucleico a la que se conecta funcionalmente. Dichos elementos reguladores se pueden poner adyacentes a una secuencia promotora heteróloga para dirigir la expresión de una molécula de ácido nucleico en respuesta a por

- ejemplo cobre, glucocorticoides, dexametasona, tetraciclinas, gibberelina, cAMP, ácido abscísico, auxina, heridas, etileno, jasmonato o ácido salicílico o para conferir la expresión de una molécula de ácido nucleico a células específicas, tejidos o órganos tal como meristemas, hojas, raíces, embriones, flores, semillas o frutos. En el contexto de la presente invención, el promotor preferiblemente es una secuencia promotora expresable de planta. Los
- 5 promotores, sin embargo, que también funcionan o funcionan únicamente en células de no planta tal como bacterias, células de levadura, células de insecto y células de animal no se excluyen de la invención. "Expresable de planta" significa que la secuencia promotora, que incluye cualesquiera elementos reguladores adicionales agregados o contenidos allí, es por lo menos capaz de inducir, conferir, activar o mejorar la expresión en una célula de planta, tejido u órgano, preferiblemente células de plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas, tejido, u órgano.
- 10 Los términos "operable de planta" y "operable en una planta" cuando se utilizan aquí, con respecto a una secuencia promotora, se debe tomar que es equivalente a una secuencia promotora expresable de planta.
- En el presente contexto, una "secuencia de promotor regulable" es un promotor que es capaz de conferir expresión en un gen estructural en una célula particular, tejido, u órgano o grupo de células, tejidos o órganos de una planta, opcionalmente bajo condiciones específicas, sin embargo no confiere de manera general expresión a través de la
- 15 planta bajo todas las condiciones. De acuerdo con lo anterior, una secuencia de promotor regulable puede ser una secuencia de promotor que confiere expresión en un gen al que se conecta funcionalmente en una ubicación particular dentro de la planta o alternativamente, a través de la planta bajo un conjunto específico de condiciones, tal como luego de inducción de expresión de gen mediante un compuesto químico u otro inductor.
- Preferiblemente, el promotor regulable utilizado en el desempeño de la presente invención confiere expresión en una
- 20 ubicación específica dentro de la planta, constitutivamente o luego de inducción, sin embargo no en la planta completa bajo cualesquiera circunstancias. Se incluyen dentro del alcance de dichos promotores secuencias promotoras específicas de célula, secuencias promotoras específicas de tejido, secuencias promotoras específicas de órgano, secuencias promotores de gen específicas de ciclo celular, secuencias de promotor inducible y secuencias de promotor constitutivo que se han modificado para conferir la expresión en una parte particular de la
- 25 planta en cualquier momento, tal como mediante la integración de dicho promotor constitutivo dentro de un elemento genético de transposición (Ac, Ds, Spm, En, u otro transposón).
- El término "específico de célula" se debe toma que indica que la expresión está predominantemente en una célula particular o tipo de célula, preferiblemente de origen de planta, aunque no necesariamente exclusivamente en dicha célula o tipo de célula.
- 30 De forma similar, el término "específico de tejido" se debe tomar que indica que la expresión está predominantemente en un tejido particular tejido o tipo de tejido, preferiblemente de origen de planta, aunque no necesariamente exclusivamente en dicho tejido o tipo de tejido.
- De forma similar, el término "específico de órgano" se debe tomar que indica que la expresión está predominantemente en un órgano particular, preferiblemente de origen de planta, aunque no necesariamente
- 35 exclusivamente en dicho órgano.
- De forma similar, el término "específico de ciclo celular" se debe tomar que indica que la expresión es predominantemente cíclica y que se presenta en una o más, no necesariamente fases consecutivas del ciclo celular aunque no necesariamente exclusivamente en células cíclicas, preferiblemente de origen de planta. Aquellos expertos en la técnica serán conscientes que un "promotor inducible" es un promotor de la actividad transcripcional que se aumenta o induce en respuesta a un estímulo de desarrollo, químico, ambiental, o físico. De forma similar, el
- 40 experto entenderá que un "promotor constitutivo" es un promotor que es transcripcionalmente activo a través de la mayoría, pero no necesariamente todas las partes de un organismo, preferiblemente una planta, durante la mayoría, pero no necesariamente todas las fases de su crecimiento y desarrollo.
- Aquellos expertos en la técnica serán fácilmente capaces de seleccionar las secuencias de promotor apropiadas para uso en regular la expresión apropiada del HOBbit o la proteína mutante HOBbit como se describe supra de las fuentes fácilmente disponibles o públicamente disponibles, sin la debida experimentación.
- 45 Poner 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 se controla por la secuencia promotora. Un promotor es usualmente, pero no necesariamente, posicionado en la dirección 5', o en el extremo 5', y dentro de 2 kb del sitio de inicio de la transcripción, de la molécula de ácido nucleico que lo regula. En la construcción del promotor heterólogo/ combinaciones de gen estructural se prefiere de manera general para posicionar el promotor en una distancia del sitio de inicio de transcripción de gen que es aproximadamente igual como la distancia entre ese promotor y el gen que lo controla en su configuración natural (es decir, el gen del que se deriva el promotor). Como se conoce en la técnica, alguna variación en esta distancia se
- 50 puede acomodar sin pérdida de la función del promotor. De forma similar, el posicionamiento preferido de un
- 55

elemento de secuencia regulador con respecto a un gen heterólogo que se pone bajo su control se define mediante el posicionamiento del elemento en su configuración natural (es decir, el gen del cual se deriva). De nuevo, como se sabe en la técnica, también puede ocurrir alguna variación en esta distancia.

5 Ejemplos de promotores adecuados para uso en construcciones de gen de la presente invención incluyen aquellos enumerados en la Tabla 3, entre otros. Los promotores enumerados en la Tabla 3 se proporcionan para propósitos solo de ejemplificación y la presente invención no se limita por la lista proporcionada aquí. Aquellos expertos en la técnica estarán fácilmente en una posición para proporcionar promotores adicionales que son útiles en realizar la presente invención.

10 En el caso de promotores constitutivos o promotores que inducen expresión a través de la planta completa, se prefiere que dichas secuencias se modifiquen mediante la adición de las secuencias de nucleótidos derivadas de uno o más de los promotores específicos de tejido enumerados en la Tabla 8, o alternatively, las secuencias de nucleótidos derivadas de uno o más de los promotores inducibles específicos de tejido mencionados anteriormente, para conferir especificidad de tejido. Por ejemplo, el promotor CaMV 35S se puede modificar mediante la adición de la secuencia promotora Adh1 de maíz, para conferir la expresión específica de raíz regulada anaeróbicamente, como se describió previamente (Ellis et al., 1987). Otro ejemplo describe conferir la expresión de gen abundante de raíz o específica de raíz al fusionar el promotor CaMV35S a los elementos del gen de GRP3 la proteína rica en glicina de maíz (Feix and Wulff 2000 - WO0015662). Se pueden lograr dichas modificaciones mediante experimentación de rutina por aquellos expertos en la técnica.

20 El término "terminador" se refiere a una secuencia de ADN al final 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, que facilita la adición de las secuencias poliadeniladas en el extremo 3' de un transcrito primario. Los terminadores se activan en células derivadas de virus, levaduras, mohos, bacterias, insectos, aves, mamíferos y plantas se conocen y se describen en la literatura. Estos se pueden aislar de bacterias, hongos, virus, animales y/o plantas.

25 Ejemplos de terminadores particularmente adecuados para uso en las construcciones de gen de la presente invención incluyen el terminador de gen de sintasa nopalina *Agrobacterium tumefaciens* (NOS), la secuencia terminadora de gen de sintasa octopina *Agrobacterium tumefaciens* (OCS), la secuencia terminadora de gen 35S del virus mosaico de Coliflor (CaMV), la secuencia terminadora de pirofosforilasa de glucosa ADP *Oryza sativa* (t3'Bt2), la secuencia terminadora del gen de zeína *Zea mays*, el terminador de gen rbcS-1A, y las secuencias terminadoras de gen rbcS-3A, entre otros.

Tabla 3. Promotores operables de planta de ejemplo para uso en la realización de la presente invención

I: PROMOTORES ESPECÍFICOS DE CÉLULA, ESPECÍFICOS DE TEJIDO, Y ESPECÍFICOS DE ÓRGANO		
FUENTE DE GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
α -amilasa (Amy32b)	aleurona	Lanahan et al, Plant Cell 4:203-211, 1992; Skriver et al, Proc Natl Acad Sci USA 88: 7266-7270, 1991
gen similar a catepsina β	aleurona	Cejudo et al, Plant Biol 20:849-856, Mol 1992
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> rolB	cambium	Nilsson et al, Physiol Plant 100:456-462, 1997
AtPRP4	flores	http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html
sintasa calcona (chsA)	flores	Van der Meer et al, Plant Mol Biol 15:95-109, 1990
LAT52	anteras	Twel et al, Mol Gen Genet 217:240-245, 1989
apetala-3	flores	

(continuación)

I: PROMOTORES ESPECÍFICOS DE CÉLULA, ESPECÍFICOS DE TEJIDO, Y ESPECÍFICOS DE ÓRGANO		
FUENTE DE GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
chitinasa	frutos (bayas, uvas, etc.)	Thomas et al. CSIRO Plant Industry, Urrbrae, South Australia, Australia; http://winetities.com.au/gwrdc/csh95-1.html
rbcS-3A	tejido verde (por ejemplo hoja)	Lam et al, Plant Cell 2:857-866, 1990; Tucker et al., Plant Physiol 113: 1303-1308, 1992
genes específicos de hoja	hoja	Baszczynski et al, Nucl Acid Res 16:4732, 1988
AtPRP4	hoja	http://sa.us.medium.edu/mmg/tierney/htmlf
promotor del gen metiltransferasa de adenina del virus clorela	hoja	Mitra and Higgins, Plant Mol Biol 26:85-93, 1994
Promotor del gen aldP de arroz	hoja	Kagaya et al, Mol Gen Genet 248:668-674, 1995
Promotor rbcS de arroz o tomate	hoja	Kyozuka et al, Plant Physiol 102:991-1000, 1993
Pinus cab-6	hoja	Yamamoto et al, Plant Cell Physiol 35:773-778, 1994
promotor rubisco	hoja	
cab (clorofila a/b/proteína de unión)	hoja	
Gen de guisante Blec4	tejidos epidérmicos florales y vegetativos	Mandaci and Dobres, Plant Mol Biol 34:961-965
SAM22	hoja senescente	Crowell 1992 et al, Plant Mol Biol 18:459-466,
Gen ltp (gen de transferencia de lípidos)		Fleming et al, Plant J 2:855-862, 1992
Gen R. japonicum nif	nódulo	Patente Estadounidense No 4 803165
Gen B. japonicum nifH	nódulo	Patente Estadounidense No 5008194
GmENOD40	nódulo	Yang et al, Plant J 3:573-585, 1993

(continuación)

I: PROMOTORES ESPECÍFICOS DE CÉLULA, ESPECÍFICOS DE TEJIDO, Y ESPECÍFICOS DE ÓRGANO		
FUENTE DE GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
carboxilasa PEP (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
Gen de virus Tungro bacilliform	floema	Bhattacharyya-Pakrasi et al, Plant J 4: 71-79, 1992
Genes específicos de 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 18:21-218, 1992
Gen expresado de polen de girasol	polen	Baltz et al, Plant J 2:713-721, 1992
Gen específico de polen B. napus	polen; antera; tapetum	Arnoldo et al, J Cell Biochem, Abstract No. Y101, 204, 1992
Genes expresables de raíz	raíces	Tingey et al, EMBO J 6:1, 1987
Gen inducible de auxina de tabaco	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
Gen B. napus G1-3b	raíz	Patente Estadounidense No 5401836
I: PROMOTORES ESPECÍFICOS DE CÉLULA, ESPECÍFICOS DE TEJIDO, Y ESPECÍFICOS DE ÓRGANO (continuación)		
FUENTE DE GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
SbPRP1	raíces	Suzuki et al, Plant Mol Biol 21:109-119, 1993
AtPRP1; AtPRP3	raíces; capilares de raíz	http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html
gen RD2	corteza de raíz	http://www2.cnsu.edu/ncsu/research
gen TobRB7	vasculatura de raíz	http://www2.cnsu.edu/ncsu/research

(continuación)

I: PROMOTORES ESPECÍFICOS DE CÉLULA, ESPECÍFICOS DE TEJIDO, Y ESPECÍFICOS DE ÓRGANO		
FUENTE DE GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
AtPRP4	hojas; flores; primordia de raíz lateral	http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html
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
Albúmina Brazil Nut	semilla	Pearson et al, Plant Mol Biol 18:235-245, 1992
legumina	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 Lett 221: 43-47, 1987
zeína	semilla	Matzke et al, Plant Mol Biol 14:323-32 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; Nucl Acids Res 17:461-462, 1989
SPA de trigo	semilla	Albani et al, Plant Cell 9:171-184, 1997
cZ19B1, zeína de maíz 19 kDa	semilla	WO0011177
mi1ps, mioinositol-1-Pi de sintasa de maíz	semilla	WO0011177
α , β , γ -gliadinas de trigo	endospermo	EMBO J 3:1409-1415, 1984
promotor ltr1 de cebada	endospermo	
hordeína B1, C, D, de cebada	endospermo	Theor Appl Gen 98:1253-1262, 1999; Plant J 4:343-355, 1993; Mol Gen Genet 250:750-60, 1996
DOF de cebada	endospermo	Mena et al, Plant J 116:53-62, 1998
blz2	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 Physiol 39: 885-889, 1998
α -globulina Glb-1 de arroz	endospermo	Wu et al, Plant Cell Physiol 39:885-889, 1998

(continuación)

I: PROMOTORES ESPECÍFICOS DE CÉLULA, ESPECÍFICOS DE TEJIDO, Y ESPECÍFICOS DE ÓRGANO		
FUENTE DE GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
genes END de maíz	endospermo	WO0012733
END1 de cebada	endospermo	WO9808961
NUC1 de cebada	nucela	WO9808961
OSH1 de arroz	embriones	Sato et al, Proc Natl Acad Sci USA, 93:8117-8122, 1996
α -globulina de arroz REB/OHP-1	endospermo	Nakase et al, Plant Mol Biol 33:513-522, 1997
ADP-glucosa de arroz PP	endospermo	Trans Res 6:157-168, 1997
Familia de gen ESR de maíz	endospermo	Plant J 12:235-246, 1997
γ -kafirina de sorgo	endospermo	Plant Mol Biol 32:1029-1035, 1996
KNOX	embriones	Postma-Haarsma et al, Plant Mol Biol 39:257-271, 1999
oleosina de arroz	embriones y aleurón	Wu et al, J Biochem 123:386, 1998
oleosina de girasol	semilla (embriones y semilla seca)	Cummins et al, Plant Mol Biol 19:873-876, 1992
HOJAY	meristema de brote	Weigel et al, Cell 69:843-859, 1992
Arabidopsis thaliana knat1	meristema de brote	Número de acceso AJ131822
Malus domestica kn1	meristema de brote	Número de acceso Z71981
CLAVATA1	meristema de brote	Número de acceso 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 patatin clase I	tubérculo	Liu et al, Plant Mol Biol 153:386-395, 1991
PCNA de arroz	meristema	Kosugi et al, Nucl Acids Res 19:1571-1576, 1991; Kosugi and Ohashi, Plant Cell 9:1607-1619, 1997
Tubulina de guisante TubA1	Células divididas	Stotz and Long, Plant Mol Biol 41:601-614, 1999
Arabidopsis cdc2a	Células cíclicas	Chung and Parish, FEBS Lett 362:215-219, 1995
Arabidopsis Rop1A	Anteras; polen maduro + tubos de polen	Li et al, Plant Physiol 118:407-417, 1998

(continuación)

I: PROMOTORES ESPECÍFICOS DE CÉLULA, ESPECÍFICOS DE TEJIDO, Y ESPECÍFICOS DE ÓRGANO		
FUENTE DE GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
Arabidopsis AtDMC1	Asociado con Meiosis-	Klimyuk and Jones, Plant J 11:1-14, 1997
PS-IAA4/5 y PS-IAA6 de guisante	Inducible de auxina	Wong et al, Plant J 9:587-599, 1996
Farnesiltransferasa de guisante	Tejidos meristemáticos; tejidos de crecimiento cercanos a floema; reprimido a azúcar y luz	Zhou et al, Plant J 12:921-930,1997
ciclina B1;1 de tabaco (N. sylvestris)	Células divididas / tejido meristemático	Trehin et al, Plant Mol.Biol. 35:667-672, 1997
Ciclinas mitóticas Catharanthus roseus CYS (tipo A) y CYM (tipo B)	Células divididas / tejido meristemático	Ito et al, Plant J 11:983-992, 1997
Arabidopsis cyc1 A (=cyc B1;1) y cyc3aAt (tipo A)	Células divididas / tejido meristemático	Shaul et al, Proc Natl Acad Sci USA 93:4868-4872, 1996
Secuencia de promotor Arabidopsis tef1	Células divididas / tejido meristemático	Regad et al, Mol Gen Genet 248:703-711, 1995
Catharanthus roseus cyc07	Células divididas / tejido meristemático	Ito et al, Plant Mol Biol 24:863-878, 1994
II: PROMOTORES CONSTITUTIVOS DE EJEMPLO		
FUENTE DE 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 100:456-462, 1997
GOS2	constitutivo	de Pater et al, Plant J 2:837-844, 1992
ubiquitina	constitutivo	Christensen et al, Plant Mol 18:675- Biol 689,1992
Ciclofilina de arroz	constitutivo	Buchholz et al, Plant Mol 25:837- Biol 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

(continuación)

II: PROMOTORES CONSTITUTIVOS DE EJEMPLO		
FUENTE DE GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
actina 2	constitutivo	An et al, Plant J 10:107-121, 1996
III: PROMOTORES INDUCIBLES DE ESTRÉS DE EJEMPLO		
NOMBRE	ESTRÉS	REFERENCIA
P5CS (delta(1)-pirrolina-5-carboxilato sintasa)	sal, agua	Zhang et al, Plant Sci 129:81-89, 1997
cor15a	frío	Hajela et al, Plant Physiol 93:1246-1252, 1990
cor15b	frío	Wilhelm et al, Plant Mol Biol 23:1073-1077, 1993
cor15a (-305 a +78 nt)	frío, sequía	Baker et al, Plant Mol Biol 24: 01-713, 1994
rd29	sal, sequía, frío	Kasuga et al, Nature Biotechnol 18:287-291, 1999
proteínas de choque térmico, que incluyen promotores artificiales que contienen el elemento de choque térmico (HSE)	calor	Barros et al, Plant Mol Biol 19 665-75, 1992. Marrs et al, Dev Genet 1 4:27-41, 1993. Schoffl et al, Mol Gen Genet 217: 246-53, 1989.
smHSP (proteínas de choque térmico pequeñas)	calor	Aguas et al, J Exp Bot 47:325-338, 1996
wcs120	frío	Ouellete et al, FEBS Lett 423:324-328, 1998
ci7	frío	Kirch et al, Plant Mol Biol 33:897-909, 1997
Adh	frío, sequía, hipoxia	Dolferus et al, Plant Physiol 105:1075-87, 1994
pws18	sal y sequía	Joshee et al, Plant Cell Physiol 39:64-72, 1998
III: PROMOTORES INDUCIBLES DE ESTRÉS DE EJEMPLO (continuación)		
NOMBRE	ESTRÉS	REFERENCIA
ci21A	Frío	Schneider et al, Plant Physiol 113:335-45, 1997
Trg-31	Sequía	Chaudhary et al, Plant Mol Biol 30:1247-57, 1996

(continuación)

III: PROMOTORES INDUCIBLES DE ESTRÉS DE EJEMPLO (continuación)		
NOMBRE	ESTRÉS	REFERENCIA
osmotina	osmótico	Raghothama et al, Plant Mol Biol 23:1117-28, 1993
lapA	Heridas, ambiental	WO99/03977 University of California/INRA
IV: PROMOTORES INDUCIBLES POR PATÓGENO DE EJEMPLO		
NOMBRE	PATÓGENO	REFERENCIA
RB7	Nemátodos de nudo de Raíz (Meloidogyne spp.)	US5760386 -North Carolina State University; Opperman et al, Science 263: 221-23, 1994
PR-1, 2, 3, 4, 5, 8, 11	fúngico, vírico, bacteriano	Ward et al, Plant Cell 3:1085-1094, 1991; Reiss et al 1996; Lebel et al, Plant J 16:223-233, 1998; Melchers et al, Plant J 5:469-480, 1994; Lawton et al, Plant Mol Biol, 19:735-743, 1992
HMG2	nemátodos	WO9503690 -Virginia Tech Intellectual Properties Inc.
Abi3	Nemátodos Cyst (Heterodera spp.)	No publicado
ARM1	nemátodos	Barthels et al, Plant Cell 9:2119-2134, 1997 WO 98/31822 -Plant Genetic Systems
Att0728	nemátodos	Barthels et al, Plant Cell 9: 2119-2134, 1997 PCT/EP98/07761
Att1712	nemátodos	Barthels et al, Plant Cell 9, 2119-2134, 1997 PCT/EP98/07761
Gst1	Diferentes tipos de patógenos	Strittmatter et al, Mol Plant-Microbe Interact 9:68-73, 1996
LEMMI	nemátodos	WO 92/21757 -Plant Genetic Systems
CLE	Geminivirus	PCT/EP99103445 -CINESTAV
PDF1.2	Hongos que incluyen Alternaria brassicicola y Botrytis cinerea	Manners et al, Plant Mol Biol, 38:1071-1080, 1998
Thi2.1	Hongos-Fusarium oxysporum f sp. matthiolae	Vignutelli et al, Plant J 14:285-295, 1998
DB#226	nemátodos	Bird and Wilson, Mol Plant-Microbe Interact 7:419-442, 1994 WO 95.322888

(continuación)

IV: PROMOTORES INDUCIBLES POR PATÓGENO DE EJEMPLO		
NOMBRE	PATÓGENO	REFERENCIA
DB#280	nemátodos	Bird and Wilson, Mol Plant-Microbe Interact 7:419-442, 1994 WO 95.322888
Cat2	nemátodos	Niebel et al, Mol Plant-Microbe Interact 8:371-378, 1995
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. Ohi (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. Ohi (Eds.)
Hs1(pro1)	nemátodos	WO 98/122335 -Jung
nsLTP	vírico, fúngico, bacteriano	Molina and Garcia-Olmedo FEBS Lett, 316:119-122, 1993
RIP	vírico, fúngico	Turner et al, Proc Natl Acad Sci USA 94:3866-3871, 1997
V: PROMOTORES INDUCIBLES POR LUZ DE EJEMPLO		
NOMBRE	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
Arabidopsis Athb-2	Mediante cambios en las relaciones de luz rojo/lejos del rojo	Carabelli et al, Proc Natl Acad Sci USA 93:3530-3535
Arabidopsis Athb-4	Luz lejos del rojo	Carabelli et al, Plant J 4:469-479
rbcS de arroz	luz	Kyozuka et al 1993, Plant Physiol 102:991-1000
CAB de arroz	luz	Tada et al 1991, EMBO J 10:1803-1808
Lemna SSU5B (rbcS)	Luz roja	Rolfe and Tobin 1991, Proc Natl Sci USA 88:2683-2686 Acad
Fragmento del promotor rbcS-3A de guisante	luz roja	Gilmartin and Chua 1990, Mol Cell Biol 10:5565-5568
Sintasa de glutamina de guisante GS2	fotorespiración y luz	Tjaden et al 1995, Plant Physiol 108:1109-1117

(continuación)

V: PROMOTORES INDUCIBLES POR LUZ DE EJEMPLO		
NOMBRE	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
Reductasa de nitrato de frijol	Nitrato y luz	Sander et al. 1995, Plant Mol Biol 27:165-177
psbD-psdC de cebada	Luz azul/UV-A	Christopher and Mullet 1994, Plant Physiol 104:1119-1129
Arabidopsis PHYB	Luz lejos del rojo	Wester et al 1994, Plant J 5:261-272
mung bean AR2	luz	Mizutani and Ohta 1998, Plant Physiol 116:357-367
CAB-M1 de maíz	luz/Ca ²⁺	Shiina et al 1997, Plant Physiol 115:477-483
Arabidopsis photolyase	luz visible / luz UV	Sakamoto et al 1998, DNA Seq 9:335-340
Arabidopsis CHS	Luz UV-B/UV-A/azul	Hartmann et al 1998, Plant Mol Biol 36:741-754
Arabidopsis Lhcb1*3	luz azul	Tilghman et al 1997, Plant Mol Biol 35:293-302
pea Lhcb1*4	luz azul	Tilghman et al 1997, Plant Mol Biol 35:293-302

Aquellos expertos en la técnica serán conscientes de secuencias promotoras adicionales y secuencias terminadoras que pueden ser adecuadas para desarrollar la invención. Dichas secuencias se pueden utilizar fácilmente sin la debida experimentación.

En el contexto de la presente invención, "expresión ectópica" o "sobre-expresión ectópica" de un gen o una proteína se confieren a patrones de expresión y/o niveles de expresión de dicho gene o proteína que no ocurre normalmente bajo condiciones naturales. Se puede lograr expresión ectópica en un número de formas que incluyen ligar funcionalmente la secuencia codificante que codifica dicha proteína en un promotor homólogo o heterólogo aislado con el fin de crear un gen quimérico y/o ligar funcionalmente dicha secuencia codificante en su propio promotor aislado (es decir el promotor no aislado que dirige naturalmente la expresión de dicha proteína) con el fin de crear una duplicación de gen recombinante o efecto de multiplicación de gen.

Preferiblemente, la secuencia promotora utilizada en el contexto de la presente invención se vincula funcionalmente a una secuencia codificante o marco de lectura abierto (ORF) que codifica un HOBbit o proteína mutante HOBbit o un homólogo, derivado y/o un fragmento inmunológicamente activo del mismo como se define supra.

La "regulación por disminución de la expresión" como se utiliza aquí significa disminuir los niveles de expresión de gen y/o los niveles de producto de gen activo y/o los niveles de actividad del producto de gen. Las reducciones en la expresión se puede llevar a cabo por ejemplo mediante la adición de secuencias codificantes o partes de las mismas en una orientación codificante (si que resulta en co-supresión) o en una orientación anticodificante con relación a una secuencia promotora y adicionalmente mediante por ejemplo mutagenia de inserción (por ejemplo inserción de T-ADN o inserción de transposón) o mediante estrategias de inactivación de gen como se describe mediante por ejemplo Angell and Baulcombe (1998 - WO9836083), Lowe et al. (1989 - WO9853083), Lederer et al. (1999 - WO9915682) o Wang et al. (1999 - WO9953050). Las construcciones genéticas se dirigen a la expresión del gen inactivo puede tener la secuencia de nucleótidos de dicho gen (o una o más partes de las mismas) contenidas allí en una orientación codificante y/o anticodificante con relación a la secuencia promotora. Otro método para regular por disminución la expresión del gen comprende el uso de ribozimas, por ejemplo como se describe en Atkins et al. 1994 (WO9400012), Lenée et al. 1995 (WO9503404), Lutziger et al. 2000 (WO0000619), Prinsen et al. 1997 (WO9713865) y Scott et al. 1997 (WO9738116).

- La modulación, que incluye disminuir, del nivel de productos de gen activos o de actividad de producto de gen se puede lograr al administrar o exponer las células, tejidos, órganos u organismos para dicho producto de gen, un homólogo, análogo, derivado y/o fragmento inmunológicamente activo del mismo. La inmunomodulación es otro ejemplo de una técnica capaz de regular por disminución los niveles de producto de gen activo y/o de actividad de producto de gen y comprende la administración de o exponer a o expresa anticuerpos en dicho producto de gen a o en células, tejidos, órganos u organismos en donde los niveles de dicho producto de gen y/o actividad de producto de gen se modulan. Dichos anticuerpos comprenden anticuerpos", anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos IgG y anticuerpos de cadena pesada así como también fragmentos de los mismos.
- La modulación, que incluyen disminución, el nivel de productos de gen activos o de la actividad del producto de gen adicionalmente se puede lograr al administrar o exponer las células, tejidos, órganos u organismos a un inhibidor o activador de dicho producto de gen o la actividad del mismo. Dichos inhibidores o activadores incluyen proteínas (que comprenden por ejemplo proteinasas y quinasas) y compuestos químicos identificados de acuerdo con la presente invención como se describe supra.
- En el contexto de la invención el término "agonista" se refiere a una sustancia que puede ser un protagonista o un antagonista, es decir puede tener efectos positivos o negativos, puede ser también un mejorador o un inhibidor o un modulador.
- El término "endoreduplicación" significa replicación de ADN actual sin mitosis posterior y citoquinesis. Al manipular el nivel de endoduplicación uno puede aumentar la capacidad de almacenamiento de, por ejemplo, células de endospermo.
- "Destino celular y/o desarrollo de planta y/o la morfología de planta y/o bioquímica y/o fisiología" significan que una o más características de desarrollo y/o morfológicas y/o bioquímicas y/o fisiológicas de una planta se altera por el desempeño de una o más etapas que pertenecen a la invención descrita aquí.
- "Destino celular" se refiere al tipo celular o las características celulares de una célula particular que se producen durante desarrollo de planta o un proceso celular de la misma, en particular durante el ciclo celular o como una consecuencia de un proceso de ciclo celular.
- "Desarrollo de planta" o el término "característica de desarrollo de planta" o término similar, cuando se utiliza aquí, se tomará que significa cualquier proceso celular de una planta que está implicada en determinar el destino de desarrollo de una célula de planta, en particular el tejido específico o tipo de órgano en el que se desarrollará una célula progenitora. Los procesos celulares relevantes para el desarrollo de planta se conocerán por aquellos expertos en la técnica. Dichos procesos incluyen, por ejemplo, morfogenia, fotomorfogenia, desarrollo de brote, desarrollo de raíz, desarrollo vegetativo, desarrollo reproductivo, elongación de tallo, florecimiento, y mecanismos reguladores implicados en determinar el destino celular, en particular un proceso o proceso regulador implicado en el ciclo celular.
- "La morfología de planta" o el término "característica morfológica de planta" o término similar, cuando se utiliza aquí, se entenderá por aquellos expertos en la técnica a lo que se refiere a la apariencia externa de una planta, que incluye una cualquiera o más características estructurales o combinación de características estructurales de la misma. Dichas características estructurales incluyen la forma, tamaño, número, posición, color, textura, disposición, y patrón de cualquier célula, tejido u órgano o grupos de células, tejidos o órganos de una planta, que incluyen la raíz, tallo, hoja, brote, pecíolo, tricomas, flor, pétalo, estigma, estilo, estambre, polen, óvulo, semilla, embriones, endospermo, recubrimiento de semilla, aleurona, fibra, fruto, cambium, madera, pulpa de madera, parénquima, aerénquima, elemento de tamiz, floema o tejido vascular, entre otros.
- "La bioquímica de la planta" o el término "característica bioquímica de planta" o término similar, cuando se utiliza aquí, se entenderá por aquellos expertos en la técnica en lo que se refiere a los procesos catalíticos y metabólicos de una planta, que incluyen metabolismo primario y secundario y los productos de los mismos, que incluyen cualesquier moléculas pequeñas, macromoléculas o compuestos químicos, tal como pero no limitado a almidones, azúcares, proteínas, péptidos, enzimas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas de ácido nucleico, celulosas, hemicelulosas, callosas, lectinas, fibras, pigmentos tal como antocianinas, vitaminas, minerales, micronutrientes, o macronutrientes, que se producen por plantas.
- "La fisiología de la planta" o el término "característica fisiológica de planta" o término similar, cuando se utiliza aquí, se entenderá que se refiere a los procesos funcionales de una planta, que incluyen procesos de desarrollo tal como crecimiento, expansión y diferenciación, desarrollo sexual, reproducción sexual, establecimiento de semilla, desarrollo de semilla, relleno de grano, reproducción asexual, división celular, latencia, germinación, adaptación de luz, fotosíntesis, expansión de hoja, producción de fibra, crecimiento secundario o producción de madera, entre otros; las respuestas de una planta en factores externamente aplicados tal como metales, químicos, hormonas, factores de crecimiento, ambiente y factores de estrés ambiental (por ejemplo anoxia, hipoxia, alta temperatura, baja

temperatura, deshidratación, luz, hora del día, inundación, sal, metales pesados, entre otros), que incluyen respuestas adaptativas de plantas a dichos factores aplicados externamente. "Patrón" o "formación de patrones" o "patrón de célula" o términos similares, cuando se utilizan aquí, se entenderá como la disposición espacial de las células, grupos de células, tejidos u órganos de un organismo dentro de este organismo. Preferiblemente, dicho organismo es una planta. Este proceso está implicado en influenciar el destino celular, desarrollo de planta, la morfología de planta, la bioquímica de la planta y la fisiología de la planta.

Cuando se utilizan aquí, los términos "dominio" o "región celular" se entienden como una célula única o un grupo de células que tienen colectivamente el mismo destino o que se pueden tratar de tal manera que obtienen dicho destino. En este contexto "destino" se entiende que tiene el potencial de desarrollar en o haber desarrollado un cierto tejido, órgano u organismo. La adquisición de destino puede implicar la ocurrencia de asimetría en una población de células previamente uniformes.

Un "meristema" es un tejido formador de una planta que se distingue de tejidos permanentes de planta por la capacidad de las células de meristema de dividir y formar nuevas células. Los meristemas pueden ser apicales, es decir determinar el eje de raíz de brote vertical de plantas y responsable del crecimiento de brote (meristemas apicales de brote) o raíz (meristemas apicales de raíz). Los meristemas adicionalmente pueden ser laterales, es decir determinar la ramificación horizontal del eje de raíz-brote y responsable del crecimiento de por ejemplo tres ramas (meristema apical de brote) o raíces laterales (meristema apical de raíz). Diversos órganos encuentran su uso en meristemas. Sin embargo, con "emanación de órgano" significa la concepción y desarrollo posterior de un órgano de un meristema. Los órganos bien conocidos que emanan de meristemas vegetativos son por ejemplo hojas. Los órganos bien conocidos que emanan de meristemas florales son por ejemplo flores.

Los medios para introducir el ADN recombinante en tejido de planta o células que incluyen, pero no se limitan a, transformación utilizando CaCl_2 y variaciones de los mismos, en particular el método descrito por Hanahan (1983), absorción de ADN directa en protoplastos (Krens et al, 1982; Paszkowski et al, 1984), la absorción mediada por PEG en protoplastos (Armstrong et al, 1990) bombardeo de micropartículas, electroporación (Fromm et al., 1985), microyección de ADN (Crossway et al., 1986), bombardeo de micropartículas de explantes de tejido o células (Christou et al, 1988; Klein et al. 1992), infiltración por vacío de tejido con ácido nucleico, o en el caso de plantas, transferencia mediada por T-ADN de *Agrobacterium* para el tejido de planta como se describe esencialmente por An et al.(1985), Dodds et al. (1985), Herrera-Estrella et al. (1983a, 1983b). los métodos para la transformación de plantas de monocotiledóneas se conocen bien en la literatura e incluyen 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 de 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), absorción de ADN (Eyal et al. 1993 - WO9318168), microinyección de células *Agrobacterium* (von Holt 1994 - DE4309203) y sonicación (Finer et al. 1997 - US5693512).

Para el bombardeo de micropartículas de células, una micropartícula se impulsa en una célula para producir una célula transformada. Se puede utilizar cualquier metodología de transformación de célula balística adecuada y aparato en desarrollar la presente invención. Los aparatos y procedimientos de ejemplo se describen pro Stomp et al. (Patente Estadounidense No. 5122466) y Sanford and Wolf (Patente Estadounidense No. 4945050). Cuando los procedimientos de transformación balísticos, la construcción de gen puede incorporar un plásmido capaz de replicar en la célula que se va a transformar.

Ejemplos de micropartículas adecuados para uso en dichos sistemas incluyen esferas doradas de 1 a 5 nm. La construcción de ADN se puede depositar en la micropartícula mediante cualquier técnica adecuada, tal como mediante precipitación.

Se puede regenerar una planta completa de la célula transformada o transfectada, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. El tejido de planta capaz de propagación clonal posterior, si por organogenia o embriogenia, se puede transformar con una construcción de gen de la presente invención y una planta completa regenerada de la misma. El tejido particular seleccionado variará dependiendo de los sistemas de propagación clonal disponibles para, y más adecuados por, las especies particulares que se transforman. Los objetivos de tejido de ejemplo incluyen discos de hoja, polen, embriones, cotiledóneas, hipocotiledóneas, megagametofitos, tejido de callo, tejido meristemático existente (por ejemplo, meristema apical, yemas axilares, y el meristema de raíz), y el tejido de meristema inducido (por ejemplo, meristema cotiledón y meristema hipocotilo).

El término "organogenia", como se utiliza aquí, significa un proceso mediante el cual los brotes y raíces se desarrollan secuencialmente desde los centros meristemáticos.

El término "embriogenia", como se utiliza aquí, significa un proceso mediante el cual los brotes y raíces se desarrollan en forma concertada (no secuencialmente), si es de células somáticas o gametos. -

Preferiblemente, la planta se produce de acuerdo con el método de la invención se transfecta o transforma con una secuencia genética, o susceptible a la introducción de una proteína, mediante cualesquier medios reconocidos en la técnica, tal como bombardeo de microproyectiles, microinyección, transformación mediada por *Agrobacterium* (que incluyen el método de transformación de 'inmersión de flor'; Bechtold and Pelletier 1998, Trieu et al. 2000), fusión de protoplasto, o electroporación, entre otros. Más preferiblemente dicha planta se produce mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

La transformación mediada por *Agrobacterium* o transformación agrolística de plantas, levadura, moho u hongos filamentosos se base en la transferencia de parte de las secuencias del vector de transformación, denominado como T-ADN, al núcleo y en la integración de dicho T-ADN en el genoma de dicho eucariote.

"*Agrobacterium*" significa un miembro de *Agrobacteriaceae*, más preferiblemente *Agrobacterium* o *Rhizobacterium* y más preferiblemente *Agrobacterium tumefaciens*.

"T-ADN", o ADN transferido, significa que parte del vector de transformación flanqueado por los límites de T-ADN es decir, después de la activación de los genes *Agrobacterium* vir, mellado en los límites de T-ADN y se transfiere como un ADN de hebra sencilla al núcleo en una célula eucariótica.

Cuando se utilizan aquí, con "límites de T-ADN", "región límite de T-ADN", o "región límite" significan el límite de T-ADN derecho (RB) o el límite de T-ADN izquierdo (LB). Dicho límite comprende una secuencia núcleo flanqueada por una región interna límite como parte del límite de flanqueo de T-ADN y/o una región externa límite como parte del límite de flanqueo de estructura principal del vector. Las secuencias núcleo comprende 22 bp en el caso de vectores tipo octopina y 25 bp en el caso de vectores tipo nopalina. Las secuencias núcleo en la región límite derecha y la región límite izquierda forman repeticiones imperfectas. Las secuencias núcleo límite son indispensables para el reconocimiento y procesamiento mediante el complejo de mellado de *Agrobacterium* que consiste de por lo menos VirD1 y VirD2. Las secuencias núcleo que flanquean un T-ADN son suficientes para promover la transferencia de dicho T-ADN. Sin embargo, es baja la eficiencia de transformación utilizando vectores de transformación que llevan únicamente el T-ADN flanqueado por dichas secuencias núcleo. Se sabe que las regiones externas e internas límite modulan la eficiencia de transferencia de T-ADN (Wang et al. 1987). Un elemento que mejora la transferencia de T-ADN se ha caracterizado y reside en la región externa de límite derecho y se denomina saturación (Peralta et al. 1986, van Haaren et al. 1987).

"Vector de transformación de T-ADN" o "vector de T-ADN" significa cualquier vector que abarca una secuencia de T-ADN flanqueada por el límite de T-DNA derecho e izquierdo que consiste de por lo menos las secuencias núcleo de límite derecho e izquierdo, respectivamente, y se utilizan para transformación de cualquier células eucariótica.

"Secuencia de estructura principal de vector de T-ADN" o "Secuencias de estructura principal de vector de T-ADN" significa todo el ADN de un vector que contiene T-ADN que se encuentra fuera de los límites de T-ADN y, más específicamente, fuera de los sitios de mellado de las repeticiones imperfectas de núcleo límite.

La presente invención incluye vectores de T-ADN optimizados de tal manera que la integración de estructura principal de vector en el genoma de una célula eucariótica se minimiza o está ausente. "Vector de T-ADN optimizado" significa un vector de T-ADN diseñado para reducir o abolir la transferencia de secuencias de estructura principal de vector en el genoma de una célula eucariótica. Dichos vectores de T-ADN se conocen por ser familiares con la técnica e incluyen aquellos descritos por Hanson et al. (1999) y por Stuiver et al. (1999 - WO9901563).

La especificación describe la inclusión de una secuencia de ADN que codifica un HOBbit o proteína mutante HOBbit, homólogo, derivado o fragmento inmunológicamente activo del mismo como se define supra, en cualquier vector de T-ADN que comprende vectores de transformación binarios, vectores de transformación super-binarios, vectores de transformación co-integrados, vectores de transformación derivados de Ri así como también en vectores que llevan T-ADN utilizados en transformación agrolística.

"Vector de transformación binario" significa un vector de transformación de T-ADN que comprende por lo menos un gen de interés y/o por lo menos un marcador seleccionable activo en la célula eucariótica que se va a transformar; y una región de estructura principal de vector que comprende por lo menos orígenes de replicación activa en *E. coli* y *Agrobacterium* y marcadores para selección en *E. coli* y *Agrobacterium*. Alternativamente, la replicación del vector de transformación binario en *Agrobacterium* es dependiente de la presencia de un plásmido auxiliar separado. El vector binario pGreen y el plásmido auxiliar pSoup forman un ejemplo de dicho como se describe en por ejemplo Hellens et al. (2000), Plant Mol. Biol. 42, 819-832, o como está disponible en el sitio de internet <http://www.pgreen.ac.uk>.

Los límites de T-ADN de un vector de transformación binario se pueden derivar de plásmidos Ti tipo nopalina o tipo octopina o de ambos. El T-ADN de un vector binario solo se transfiere a una célula eucariótica en conjunto con un plásmido auxiliar. También se conocen en la técnica múltiples cepas de vector binario *Agrobacterium* para co-transformación eficiente de las plantas (Bidney and Scelonge 2000 - WO0018939).

"Plásmido auxiliar" significa un plásmido que se mantiene establemente en *Agrobacterium* y por lo menos se lleva a cabo para la configuración de genes vir necesarios para permitir la transferencia del T-ADN. Dicha configuración de genes vir se puede derivar de plásmidos Ti tipo octopina o tipo nopalina o de ambos.

5 "Vector de transformación super-binario" significa un vector de transformación binario adicionalmente llevado en la región de estructura principal de vector de una región vir del plásmido Ti pTiBo542 de la cepa súper-virulenta *A. tumefaciens* A281 (Hiei et al. 1994 - EP0604662, Hiei et al. 1995 - EP0687730). Se utilizan vectores de transformación super-binarios en conjunto con un plásmido auxiliar.

"Vector de transformación co-integrado" significa un vector T-ADN por lo menos que comprende:

10 (a) una región T-ADN que comprende por lo menos un gen de interés y/o por lo menos un marcador seleccionable activo en plantas; y

(b) una región de estructura principal de vector que comprende por lo menos orígenes de replicación activos en *Escherichia coli* y *Agrobacterium*, y marcadores para selección en *E. coli* y *Agrobacterium*, y un conjunto de genes vir necesarios para permitir la transferencia del T-ADN.

15 Los límites de T-ADN y dicho conjunto de genes vir de dicho vector de T-ADN se puede derivada de plásmidos Ti tipo octopina o nopalina o de ambos.

"Vector de transformación de planta derivado de Ri" significa un vector de transformación binario en el que los límites de T-ADN se derivan de un plásmido Ti y dicho vector de transformación binario se utiliza en conjunto con un plásmido Ri auxiliar que lleva el conjunto necesario de genes vir.

20 Como se utiliza aquí, el término "gen marcador seleccionable" o "marcador seleccionable" o "marcador para selección" incluye cualquier gen que confiere un fenotipo en una célula en el que se expresa para facilitar la identificación y/o selección de células que se transfectan o transforman con una construcción de gen de la invención o a derivado de la misma. Los genes marcadores seleccionables adecuados contemplados aquí incluyen el gen de resistencia a ampicilina (Ampr), gen de resistencia a tetraciclina (Tcr), gen de resistencia a canamicina bacteriano (Kanr), gen de resistencia a fosfotricina, gen de fosfotransferasa a neomicina (nptII), gen de resistencia a higromicina, gen β -glucuronidasa (GUS), gen cloramfenicol acetiltransferasa (CAT), gen de proteína fluorescente verde (gfp) (Haseloff et al, 1997), y gen luciferasa, entre otros. "Agrolísticos", "transformación agrolística" o "transferencia agrolística" significa aquí un método de transformación que combina características de transformación mediada por *Agrobacterium* y de suministro de ADN biolístico. Como tal, un plásmido objetivo que contiene T-ADN se cosumministra con ADN/ARN que permite la producción planta de VirD1 y VirD2 con o sin VirE2 (Hansen and Chilton 1996; Hansen et al. 1997; Hansen and Chilton 1997 - WO9712046).

La presente invención describe adicionalmente un método para retirar de las células transformadas una secuencia de ADN externa integrada establemente mediante recombinación que implica una recombinasa y sitios de recombinación.

35 "ADN externo" significa cualquier secuencia de ADN que se introduce en el genoma del anfitrión mediante técnicas recombinantes. Dicho ADN externo 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 que se puede expresar. El ADN externo adicionalmente incluye intervenir las secuencias de ADN como se define supra. "Evento de recombinación" significa un evento de recombinación específico de sitio o un evento de recombinación efectuado por un 'salto' de transposón.

40 "Recombinasa" significa una recombinasa específica de sitio o una transposasa.

"Sitio de recombinación" significa sitio de recombinación específico de sitio o secuencias límite de transposón.

con "evento de recombinación específico de sitio" significa un evento catalizado por un sistema que consiste de manera general de tres elementos: un par de secuencias de ADN (las secuencias o sitios de recombinación específicos de sitio) y una enzima específica (la recombinasa específica de sitio).

45 La recombinasa específica de sitio cataliza una reacción de recombinación solo entre dos secuencias de recombinación específicas de sitio dependiendo de la orientación de las secuencias de recombinación específicas de sitio. Las secuencias que intervienen entre dos sitios de recombinación específicos de sitio se invertirán en la presencia de la recombinasa específica de sitio cuando las secuencias de recombinación específicas de sitio se orientan en direcciones opuestas con relación entre sí (es decir repeticiones invertidas). Si las secuencias de recombinación específicas de sitio se orientan en la misma dirección con relación entre sí (es decir repeticiones

directas), entonces se eliminarán cualesquiera secuencias que intervienen luego de la interacción con la recombinasa específica de sitio. Sin embargo, si las secuencias de recombinación específicas de sitio están presentes como repeticiones directas en ambos extremos de una secuencia de ADN externa integrada en un genoma eucariótico, dicha integración de dichas se puede reversar posteriormente mediante la interacción de las secuencias de recombinación específicas de sitio con la recombinasa específica de sitio correspondiente.

Se puede utilizar un número de diferentes sistemas de recombinasa específicos de sitio que incluyen pero no se limitan al sistema Cre/lox de bacteriófago P1, el sistema FLP/FRT de levadura, la recombinasa Gin de fago Mu, la recombinasa Pin de *E. coli*, PinB, PinD y PinF de *Shigella*, y el sistema R/RS de *Zygosaccharomyces rouxii*. Las recombinasas de manera general son integrasas, resolvasas o flippasas. También se pueden utilizar recombinasas específicas duales en conjunto con repeticiones directas e indirectas de dos sitios diferentes de recombinación específicos de sitio que corresponden la recombinasa específica dual (Baszczyński et al. 1999 - WO9925840). Los sistemas de recombinasa específicos de sitio preferidos son el bacteriófago P1 Cre/lox, los sistemas FLP/FRT de levadura y *Z. rouxii* R/RS. En estos sistemas una recombinasa (Cre, FLP o R) interactúa específicamente con su respectiva secuencia de recombinación específica de sitio (lox, FRT, o RS respectivamente) para invertir o cortar las secuencias que intervienen. Las secuencias de recombinación específicas de 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 se han utilizado con alta eficiencia en plantas tal como tabaco (Dale et al. 1990, Onouchi et al. 1991, Sugita et al. 2000) y *Arabidopsis* (Osborne et al. 1995, Onouchi et al. 1995). Los sistemas de recombinación específicos de sitio tienen muchas aplicaciones en biología de molecular planta que incluyen métodos para el control de recombinación homóloga (por ejemplo Hodges et al. 1996 - US5527695), para inserción dirigida, apilamiento de genes, etc. (Baszczyński et al. 1999 - WO9925821) y para resolución de patrones de integración de T-ADN complejos o para el corte de un marcador seleccionable (Ow et al. 1999 - WO9923202).

Aunque las secuencias de recombinación específicas de sitio se pueden ligar en los extremos del ADN que se van a cortar o se invierten, el gen que codifica la recombinasa específica de sitio se puede ubicar en cualquier parte. Por ejemplo, el gen de recombinasa ya puede estar presente en el ADN de eucariote o se puede suministrar por un fragmento de ADN introducido finalmente ya sea introducido directamente en las células, a través de cruce o a través de polinación cruzada. Alternativamente, se puede introducir una proteína recombinasa sustancialmente purificada directamente en la célula eucariótica, por ejemplo mediante micro-inyección o bombardeo de partículas. Normalmente, la región codificante de recombinasa específica de sitio se ligará funcionalmente a las secuencias reguladoras que permiten la expresión de la recombinasa específica de sitio en la célula eucariótica.

"Evento de recombinación efectuado por salto de transposón" o "recombinación mediada por transposasa" significa un evento de recombinación catalizado por un sistema que consiste de tres elementos: un par de secuencias de ADN (las secuencias límite de transposón) y una enzima específica (la transposasa). La transposasa cataliza una reacción de recombinación solo entre dos secuencias límite de transposón que están dispuestas como repeticiones invertidas.

Se puede utilizar un número de diferentes sistemas de transposón/transposasa que incluye pero no se limita al sistema Ds/Ac, el sistema Spm y el sistema Mu. Estos sistemas se originan de maíz pero se ha mostrado que por lo menos el sistema Ds/Ac y Spm también funciona en otras plantas (Fedoroff et al. 1993, Schlappi et al. 1993, Van Sluys et al. 1987). Se prefieren los transposones tipo Ds y Spm que se delinean por las secuencias límite 11 bp- y 13 bp, respectivamente.

Aunque las secuencias límite de transposón se puede ligar a los extremos de ADN que se cortan, el gen que codifica la transposasa se puede ubicar en cualquier parte. Por ejemplo, el gen de recombinasa ya puede estar presente en ADN de eucariote o se puede suministrar por un fragmento de ADN finalmente introducido ya sea introducido directamente en las células, a través del cruce o a través de polinación cruzada. Alternativamente, se puede introducir una proteína transposasa sustancialmente purificada directamente en las células, por ejemplo mediante microinyección o bombardeo de partículas. Como parte de la presente invención, las secuencias límite de transposón se incluyen en una secuencia de ADN externa de tal manera que se encuentran fuera de dicha secuencia de ADN y transforma dicho ADN en una entidad similar a transposón que se puede mover mediante la acción de una transposasa.

Los transposones frecuentemente se reintegran en otro locus del genoma del anfitrión, puede ser necesaria la segregación de la progenie de los anfitriones en los que la transposasa se deja actuar para separar los anfitriones transformados que contienen por ejemplo solo la huella de transposón y anfitriones transformados que aún contienen el ADN externo.

En el desarrollo de la presente invención, el elemento genético se induce preferiblemente para movilizar, tal como, por ejemplo, mediante la expresión de una proteína recombinasa en el que pone en contacto el sitio de integración del elemento genético y facilita un evento de recombinación allí, cortando el elemento genético completamente, o alternativamente, dividiendo una "huella", de manera general de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud o más,

en el sitio de integración original. Aquellos anfitriones y partes anfitrionas que se han producido de acuerdo con el método de la invención se pueden identificar mediante hibridación de ácido nucleico estándar y/o técnicas de amplificación para detectar la presencia del elemento genético movilizable o una construcción genética que comprende la misma. Alternativamente, en el caso de células anfitrionas transformadas, tejidos, y anfitriones en donde el elemento genético movilizable se ha costado, es posible detectar una huella en el genoma del anfitrión que se ha dejado luego del evento de corte, utilizando dichas técnicas. Como se utiliza aquí, el término "huella" se tomará como se refiere a cualquier derivado de un elemento genético movilizable o construcción de gen que comprende el mismo como se describe aquí que se produce mediante corte, eliminación u otro retiro del elemento genético movilizable del genoma de una célula transformada previamente con dicha construcción genética. Una huella de manera general comprende por lo menos una copia única del locus de recombinación o transposón utilizado para promover el corte. Sin embargo, una huella puede comprender secuencias adicionales derivadas de la construcción genética, por ejemplo secuencia de nucleótidos derivada de la secuencia límite izquierda, la secuencia límite derecha, origen de replicación, secuencia que codifica la transposasa o que codifica la recombinasa si se utiliza, o otras secuencias de nucleótidos derivadas de vector. De acuerdo con lo anterior, una huella es identificable de acuerdo con la secuencia de nucleótidos del locus de recombinación o transposón de la construcción genética utilizada, tal como, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a un sitio lox, sitio frt o sitio RS. El término "ciclo celular" significa los eventos estructurales y bioquímicos cíclicos asociados con el crecimiento y con la división de las células, y en particular con la regulación de la replicación de ADN y mitosis. El ciclo celular incluye las 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 lo que resulta en ciclo celular modificado tal como endomitosis, acitoquinesis, poliploidia, politenia, y endoreduplicación.

El término "proteína que interactúa con el ciclo celular", "proteína de ciclo celular" o "proteína de control de ciclo celular" como se denota aquí significa una proteína que ejerce control en o regula o si se requiere para el ciclo celular o parte del mismo de una célula, tejido, órgano u organismo completo y/o replicación de ADN. Esto también puede ser capaz de unir a, regular o estar regulado por quinasas dependientes de ciclina o sus subunidades. El término también incluye péptidos, polipéptidos, fragmentos, variantes, homólogos, alelos o precursores (por ejemplo preproteínas o preproteínas) de los mismos.

Las proteínas de control de ciclo celular y su función en regular el ciclo celular de organismos eucarióticos se revisan en detalle por John (1981) y documentos que contribuyen allí (Norbury and Nurse 1992; Nurse 1990; Ormrod and Francis 1993) y documentos que contribuyen allí (Doerner et al. 1996; Elledge 1996; Francis and Halford 1995; Francis et al. 1998; Hirt et al. 1991; Mironov et al. 1999).

El término "genes de control de ciclo celular control" se refiere a cualquier gen o mutante del mismo que ejerce control en o se requieren para: síntesis de ADN cromosómico y para mitosis (banda preprofase, envoltura nuclear, formación de huso, condensación de cromosoma, segregación de cromosoma, formación de nuevos núcleos, formación de fragmoplasto, duplicación de centro que organiza el microtúbulo, etc.) meiosis, citoquinesis, crecimiento celular, endoreduplicación, genes que controlan el ciclo celular también todos los genes que ejercen control en los anteriores: homólogos de CDK, ciclinas, E2F, Rb, CKI, Ck, y también cualesquiera genes que interfieren con los anteriores, ciclina D, cdc25, Wee1, Nim1, quinasas MAP, etc.

Más específicamente, los genes que controlan el ciclo celular son todos los genes implicados en el control de entrada y la progresión a través de la fase S. Estos incluyen, no exclusivamente, genes que expresan "proteínas de control de ciclo celular" tal como quinasas dependientes de ciclina (CDK), inhibidores de quinasa dependiente de ciclina (CKI), ciclinas D, E y A, E2F y factores de transcripción DP, proteínas de bolsillo, quinasa CDC7/DBF4, CDC6, MCM2-7, proteínas Orc, cdc45, componentes de ligasa ubiquitina SCF, PCNA, ADN-polimerasa.

El término "proteína de control de ciclo celular" incluye ciclinas A, B, C, D y E que incluyen CYCA1;1, CYCA2;1, CYCA3;1, CYCB1;1, CYCB1;2, CYC B2;2, CYCD1;1, CYCD2;1, CYCD3;1, y CYCD4;1 (Evans et al. 1983; Francis et al. 1998; Labbe et al. 1989; Murray and Kirschner 1989; Renaudin et al. 1996; Soni et al. 1995; Sorrell et al. 1999; Swenson et al. 1986) proteínas de inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CKI) tal como ICK1 (Wang et al. 1997), FL39, FL66, FL67 (PCT/EP98/05895), Sic1, Far1, Rum1, p21, p27, p57, p16, p15, p18, p19 (Elledge 1996; Pines 1995), p14 y p14ARF; p13suc1 o CKS1At (De Veylder et al. 1997; Hayles y Nurse 1986) y nim-1 (Russell and Nurse 1987a; Russell and Nurse 1987b; Fantes 1989; Russell and Nurse 1986; Russell and Nurse 1987a; Russell and Nurse 1987b) homólogos de Cdc2 tal como Cdc2MsB (Hirt et al. 1993) quinasa .CdcMs (Bogre et al. 1997) fosfatasa cdc2 T14Y15 tal como fosfatasa de proteína Cdc25 o p80cdc25 (Bell et al. 1993; Elledge 1996; Kumagai and Dunphy 1991; Russell and Nurse 1986) y Pyp3 (Elledge 1996) proteína quinasa cdc2 o p34cdc2 (Colasanti et al. 1991; Feiler and Jacobs 1990; Hirt et al. 1991; John et al. 1989; Lee and Nurse 1987; Nurse and Bissett 1981; Ormrod and Francis 1993) proteína quinasa cdc2a (Hemerly et al. 1993) quinasas cdc2 T14Y15 tal como wee1 o p107wee1 (Elledge 1996; Russell and Nurse 1986; Russell and Nurse 1987a; Russell and Nurse 1987b; Sun et al. 1999) mik1 (Lundgren et al. 1991) y myt1 (Elledge 1996); quinasas cdc2 T161 tal como Cak y Civ (Elledge 1996); fosfatasa cdc2 T161 al como Kap1 (Elledge 1996); proteína quinasa cdc28 o p34cdc28 (Nasmyth 1993; Reed et al.

1985) p40MO15 (Fesquet et al. 1993; Poon et al. 1993) quinasa chk1 (Zeng et al. 1998) quinasa cds1 (Zeng et al. 1998) quinasa H1 asociada con crecimiento (Labbe et al. 1989; Lake and Salzman 1972; Langan 1978; Zeng et al. 1998) quinasas MAP descritas por (Binarova et al. 1998; Bögre et al. 1999; Calderini et al. 1998; Wilson et al. 1999).

5 Otras proteínas de control de ciclo celular que están implicadas en la entrada mediada por ciclina D en G1 de G0 incluyen pRb (Xie et al. 1996; Huntley et al. 1998) E2F, RIP, MCM7 y potencialmente proteínas como pRb p107 y p130.

10 Otras proteínas de control de ciclo celular que están implicadas en la formación de un complejo pre-replicativo en uno o más orígenes de replicación, tal como, pero no limitado a, proteínas ORC, CDC6, CDC14, RPA y MCM o en la regulación de la formación de este complejo pre-replicativo, tal como, pero no limitado a, las proteínas CDC7, DBF4 y MBF.

15 Para el actual propósito, el término "proteína de control de ciclo celular" se considerará además que incluye una cualquiera o más de aquellas proteínas que están implicadas en el recambio de cualquier otra proteína de control de ciclo celular, o en regular la vida útil de dicha otra proteína de control de ciclo celular. El término "recambio de proteína" incluye todas las modificaciones bioquímicas de una proteína que conduce al retiro físico o funcional de dicha proteína. Aunque no esté limitado a esto, ejemplos de dichas modificaciones son fosforilación, ubiquitinación y proteólisis. Las proteínas particularmente preferidas que están implicadas en la proteólisis de una o más de otra cualquiera de las proteínas de control de ciclo celular mencionadas anteriormente incluyen las proteínas derivadas de levadura y derivadas de animal, Skp1, Skp2, Rub1, Cdc20, cullins, CDC23, CDC27, CDC16, y homólogos derivados de planta de los mismos (Cohen-Fix and Koshland 1997; Hochstrasser 1998; Krek 1998; Lisztwan et al. 1998) y Plesse et al in (Francis et al. 1998)).

20 Para el actual propósito, el término "genes que controlan el ciclo celular" adicionalmente se tomarán por incluir uno cualquiera o más de aquellos genes que están implicados en la regulación transcripcional de expresión de gen que controla el ciclo celular tal como factores de transcripción y proteínas de señal en la dirección 5'. No se excluyen los genes adicionales que controlan el ciclo celular.

25 Para el actual propósito, el término "genes que controlan el ciclo celular" adicionalmente se tomarán por incluir cualquier gen de control del ciclo celular o mutante del mismo, que se efectúa mediante señales ambientales tal como por ejemplo estrés, nutrientes, patógenos, o mediante señales intrínsecas tal como los mitógenos de animal u hormonas de planta (auxinas, citoquinas, etileno, ácido gibbélico, ácido abscísico y brasinoesteroides).

30 El término "la progresión del ciclo celular" se refiere al proceso de pasar a través de diferentes fases del ciclo celular. El término "índice de progresión del ciclo celular" de acuerdo con lo anterior se refiere a la velocidad en la que se realizan dichas fases de ciclo celular o el tiempo requerido para completar dichas fases de ciclo celular.

35 "Ensayo de dos híbridos de levadura" significa un ensayo que se basa en la observación de que muchos factores de transcripción eucarióticos comprenden dos dominios, un dominio de unión de ADN (DB) y un dominio de activación (AD) que, cuando se separa físicamente (es decir la interrupción del enlace covalente) no efectúa la expresión del gen objetivo. Dos proteínas permiten interactuar físicamente con una de dichas proteínas fusionadas a DB y la otra de dichas proteínas fusionada a AD reunirá los dominios DB y AD del factor de transcripción que resulta en expresión del gen objetivo. El gen objetivo en el ensayo de dos híbridos de levadura es usualmente un gen indicador tal como el gen β -galactosidasa. La interacción entre los patrones de proteína en el ensayo de dos híbridos de levadura así se puede cuantificar al medir la actividad del producto de gen indicador (Bartel and Fields 1997).

40 Alternativamente, se puede utilizar un sistema de dos híbridos de mamífero que incluye por ejemplo un gen indicador que codifica la proteína fluorescente verde quimérica (Shioda et al. 2000). Todavía otra alternativa consiste de un sistema de dos híbridos bacteriano utilizando por ejemplo HIS como gen indicador (Joung et al. 2000).

45 El término "fragmento de una secuencia" o "parte de una secuencia" significa una secuencia truncada de la secuencia original denominada. La secuencia truncada (secuencia de ácidos nucleicos o proteínas) puede variar ampliamente de longitud; el tamaño mínimo es una secuencia de suficiente tamaño para proporcionar una secuencia con por lo menos una función comparable y/o actividad o la secuencia original denominada, mientras que el tamaño máximo no es crítico. En algunas aplicaciones, el tamaño máximo usualmente no es sustancialmente mayor que aquel requerido para proporcionar la actividad deseada y/o las funciones de la secuencia original. Normalmente, la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos truncada variará de aproximadamente 5 a 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. Es usualmente deseable seleccionar secuencias de por lo menos aproximadamente 10, 12 o 15 aminoácidos o nucleótidos, up to un máximo de aproximadamente 20 o 25 aminoácidos o nucleótidos.

55 Adicionalmente, las simulaciones de plegado y el rediseño de ordenador de motivos estructurales de la proteína de la invención se puede realizar utilizando programas de ordenador (Olszewski et al. 1996, Hoffman et al. 1995). El

modelamiento de ordenador de plegado de proteína se puede utilizar para el análisis conformacional y energético de modelos de péptido y proteína detallados (Monge et al. 1995, Renouf et al. 1995). En particular, se pueden utilizar programas apropiados para la identificación de sitios interactivos de la proteína HOBbit y la proteína que interactúa con HOBbit mediante búsquedas asistenciales de ordenador para las secuencias complementarias de péptido (Fassina and Melli 1994). Los sistemas de ordenador apropiados adicionales para el diseño de la proteína y los péptidos se describen en la técnica anterior, por ejemplo en Berry and Brenner (1994), Wodak (1987), Pabo and Suchanek (1986). Los resultados obtenidos forman el análisis de ordenador descrito anteriormente se pueden utilizar para, por ejemplo la preparación de imitadores de péptido de la proteína de la invención o fragmentos de los mismos. Dichos análogos de pseudopéptido de la secuencia de aminoácidos natural de la proteína pueden imitar muy eficientemente la proteína progenitora (Benkirane et al. 1996). Por ejemplo, la incorporación de residuos de aminoácido ω acirales fácilmente disponibles en una proteína de la invención o un fragmento de la misma resulta en la sustitución de enlaces amino por unidades polimetileno de una cadena alifática, por lo que se proporciona una estrategia conveniente para la construcción de un imitador de péptido (Banerjee et al. 1996). Los análogos de imitador de péptido superactivos de hormonas de péptido pequeñas en otros sistemas se describen en la técnica anterior (Zhang et al. 1996). Los imitadores de péptido apropiados de la proteína de la presente invención también se pueden identificar mediante la síntesis de colecciones combinatorias imitadoras de péptido a través de alquilación de amina sucesiva y prueba de los compuestos resultantes, por ejemplo, para su unión, las propiedades inhibitorias de quinasa y/o inmunológicas. Los métodos para la generación y uso de colecciones combinatorias de imitadores de péptido se describen en la técnica anterior, por ejemplo en Ostresh et al. (1996) y Domer et al. (1996).

Adicionalmente, se puede utilizar una estructura tridimensional y/o cristalográfica de la proteína de la invención para el diseño de inhibidores de imitadores de péptido de la actividad biológica de la proteína de la invención (Rose et al. 1996, Ruterber et al. 1996).

Los compuestos que se van a obtener o identificar en los métodos de la invención pueden ser compuestos que son capaces de unirse a cualquiera de los ácidos nucleicos, péptidos o proteínas de la invención. Otros compuestos interesantes que se van a identificar son compuestos que modulan la expresión de los genes o las proteínas de la invención de tal forma que se mejora o reduce la expresión de dicho gen o proteína mediante la acción de dicho compuesto. Alternativamente el compuesto puede ejercer su acción al mejorar o reducir directamente o indirectamente la actividad de cualquiera de la proteínas de la invención.

Dicho compuesto o pluralidad de compuestos puede estar comprendido, por ejemplo, muestras, por ejemplo, extractos celulares de, por ejemplo, plantas, animales o microorganismos. Adicionalmente, dichos compuestos se pueden conocer en la técnica pero hasta ahora no se sabe que son capaces de suprimir o activar las proteínas que interactúan con el ciclo celular. La mezcla de reacción puede ser un extracto libre de célula que puede comprender una célula o cultivo de tejido. Las configuraciones adecuadas para el método se conocen por la persona experta en la técnica y, por ejemplo, se describen de manera general en Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, tercera edición (1994), en particular Capítulo 17. La pluralidad de compuestos, por ejemplo, se puede agregar a la mezcla de reacción, medio de cultivo o se inyectan dentro de la célula.

Si se describe una muestra que contiene un compuesto o una pluralidad de compuestos, entonces es posible aislar el compuesto que forma la muestra original identificado que contiene el compuesto capaz de actuar como un agonista, uno puede subdividir adicionalmente la muestra original, por ejemplo, si consiste de una pluralidad de diferentes compuestos, con el fin de reducir el número de diferente sustancias por muestra y repetir el método con las subdivisiones de la muestra original. Dependiendo de la complejidad de las muestras, las etapas descritas anteriormente se pueden realizar varias veces, preferiblemente hasta la muestra identificada de acuerdo con el método de la invención solo comprende un número limitado de o solo una sustancia. Preferiblemente dicha muestra comprende sustancias o químicos similares y/o propiedades físicas, y más preferiblemente dichas sustancias son idénticas. Preferiblemente, el compuesto identificado de acuerdo con el método descrito anteriormente o su derivado se formula adicionalmente en una forma adecuada para la aplicación en siembra de planta o célula de planta y cultivo de tejido.

La invención, ahora se describe de manera general, se entenderá fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen únicamente para propósitos de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención y no pretenden limitar la invención.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Características fenotípicas de plántulas *Arabidopsis thaliana* mutantes de hobbit (hbt).

El fenotipo de plántula hobbit muestra que el gen HOBbit (HBT) se requiere para la división celular post-embriogénica en el meristema de raíz y en los meristemas apicales de brote. Los alelos fuertes carecen de división celular en el meristema de raíz de la etapa clave del inicio de embriogenia. La apariencia de las plántulas 7 días después de germinación en 0,8 % plantagar se muestra (A) una planta *A. thaliana* tipo natural (ecotipo Columbia-O;

Col-O), (B) una plántula hbt2311 *A. thaliana* homocigoto mutante (Col-O), (C) una plántula hbPGII-24/1 *A. thaliana* homocigoto mutante (ecotipo Landsberg erecta; Ler), y (D) una plántula hbte56 *A. thaliana* mutante (ecotipo Col-O). Los mutantes se muestran en 4 x de magnificación con relación a la plántula tipo natural (Willemssen et al. 1998).

Figura 2. Expresión de gen marcador de calíptro de raíz y calíptro de raíz lateral.

5 La punta de raíz distal de *Arabidopsis* contiene tipos de células especializados tal como aquellos que construyen el capilar de raíz de columnela o el capilar de raíz lateral. Estos tipos de células no se especifican en plántulas hbt, lo que demuestra que la actividad de gen HBT se requiere para la especificación del destino celular en la punta de raíz distal. Se ilustran la expresión del gen marcador específico calíptro de raíz que comprende el promotor 35S::B2 vinculado funcionalmente al marcador GUS (A, C) y la expresión del gen marcador específico calíptro de raíz lateral que comprende el promotor LRC244 vinculado funcionalmente al marcador GUS (B, D). Las raíces *A. thaliana* tipo natural (ecotipo Col-O) se muestran en (A) y (B), la punta de raíz de una plántula hbt2311 *A. thaliana* homocigota mutante se describe en (C) y (D) (Willemssen et al. 1998). El capilar de raíz se tiñe abundantemente en (A) y las flechas (B) apuntan a las capas de células de calíptro de raíz lateral que expresan GUS. No es evidente tinte GUS en (C) y (D). La barra representa aproximadamente 45 mm.

15 Figura 3. Expresión de gen marcador calíptro de raíz ectópica y formación de capilar de raíz ectópica en plántulas *A. thaliana* de mutante hbt.

Los cambios post-embriogénicos en el patrón de expresión de gen y la identidad celular en la epidermis demuestran que el gen HBT se requiere para la determinación de destino celular en tipos celulares de no raíz. Esto se ilustra por la expresión del marcador calíptro de raíz (35S::B2 vinculado funcionalmente a GUS) no solo en el capilar de raíz sino también ectópicamente en el hipocotilo y las cotiledóneas (A) de plántulas hbt2311 *A. thaliana* mutantes, y mediante la formación de capilares de raíz ectópicas en el hipocotilo de las plántulas hbt2311 *A. thaliana* mutantes que crecen en la oscuridad (B).

Figura 4. Centro inactivo y expresión de gen de marcador de endodermis de raíz.

25 La punta de raíz de *Arabidopsis* contiene tipos celulares especializados tal como aquellos que construyen el centro inactivo (QC) o la endodermis. El QC no se especifica en plántulas hbt, lo que demuestra que se requiere actividad del gen HBT para especificación de las células QC en la punta de raíz. Se ilustran la expresión del gen marcador específico QC que comprende el promotor QC46 vinculado funcionalmente al marcador GUS (A, C) y la expresión del gen marcador de endodermis de raíz que comprende el promotor SCARECROW (SCR) vinculado funcionalmente al marcador GUS (B, D). Las raíces *A. thaliana* tipo natural (ecotipo Col-O) se muestran en (A) y (B), la punta de raíz de una plántula hbt2311 *A. thaliana* homocigota mutante se describe en (C) y (D). El QC se tiñe abundantemente en (A) y la endodermis es visible en (B). No es evidente el tinte GUS en (C) pero es aún visible en (D).

Figura 5. Transferencia de células epidérmicas en plántulas *A. thaliana* de mutante hbt.

35 Las plántulas *A. thaliana* tipo natural y las plántulas hbt²³¹¹ *A. thaliana* homocigotas mutantes se criofijan y se toma una fotografía mediante microscopía de electrones de exploración. Son claramente visibles las disposiciones irregulares de células epidérmicas hinchadas de cotiledóneas y hipocotilo de la plántula mutante (C) comparado con cotiledóneas (A) y hipocotilo (B) de la plántula tipo natural.

Figura 6. Estabilización de ciclina B1 en plántulas *A. thaliana* de mutante hbt.

40 La estabilidad de ciclina B1 se evalúa indirectamente por medio de tinción GUS. El promotor B1 de ciclina *A. thaliana* se vincula funcionalmente al dominio de inestabilidad de ciclina B1, es decir secuencia de destrucción, seguido por GUS. La estabilización de GUS conduce a tinción GUS aumentada en la plántula de hbt²³¹¹ *A. thaliana* de mutante homocigoto (B) con relación a una plántula tipo natural (A) Aunque las plántulas tipo natural muestran fuertemente la tinción GUS (indicado por flechas), un patrón irregular de tinción GUS es obvio en el fondo genético mutante hbt.

Figura 7. Estabilización de AXR3 en plántulas *A. thaliana* de mutante hbt.

45 La estabilidad de AXR3 se evalúa indirectamente por medio de tinción GUS. El promotor de choque térmico de tabaco se vincula funcionalmente al dominio I y la inestabilidad del dominio II de AXR3 seguido por GUS. La estabilización de GUS conduce a tinción GUS aumentada en la plántula hbt²³¹¹ *A. thaliana* homocigota mutante (B) con relación a una plántula tipo natural (A). Aunque las plántulas tipo natural muestran fuertemente tinción GUS, un patrón irregular de tinción GUS (indicado por flechas) es obvio en el fondo genético hbt mutante.

50 Figura 8. Alineación de secuencia de aminoácidos de Cdc27A y HBT/Cdc27B.

Se alinean las secuencia de aminoácidos de Cdc27A (número de acceso GenBank AC001645; ID de proteína AAB63645.1) y de HBT/Cdc27B2 de *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col-O). La parte terminal NH₂ de la proteína HBT/Cdc27B no anotada en el GenBank (número de acceso AC006081; ID de proteína AAD24396.1) está bajo corchete e indicada por la SEQ ID NO 5. Se introducen espacios (-) para asegurar una alineación óptica. Los aminoácidos óptimos se somborean en un recuadro negro. Los aminoácidos similares (los grupos M, I, V, L; R, K, H; F, W, Y; D, E; N, Q; S, T) se somborean en un recuadro gris.

Figura 9. Representación esquemática del marco de lectura abierto HBT y la secuencia de proteínas e indicación de las mutaciones hbt diferentes.

Los codones de inicio y parada se subrayan. En el nivel de aminoácido, el codón de parada se representa por un '*'. Se indican entre paréntesis cuadrados y se somborean en un recuadro gris los diferentes dominios de repetición de tetratricopéptido (TPR) de HBT con base en la delineación de los TPR en Cdc27 de levadura (Lamb et al. 1994). Se indican adicionalmente en los cuadros los diversos puntos de mutación caracterizados en diferentes mutantes hbt, el nucleótido y aminoácido mutados se somborean en un recuadro negro. El número mutante se indica por fuera del cuadro, por ejemplo hbt5421. En un mutante, hbt2311, el residuo de glutamina se cambia en un codón de parada indicado por '**' y se somborea en un recuadro negro. Ocurren tres mutaciones en los límites de intrones y resultan en la eliminación de parte de la proteína HBT. La inserción se aísla independientemente cuatro veces y se indica por hbt5422, hbt5423, hbt5859, hbt9624. Los tramos de nucleótidos y aminoácidos insertados se delimitan por paréntesis cuadrados y se subrayan. Los mutantes de eliminación son hbt9620 y hbt5721 y las eliminaciones se indican entre paréntesis redondos y la secuencia de nucleótidos eliminada se somborea en un recuadro negro. El número de aminoácidos a la derecha no tiene en cuenta la inserción o las eliminaciones.

Figura 10. Representación esquemática del gen HBT con indicación de intrones, exones y mutaciones de puntos hbt.

Los codones de inicio y parada se subrayan. Los exones se somborean en un recuadro gris. Las mutaciones de punto indican adelante la secuencia de nucleótidos y se somborean en un recuadro negro y con el número mutante, por ejemplo hbt5421.

Figura 11. Análisis de hibridación In situ de HBT/CDC27B y expresión AtCDC16 en embriones *A. thaliana* tipo natural.

Se realiza hibridación in situ con sondas de ARN anticodificantes marcadas DIG específicas de gen. Un patrón de expresión irregular HBT es visible en etapa octante (A) y etapa clave (B) de embriones *A. thaliana* tipo natural. Como un control negativo, se realiza hibridación in situ con una sonda de ARN codificante marcada DIG en embriones en etapa octante (C). Un patrón de expresión AtCDC16 uniforme es visible en etapa octante (D) y etapa clave (E) de embriones *A. thaliana* tipo natural.

Figura 12. Análisis de hibridación in situ de expresión HBT/CDC27B, AtCDC16 y AtCDC27A en raíces de plántulas *A. thaliana* tipo natural.

Se realiza hibridación in situ con sondas de ARN anticodificantes marcadas DIG específicas de gen. Un patrón de expresión irregular HBT es visible en una sección cruzada de una raíz (A) y una raíz mutante completa (B) de plántulas *A. thaliana* tipo natural. Una expresión uniforme en una raíz mutante completa de plántulas *A. thaliana* tipo natural se observa para AtCDC16 (C) y AtCDC27A (D).

Figura 13. Lista de secuencias (SEQ ID NOs).

Figura 15. Ensayo de complementación de levadura

La expresión de AtCDC27A y HOBBIT comparado con un vector vacío pREP3 bajo el promotor represible de tiamina en *S. pombe* nuc2ts, a la temperatura permisiva (25° C, A) y la temperatura restrictiva (37° C, B)

Figura 16. Patrón de expresión del gen HBT.

La expresión HBT durante embriogenia (A-D) y post embriogenia (M-O) en raíces tipo natural utilizando sondas anticodificantes (A, B, D, M y N) y codificantes (C y O). Expresión HBT en embriones hbt mutantes con una sonda anticodificante (E y codificante (F). Expresión AtCDC27At de embriones tipo natural (G-I) y plántulas (P-R) con sondas anticodificante (G, K, P y Q) y codificante (I y R). Marcado doble de AtCYC2B (J) y HBT (K) en una sección única (ambos sondas anticodificantes) y marcado doble de sondas AtCYC2B anticodificante y HBT codificante en una sección única como un control (L). En ambos casos la detección de la sonda AtCYC2B anticodificante (fast red)

se realiza seguido por una etapa de inactivación de la fosfatasa alcalina y el marcado y detección de la sonda (anti)codificante HBT (NBT/BCIP).

Figura 17. Aplicación de auxina exógena.

5 Expresión de DR5::GUS en raíces tipo natural (A-E) y en plántulas hbt (E-I). Se transfieren plántulas tres días post germinación a placas 0.5 GM (A y F) y las placas 0.5 GM que contienen 10⁻⁹ M 2,4 D (B y G), 10⁻⁸ M 2,4 D (C y H), 10⁻⁷ M 2,4 D (D y I) y 10⁻⁶ M 2,4 D (E y J) y se incuban durante otros tres días. Se muestran mutantes en 10x de magnificación de la plántula tipo natural.

Figura 18. Mediciones de longitud de célula de hipocotilo y epidermis.

(A) Longitudes de hipocotilo de mutantes únicos hbt y mutantes dobles hbt axr3-1T germinados en la luz.
10 (B) Longitudes de hipocotilo de mutantes únicos hbt y hbt axr3-1T de mutantes dobles germinados en la oscuridad.
(C) Longitud de células epidérmicas de hipocotiledóneas de los mutantes únicos hbt y los mutantes dobles hbt axr3-1T. L: Plántulas germinadas en la luz, D: plántulas germinadas en la oscuridad.

Figura 19: Los mutantes hbt contienen niveles mayores de proteína ARX3.

15 (A) Análisis RT-PCR de expresión AXR3 en Col-0 Arabidopsis tipo natural (tipo natural) y el fondo mutante hobbit (hbt9620 y hbt5722). Se extrae el ARN de plántulas mutantes y tipo natural. Después de síntesis de cADN, se realiza PCR respectivamente utilizando cebadores específicos AXR3, y ubiquitina (UBQ) como control constitutivo. Los resultados muestran que el mRNA AXR3 son menores en el tipo natural.

20 (B) Análisis Western blot de expresión AXR3/IAA17 en Col-0 Arabidopsis tipo natural (tipo natural) y el fondo hobbit (hbt2311, hbt9620 y hbt56). Las proteínas se extraen de las plantas completas (10 d.p.g.), se cuantifican, y 1 mg se separa en un gel de poliacrilamida 15 %. Después de la transferencia, las membranas se incuban primero con el anticuerpo anti-AXR3/IAA17 (transferencia superior), y luego con anticuerpo anti-actina (transferencia inferior) como el control de la carga de proteína. El resultado muestra que los mutantes hbt acumulan una banda en el tamaño AXR3 esperado.

25 (C) Análisis Western de expresión AXR3/IAA17 en hbt2311 y hbt2311, axr3GT3958 (plantas individuales de 3 cruces independientes). El experimento se lleva a cabo en las mismas condiciones como B, excepto que las plantas son 25 d.p.g. El resultado muestra que la vasta mayoría de proteínas detectadas por el antisuero en plántulas hbt es AXR3/IAA17.

30 Los marcadores de peso molecular en kilo Dalton (kDa) se indican en el lado derecho del panel B y C y. La banda esperada de ARX3 se indica por una flecha). Como un control la proteína ACTIN también se tñe en los mismos extractos de planta.

Figura 20: Contenido de ADN nuclear en hipocotiledóneas después de endoreduplicación.

El histograma del contenido de ADN de las células hipocotiledóneas de plantas arabidopsis tipo natural (tipo natural) y plantas mutantes hbt (hbt2311). La distribución ploidia de las diferentes células se mide de acuerdo con el contenido de ADN.

35 EJEMPLOS

Para todas las etapas de clonación molecular, y a menos que se indique otra cosa, se siguen los protocolos estándar como se describe en Sambrook et al. 1989.

Ejemplo 1. Identificación de plantas Arabidopsis thaliana de hbt mutante y análisis de complementación.

40 Se han identificado once alelos del gen HBT, todos con similares fenotipos mutantes (Willemsen et al., 1998). Debido a que se han inducido todas las mutaciones por EMS, el aislamiento del gen HBT basado en su posición de mapa es el método más directo. Diversos factores influyen de la eficiencia del mapa con base en el procedimiento de clonación. Primero, el tamaño de la población de mapeo es muy importante. Cuando se generan muchos recombinantes aumenta la oportunidad de que exista un evento de cruce cerca al gen de interés y así se reduce el número de genes candidatos que se han secuenciado para identificar el gen mutante. Segundo, aunque EMS
45 usualmente introduce los cambios de par base único, existe un cambio pequeño de redistribuciones cromosómicas

que interfieren fuertemente con la calidad de población de mapeo. Cuando dicha redistribución rodea el locus mutante, no habrá recombinación en esta área, debido a que las redistribuciones interfieren con la alineación correcta de cromátidas homólogos durante meiosis necesaria para la ruptura precisa, intercambio y reunión de los cromátidas en el proceso de recombinación. Por lo tanto generamos dos poblaciones de mapeo, utilizando diferentes alelos. Tercero, la cantidad de información que está disponible a cerca de la región cromosómica del gen mutado. Si la región cromosómica en la que el gen mutante se ubica se cubre por un gran número de marcadores, estos se pueden utilizar para el mapeo fino del locus mutante. Sin embargo, si los marcadores disponibles son escasos, se han desarrollado nuevos marcadores, que consumen tiempo. Diversos mapas detallados se han generado al combinar datos marcadores moleculares y genéticos disponibles que proporcionan una estructura principal para el mapeo del locus mutante (Chang et al., 1988; Nam et al., 1989; Talon et al., 1990; Reiter et al., 1992; Hauge et al., 1993). Una gran conexión de polimorfismos de nucleótido únicos (SNP) entre Col-0 y Ler se ha publicado recientemente en la Base de Datos Arabidopsis thaliana que se puede utilizar para diseñar nuevos marcadores moleculares. Aunque muchos marcadores clásicos dependen de la presencia de un polimorfismo en un sitio de restricción, se han desarrollado diversos nuevos marcadores moleculares que distinguen diferentes ecotipos mediante un polimorfismo único de nucleótido. y finalmente, la información disponible a cerca de la secuencia del genoma Arabidopsis completo que facilita un desarrollo rápido de nuevos marcadores moleculares, debido a que también se proporciona información a cerca de la posición de los genes. Esto es importante cuando se han desarrollado marcadores moleculares para combinaciones de ecotipo diferentes a Col-0 y Ler, para los que es una cantidad limitada de los SNP conocidos. En este caso, las regiones intragénicas seleccionadas para generación de marcador aumentará el cambio para identificar polimorfismos.

Generamos un conjunto de recombinantes y mediante detección de esta colección de recombinantes con marcadores publicados (morfológicos y moleculares) y nuevos marcadores (moleculares) que se han desarrollado en nuestro laboratorio, somos capaces de posicionar el locus hbt en un intervalo de ADN de aproximadamente 120 kb. En este punto iniciamos el secuenciamiento en los marcos de lectura abiertos presentes en este intervalo en el fondo mutante de dos alelos Col-0 y esto revela mutaciones en una de las unidades de transcripción. Confirmamos que esta unidad de transcripción representa el gen HBT mediante secuenciamiento de todos los alelos mutantes y mediante análisis de complementación. Más en detalle, estos experimentos fueron llevados a cabo como sigue.

Para experimentos de mutagenie se utiliza Arabidopsis thaliana ecotipo Columbia-0 (que contiene un transgen de marcador que consiste del promotor del gen S-adenosil-metionina-sintetasa expresado vascular (SAM) fusionado a β -glucuronidasa; Peleman et al., 1989). Las semillas secas se mutagenizan con 10 mM etil metano slufonato frescamente hecho (EMS) en agua durante 24 horas a 22° C. Las semillas se siembran en el suelo y se cultivan en un cámara de planta a 22° C, 75 % de humedad con un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Las silicuas individuales que representan 10,000 familias M1 se cosechan, luego las semillas se suspenden en 0.1 % de agarosa y se ponen en placas en un medio que contiene 0.8 % de agar de planta (Duchefa) y 50 mg/ml de ampicilina.

Las plántulas M2 agrupadas en familias individuales se detectan bajo un microscopio para disección Zeiss stemi SV-6 para los mutantes defectuosos de meristema de raíz al pre-seleccionar mutantes con longitud de raíz severamente reducida, y análisis posterior de la estructura calíptra de raíz en especímenes depurados (véase Ejemplo 3). La progenie M3 de los hermanos de mutantes candidatos con estructura calíptra de raíz aberrante se vuelve a probar el fenotipo mutante, y se depuran las preparaciones de óvulo (véase Ejemplo 3) se examinan utilizando ópticas Nomarski para detectar anomalías en el desarrollo del embriones. Se recuperan seis alelos hbt, 2311, 5721, 5859, 8052, 9620 y 9624. 7.7 % de las familias M1 segregan mutantes de clorofila, y se recuperan 6 monópteros y 7 alelos gnom (análisis de complementación por T. Berleth y U. Mayer, datos no mostrados). El alelo hbt1611 se recupera de un experimento de mutagenia separado realizado anteriormente al utilizar semillas Landsberg erecta. Los alelos hbt GVI-20/1, GVII-24/1, G221-30/2 (ecotipo Landsberg erecta) se proporcionan por G. Jurgens (University of Tübingen) y el alelo hbfe56 (ecotipo Columbia-0) se proporciona por C. Bellini y H. Höfte (INRA, Versailles).

En las pruebas de complementación combinamos alelos hobbit (con el marcador dominante SAM-GUS) como donantes con los alelos Ler o hbfe56 como receptores, que permiten la selección de eventos de polinación cruzada exitosos. No se observa complementación en combinaciones del alelo de referencia hbt2311 con hbte56, hbtGVI-20/1, hbtGVII-24/1 hbt221-30/2 y hbt1611, en combinaciones de hbt5859 con hbte56 y hbtGVII-24/1, en combinaciones de hbt5721 y hbt9624 con hbtGVI-20/1, y en combinaciones de hbt8052 y hbt9620 con hbtGVII-24/1, poniendo así todos los alelos hbt en un grupo de complementación único (Willemsen et al. 1998).

Ejemplo 2. Recombinación de mapeo del locus hbt.

Se utilizan plantas heterocigotas hbt^{GVI-20/1} (ecotipo Ler) para polinizar plantas Col-0 y se seleccionan plantas F1 que segregan mutantes. Los mutantes individuales F2 hbt se cultivan en nitrógeno líquido, y se suspenden en 200 ml de ddH₂O. Se analizan dos a ten ml de los aislados de ADN utilizando CAPS y marcadores microsatélite (Koorneef and Stam, 1992). Las frecuencias de recombinación en cromosomas n hbt se calculan como $r = n_{Col} / (n_{Col} + n_{Ler})$, y se calculan las distancias genéticas utilizando la función de mapeo Kosambi. El ligado se observa entre hbt y los

marcadores de cromosoma II m246 (cromosomas recombinantes 8/52, 15.465.5 cM) y GPA1 (cromosomas recombinantes 24/294, 8.261.6 cM). El alelo Col-0 hbt 2311 se cruza posteriormente con una estirpe Ler con marcadores de flaqueo sti y er. Las estirpes F2 con cromosomas recombinantes se seleccionan con base en la apariencia de "solo sti" y "solo er". Se prepara ADN de estirpes F3 de estos recombinantes que segregan hbt, y una variedad de marcadores CAPS y SNP se utilizan para mapear el gen en una región en BAC F6F22 y T2G17.

Sin embargo, los dos marcadores más cercanos que flanquean el gen HBT se ubican en dos BAC que se sobreponen parcialmente, F6F22 y T2G17. La distancia física entre los dos marcadores es aproximadamente 120 kb. Estos dos BAC se secuencian mediante el Genoma Iniciador Arabidopsis (AGI) y 30 marcos de lectura abiertos putativos (ORF) se predicen en esta área. Para amplificar y secuenciar estos ORF candidatos, se diseñan cebadores. El ADN se aísla de dos alelos Col-0 hbt (hbt2311 y hbt9620, PCR amplificado y secuenciado. Los cebadores PCR que consisten de 30 nucleótidos se diseñan con un promedio de temperatura de fusión de 65° C utilizando el programa Primer3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer.htm>). Se mezcla 5-10 mg de ADN con una mezcla PCR (75 mM Tris-HCl pH 9.0; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0.1 %. Tween 20; 2mM MgCl₂; 200 µM dNTP; cebadores 200 µM; 1u polimerasa). El ADN se amplifica a través de 35 ciclos (94° C durante 1 min, 60° C durante 1 min y 72° C durante 1.5 min por ciclo) y se detecta en 1 % de gel de agarosa (Hispanagar). Para productos de secuenciamiento de dos amplificaciones PCR independientes se lavan sobre una columna (Equipo de Purificación de Producto PCR Altamente Puro: Boehringer Mannheim). Se realizan reacciones de secuencia utilizando la Premezcla de Secuenciamiento Grande de Terminador de Tinte (GENPAK LTD) y se analizan en un Analizador Genético ABI PRISM 310.

Las secuencias obtenidas se comparan con la secuencia Col-0 publicada en la base de datos del Centro Nacional para Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Identificamos mutaciones para estos dos alelos solo en ORF T2G17.20 y se decide secuenciar este ORF en el fondo mutante de los otros alelos hbt. Ocho más alelos hbt revelan los cambios de secuencia en T2G17.20, por lo tanto concluimos que esta unidad de transcripción representa el gen HBT.

Análisis de alelos mutantes

Las mutaciones en los alelos hbt se identifican mediante productos de secuenciamiento de dos reacciones PCR independientes de plántulas mutantes.

(Cebadores:

SEQ ID Nr. 41: HBT AF: AGAGTGACCTACTTACTACATTGGTACAAAACC;

SEQ ID Nr. 42: HBT AR: CCCATTAAAGCGTAAACGCTGCTCTCTGAAG;

SEQ ID Nr. 43: HBT BF: TATTCAAATGGTCAATTATAAAGCCCAATAAG;

SEQ ID Nr. 44: HBT BR: TGAATGAATACTTTCTCAACTACTATTGAAGC;

SEQ ID Nr. 45: HBT CF: TATGAGTCAACTGTTAGAGGAATGTCTCTG;

SEQ ID Nr. 46: HBT CR: GAAGTTGACAGTTGTTGCATATACTGC;

SEQ ID Nr. 47: HBT DF: TCTTACACTTTTCTGTCTGCTCAACTTTCA;

SEQ ID Nr. 48: HBT DR: CAAAGAACTCAATTTAGAACCTCCCAAATAC;

SEQ ID Nr. 49: HBT EF: CAGATTTCTGGCAGACTATTTTCTGATTCT;

SEQ ID Nr. 50: HBT ER: AAGTAACTCAGCTTCATGTCTTCCTTCAAA;

SEQ ID Nr. 51: HBT FF: GATATTTATTTGCAGCATTTGAAGGAAGAC;

SEQ ID Nr. 52: HBT FR: GAATTTTCAGATTTAAAAACCATCATTGGA;

SEQ ID Nr. 53: HBT GF: AGTCTTTAAACAGAGTCGTCCAATGATG;

SEQ ID Nr. 54: HBT GR: ATATTGCGATTAGGTAGTGTACGGACAAC.

Se sintetiza el cADN de ARN de los mutantes de división (GVII-24/1, G221-30/2, 5859, 9624, 9620 y 5721) y la región de interés se amplifica PCR y se secuencia.

Ejemplo 3. Análisis fenotípico de plantas *Arabidopsis thaliana* hbt mutantes.

La estirpe de marcador calíptro de raíz que contiene el promotor 35S::B2 fusionado con GUS (β -glucuronidasa) (Benfey et al., 1990) (figura 2 y 3) y la estirpe de marcador calíptro de raíz lateral que contiene el promotor específico calíptro de raíz lateral LRC244 fusionado con GUS (Malamy and Benfey, 1997) (figura 2) se proporcionan por P. Benfey (New York University). La estirpe de marcador que contiene el gen quimérico que comprende el promotor específico de centro inactivo GC46 y el gen GUS (figura 4) se obtiene de la colección INRA-Versailles. La estirpe de marcador que contiene el promotor SCARECROW (SCR) fusionado con GUS (pSCR::GUS) (figura 4) se proporciona por Dr. Philip Benfey (Wysocka-Diller et al., 2000). Se utiliza el pGL2::GUS (Masucci et al., 1996).

La estirpe de marcador que contiene el promotor de choque térmico de soja HSP19 que dirige la expresión de la proteína de fusión que comprende los dominios I y II AXR3 seguido por GUS (figura 7) se obtiene de O. Leyser (University of California at Davis). La estirpe de marcador que contiene el promotor A. *thaliana* de ciclina B1 (Ferreira et al. 1994) dirige la expresión de la proteína de fusión que comprende la secuencia de destrucción de ciclina B1 seguido por GUS (figura 6) se proporciona por Dr. Peter Doerner (Salk Institute for biological studies, La Jolla).

Todas las estirpes de marcador se cruzan con heterocigotos hbt. Las estirpes F2 derivadas de estos cruces segregan hbt y homocigotos para los marcadores se seleccionan y analizan por tinción X-gluc como se describe adelante. La expresión de la proteína de fusión AXR3-GUS se activa al aplicar un choque térmico (2h a 37° C).

La fijación, inclusión, corte y microscopía para análisis histológico de plántulas y embriones se realizan como se describió previamente (Scheres et al., 1994, 1995). Para análisis cuantitativo de fenotipos de embriones, los óvulos se depuran durante 10 minutos en una mezcla 8:3:1 de hidrato cloral: agua destilada: glicerol (Mayer et al., 1991) y se visualizan embriones utilizando ópticas Nomarski en un fotomicroscopio Zeiss III.

El meristema apical de brote en embriones maduros de hbt²³¹¹, hbt⁵⁸⁵⁹, hbt⁵⁷²¹, hbt⁸⁰⁵², hbt⁹⁶²⁰, hbtG^{VII-24/1} y hbtG^{221-30/2} se visualiza mediante microscopía de exploración láser confocal (CSLM) como se describió previamente (Clark et al., 1995).

Se determinan los números de células de la raíz en plántulas depuradas con hidrato cloral al contar las células corticales en archivos que se extienden desde el centro inactivo hasta el capilar de raíz más superior. Para mediciones de longitud de raíz las plántulas se cultivan a 1/2 GM (8 g/l de agar de planta Duchefa, 2.2 g/l de Murashige y sales Skoog incluyendo vitaminas, 1 % de sacarosa) durante 10 días. Después de depuración de las plántulas las raíces se miden desde la punta hasta el capilar de raíz más superior utilizando un sistema de análisis de imagen VIDAS RT (Zeiss/Kontron) con un paquete de software que está disponible en solicitud (M. Terlou, Department of Image Processing and Design, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht).

Se visualizan gránulos de almidón en el capilar de raíz de columnela con 1 % de solución lugol (Merck) en plántulas de 3 días de edad que se cultivan 1/2 GM. Las plántulas se tiñen durante 3 minutos, se enjuagan con agua, se depuran con hidrato cloral y se fotografían con ópticas Nomarski en un fotomicroscopio Zeiss III con una película Agfa APX-25.

Se determinan los números de células en el hipocotilo en plántulas depuradas de hidrato cloral de 10 días de edad. Las células corticales se cuentan en archivos del capilar de raíz más superior para el punto de bifurcación de cotiledón. Los números de células en la epidermis de cotiledón de los embriones maduros se cuentan en circunferencia y en secciones longitudinales medias muestran las cotiledóneas y el meristema apical de brote. La actividad de β -glucuronidasa en estirpes de marcador transgénico se visualización mediante tinción durante 2-16 horas a 37° C en 0.5 mg/ml de X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-glucuronida; Biosynth AG) disuelto en n-dimetilformamida, 0.1 % de Triton X-100, 0.5 mM K₄Fe(CN)₆·H₂O, 0.5 mM K₃Fe(CN)₆, y regulador de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.2.

Ejemplo 4. Hibridación in situ.

Se realiza hibridación in situ utilizando una marca de ARN digoxigenina y sistema de detección (Roche) (figura 11 y 12).

Síntesis de sonda

La sonda de ARN HOBbit se sintetiza utilizando un fragmento 600pb de la región de terminal N del cADN. El fragmento se clona en el vector PGMT, que contiene promotores de polimerasa de ARN Sp6 y T7. El ARN HBT

anticodificante se sintetiza utilizando polimerasa de ARN T7 y el control codificante control con la polimerasa de ARN Sp6.

Preparación del material

- 5 Los tejidos frescos se fijan 4 horas a 4° C en 4 % de formaldehído luego de infiltración de vacío (2 min), después de lo cual se omiten en la etapa gradual de etanol 10 %, 30 %, 50 % y se deja durante la noche a 70 % de etanol. Las muestras luego se tratan con 95 % de etanol 0.1 % de eosina durante la noche y después de varias incubaciones en 100 % de etanol 0.1 % de eosina; se realizan etapas graduales de xilema (25 %, 50 % y 75 %). El material se embebe finalmente en parafina. Se realizan secciones de 8 mm y se montan sobre portaobjetos cubiertos.

Pretratamiento antes de hibridación

- 10 La parafina se retira mediante tratamiento con xilema y los tejidos se incuban en diferentes concentraciones de etanol (100 %, 95 %, 80 %, 60 %, 30 % y 10 %). Las incubaciones en NaCl 0.83 % 5 min, PBS 5 min, 4 % de formaldehído en PBS luego de estas etapas. Después de lo cual se ha realizado un tratamiento con proteinasa K, esta etapa se sigue por una deshidratación gradual con etanol (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 95 % y 100 %).

Hibridación

- 15 Los portaobjetos se hibridan durante la noche a 62 °C.

Lavado y detección

- 20 Las etapas de lavado se realizan utilizando una solución de lavado (2xSSC, Formamida 50 %) a 65 °C durante 30 min, después de lo cual se realizan incubaciones en regulador NT (500 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8). Los portaobjetos se tratan con Rnasa A y después de incubación con la solución de lavado, las muestras se tratan con una solución de bloqueo (regulador de anticuerpo: 150 mM NaCl, 100 mM Tris, BSA y extracto de planta) durante 1 hora. Se prepara una dilución 1:1000 de anticuerpo en la misma solución de bloqueo en donde se incuban las muestras durante 2 horas. Para el Regulador de tinción (100 mM NaCl, 100 mM T, pH9, 5) se agregan los siguientes reactivos de tinción BCIP y NBT (proporcionado por Roche). La incubación durante la noche a temperatura ambiente y después de revisar la reacción de tinción se detiene mediante incubación en etanol 95 % y los portaobjetos se montan en glicerol 1:1.
- 25

Ejemplo 5. Expresión ectópica del gen HOBbit.

- 30 El cADN HOBbit como se identifica por SEQ ID NO 2 o 3 se vincula funcionalmente a un promotor operacional en construcciones de expresión de plantas se insertan dentro de un vector de transformación de planta binario adecuado que comprende adicionalmente en su marcador seleccionable T-ADN apropiado. Después de la transferencia de dichos vectores de transformación de planta a *Agrobacterium tumefaciens* por medio de electroporación, y posteriormente las plantas se transforman con procedimientos de transformación estándar. Se seleccionan las plantas transformadas en un medio que contiene el agente selectivo apropiado. Se seleccionan homocigotos de plantas T2 para los transgenes introducidos en una forma análoga. Las plantas preferidas que se van a transformar son *Arabidopsis thaliana* y plantas de cultivo.

35 Sobreexpresión

Se utilizan diversos sistemas de promotor para dirigir la expresión del gen Hobbit en las plantas transgénicas, tal como el promotor ubiquitina constitutivo, el promotor UAS de levadura activado por el factor de transcripción GAL4 y el promotor Hsp19.

- 40 El promotor responsable GAL4 permite la expresión específica del gen como sigue: Las estirpes transgénicas *A. thaliana* que contienen el ORF GAL4 vinculado funcionalmente a una amplia variedad de por ejemplo promotores de gen específicos de tejido o específicos de ciclo celular se obtienen del centro de depósito de *Arabidopsis* de Nottingham (colección J. Haseloff). El elemento GAL4 se clona entre los sitios de recombinación Cre-Lox. Dichas estirpes que expresan GAL4 se cruzan con las plantas transgénicas *A. thaliana* obtenidas anteriormente para el promotor UAS de levadura responsable de GAL4.

- 45 El promotor Hsp19 permitirá la expresión inducible Hobbit.

También el promotor *cdc2a* específico de ciclo celular, que permite la expresión específica en células de meristema. El promotor 2S2 también se utiliza para la expresión directa en células almacenadas. Para la expresión en monocotiledóneas, el promotor oleosina se utiliza para la expresión directa en células embrionarias, la prolamina para

células almacenadas y GOS2 para expresión constitutiva. En una solicitud preferida de expresión hobbit ectópica, estas construcciones se transforman en plantas de arroz por medio de transformación mediada por agrobacterium.

Los efectos fenotípicos de expresión HOBbit ectópica se estudian en plantas transgénicas *A. thaliana* que expresan constitutivamente HOBbit bajo el control del promotor constitutivo ubiquitina o en la progenie de los cruces que incluyen plantas *A. thaliana* que expresan ectópicamente HOBbit en por ejemplo una forma específica de tejido o específica de ciclo celular. Alternativamente, la expresión HOBbit bajo el control de un promotor de choque térmico se induce en una etapa post-embriogénica.

Cuando se agrega actividad Hobbit extra a las células de planta, las células de planta son más sensibles o más responsables de auxina. Alternativamente, las células de plantas normalmente no son sensibles a la auxina y después de actividad Hobbit alterada, se hacen sensibles a la auxina. Esta respuesta mayor resulta en efectos fenotípicos tal como, formación de más órganos tal como formación de más raíces laterales o diferentes patrones de ramificación. También se prevén otros efectos fenotípicos por la técnica de la presente invención debido al efecto pleiotrópico de la hormona auxina.

Regulación por disminución

La expresión ectópica del ARN anticodificante del gen Hobbit resulta en regulación por disminución de la actividad Hobbit en la célula. La actividad Hobbit menor en una célula resulta en una respuesta menor a auxina. La reducción de los efectos relacionados con auxina en estas células resulta en efectos fenotípicos tal como eliminación o retardo de la formación de órganos tal como eliminación de raíces laterales.

También se prevén otros efectos fenotípicos debido al efecto pleiotrópico de la hormona auxina.

Co-expresión

El gen Hobbit también se expresa ectópicamente (sobreexpresión o regulación por disminución) en relación con la modulación de otros genes o proteínas. Esto es particularmente interesante para diseñar un efecto fenotípico particular, con base en la combinación de los efectos mediados por cada uno de los genes. Por ejemplo, el gen Hobbit se co-expresa con un gen implicado en los efectos de citoquinina. Se sabe que ambas auxinas, que actúan en la fase S, y citoquinina, que actúan en la fase M son necesarias para inducir la división celular normal en plantas.

También, el gen Hobbit se co-expresa con otros genes que codifican un factor limitante en el proceso de ciclo celular, más particularmente un factor limitante del APC. Aquí, se re-establece un equilibrio de ambas proteínas, pero ahora en un nivel mayor que el normal.

Alteración de expresión endógena

Otra aplicación de la presente invención es la recombinación mediada por CRE-lox que crea pérdida de clones de función en el fondo tipo natural. Con este método las plantas se transforman con una construcción que lleva una copia tipo natural del gen HBT dirigido por su propio promotor entre dos sitios lox. Estas plantas transgénicas luego se tratan con un choque térmico corto, activando la recombinación dirigida CRE y la eliminación del gen HBT. Introduciendo esta construcción en un fondo de mutante hbt resulta en una planta tipo natural complementada. La activación CRE de choque térmico posterior así crea clones mutantes en una planta tipo natural heterocigota de otra forma. Esto es un sistema poderoso debido a estos clones mutantes se estudia la función del gen, sin defectos a largo plazo y posibles indirectos. Dichos efectos probablemente están presentes en el mutante hbt. También es posible inducir estos clones en plantas de adulto, para estudiar la función HBT en la planta adulta por ejemplo durante desarrollo de flores. Estos experimentos proporcionan información importante y poderosa de cómo el gen HBT liga la progresión del ciclo celular para competencia de desarrollo.

Ejemplo 6: Complementación de levadura: función de HOBbit en el APC

La región codificante del cADN HBT se amplifica por PCR utilizando los siguientes cebadores: SEQ ID Nr. 55: YC F: GAAGTCGACACAACTATGGAAGCT y SEQ ID Nr. 56: YC R: AATCATACCCAAGGATCCTGGAG. El PCR se lleva a cabo utilizando el Sistema de Amplificación ELONGASE esencialmente como se recomienda por la fabricación (Life Technologies), excepto que las reacciones se ciclizan automáticamente a través de ciclos de tiempo/temperatura como sigue: desnaturalización 94° C/1 min; hibridación 50° C/1 min, y extensión 68° C. El fragmento de ADN amplificado resultante se purifica a través de gel de agarosa, y se introduce en pGEM-T (Promega). Se secuencian el plásmido resultante. Se libera el inserto de aproximadamente 2,4 kb mediante digestión con Sall y BamHI y transcripcionalmente fusionado con el promotor represible tiamina (not1) en el vector lanzadera de levadura pREP3 (Maundrell, 1990), que contiene LEU2 como un marcador seleccionable. La construcción de plásmido se transforma en la cepa *Schizosaccharomyces pombe* nuc2-663 (Hirano et al., 1988), utilizando el método

de acetato de litio (Okasaki et al., 1990). Se inoculan las colonias resultantes Leu⁺ en medio líquido mínimo (Moreno et al., 1991) que contiene 5mM tiamina y se cultivan durante la noche a 25° C. Las células se lavan en medio mínimo sin tiamina, dividido en dos matraces y se cultivan a 25° C durante 16 hr para inducir el promotor. Un matraz se cambia a 37° C, el otro se mantiene a 25° C y las muestras se toman cada dos horas para medir la densidad óptica.

- 5 El cADN HBT complementa parcialmente una mutación nuc2ts en *S. pombe* (véase figura 15).

Ejemplo 7: Hibridación in situ:

La expresión de HBT es regulada por el ciclo celular y la expresión del gen HBT se regula por el ciclo celular con un pico de expresión en la fase G2/M.

- 10 Se realizan hibridaciones in situ utilizando una marca de ARN digoxigenina y sistema de detección (Roche). Las sondas codificante y anticodificante de diferentes regiones de cADN del gen HBT y se sintetizan CDC27At (figura 16): parte del ORF de terminal N, central, y terminal C. Se utilizan los siguientes cebadores:

SEQ ID Nr. 57: HBT NF: GCAACAACGTCAACTTCCCTCGGCTT

SEQ ID Nr. 58: HBT NR: AGAACCAGTCGTTGAGGCAGTATTAGGCC;

SEQ ID Nr. 33: HBT 2F y SEQ ID Nr. 34: HBT 2R; SEQ ID Nr. 35: HBT 3F y SEQ ID Nr. 36: HBT 3R;

- 15 SEQ ID Nr. 59: CDC27 1 F: ATGATGGAGAATCTACTGGCGAATTG;

SEQ ID Nr. 60: CDC27 1R: CATCGAGGAAAGAGAAGGTGCATAG;

SEQ ID Nr. 61: CDC27 2F: ATCCTAGTGAATCTTCCCCGGATCG;

SEQ ID Nr. 62: CDC27 2R: AGCCAGTTGAAATTGATGCTGCG;

SEQ ID Nr. 63: CDC27 3F: GATGCAGAGAGATGCTACCGGAAGGC;

- 20 SEQ ID Nr. 64: CDC27 3R: CTAAATGCAAAATGTGACCATGATTG

Los tejidos se fijan, se deshidratan y se embeben como se describe (Wilkinson and Nieto, 1993). Se realiza hibridación a 62° C y las etapas de lavado se llevan a cabo bajo condiciones exigentes (2xSSC, 50 % de formamida a 65° C). Se realizan marcas dobles de acuerdo con Long and Barton (1998). La sonda AtCYC2B anticodificante se marca con digoxigena-11-UTP y las sondas HBT anticodificante y codificante con fluoresceína-12-UTP. Primero se detecta AtCYC2B utilizando el anticuerpo anti-digoxigena (1:1250) al que se conjuga la fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim). Se utiliza Fast Red como un sustrato. Luego se detectan transcritos HBT utilizando el anticuerpo anti-fluoresceína (1:6000) también conjugado con fosfatasa alcalina. Se utiliza NBT/BCIP como un sustrato.

- 30 El material de planta de microscopia de luz se depura y se monta de acuerdo con Scheres et al., 1994 y se fotografía utilizando un microscopio Axioskope 2 con ópticas Nomarski (Zeiss) y una Cámara Digital Nikon (Nikon, DXM1200). Para los tejidos EM de exploración se fina de acuerdo con (Bowman et al., 1989) y se visualizan con un microscopio Philips XL301abs de Feicompagny.

Ejemplo 8: Estructura de transcripto HBT

- 35 Para determinar la secuencia de transcripto correcto del gen hobbit, el ARN se aísla de plántulas Col-0 utilizando un equipo Purescript (Gentra) y se realiza RT-PCR (equipo Ready-to-go; Pharmacia) utilizando los siguientes cebadores:

SEQ ID Nr. 31: HBT 1F GAAGAAAGGCAACAACATGGAAGCTATG;

SEQ ID Nr. 32: HBT 1 R: GAACTGTCAAGTAATAAGGGAGTTTGGGTTT;

SEQ ID Nr. 33: HBT 2F: ATGCAACAACGTCAACTTCCCTCG;

SEQ ID Nr. 34: HBT 2R: TATCCATTCTTCTAAGCAATAAGGAGAAGC;

- 40 SEQ ID Nr. 35: HBT 3F: AAATTTTAAACCTCCTTAGGACACTCGGA;

SEQ ID Nr. 36: HBT 3R: TCACGGGCTCTCATCGATCTCATCT.

Adicionalmente, el producto obtenido con los cebadores HBT 1 F y HBT 1 R se utiliza como una sonda para detectar una colección de cADN (Giraudat et al., 1992). El cADN identificado se secuencía junto con los productos RT-PCR. El extremo 3' del cADN identificado de HBT se confirma utilizando un equipo 5'/3' RACE (Boehringer Mannheim; cebadores: SEQ ID Nr. 37: HBT 3'2F: GTTCTTGAGGAGCTCAAAGAGTATG y SEQ ID Nr. 38: HBT 3'1F: GCTTTAATGGGCAGGATCTATAAG) y mediante secuenciamiento del producto RACE.

Se determina el sitio de inicio de transcripción HBT utilizando Protección RNasa en 20 mg de ARN total de raíces y cotiledóneas y en 1 mg de ARN poli A de plántulas. Un fragmento de ADN 350 bp HBT (cebadores: SEQ ID Nr. 39: HBT BF: TATTCAAATGGTCAATTATAAAGCCCAATAAG y SEQ ID Nr. 40: HBT 5'1R: ACATGAAAATAGCATTTTTGTAGAC), que incluyen el ATG putativo y el inicio de transcripción, se subclona en un vector pGEMT (Promega). Las sondas de ARN anticodificante y codificante se sintetizan utilizando la polimerasa de ARN T7 y Sp6 y el experimento de protección de RNasa se lleva a cabo utilizando el Equipo de Protección RNasa Ambion RPA II, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En este experimento la sonda de control endógeno utilizada es el ARN 18S proporcionado por Ambion. Las comparaciones con la secuencia de proteínas deducida se realizan utilizando el programa BLAST.

Ejemplo 9: Prueba de sensibilidad de auxina.

Se utilizan construcciones DR5::GUS (Ulmasov et al., 1997b). Las plántulas se germinan en medio 0.5 GM como se describe, 3 dpv transferido a placas 0.5 GM frescas que contienen diferentes concentraciones de 2,4 D o IAA ($5 \cdot 10^{-9}$ M hasta $5 \cdot 10^{-6}$ M) (véase figura 17) y se incuban durante 3 días adicionales. Después que se visualiza la b-glucuronidasa como se describe (Willemsen et al., 1998).

Ejemplo 10: axr3-1 T cruces para hbt²³¹¹

Las plantas homocigotas axr3-1T se cruzan con plantas heterocigotas hbt²³¹¹. El F1 se deja auto-polinar y se analizan en plántulas F2. Para medir los hipocotilos de los mutantes únicos hbt, se analizan plántulas que surgen del cruce con axr3-1T pero no segregan axr3-1 T. Se miden las longitudes de célula epidérmica e hipocotilo (véase figura 18) utilizando un Microscopio Zeiss II, una cámara CCD (Panasonic, WC-CD50) y un sistema de análisis de imagen (IBAS, Kontron/Zeiss).

Ejemplo 11: Nivel de ARX3 en mutantes hbt

Material de Planta.

Se describen aquí alelos hbt. El alelo nulo axr3^{GT3958} (véase figura 19) (estirpe de semilla GT3958, base de datos NASC) contiene una inserción de elemento único Ds en el primer exón del gen axr3 y está en el fondo L-er. Todas las plantas se cultivan en 1/2 de GM.

Análisis RT-PCR

Cebadores AXR3: SEQ ID Nr. 65: AXR3-F: TCT TCC CGG TGG AGA TAC AG y SEQ ID Nr. 66: AXR3-R:GCC CAT GGT AAA AGA GCT GA

Análisis Western blot.

Se produjo extracto de proteína cruda a partir de plántulas enteras utilizando el procedimiento EZ como se describe en Martínez-García et al. (1999). Las proteínas totales se cuantifican utilizando el reactivo DC (Bio-Rad, Hercules, USA). Se separa 1 mg de extracto en 15 % de gel de poliacrilamida, se transfiere en membranas Immobilon-P siguiendo las instrucciones del fabricante (Millipore Corp., Bedford, USA). Las membranas se bloquean, se incuban con el anticuerpo purificado anti-AXR3/IAA17 (1/500; Ouellet et al., 2001) y IgG anti-conejo conjugado con HRP (1/5000; Bio-Rad, Hercules, USA), y se revela como se describe en el equipo ECL (Amersham Pharmacia biotech., Roosendaal, Países Bajos). Las membranas luego se incuban con IgG anti-actina (1/3000; ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, USA) y IgG anti-ratón conjugado con HRP (1/5000; Bio-Rad, Hercules, USA), siguiendo el mismo procedimiento.

Ejemplo 12: Análisis citométrico de flujo.

Diez a doce hipocotilos (de plántulas cultivadas en condiciones de luz u oscuridad, 2 a 7 d.p.g.) se cortan con una cuchilla de afeitar en el regulador de extracción (pH 7.0, cloruro de magnesio 45 mM, citrato de sodio 30 mM, 20 mM

- 5 4-morfolinopropano sulfonato, metabisulfito de sodio 1 M y Triton X-100 al 0,5 % que contiene 5 µg / ml de DAPI. Los núcleos se filtran (30 mm) y 1000-2500 núcleos se analizan en un citómetro (EPICS V, Coulter) con excitación láser (40 mW) a 357 µm. Cada resultado es el valor medio de por lo menos dos mediciones independientes (es decir por lo menos 20 hipocotiledóneas). En contraste al tipo natural, un alto porcentaje de núcleos hbt con un contenido de ADN entre 2C y 4C, que sugiere progresión de fase S lenta – que se ha ligado en la literatura en actividad APC reducida (véase figura 20).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Universiteit Utrecht
- <120> Un gen que regula el desarrollo de la planta y sus usos
- 10 <130> CROP-009-PCT
- <150> EP 00870271.4
- <151> 2000-11-13
- <150> US 60/250,402
- <151> 2000-11-30
- 15 <160> 66
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 4577
- <212> ADN
- 20 <213> Arabidopsis thaliana
- <400> 1

atggaagcta tgcttgtgga ctgtgtaaac aacagtcttc gtcattttgt ctacaaaaat	60
gctattttca tgtgcgagcg tctctgcgct gagtttcctt ctgaggtaat caccctcttc	120
tttactcttc tctctctgat tttacctctc taattcaaat tctgtaaatc gaagctcttg	180
gaatggtaaa tttgatattt ttgggtttgt aattcctctg ggtatctatg aattcgtcga	240
aagtgcgtct ctttttggat ttggaattcg atagcttcac tgtgttcttc gagattgatt	300
ttggtttctt accttttagc cctttgtttt caagatccgt gtgttcaatt aggagatgaa	360
ttcgtgttct tttctctctc ttgttgaatt tgttttctct agtagctgtg ctcaatgctc	420
attactgatt tggctcttgg aaaatttgca ttttgagggg taatgacttt tgtccatata	480
tgtgatctca agttaagta tttattatcc ttggaactta gctatgagtc aactgttaga	540
ggaatgtctc tgggattatc tcaagctttg ttaaaatttg ggtaataca gcttcaatag	600
tagttgagaa agtattcatt cattcagcct ttgggtctga atattttcaa cattcgtagt	660
ggttggtccag tttctagctt cagtttagtag aaatcatgtc aataaatgat tggccttttt	720
gtttgatcac tttctgaatt ttcctcttat ataggttaat ttgcagctat tagccaccag	780
ctacctgcag aataatcaag cttacagtgc atatcatctg ctaaaggggtg cgtggcattg	840
tttcttgact tgttgcttgt tagcctttta gtcagaattt tgcaccttct tttgttaggt	900
cgttttgatt atctttgtat atatatTTTT tttttgttat gtaaaggaac acaaatggct	960
cagtcccgat acttggttcgc attatcatgc ttccagatgg accttctcaa tgaagctgaa	1020
tctgcactct gccctgttaa tgaacctggg gcggagggtat ttaatgttct ctggtatttt	1080
gcctttatct gcttactgaa tgtcatttta caaaaacagt gtgtcagttt ctggacctta	1140
tttattgatt tagttcagtg aagataacaa catgcttctg attattgtgc agatcccaaa	1200

tggtgcagca ggccattacc ttcttggaact tatttacaag tacgtttttt gttctgtcta	1260
tgcatttttt cttagattctg aatggcttag atgagatgat tcctcatata taacagtga	1320
cttttaggta tactgataga aggaagaatg ctgctcaaca atttaaacag tccttgacaa	1380
tagaccctct actttgggct gcatatgagg aattatgtat attaggtgaa cataatccgt	1440
tttctgcata cttcacagat atgttatggg tctcttacac ttttctgtct gctcaacttt	1500
cagggtgctgc tgaggaagca actgcagttt ttggtgaaac agctgctctc tcattcaaa	1560
agcagtatat gcaacaactg tcaacttccc tcggcttaaa cacttacaac gaggaacgta	1620
attcaacttc tactaaaaac acgagttctg aagattatag tccaaggcag tetaaacaca	1680
cacaaagcca tggccttaaa gatatctccg gaaatttcca ttctcatgga gtaaatggag	1740
gtgtttcgaa catgtcattc tataatacgc cttcgccagt ggctgcacag gtaatgtcac	1800
acaattgtcg tactgctttt ttatgtaata caactatctc tccatctgtt gatcacacat	1860
tctgtagtac ttaggagatt tgtgcatcat ggggtgtgat ttcacagcgt ttgtatctgt	1920
tttttctata tctgttatgc caaagaatg ggtgtctctc tcttttgact attaaaaatg	1980
gggtcttcat tatgttttag tgtctttggg ttggcttggt aattttatca accttttag	2040
ttatctgaat aataacagct gtaagtaaat gcttttttgt atttttgaaa ttgtagctat	2100
ccggtatagc tccaccacca cttttccgga attttcagcc agctgttgca aacccaaact	2160
cccttattac tgacagttct ccaaagtcca ctgttaactc tactcttcaa gcacctagaa	2220
gaaagtttgt agatgaagga aagttacgta aggtaggatt cacataatca catatctcta	2280
cttgacatca tcaaatcata attttgaatt attggtcttt ctctgtaata gtctatttctg	2340
tactcgggat gaaattttct ataccaactt tcttaccgtg agtgcattgc tcttatgttt	2400
gcagatttct ggcagactat tttctgattc tggccacga cggagttcaa gactgtctgc	2460
tgattcaggg gcaaacatta attcaagtgt tgcaacagta agcggaaatg tgaacaacgc	2520
ttccaagtat ttgggaggtt ctaaattgag ttctttggca cttcgttctg taacacttcg	2580
gaagggacac tcctgggcaa atgaaaacat ggaatgaagg tgtgacattc catgcactat	2640
accactatat tgtttgaaat ctgcccttgt gtgactattg ttatcatgcc ttctattttt	2700
ggtgtctgca tatttgaat accgtcattc tgatgggttt aggggtccgt ggggaacctt	2760
ttgatgatc aaggcctaact actgcctcaa cgaactggtc tatggcttcc aatgatcaag	2820
aagacgaaac aatgtcgatt ggtggcatag caatgagttc tcaacaacac acaattggtg	2880
tttcggaaat tttaaacctc cttaggacac tcggagaagg gtgtagactt tcatacatgt	2940
acaggtgtca ggtaggcata ttattgttct cgtgaattat gcaagtgagg tgaacctata	3000
taggcttctc tcattgtctc cttctgcttc tgggtcgttc aggaggcaact ggatacgtat	3060

```

atgaaacttc cacataagca ttataatata ggatgggttc tttcccaggt aactagtac 3120
tctttctctt ttaggtgcc atatatggat atagcctgaa tcagttttac tctagtggcc 3180
tgtgatagtt attgttgaaa ggtttatata cacatactat ggctattaaa tgtaggtcgg 3240
gaaagcatac tttgaactaa ttgactatct agaggctgaa aaggcattcc gtcttgccc 3300
tctggcttct ccttattgct tagaaggaaat ggatatatac tctacggtcc tctatgtaag 3360
tgtattatcc tggtttctaa acatgcaatc tcggatgagt gcgaaagaa atcacattta 3420
tgtaaatctt tcatcagcaa gatatgatat ttatttgag catttgaagg aagacatgaa 3480
gctgagttac ttggctcagg aactaatatc aaccgatcgc ttagctcctc aatcttggtta 3540
ttttttgtcg aagttgtttt tctgattaac gttttcattt attgttggtta ataagagaaa 3600
taagcaatca attatgtagg tgtgctatgg gaaattgcta tagcttgcaa aaggaccatg 3660
agaccgcact gaagaatttc ctacgagctg ttcaactgaa tocaagattt gcatatgcac 3720
ataccttatg tggccacgag taagagagcc tctatccatt tgactttgtc ttgcacaatg 3780
tgcttaaaat tatctgggta ttgggtctaat tgacacttct tatctttact gtctctgtag 3840
atacacaact cttgaggatt ttgagaacgg aatgaaaagt taccaaaacg cacttcgtgt 3900
agatacaaga cactacaacg catggtacgg gcttggaatg atatatctac gccaaagagaa 3960
gttagagttc tcagagcacc acttcagaat ggctttccta ataaaccoga gtctctctgt 4020
tataatgtct tatttaggga catctttgca tgcttgaag gttatcttat tactttcatc 4080
ttatcaggtc tacaagaaaa acaatctttg aagaatgact aaatgcttct tcttgttttg 4140
tgttaataga gaagttagga agcactagag ataattggagc aagccatagt agcagataga 4200
aaaaaccctc ttccaatgta ccagaaagct aacatacttg tctgcttaga aagattagat 4260
gaagctctag aagttcttga ggagctcaaa gagtatgagc cttcagagag cagcgtttac 4320
gctttaatgg gcaggatcta taagcggcga aacatgcacg ataaagccat gcttcatttc 4380
ggtctagctt tagatatgaa accgcctgca actgacgttg ctgcaataaa ggttcgagtc 4440
tttaaaacag agtcgtccaa tgatgggttt taaatctgaa aattcaagga ttcatagctt 4500
aaactgggta ttattgtctg aaacaggctg caatggagaa attgcattgt ccagatgaga 4560
tcgatgagag cccgtga 4577

```

<210> 2

<211> 2480

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

```

gaagaggcaa caactatgga agctatgctt gtggactgtg taaacaacag tcttcgtcat 60
tttgtctaca aaaatgctat tttcatgtgc gagcgtctct gcgctgagtt tccttctgag 120

```

gttaatttgc agctatttagc caccagctac ctgcagaata atcaagctta cagtgcataat	180
catctgctaa aggggaacaca aatggctcag tcccgataact tgttcgcatt atcatgcttc	240
cagatggacc ttctcaatga agctgaatct gcactctgcc ctgttaatga acctggtgcg	300
gagatcccaa atggtgcagc agggcattac cttcttgac ttatttacaa aaggaagaat	360
gctgctcaac aatttaacaa gtccttgaca atagaccctc tactttgggc tgcataatgag	420
gaattatgta tattaggtgc tgcagaggaa gcaactgcag tttttggtga aacagctgct	480
ctctccattc aaaagcagta tatgcaacaa ctgtcaactt ccctcggctt aaacacttac	540
aacgaggaac gtaattcaac ttctactaaa aacacgagtt ctgaagatta tagtccaagg	600
cagtctaaac acacacaaag ccattggcctt aaagatatct ccggaaattt ccattctcat	660
ggagttaatg gaggtgttcc gaacatgtca ttctataata cgccttcgcc agtggctgca	720
cagctatccg gtatagctcc accaccactt ttccggaatt ttcagccagc tgttgcaaac	780
ccaaactccc ttattactga cagttctcca aagtccactg ttaactctac tcttcaagca	840
cctagaagaa agttttgtaga tgaaggaaag ttacgtaaga tttctggcag actattttct	900
gattctggtc cagcagcgag ttcaagactg tctgctgatt caggggcaaa cattaattca	960
agtgttgcaa cagtaagcgg aaatgtgaac aacgcttcca agtatttggg aggttctaaa	1020
ttgagttctt tggcacttgc ttctgtaaca cttcggaagg gacactcctg ggcaaatgaa	1080
aacatggatg aaggggtccg tggggaacct tttgatgatt caaggcctaa tactgcctca	1140
acgactgggt ctatggcttc caatgatcaa gaagacgaaa caatgtcgat tgggtgcata	1200
gcaatgagtt ctcaacaacat cacaattggt gtttcggaaa ttttaaacct ccttaggaca	1260
ctcggagaag ggtgtagact ttcatacatg tacagggtgc aggaggcact ggatacgtat	1320
atgaaacttc cacataagca ttataataca ggatgggttc tttcccaggt cgggaaagca	1380
tactttgaac taattgacta ttttagaggct gaaaaggcat tccgtcttgc ccgtctggct	1440
tctccttatt gcttagaagg aatggatata tactctacgg tctctatca tttgaaggaa	1500
gacatgaagc tgagttactt ggctcaggaa ctaatatcaa ccgatcgctt agctcctcaa	1560
tcttgggtgt ctatgggaaa ttgctatagc ttgcaaaagg accatgagac cgcactgaag	1620
aatttcctac gagctgttca actgaatcca agatttgcatt atgcacatac cttatgtggc	1680
cacgaataca caactcttga ggatttttag aacggaatga aaagttaacca aaacgcactt	1740
cgtgtagata caagacacta caacgcatgg tacgggcttg gaatgatata tctacgcaa	1800
gagaagttag agttctcaga gcatcacttc agaattggctt tcctaataaa cccgagttcc	1860
tctgttataa tgtcttattt agggacatct ttgcatgcct tgaagagaag tgaggagca	1920
ctagagataa tggagcaagc catagtagca gatagaaaa accctcttcc aatgtaccag	1980
aaagctaaca tacttgtctg cttagaaaga ttagatgaag ctctagaagt tcttgaggag	2040
ctcaaagagt atgcgccttc agagagcagc gtttacgctt taatgggcag gatctataag	2100
cggcgaaaca tgcacgataa agccatgctt catttcggtc tagctttaga tatgaaaccg	2160
cctgcaactg acgttgctgc aataaaggct gcaatggaga aattgcatgt tccagatgag	2220
atcgatgaga gcccgtagaa ccatagctac tccaagaacc ttgggtatga attaatgtga	2280
gaccgttgct gctccacgaa ccattgggtat gaattattta gtgcaaagcc tactctttt	2340
agggaaactag ttgggtttga atgtagtttt gttaccaaac cgtaacacag ccacaagagc	2400
ccacatgact tgagtatgta tcatgagttg atctgtatgt tgtccgtaac actaccta	2460
cgaatatat gatttttcca	2480

<210> 3

<211> 2235

5 <212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

```

atggaagcta tgcctgtgga ctgtgtaaac aacagtcttc gtcattttgt ctacaaaaat    60
gctattttca tgtgcgagcg tctctgcgct gagtttcctt ctgagggtta tttgcageta    120
ttagccacca gctacctgca gaataatcaa gcttacagtg catatcatct gctaaagga    180
acacaaatgg ctcagtcocg atacttggtc gcattatcat gettccagat ggaccttctc    240
aatgaagctg aatctgcact ctgcctgttt aatgaacctg gtgcggagat cccaaatggt    300
gcagcaggcc attaccttct tggacttatt tacaagtata ctgatagaag gaagaatgct    360
getcaacaat ttaaacagtc cttgacaata gacctcttac tttgggctgc atatgaggaa    420
ttatgtatat taggtgctgc tgagggaagca actgcagttt ttgggtgaac agctgctctc    480
tccattcaca agcagtatat gcaacaactg tcaacttccc tcggcttaaa cacttaaac    540
gaggaaagta attcaacttc tactaaaaac acgagttctg aagattatag tccaaggcag    600
tctaaacaca cacaagcca tggccttaaa gatatactcc gaaatttcca ttctcatgga    660
gttaaatggag gtgtttcgaa catgtcattc tataatacgc ctgcgccagt ggtgcacag    720
ctatccggtg tagctccacc accacttttc cggaaatttc agccagctgt tgcaaaccca    780
aactccctta ttactgcacg ttctccaaag tccactgtta actctactct tcaagacct    840
agaagaaagt ttgtagatga aggaagttta cgttaagatt ctggcagact attttctgat    900
tctggtecac gacggagttc aagactgtct gctgattcag gggcaaacat taattcaagt    960
gttgcacacg taagcggaaa tgtgaacaa cgttccaagt atttgggagg ttctaaattg    1020
agttcttttg cacttcgttc tgtaacactt cggaaaggac actcctgggc aaatgaaaac    1080
atggtatgaag gggtcctggt ggaacctttt gatgattcaa ggctaatac tgccatcaacg    1140
actggttcta tggcttccaa tgatcaagaa gacgaaccaa tgtcgatttg tggcatagca    1200

atgagttctc aaacaatcac aattgggtgt tcggaattt taaacctcct taggacactc    1260
ggagaagggt gtagacttcc atacatgtac aggtgtcagg aggcactgga tacgtatatg    1320
aaacttccac ataagcatta taatacagga tgggttcttt ccaggtcgg gaaagcatac    1380
tttgaactaa ctgactattt agaggtgaa aaggcattcc gtcttgccc tctggcttct    1440
ccttattgct tagaaggaaat ggatatatac tctacggtcc tctatcattt gaaggagac    1500
atgaagctga gttacttggc tcaggaacta atatcaaccg atcgcttagc tctcaatct    1560
tgggtgtgcta tgggaattg ctatagcttg caaaaggacc atgagaccgc actgaagaat    1620
ttcctacgag ctgttcaact gaatccaaga tttgcatacg cacatccctt atgtggccac    1680
gaatacacia ctcttgagga ttttgagaac ggaatgaaa gttaccaaaa cgcacttcgt    1740
gtagatacaa gacactacaa cgcattgtac gggttgga tgatatatct acgccaagag    1800
aagttagagt tctcagagca tcaactcaga atggctttcc taataaaccc gagttcctct    1860
gttataatgt cttatttagg gacatctttg catgccttga agagaagtga ggaagcacta    1920
gagataatgg agcaagccat agtagcagat agaaaaaac ctcttccaat gtaccagaaa    1980
gctaacatac ttgtctgctt agaaagatta gatgaagctc tagaagttct tgaggagctc    2040
aaagagtatg cgccttcaga gagcagcgtt tacgctttaa tgggcaggat ctataagcgg    2100
cgaaacatgc acgataaagc catgcttcat ttccgtctag ctttagatat gaaaccgcct    2160
gcaactgacg ttgtctcaat aaaggctgca atggagaaat tgcattgtcc agatgagatc    2220
gatgagagcc cgtga                                     2235

```

5 <210> 4

<211> 486

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

```

atggaagcta tgccttgtag ctgtgtaaac aacagtcttc gtcattttgt ctacaaaaat    60
gctattttca tgtgcgagcg tctctgcgct gagtttccct ctgagggttaa ttgcagcta    120
ttagccacca gctacctgca gaataatcaa gcttacagtg catatcatct gctaaagga    180
acacaaatgg ctccgtcccg ataactgttc gcattatcat gctccagat ggaccttctc    240
aatgaagctg aatctgcact ctgccctgtt aatgaacctg gtgcggagat cccaaatggt    300
gcagcaggcc attaccttct tggacttatt taaaaagga agaattgctg tcaacaattt    360
aaacagtcct tgacaataga cctctacttt tgggctgcat atgaggaatt atgtatatta    420
ggctgctgctg aggaagcaac tgcagttttt ggtgaacag ctgctctctc cattcaaaag    480
cagtat                                           486

```

<210> 5

5 <211> 498

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 5.

```

atggaagcta tgccttgtag ctgtgtaaac aacagtcttc gtcattttgt ctacaaaaat    60
gctattttca tgtgcgagcg tctctgcgct gagtttccct ctgagggttaa ttgcagcta    120
ttagccacca gctacctgca gaataatcaa gcttacagtg catatcatct gctaaagga    180
acacaaatgg ctccgtcccg ataactgttc gcattatcat gctccagat ggaccttctc    240
aatgaagctg aatctgcact ctgccctgtt aatgaacctg gtgcggagat cccaaatggt    300
gcagcaggcc attaccttct tggacttatt tacaagtata ctgatagaag gaagaatgct    360
gctcaacaat ttaaacagtc cttgacaata gacctctac tttgggctgc atatgaggaa    420
ttatgtatat taggtgctgc tgaggaaaca actgcagttt ttggtgaac agctgctctc    480
tccattcaaa agcagtat                                           498

```

10 <210> 6

<211> 162

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

```

Met Glu Ala Met Leu Val Asp Cys Val Asn Asn Ser Leu Arg His Phe
1      5      10      15

Val Tyr Lys Asn Ala Ile Phe Met Cys Glu Arg Leu Cys Ala Glu Phe
      20      25      30

Pro Ser Glu Val Asn Leu Gln Leu Leu Ala Thr Ser Tyr Leu Gln Asn
      35      40      45

Asn Gln Ala Tyr Ser Ala Tyr His Leu Leu Lys Gly Thr Gln Met Ala
      50      55      60

Gln Ser Arg Tyr Leu Phe Ala Leu Ser Cys Phe Gln Met Asp Leu Leu
      65      70      75      80

Asn Glu Ala Glu Ser Ala Leu Cys Pro Val Asn Glu Pro Gly Ala Glu
      85      90      95

Ile Pro Asn Gly Ala Ala Gly His Tyr Leu Leu Gly Leu Ile Tyr Lys
      100      105      110

Arg Lys Asn Ala Ala Gln Gln Phe Lys Gln Ser Leu Thr Ile Asp Pro
      115      120      125

Leu Leu Trp Ala Ala Tyr Glu Glu Leu Cys Ile Leu Gly Ala Ala Glu
      130      135      140

Glu Ala Thr Ala Val Phe Gly Glu Thr Ala Ala Leu Ser Ile Gln Lys
      145      150      155      160

Gln Tyr

```

<210> 7

<211> 166

5 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 7

```

Met Glu Ala Met Leu Val Asp Cys Val Asn Asn Ser Leu Arg His Phe
 1      5      10      15

Val Tyr Lys Asn Ala Ile Phe Met Cys Glu Arg Leu Cys Ala Glu Phe
      20      25      30

Pro Ser Glu Val Asn Leu Gln Leu Leu Ala Thr Ser Tyr Leu Gln Asn
      35      40      45

Asn Gln Ala Tyr Ser Ala Tyr His Leu Leu Lys Gly Thr Gln Met Ala
      50      55      60

Gln Ser Arg Tyr Leu Phe Ala Leu Ser Cys Phe Gln Met Asp Leu Leu
      65      70      75      80

Asn Glu Ala Glu Ser Ala Leu Cys Pro Val Asn Glu Pro Gly Ala Glu
      85      90      95

Ile Pro Asn Gly Ala Ala Gly His Tyr Leu Leu Gly Leu Ile Tyr Lys
      100      105      110

Tyr Thr Asp Arg Arg Lys Asn Ala Ala Gln Gln Phe Lys Gln Ser Leu
      115      120      125

Thr Ile Asp Pro Leu Leu Trp Ala Ala Tyr Glu Glu Leu Cys Ile Leu
      130      135      140

Gly Ala Ala Glu Glu Ala Thr Ala Val Phe Gly Glu Thr Ala Ala Leu
      145      150      155      160

Ser Ile Gln Lys Gln Tyr
      165

```

<210> 8

<211> 740

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

Met Glu Ala Met Leu Val Asp Cys Val Asn Asn Ser Leu Arg His Phe
1 5 10 15

Val Tyr Lys Asn Ala Ile Phe Met Cys Glu Arg Leu Cys Ala Glu Phe
20 25 30

Pro Ser Glu Val Asn Leu Gln Leu Leu Ala Thr Ser Tyr Leu Gln Asn
35 40 45

Asn Gln Ala Tyr Ser Ala Tyr His Leu Leu Lys Gly Thr Gln Met Ala
50 55 60

Gln Ser Arg Tyr Leu Phe Ala Leu Ser Cys Phe Gln Met Asp Leu Leu
65 70 75 80

Asn Glu Ala Glu Ser Ala Leu Cys Pro Val Asn Glu Pro Gly Ala Glu
85 90 95

Ile Pro Asn Gly Ala Ala Gly His Tyr Leu Leu Gly Leu Ile Tyr Lys
100 105 110

Arg Lys Asn Ala Ala Gln Gln Phe Lys Gln Ser Leu Thr Ile Asp Pro
115 120 125

Leu Leu Trp Ala Ala Tyr Glu Glu Leu Cys Ile Leu Gly Ala Ala Glu
130 135 140

Glu Ala Thr Ala Val Phe Gly Glu Thr Ala Ala Leu Ser Ile Gln Lys
145 150 155 160

Gln Tyr Met Gln Gln Leu Ser Thr Ser Leu Gly Leu Asn Thr Tyr Asn
165 170 175

Glu Glu Arg Asn Ser Thr Ser Thr Lys Asn Thr Ser Ser Glu Asp Tyr
180 185 190

Ser Pro Arg Gln Ser Lys His Thr Gln Ser His Gly Leu Lys Asp Ile
195 200 205

Ser Gly Asn Phe His Ser His Gly Val Asn Gly Gly Val Ser Asn Met
210 215 220

Ser Phe Tyr Asn Thr Pro Ser Pro Val Ala Ala Gln Leu Ser Gly Ile
 225 230 235 240
 Ala Pro Pro Pro Leu Phe Arg Asn Phe Gln Pro Ala Val Ala Asn Pro
 245 250 255
 Asn Ser Leu Ile Thr Asp Ser Ser Pro Lys Ser Thr Val Asn Ser Thr
 260 265 270
 Leu Gln Ala Pro Arg Arg Lys Phe Val Asp Glu Gly Lys Leu Arg Lys
 275 280 285
 Ile Ser Gly Arg Leu Phe Ser Asp Ser Gly Pro Arg Arg Ser Ser Arg
 290 295 300
 Leu Ser Ala Asp Ser Gly Ala Asn Ile Asn Ser Ser Val Ala Thr Val
 305 310 315 320
 Ser Gly Asn Val Asn Asn Ala Ser Lys Tyr Leu Gly Gly Ser Lys Leu
 325 330 335
 Ser Ser Leu Ala Leu Arg Ser Val Thr Leu Arg Lys Gly His Ser Trp
 340 345 350
 Ala Asn Glu Asn Met Asp Glu Gly Val Arg Gly Glu Pro Phe Asp Asp
 355 360 365
 Ser Arg Pro Asn Thr Ala Ser Thr Thr Gly Ser Met Ala Ser Asn Asp
 370 375 380
 Gln Glu Asp Glu Thr Met Ser Ile Gly Gly Ile Ala Met Ser Ser Gln
 385 390 395 400
 Thr Ile Thr Ile Gly Val Ser Glu Ile Leu Asn Leu Leu Arg Thr Leu
 405 410 415
 Gly Glu Gly Cys Arg Leu Ser Tyr Met Tyr Arg Cys Gln Glu Ala Leu
 420 425 430
 Asp Thr Tyr Met Lys Leu Pro His Lys His Tyr Asn Thr Gly Trp Val
 435 440 445
 Leu Ser Gln Val Gly Lys Ala Tyr Phe Glu Leu Ile Asp Tyr Leu Glu
 450 455 460
 Ala Glu Lys Ala Phe Arg Leu Ala Arg Leu Ala Ser Pro Tyr Cys Leu
 465 470 475 480

Glu Gly Met Asp Ile Tyr Ser Thr Val Leu Tyr His Leu Lys Glu Asp
485 490 495

Met Lys Leu Ser Tyr Leu Ala Gln Glu Leu Ile Ser Thr Asp Arg Leu
500 505 510

Ala Pro Gln Ser Trp Cys Ala Met Gly Asn Cys Tyr Ser Leu Gln Lys
515 520 525

Asp His Glu Thr Ala Leu Lys Asn Phe Leu Arg Ala Val Gln Leu Asn
530 535 540

Pro Arg Phe Ala Tyr Ala His Thr Leu Cys Gly His Glu Tyr Thr Thr
545 550 555 560

Leu Glu Asp Phe Glu Asn Gly Met Lys Ser Tyr Gln Asn Ala Leu Arg
565 570 575

Val Asp Thr Arg His Tyr Asn Ala Trp Tyr Gly Leu Gly Met Ile Tyr
580 585 590

Leu Arg Gln Glu Lys Leu Glu Phe Ser Glu His His Phe Arg Met Ala
595 600 605

Phe Leu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Val Ile Met Ser Tyr Leu Gly Thr
610 615 620

Ser Leu His Ala Leu Lys Arg Ser Glu Glu Ala Leu Glu Ile Met Glu
625 630 635 640

Gln Ala Ile Val Ala Asp Arg Lys Asn Pro Leu Pro Met Tyr Gln Lys
645 650 655

Ala Asn Ile Leu Val Cys Leu Glu Arg Leu Asp Glu Ala Leu Glu Val
660 665 670

Leu Glu Glu Leu Lys Glu Tyr Ala Pro Ser Glu Ser Ser Val Tyr Ala
675 680 685

Leu Met Gly Arg Ile Tyr Lys Arg Arg Asn Met His Asp Lys Ala Met
690 695 700

Leu His Phe Gly Leu Ala Leu Asp Met Lys Pro Pro Ala Thr Asp Val
705 710 715 720

Ala Ala Ile Lys Ala Ala Met Glu Lys Leu His Val Pro Asp Glu Ile

725

730

735

Asp Glu Ser Pro
740

<210> 9

<211> 744

5 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 9

```

Met Glu Ala Met Leu Val Asp Cys Val Asn Asn Ser Leu Arg His Phe
 1          5          10          15

Val Tyr Lys Asn Ala Ile Phe Met Cys Glu Arg Leu Cys Ala Glu Phe
          20          25          30

Pro Ser Glu Val Asn Leu Gln Leu Leu Ala Thr Ser Tyr Leu Gln Asn
          35          40          45

Asn Gln Ala Tyr Ser Ala Tyr His Leu Leu Lys Gly Thr Gln Met Ala
          50          55          60

Gln Ser Arg Tyr Leu Phe Ala Leu Ser Cys Phe Gln Met Asp Leu Leu
65          70          75          80

Asn Glu Ala Glu Ser Ala Leu Cys Pro Val Asn Glu Pro Gly Ala Glu
          85          90          95

Ile Pro Asn Gly Ala Ala Gly His Tyr Leu Leu Gly Leu Ile Tyr Lys
          100          105          110

Tyr Thr Asp Arg Arg Lys Asn Ala Ala Gln Gln Phe Lys Gln Ser Leu
          115          120          125

Thr Ile Asp Pro Leu Leu Trp Ala Ala Tyr Glu Glu Leu Cys Ile Leu
          130          135          140

Gly Ala Ala Glu Glu Ala Thr Ala Val Phe Gly Glu Thr Ala Ala Leu
          145          150          155          160

Ser Ile Gln Lys Gln Tyr Met Gln Gln Leu Ser Thr Ser Leu Gly Leu
          165          170          175

Asn Thr Tyr Asn Glu Glu Arg Asn Ser Thr Ser Thr Lys Asn Thr Ser
          180          185          190

Ser Glu Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Ser Lys His Thr Gln Ser His Gly

```

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

Thr Gly Trp Val Leu Ser Gln Val Gly Lys Ala Tyr Phe Glu Leu Ile
 450 455 460
 Asp Tyr Leu Glu Ala Glu Lys Ala Phe Arg Leu Ala Arg Leu Ala Ser
 465 470 475 480
 Pro Tyr Cys Leu Glu Gly Met Asp Ile Tyr Ser Thr Val Leu Tyr His
 485 490 495
 Leu Lys Glu Asp Met Lys Leu Ser Tyr Leu Ala Gln Glu Leu Ile Ser
 500 505 510
 Thr Asp Arg Leu Ala Pro Gln Ser Trp Cys Ala Met Gly Asn Cys Tyr
 515 520 525
 Ser Leu Gln Lys Asp His Glu Thr Ala Leu Lys Asn Phe Leu Arg Ala
 530 535 540
 Val Gln Leu Asn Pro Arg Phe Ala Tyr Ala His Thr Leu Cys Gly His
 545 550 555 560
 Glu Tyr Thr Thr Leu Glu Asp Phe Glu Asn Gly Met Lys Ser Tyr Gln
 565 570 575
 Asn Ala Leu Arg Val Asp Thr Arg His Tyr Asn Ala Trp Tyr Gly Leu
 580 585 590
 Gly Met Ile Tyr Leu Arg Gln Glu Lys Leu Glu Phe Ser Glu His His
 595 600 605
 Phe Arg Met Ala Phe Leu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Val Ile Met Ser
 610 615 620
 Tyr Leu Gly Thr Ser Leu His Ala Leu Lys Arg Ser Glu Glu Ala Leu
 625 630 635 640
 Glu Ile Met Glu Gln Ala Ile Val Ala Asp Arg Lys Asn Pro Leu Pro
 645 650 655
 Met Tyr Gln Lys Ala Asn Ile Leu Val Cys Leu Glu Arg Leu Asp Glu
 660 665 670
 Ala Leu Glu Val Leu Glu Glu Leu Lys Glu Tyr Ala Pro Ser Glu Ser
 675 680 685
 Ser Val Tyr Ala Leu Met Gly Arg Ile Tyr Lys Arg Arg Asn Met His
 690 695 700
 Asp Lys Ala Met Leu His Phe Gly Leu Ala Leu Asp Met Lys Pro Pro
 705 710 715 720
 Ala Thr Asp Val Ala Ala Ile Lys Ala Ala Met Glu Lys Leu His Val
 725 730 735
 Pro Asp Glu Ile Asp Glu Ser Pro
 740

<211> 4577

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

```

atggaagcta tgcttgtgga ctgtgtaaac aacagtcctc gtcattttgt ctacaaaaat    60
gttattttca tgtgcgagcg tctctgcgct gagtttcctt ctgaggtaat caccctcttc    120
tttcactctc tctctctgat ttacctctc taattcaaat tctgtaaate gaagctcttg    180
gaatggtaaa tttgatattt ttgggtttgt aattcctctg ggtatctatg aattcgctga    240
aagtgcgtct ctttttggat ttggaattcg atagcttcac tgtgttcttc gagattgatt    300
ttggtttctt accttttagc cttttgtttt caagatccgt gtgttcaatt aggagatgaa    360
ttcgtgttct tttctctctc ttgttgaatt tgttttctct agtagctgtg ctcaatgctc    420
attactgatt tggctcttgg aaaatttgca ttttgagggg taatgacttt tgtccatata    480
tgtgatctca agtttaagta tttattatcc ttggaactta gctatgagtc aactgttaga    540
ggaatgtctc tgggattatc tcaagctttg ttaaaatttg ggttaataca gcttcaatag    600
tagttgagaa agtattcatt cattcagcct ttgggtctgga atattttcaa cattcgtagt    660
ggttgtccag tttctagctt cagttagtag aaatcatgtc aataaatgat tggccttttt    720
gtttgatcac tttctgaatt ttctcttat ataggttaat ttgcagctat tagccaccag    780
ctacctgcag aataatcaag cttacagtgc atatcatctg cttaaagggtg cgtggcattg    840
tttcttgact tgttgcttgt tagcctttta gtcagaattt tgcaccttct tttgttaggt    900
cgttttgatt atctttgtat atatattttt tttttgttat gtaaaggaac acaaatggct    960
cagtcccgat acttgttcgc attatcatgc ttccagatgg accttctcaa tgaagctgaa   1020
tctgcactct gccctgttaa tgaacctggg gcggaggtat ttaatgttct ctgggtatttt   1080
gcctttatct gcttactgaa tgtcatttta caaaaacagt gtgtcagttt ctggacctta   1140
tttattgatt tagttcagtg aagataacaa catgcttctg attattgtgc agatcccaaa   1200
tgggtgcagca ggccattacc ttcttggact tatttacaag tacgtttttt gttctgtcta   1260
tgcatttttt cttgattctg aatggcttag atgagatgat tctcatata taacagtgac   1320

```

cttttaggta tactgataga aggaagaatg ctgctcaaca atttaaacag tccttgacaa	1380
tagaccctct actttgggct gcatatgagg aattatgtat attaggtgaa cataatccgt	1440
tttctgcata cttcacagat atgttatggt tctcttacac ttttctgtct gctcaacttt	1500
cagggtgctgc tgaggaagca actgcagttt ttgggtgaaac agctgctctc tccattcaaa	1560
agcagtatat gcaacaactg tcaacttccc tcgggtttaa cacttacaac gaggaacgta	1620
attcaacttc tactaaaaac acgagttctg aagattatag tccaaggcag tctaaacaca	1680
cacaaagcca tggcctttaa gatatctccg gaaatttcca ttctcatgga gttaatggag	1740
gtgtttcgaa catgtcattc tataatacgc ctctgccagt ggctgcacag gtaatgtcac	1800
acaattgtcg tactgctttt ttatgtaata caactatata tccatctgtt gatcacacat	1860
tctgtagtac ttaggagatt tgtgcatcat ggggtgtgat ttcacagcgt ttgtatctgt	1920
tttttctata tctgttatgc caaaagaatg ggtgtgtctat tcttttgact attaaaaatg	1980
gggtcttcat tatgttttag tgtctttggt ttggcttgtt aattttatca acctttttag	2040
ttatctgaat aataacagct gtaagtaaat gcttttttgt atttttgaaa ttgtagctat	2100
ccggtatagc tccaccacca cttttccgga attttcagcc agctgttgca aaccctaaact	2160
cccttattac tgacagttct ccaaagtcca ctgttaactc tactcttcaa gcacctagaa	2220
gaaagtttgt agatgaagga aagttacgta aggtaggatt cacataatca catatctcta	2280
cttgacatca tcaaatcata attttgaatt attggctctt ctctgtaata gtctatttctg	2340
tactcgggat gaaattttct ataccaactt tcttaccgtg agtgcattgc tcttatgttt	2400
gcagatttct ggcagactat tttctgattc tgggtccacga cggagttcaa gactgtctgc	2460
tgattcaggg gcaaacatta attcaagtgt tgcaacagta agcggaaatg tgaacaacgc	2520
ttccaagtat ttgggaggtt ctaaattgag ttctttggca ctctgttctg taacacttctg	2580
gaagggacac tcctgggcaa atgaaaacat ggatgaaggt tgtgacattc catgcactat	2640
accactatat tgtttgaaat ctgcccttgt gtgactattg ttatcatgcc ttctattttt	2700
ggtgtctgca tattttgtaat accgtcattc tgatgggttt aggggtccgt ggggaacctt	2760
ttgatgattc aaggcctaact actgcctcaa cgactgggtc tatggcttcc aatgatcaag	2820
aagacgaaac aatgtcgatt ggtggcatag caatgagttc tcaaacaatc acaattggtg	2880
tttcggaaat tttaaacctc cttaggacac tcggagaagg gtgtagactt tcatacatgt	2940
acaggtgtca ggtaggcata ttattgttct cgtgaattat gcaagtgagg tgaacctata	3000
taggcttata tcattgtctc cttctgcttc tgggtcgttc aggaggcact ggatacgtat	3060
atgaaacttc cacataagca ttataatata ggatgggttc tttcccaggt aactagtac	3120
tctttctctt ttaggctgcc atatatggat atagcctgaa tcagttttac tctagtggcc	3180
tgtgatagtt attgttgaaa ggtttatata cacatactat ggctattaaa tgtaggtcgg	3240

gaaagcatac ttggaactaa ttgactatct agaggctgaa aaggcattcc gtcttgcccg 3300
tctggcttct ccttattgct tagaaggaat ggatatatac tctacgggcc tctatgtaag 3360
tgtattatcc tggtttctaa acatgcaatc tcggatgagt gcggaagaa atcacattta 3420
tgtaaatttt tcatcagcaa gatatgatat ttatttgagc catttgaagg aagacatgaa 3480
gctgagttac ttggctcagg aactaatatc aaccgatcgc ttagctcttc aatcttggtg 3540
ttttttgtcg aagttgtttt tctgattaac gttttcattt attgttggtg ataagagaaa 3600
taagcaatca attatgtagg tgtgctatgg gaaattgcta tagcttgcaa aaggaccatg 3660
agaccgcact gaagaatttc ctacgagctg ttcaactgaa tccaagattt gcatatgcac 3720
ataccttatg tggccacgag taagagagcc tctatccatt tgactttgtc ttgcacaatg 3780
tgcttaaaat tatctggtta ttggtctaata tgacactttc tatctttact gtctctgtag 3840
atacacaact cttgaggatt ttgagaacgg aatgaaaagt taccaaaacg cacttcgtgt 3900
agatacaaga cactacaacg catggtacgg gcttggaatg atatatctac gccaaagagaa 3960
gttagagttc tcagagcacc acttcagaat ggctttccta ataaaccga gttcctctgt 4020
tataatgtct tatttaggga catctttgca tgccttgaa gttatcttat tactttcatc 4080
ttatcaggct tacaagaaaa acaatctttg aagaatgact aaatgcttct tcttggtttg 4140
tgtaaataga gaagttagga agcactagag ataatggagc aagccatagt agcagataga 4200
aaaaaccctc ttccaatgta ccagaaagct aacatacttg tctgcttaga aagattagat 4260
gaagctctag aagttcttga ggagctcaa gagtatgagc cttcagagag cagcgtttac 4320
gctttaatgg gcaggatcta taagcggcga aacatgcacg ataaagccat gcttcatttc 4380
ggctagctt tagatatgaa accgcctgca actgacgttg ctgcaataaa ggttcgagtc 4440
tttaaaacag agtcgtccaa tgatggtttt taaatctgaa aattcaagga ttcatagctt 4500
aaactgggtt ttattgtctg aaacaggctg caatggagaa attgcatggt ccagatgaga 4560
tcgatgagag cccgtga 4577

<210> 11

<211> 4577

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 11

atggaagcta tgcttggtga ctgtgtaaac aacagtcttc gtcattttgt ctacaaaaat 60
gctattttca tgtgcgagcg tctctgcgct gagtttcctt ctgaggtaat caccctcttc 120
tttactcttc tctctctgat ttacctcttc taattcaaat tctgtaaatc gaagctcttg 180
gaatggtaaa ttgatatttt ttgggtttgt aattcctctg ggtatctatg aattcgtcga 240
aagtgcgtct ctttttggat ttggaattcg atagcttcac tgtgttcttc gagattgatt 300

ttggtttctt	accttttagc	cctttgtttt	caagatccgt	gtgttcaatt	aggagatgaa	360
ttcgtgttct	tttctctctc	ttgttgaatt	tggtttctct	agtagctgtg	ctcaatgctc	420
attactgatt	tggctcttgg	aaaatttgca	ttttgagggg	taatgacttt	tgtccatata	480
tgtgatctca	agtttaagta	tttattatcc	ttggaactta	gctatgagtc	aactgttaga	540
ggaatgtctc	tgggattatc	tcaagctttg	ttaaaatttg	ggttaataca	gcttcaatag	600
tagttgagaa	agtattcatt	cattcagcct	ttggtctgga	atattttcaa	cattcgtagt	660
ggttggtccag	tttctagctt	cagtttagtag	aaatcatgtc	aataaatgat	tggccttttt	720
gtttgatcac	tttctgaatt	ttcctcttat	ataggttaat	ttgcagctat	tagccaccag	780
ctacctgcag	aataatcaag	cttacagtgc	atatcatctg	ctaaaggggtg	cgtggcattg	840
tttcttgact	tgttgcttgt	tagcctttta	gtcagaattt	tgcaccttct	tttgttaggt	900
cgttttgatt	atctttgtat	atatattttt	ttttgttat	gtaaaggaac	acaaatggct	960
cagtcccgat	acttggtcgc	attatcatgc	ttccagatgg	accttctcaa	tgaagctgaa	1020
tctgcactct	gccctgttaa	tgaacctggt	gcggagggtat	ttaatgttct	ctggtatttt	1080
gcctttattc	gcttactgaa	tgtcatttta	caaaaacagt	gtgtcagttt	ctggacctta	1140
tttattgatt	tagttcagtg	aagataacaa	catgcttctg	attattgtgc	agatcccaaa	1200
tgggtgcagca	ggccattacc	ttcttggact	tatttacaag	tacgtttttt	gttctgtcta	1260
tgcatTTTTT	cttgattctg	aatggcttag	atgagatgat	tcctcatata	taacagtgac	1320
cttttaggta	tactgataga	aggaagaatg	ctgctcaaca	atttaaacag	tccttgacaa	1380
tagaccctct	actttgggct	gcatatgagg	aattatgtat	attaggtgaa	cataatccgt	1440
tttctgcata	cttcacagat	atgttatggt	tctcttacac	ttttctgtct	gtcgaacttt	1500
caagtgtctg	tgaggaagca	actgcagttt	ttggtgaaac	agctgtctct	tccattcaaa	1560
agcagtatat	gcaacaactg	tcaacttccc	tcggcttaaa	cacttacaac	gaggaacgta	1620
attcaacttc	tactaaaaac	acgagttctg	aagattatag	tccaaggcag	tctaaacaca	1680
cacaaagcca	tggccttaaa	gatatctccg	gaaatttcca	ttctcatgga	gttaatggag	1740
gtgtttcgaa	catgtcatte	tataatacgc	cttcgccagt	ggctgcacag	gtaatgtcac	1800
acaattgtcg	tactgctttt	ttatgtaata	caactatata	tccatctgtt	gatcacacat	1860
tctgtagtac	ttaggagatt	tgtgcatcat	gggtgttgat	ttcacagcgt	ttgtatctgt	1920
tttttctata	tctgttatgc	caaaagaatg	gggtgtctat	tcttttgact	attaaaaatg	1980
gggtcttcat	tatgttttag	tgtctttggt	ttggcttggt	aattttatca	acctttttag	2040
ttatctgaat	aataacagct	gtaagtaa	gcttttttgt	atttttgaaa	ttgtagctat	2100
ccggtatagc	tccaccacca	cttttccgga	attttcagcc	agctgttgca	aacccaaact	2160

cccttattac	tgacagttct	ccaaagtcca	ctgttaactc	tactcttcaa	gcacctagaa	2220
gaaagtttgt	agatgaagga	aagttacgta	aggtaggatt	cacataatca	catatctcta	2280
cttgacatca	tcaaatcata	atthttgaatt	attgggtcttt	ctctgtaata	gtctatttctg	2340
tactcgggat	gaaatthttct	ataccaactt	tcttaccgtg	agtgcattgtc	tcttatgttt	2400
gcagatttct	ggcagactat	tttctgattc	tgggtccacga	cggagttcaa	gactgtctgc	2460
tgattcaggg	gcaaacatta	attcaagtgt	tgcaacagta	agcggaaatg	tgaacaacgc	2520
ttccaagtat	ttggggagggt	ctaaattgag	ttctttggca	cttcgttctg	taaacacttcg	2580
gaagggacac	tcctggggcaa	atgaaaacat	ggatgaaggt	tgtgacattc	catgcactat	2640
accactatat	tgtttgaaat	ctgcccttgt	gtgactattg	ttatcatgcc	ttctattttt	2700
ggtgtctgca	tatttgtaat	accgtcattc	tgatgggttt	aggggtccgt	ggggaacctt	2760
ttgatgattc	aaggcccta	actgcctcaa	cgactgggtc	tatggcttcc	aatgatcaag	2820
aagacgaaac	aatgtcgatt	ggtggcatag	caatgagttc	tcaacaatc	acaattggtg	2880
tttcggaaat	tttaaacctc	cttaggacac	tcggagaagg	gtgtagactt	tcatacatgt	2940
acaggtgtca	ggtaggcata	ttattgttct	cgtgaattat	gcaagtgagg	tgaacctata	3000
taggcttate	tcattgtctc	cttctgcttc	tgggtcgttc	aggaggcact	ggatacgtat	3060
atgaaacttc	cacataagca	ttataatata	ggatgggttc	tttcccagggt	aactagtgc	3120
tctttctctt	ttaggctgcc	atatatggat	atagcctgaa	tcagtthttac	tctagtggcc	3180
tgtgatagtt	attgttgaaa	ggthttatata	cacatactat	ggctattaaa	tgtaggtcgg	3240
gaaagcatat	tttgaactaa	ttgactatth	agaggctgaa	aaggcatttc	gtcttgccc	3300
tctggcttct	ccttattgct	tagaaggaat	ggatatatac	tctacgggtc	tctatgtaag	3360
tgtattatcc	tggthttctaa	acatgcaatc	tcggatgagt	gcggaaagaa	atcacattta	3420
tgtaaattht	tcatacagcaa	gatatgatat	ttatttgtag	catttgaaagg	aagacatgaa	3480
gctgagttac	ttggctcagg	aactaatatc	aaccgatcgc	ttagctcttc	aatcttggtta	3540
ttttttgtcg	aagttgttht	tctgattaac	gtthttcattt	attgttggtta	ataagagaaa	3600
taagcaatca	attatgtagg	tgtgctatgg	gaaattgcta	tagcttgcaa	aaggaccatg	3660
agaccgcact	gaagaattht	ctacgagctg	ttcaactgaa	tccaagattt	gcataatgcac	3720
ataccttatg	tggccacgag	taagagagcc	tctatccatt	tgactttgtc	ttgcacaatg	3780
tgtttaaatt	tatctgggtta	ttggtctaat	tgacacttht	tatctthtact	gtctctgtag	3840
atacacaact	cttgaggatt	ttgagaacgg	aatgaaaagt	tacaaaaacg	cacttcgtgt	3900
agatacaaga	cactacaacg	catggtacgg	gcttggaatg	atatatctac	gccaagagaa	3960
gttagagttc	tcagagcatc	acttcagaat	ggctthtcta	ataaaccoga	gttctctgt	4020
tataatgtct	tatttaggga	catctthtga	tgccttgaag	gttatcttat	tactthtcatc	4080

```

ttatcaggtc tacaagaaaa acaatctttg aagaatgact aaatgcttct tcttgttttg 4140
tgtaaataga gaagtgagga agcactagag ataatggagc aagccatagt agcagataga 4200
aaaaaccctc ttccaatgta ccagaaagct aacatacttg tctgcttaga aagattagat 4260
gaagctctag aagttcttga ggagctcaaa gagtatgagc cttcagagag cagcgtttac 4320
gctttaatgg gcaggatcta taagcggcga aacatgcacg ataaagccat gcttcatttc 4380
ggtctagctt tagatatgaa accgcctgca actgacgttg ctgcaataaa ggttcgagtc 4440
tttaaaacag agtcgtccaa tgatggtttt taaatctgaa aattcaagga ttcatagctt 4500
aaactggtta ttattgtctg aaacaggctg caatggagaa attgcatgtt ccagatgaga 4560
tcgatgagag cccgtga 4577

```

<210> 12

<211> 4577

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 12

```

atggaagcta tgcttggtga ctgtgtaaac aacagtcttc gtcattttgt ctacaaaaat 60
gctattttca tgtgcgagcg tctctgcgct gagtttcctt ctgaggtaat caccctcttc 120
tttactctc tctctctgat tttacctctc taattcaaat tctgtaaata gaagctcttg 180
gaatggtaaa tttgatattt ttgggtttgt aattcctctg ggtatctatg aattcgtcga 240
aagtgcgtct ctttttggtt ttggaattcg atagcttcac tgtgttcttc gagattgatt 300
ttggtttctt accttttagc cttttgtttt caagatccgt gtgttcaatt aggagatgaa 360
ttogtgttct tttctctctc ttgttgaatt tgttttctct agtagctgtg ctcaatgctc 420
attactgatt tgggtcttgg aaaatttgca ttttgagggt taatgacttt tgtccatata 480
tgtgatctca agtttaagta tttattatcc ttggaactta gctatgagtc aactgttaga 540
ggaatgtctc tgggattatc tcaagctttg ttaaaatttg ggttaataca gcttcaatag 600
tagttgagaa agtattcatt cattcagcct ttggtctgga atattttcaa cattcgtagt 660
ggttggtccag tttctagctt cagttagtag aaatcatgtc aataaatgat tggccttttt 720
gtttgatcac tttctgaatt ttcctcttat ataggttaat ttgcagctat tagccaccag 780
ctacctgcag aataatcaag cttacagtgc atatcatctg cttaaaggggtg cgtggcattg 840
tttcttgact tgttgcttgt tagcctttta gtcagaattt tgcaccttct tttgttaggt 900
cgttttgatt atctttgtat atatattttt tttttgttat gtaaaggaac acaaattggc 960
cagtcccgat acttggtcgc attatcatgc ttccagatgg accttctcaa tgaagctgaa 1020
tctgcactct gccctgttaa tgaacctggg ggggaggtat ttaatgttct ctggatattt 1080
gcctttattc gcttactgaa tgtcatttta caaaaacagt gtgtcagttt ctggacctta 1140

```

tttattgatt	tagttcagtg	aagataacaa	catgcttctg	attattgtgc	agatcccaaa	1200
tggtgcagca	ggccattacc	ttcttggact	tatttacaag	tacgtttttt	gttctgtcta	1260
tgcatTTTTT	cttgattctg	aatggcttag	atgagatgat	tcctcatata	taacagtgc	1320
cttttaggta	tactgataga	aggaagaatg	ctgctcaaca	atttaaacag	tccttgacaa	1380
tagaccctct	actttgggct	gcatatgagg	aattatgtat	attaggtgaa	cataatccgt	1440
tttctgcata	cttcacagat	atgttatggg	tctcttacac	tttctgtct	gctcaacttt	1500
cagggtgctgc	tgaggaagca	actgcagttt	ttgggtgaaac	agctgctctc	tccattcaaa	1560
agcagtatat	gcaacaactg	tcaacttccc	tcggcttaaa	cacttacaac	gaggaacgta	1620
attcaacttc	tactaaaaac	acgagttctg	aagattatag	tccaaggcag	tctaaacaca	1680
cacaaagcca	tggccttaaa	gatatctccg	gaaatttcca	ttctcatgga	gttaatggag	1740
gtgtttcgaa	catgtcattc	tataatacgc	cttcgccagt	ggctgcacag	gtaatgtcac	1800
acaattgtcg	tactgctttt	ttatgtaata	caactatata	tccatctgtt	gatcacacat	1860
tctgtagtac	ttaggagatt	tgtgcatcat	gggtgttgat	ttcacagcgt	ttgtatctgt	1920
ttttctata	tctgttatgc	caaaagaatg	ggttgtctat	tcttttgact	attaaaaatg	1980
gggtcttcat	tatgttttag	tgtctttggg	ttggcttgtt	aattttatca	acctttttag	2040
ttatctgaat	aataacagct	gtaagtaa	gcttttttgt	atttttgaaa	ttgtagctat	2100
ccggtatagc	tccaccacca	cttttccgga	attttcagcc	agctgttgca	aacccaaact	2160
cccttattac	tgacagttct	ccaaagtcca	ctgttaactc	tactcttcaa	gcacctagaa	2220
gaaagtttgt	agatgaagga	aagttacgta	aggtaggatt	cacataatca	catatctcta	2280
cttgacatca	tcaaatcata	attttgaatt	attggtcttt	ctctgtaata	gtctatttcg	2340
tactcgggat	gaaattttct	ataccaactt	tcttaccgtg	agtgcattgc	tcttatgttt	2400
gcagatttct	ggcagactat	tttctgattc	tggtccacga	cggagttaa	gactgtctgc	2460
tgattcaggg	gcaaacatta	attcaagtgt	tgcaacagta	agcggaaatg	tgaacaacgc	2520
ttccaagtat	ttgggaggtt	ctaaattgag	ttctttggca	cttcgttctg	taacacttcg	2580
gaagggacac	tcctgggcaa	atgaaaacat	ggatgaaggt	tgtgacattc	catgcactat	2640
accactatat	tgtttgaaat	ctgcccttgt	gtgactattg	ttatcatgcc	ttctattttt	2700
ggtgtctgca	tatttgtaat	accgtcattc	tgatgggttt	aggggtccgt	ggggaacctt	2760
ttgatgattc	aaggccta	actgcctcaa	cgaactgttc	tatggcttcc	aatgatcaag	2820
aagacgaaac	aatgtcgatt	ggtggcatag	caatgagttc	tcaaacaatc	acaattgggtg	2880
tttcggaaat	tttaaacttc	cttaggacac	tcagagaagg	gtgtagactt	tcatacatgt	2940
acaggtgtca	ggtaggcata	ttattgttct	cgtgaattat	gcaagtgagg	tgaacctata	3000

taggcttata tcattgtctc cttctgcttc tgggtcgttc aggaggcact ggatacgtat 3060
atgaaacttc cacataagca ttataatata ggatgggttc tttcccaggt aactagtac 3120
tctttctctt ttaggctgcc atatatggat atagcctgaa tcagttttac tctagtggcc 3180
tgtgatagtt attgttgaaa ggtttatata cacatactat ggctattaaa ttaggtcgg 3240
gaaagcatac tttgaactaa ttgactattt agaggctgaa aaggcattcc gtcttgcccg 3300
tctggcttct ccttattgct tagaaggaat ggatatatac tctacggccc tctatgtaag 3360
tgtattatcc tggtttctaa acatgcaatc tcggatgagt gcggaagaa atcacattta 3420
tgtaaatatt tcacagcaa gatatgatat ttatttgcag catttgaagg aagacatgaa 3480
gctgagttac ttggctcagg aactaatatc aaccgatcgc ttagctcctc aatcttggtta 3540
ttttttgtcg aagttgtttt tctgattaac gttttcattt attgttggtta ataagagaaa 3600
taagcaatca attatgtagg tgtgctatgg gaaattgcta tagcttgcaa aaggaccatg 3660
agaccgcact gaagaatttc ctacgagctg ttcaactgaa tccaagattt gcatatgcac 3720
ataccttatg tggccacgag taagagagcc tctatccatt tgactttgtc ttgcacaatg 3780
tgcttaaaat tatctggtta ttggtctaatt tgacactttc tatctttact gtctctgtag 3840
atacacaact cttgaggatt ttgagaacgg aatgaaaagt taccaaaacg cacttcgtgt 3900
agatacaaga cactacaacg catggtacgg gcttggaatg atatatctac gccaaagaaa 3960
gttagagttc tcagagcacc acttcagaat ggctttccta ataaaccga gttcctctgt 4020
tataatgtct tatttaggga catctttgca tgccttgaag gttatcttat tactttcatc 4080
ttatcaggtc tacaagaaaa acaatctttg aagaatgact aaatgcttct tcttgttttg 4140
tgttaataga gaagttagga agcactagag ataatggagc aagccatagt agcagataga 4200
aaaaaccctc ttccaatgta ccagaaagct aacatacttg tctgcttaga aagattagat 4260
gaagctctag aagttcttga ggagctcaaa gagtatgcgc cttcagagag cagcgtttac 4320
gctttaatgg gcaggatcta taagcggcga aacatgcacg ataaagccat gcttcatttc 4380
ggcttagctt tagatatgaa accgcctgca actgacgttg ctgcaataaa gggttcgagtc 4440
tttaaaacag agtcgtccaa tgatggtttt taaatctgaa aattcaagga ttcatagctt 4500
aaactgggta ttattgtctg aaacaggctg caatggagaa attgcatgtt ccagatgaga 4560
tcgatgagag cccgtga 4577

<210> 13

<211> 4577

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 13

atggaagcta tgcttggtga ctgtgtaaac aacagtcttc gtcattttgt ctacaaaaat 60

gctattttca tgtgcgagcg tctctgcgct gagtttcctt ctgaggtaat caccctcttc	120
tttactcttc tctctctgat tttacctctc taattcaaat tctgtaaatc gaagctcttg	180
gaatggtaaa tttgatattt ttgggtttgt aattcctctg ggtatctatg aattcgtcga	240
aagtgcgtct ctttttggat ttggaattcg atagcttcac tgtgttcttc gagattgatt	300
ttggtttctt accttttagc cctttgtttt caagatccgt gtgttcaatt aggagatgaa	360
ttcgtgttct tttctctctc ttgttgaatt tgttttctct agtagctgtg ctcaatgctc	420
attactgatt tggctcttgg aaaatttgca ttttgagggg taatgacttt tgtccatata	480
tgtgatctca agtttaagta tttattatcc ttggaactta gctatgagtc aactgttaga	540
ggaatgtctc tgggattatc tcaagctttg ttaaaatttg ggttaataca gcttcaatag	600
tagttgagaa agtattcatt cattcagcct ttgggtctgga atattttcaa cattcgtagt	660
ggttgtccag tttctagctt cagttagtag aaatcatgtc aataaatgat tggccttttt	720
gtttgatcac tttctgaatt ttctctttat ataggttaat ttgcagctat tagccaccag	780
ctacctgcag aataatcaag cttacagtgc atatcatctg cttaaagggtg cgtggcattg	840
tttcttgact tgttgcttgt tagcctttta gtcagaattt tgcaccttct tttgttaggt	900
cgttttgatt atctttgtat atatattttt tttttgttat gtaaaggaaac acaaattggct	960
cagtcccgat acttgttcgc attatcatgc ttccagatgg accttctcaa tgaagctgaa	1020
tctgcactct gccctgttaa tgaacctggg gccggaggtat ttaatgttct ctggtatttt	1080
gcctttattc gcttactgaa tgtcatttta caaaaacagt gtgtcagttt ctggacctta	1140
tttattgatt tagttcagtg aagataacaa catgcttctg attattgtgc agatcccaaa	1200
tgggtgcagca ggccattacc ttcttggact tatttacaag tacgtttttt gttctgtcta	1260
tgcatttttt cttgattctg aatggcttag atgagatgat tcctcatata taacagtgac	1320
cttttaggta tactgataga aggaagaatg ctgctcaaca atttaaacag tccttgacaa	1380
tagaccctct actttgggct gcatatgagg aattatgtat attaggtgaa cataatccgt	1440
tttctgcata cttcacagat atgttatggg tctcttacac ttttctgtct gctcaacttt	1500
cagggtgctgc tgaggaagca actgcagttt ttgggtgaaac agctgctctc tccattcaaa	1560
agcagtatat gcaacaactg tcaacttccc tcggcttaaa cacttacaac gaggaacgta	1620
attcaacttc tactaaaaac acgagttctg aagattatag tccaaggcag tctaaacaca	1680
cacaaagcca tggccttaaa gatatctccg gaaatttcca ttctcatgga gttaatggag	1740
gtgtttcgaa catgtcattc tataatacgc cttcgccagt ggctgcacag gtaatgtcac	1800
acaattgtcg tactgctttt ttatgtaata caactatato tccatctgtt gatcacacat	1860
tctgtagtac ttaggagatt tgtgcatcat ggggtgtgat ttcacagcgt ttgtatctgt	1920
tttttctata tctgttatgc caaaagaatg ggttgtctat tcttttgact attaaaaatg	1980

gggtcttcat tatgttttag tgtctttggt ttggcttggt aattttatca acctttttag	2040
ttatctgaat aataacagct gtaagtaaat gcttttttgt atttttgaaa ttgtagctat	2100
ccggtatagc tccaccacca cttttccgga attttcagcc agctgttgca aacccaaact	2160
cccttattac tgacagttct ccaaagtcca ctgttaactc tactcttcaa gcacctagaa	2220
gaaagtttgt agatgaagga aagttacgta aggtaggatt cacataatca catatctcta	2280
cttgacatca tcaaatcata attttgaatt attggtcttt ctctgtaata gtctatttcg	2340
tactcgggat gaaattttct ataccaactt tcttaccgtg agtgcattgc tcttatgttt	2400
gcagatttct ggcagactat tttctgattc tgggtccacga cggagttcaa gactgtctgc	2460
tgattcaggg gcaaacatta attcaagtgt tgcaacagta agcggaaatg tgaacaacgc	2520
ttccaagtat ttgggagggt ctaaattgag ttctttggca ctctgttctg taacacttcg	2580
gaagggacac tcctgggcaa atgaaaacat ggatgaagg tgtgacattc catgcactat	2640
accactatat tgtttgaaat ctgcccttgt gtgactattg ttatcatgcc ttctattttt	2700
ggtgtctgca tatttgaat accgtcatte tgatgggttt aggggtccgt ggggaacctt	2760
ttgatgattc aaggcctaact actgcctcaa cgactgggtc tatggcttcc aatgatcaag	2820
aagacgaaac aatgtcgatt ggtggcatag caatgagttc tcaaacaatc acaattggtg	2880
tttcggaaat tttaaacctc cttaggacac tcggagaagg gtgtagactt tcatacatgt	2940
acagggtgtca ggtaggcata ttattgttct cgtgaattat gcaagtgagg tgaacctata	3000
taggcttatt tcattgtctc ctctctcttc tgggtcgttc aagaggcact ggatacgtat	3060
atgaaacttc cacataagca ttataatata ggatgggttc tttcccagg taaactagtac	3120
tctttctctt ttaggctgcc atatattgat atagcctgaa tcagttttac tctagtggcc	3180
tgtgatagtt attgttgaaa ggtttatata cacatactat ggctattaaa tgtaggtcgg	3240
gaaagcatac tttgaaacta ttgactattt agaggctgaa aaggcattcc gtcttgcccg	3300
tctggcttct ccttattgct tagaaggaat ggatatatac tctacgggtc tctatgtaag	3360
tgtattatcc tgggtttctaa acatgcaatc tcggatgagt gcggaaagaa atcacattta	3420
tgtaaatttt tcattcagca gatattgat ttatttgag catttgagg aagacatgaa	3480
gctgagttac ttggctcagg aactaatatc aaccgatcgc ttagctcttc aatcttggtg	3540
ttttttgtcg aagttgtttt tctgattaac gttttcattt attgttggtg ataagagaaa	3600
taagcaatca attatgtagg tgtgctatgg gaaattgcta tagcttgcaa aaggaccatg	3660
agaccgcact gaagaatttc ctacgagctg ttcaactgaa tccaagattt gcatatgcac	3720
ataccttatg tggccacgag taagagagcc tctatccatt tgactttgtc ttgcacaatg	3780
tgcttaaaat tatctgggta ttgggtctaatt tgacactttc tatctttact gtctctgtag	3840

```

atacacaact cttgaggatt ttgagaacgg aatgaaaagt taccaaaacg cacttcgtgt 3900
agatacaaga cactacaacg catggtacgg gcttggaatg atatatctac gccaagagaa 3960
gttagagttc tcagagcatc acttcagaat ggctttccta ataaaccga gttcctctgt 4020
tataatgtct tatttaggga catctttgca tgccttgaag gttatcttat tactttcatc 4080
ttatcaggtc tacaagaaaa acaatctttg aagaatgact aaatgcttct tcttgttttg 4140
tgtaaataga gaagttagga agcactagag ataatggagc aagccatagt agcagataga 4200
aaaaaccctc ttccaatgta ccagaaagct aacataactg tctgcttaga aagattagat 4260
gaagctctag aagttcttga ggagctcaaa gagtatgccc cttcagagag cagcgtttac 4320
gctttaatgg gcaggatcta taagcggcga aacatgcacg ataaagccat gcttcatttc 4380
ggtctagctt tagatatgaa accgcctgca actgacgttg ctgcaataaa ggttcgagtc 4440
tttaaaacag agtcgtccaa tgatgggttt taaatctgaa aattcaagga ttcatagctt 4500
aaactgggta ttattgtctg aaacaggctg caatggagaa attgcatgtt ccagatgaga 4560
tcgatgagag cccgtga 4577

```

<210> 14

<211> 4577

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 14

```

atggaagcta tgcttggtga ctgtgtaaac aacagtcttc gtcattttgt ctacaaaaat 60
gctattttca tgtgcgagcg tctctgcgct gagtttctt ctgaggtaat caccctcttc 120
tttcactctc tctctctgat ttacctctc taattcaaat tctgtaaatc gaagctcttg 180
gaatggtaaa ttgatattt ttgggtttgt aattcctctg ggtatctatg aattcgtcga 240
aagtgcgtct ctttttgat ttggaattcg atagcttcac tgtgttcttc gagattgatt 300
ttgggtttct acccttttagc cctttgtttt caagatccgt gtgttcaatt aggagatgaa 360
ttcgtgttct tttctctctc ttgttgaatt tgttttctct agtagctgtg ctcaatgctc 420
attactgatt tggctcttgg aaaatttgca ttttgagggt taatgacttt tgtccatata 480
tgtgatctca agtttaagta tttattatcc ttggaactta gctatgagtc aactgttaga 540
ggaatgtctc tgggattatc tcaagctttg ttaaaatttg ggttaataca gcttcaatag 600
tagttgagaa agtattcatt cattcagcct ttggtctgga atattttcaa cattcgtagt 660
ggttggtccag tttctagctt cagtttagtag aaatcatgtc aataaatgat tggccttttt 720
gtttgatcac tttctgaatt ttctcttat ataggtaat ttgcagctat tagccaccag 780
ctacctgcag aataatcaag cttacagtgc atatcatctg ctaaaggggt cgtggcattg 840
tttcttgact tgttgcttgt tagcctttta gtcagaattt tgcaccttct tttgttaggt 900

```

cgttttgatt atctttgtat atatattttt tttttgttat gtaaaggaac acaaatggct	960
cagtcccgat acttggttcgc attatcatgc ttccagatgg accttctcaa tgaagctgaa	1020
tctgcaactct gccctgttaa tgaacctggg gcggaggtat ttaatgttct ctggtatttt	1080
gcctttattc gcttactgaa tgtcatttta caaaaacagt gtgtcagttt ctggacctta	1140
tttattgatt tagttcagtg aagataacaa catgcttctg attattgtgc agatcccaaa	1200
tgggtgcagca ggccattacc ttcttggact tatttacaag tacgtttttt gttctgtcta	1260
tgcatttttt ctgattctg aatggcttag atgagatgat tcctcatata taacagtgc	1320
cttttaggta tactgataga aggaagaatg ctgctcaaca atttaaacag tccttgacaa	1380
tagacctct actttgggt gcataatgagg aattatgtat attaggtgaa cataatccgt	1440
tttctgcata cttcacagat atgttatggt tctcttacac ttttctgtct gctcaacttt	1500
cagggtctgc tgaggaagca actgcagttt ttggtgaaac agctgctctc tccattcaaa	1560
agcagtatat gcaacaactg tcaacttccc tcggcttaaa cacttacaac gaggaacgta	1620
attcaacttc tactaaaaac acgagtcttg aagattatag tccaaggcag tctaaacaca	1680
cacaaagcca tggccttaaa gatattctcg gaaatttcca ttctcatgga gttaatggag	1740
gtgtttcgaa catgtcattc tataatacgc cttcgccagt ggctgcacag gtaatgtcac	1800
acaattgtcg tactgctttt ttatgtaata caactatato tccatctggt gatcacacat	1860
tctgtagtac ttaggagatt tgtgcatcat ggggtgtgat ttcacagcgt ttgtatctgt	1920
tttttctata tctgttatgc caaaagaatg ggtgtgtctat tcttttgact attaaaaatg	1980
gggtcttcat tatgttttag tgtctttggt ttggcttgtt aattttatca acctttttag	2040
ttatctgaat aataacagct gtaagtaa atgtttttgt atttttgaaa ttgtagctat	2100
ccggtatagc tccaccacca cttttccgga attttcagcc agctgttgca aacccaaact	2160
cccttattac tgacagttct ccaaagtcca ctgttaactc tactcttcaa gcacctagaa	2220
gaaagtgtgt agatgaagga aagttacgta aggtaggatt cacataatca catatctcta	2280
cttgacatca tcaaatcata attttgaatt attggtcttt ctctgtaata gtctatttcg	2340
tactcgggat gaaattttct ataccaactt tcttaccgtg agtgcatgct tcttatgttt	2400
gcagatttct ggcagactat tttctgattc tgggtccacga cggagttcaa gactgtctgc	2460
tgattcaggg gcaaacatta attcaagtgt tgcaacagta agcggaaatg tgaacaacgc	2520
ttccaagtat ttgggaggtt ctaaattgag ttctttggca ctctgttctg taacacttcg	2580
gaagggacac tcctgggcaa atgaaaacat ggtgaaggt tgtgacattc catgcactat	2640
accactatat tgtttgaaat ctgcccttgt gtgactattg ttatcatgcc ttctattttt	2700
ggtgtctgca tatttgtaat accgtcattc tgatgggttt aggggtccgt ggggaacctt	2760
ttgatgattc aaggccta atctgcctcaa cgactggttc tatggcttcc aatgatcaag	2820

aagacgaaac aatgtcgatt ggtggcatag caatgagttc tcaaacaatc acaattggtg 2880
tttcggaaat tttaaacctc cttaggacac tcggagaagg gtgtagactt tcatacatgt 2940
acaggtgtca ggtaggcata ttattgttct cgtgaattat gcaagtgagg tgaacctata 3000
taggcttate tcattgtctc cttctgcttc tgggtcgttc aggaggcact ggatacgtat 3060
atgaaacttc cacataagca ttataatata ggatgggttc tttcccaggt aactagtgcac 3120
tctttctctt ttaggctgcc atatatggat atagcctgaa tcagttttac tctagtggcc 3180
tgtgatagtt attgttgaaa ggtttatata cacatactat ggctattaaa tgtaggctcg 3240
gaaagcatatc tttgaactaa ttgactatct agaggctgaa aaggcattcc gtcttgcccc 3300
tctggcttct ccttattgct tagaaggaat ggatatatac tctacggctc tctatgtaaa 3360
tgtattatcc tggtttctaa acatgcaatc tcggatgagt gcggaagaa atcacattta 3420
tgtaaatctt tcatacagca gatatgatat ttatttgcag catttgaagg aagacatgaa 3480
gctgagttac ttggctcagg aactaatatc aaccgatcgc ttagctctc aatcttggtg 3540
ttttttgtcg aagttgtttt tctgattaac gttttcattt attgttggtg ataagagaaa 3600
taagcaatca attatgtagg tgtgctatgg gaaattgcta tagcttgcaa aaggaccatg 3660
agaccgact gaagaatttc ctacgagctg ttcaactgaa tccaagattt gcatatgcac 3720
ataccttatg tggccacgag taagagagcc tctatccatt tgactttgtc ttgcacaatg 3780
tgcttaaaat tatctgggta ttggtctaatt tgacactttc tatctttact gtctctgtag 3840
atacacaact cttgaggatt ttgagaacgg aatgaaaagt taccaaaacg cacttcgtgt 3900
agatacaaga cactacaacg catggtacgg gcttggaatg atatatctac gccaaagaaa 3960
gttagagttc tcagagcatc acttcagaat ggctttccta ataaaccoga gtctctctgt 4020
tataatgtct tatttaggga catctttgca tgccttgaag gttatcttat tactttcatc 4080
ttatcaggtc tacaagaaaa acaatctttg aagaatgact aaatgcttct tcttggtttg 4140
tgttaataga gaagtggaga agcactagag ataatggagc aagccatagt agcagataga 4200
aaaaacctc tccaatgta ccagaaagct aacatacttg tctgcttaga aagattagat 4260
gaagctctag aagttcttga ggagctcaa gagtatgccc cttcagagag cagcgtttac 4320
gctttaatgg gcaggatcta taagcggcga aacatgcacg ataaagccat gcttcatttc 4380
ggtctagctt tagatatgaa accgcctgca actgacgttg ctgcaataaa ggttcgagtc 4440
tttaaaacag agtcgtccaa tgatgggttt taaatctgaa aattcaagga ttcatagctt 4500
aaactgggta ttattgtctg aaacaggctg caatggagaa attgcatgtt ccagatgaga 4560
tcgatgagag cccgtga 4577

<210> 15

<211> 4577

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 15

atggaagcta	tgcttgtgga	ctgtgtaaac	aacagtcttc	gtcattttgt	ctacaaaaat	60
gctattttca	tgtgcgagcg	tctctgcgct	gagtttcctt	ctgaggtaat	cacctcttc	120
tttcaactctc	tctctctgat	tttacctctc	taattcaaat	tctgtaaatc	gaagctcttg	180
gaatggtaaa	tttgatattt	ttgggtttgt	aattcctctg	ggtatctatg	aattcgtcga	240
aagtgcgtct	ctttttggat	ttggaattcg	atagcttcac	tgtgttcttc	gagattgatt	300
ttggtttctt	accttttagc	cctttgtttt	caagatccgt	gtgttcaatt	aggagatgaa	360
ttcgtgttct	tttctctctc	ttgttgaatt	tgttttctct	agtagctgtg	ctcaatgctc	420
attactgatt	tggctcttgg	aaaatttgca	ttttgagggg	taatgacttt	tgtccatata	480
tgtgatctca	agtttaagta	tttattatcc	ttggaactta	gctatgagtc	aactgttaga	540
ggaatgtctc	tgggattatc	tcaagctttg	ttaaaatttg	ggtaataaca	gcttcaatag	600
tagttgagaa	agtattcatt	cattcagcct	ttggtctgga	atattttcaa	cattcgtagt	660
ggttgtccag	tttctagctt	cagttagtag	aaatcatgtc	aataaatgat	tggccttttt	720
gtttgatcac	tttctgaatt	ttcctcttat	ataggttaat	ttgcagctat	tagccaccag	780
ctacctgcag	aataatcaag	cttacagtgc	atatcatctg	ctaaaggggtg	cgtggcattg	840
tttcttgact	tgttgcttgt	tagcctttta	gtcagaattt	tgcaccttct	tttgttaggt	900
cgttttgatt	atctttgtat	atataatttt	tttttgttat	gtaaaggaac	acaaatggct	960
cagtcocgat	acttgcttgc	attatcatgc	ttccagatgg	accttctcaa	tgaagctgaa	1020
tctgcactct	gcctgtttaa	tgaacctggg	gctgaggtat	ttaatgttct	ctgggtatttt	1080
gcctttatct	gcttactgaa	tgtcatttta	caaaaacagt	gtgtcagttt	ctggacctta	1140
tttattgatt	tagttcagtg	aagataacaa	catgcttctg	attattgtgc	agatcccaaa	1200
tgggtgcagca	ggccattacc	ttcttggtact	tatttacaag	tacgtttttt	gttctgtcta	1260
tgcatttttt	cttgattctg	aatggcttag	atgagatgat	tcctcatata	taacagtgac	1320
cttttaggta	tactgataga	aggaagaatg	ctgctcaaca	atttaaacag	tccttgacaa	1380
tagacctctc	actttgggct	gcatatgagg	aattatgtat	attaggtgaa	cataatccgt	1440
tttctgcata	cttcacagat	atgttatggg	tctcttacac	ttttctgtct	gctcaacttt	1500
caggtgctgc	tgaggaagca	actgcagttt	ttggtgaaac	agctgctctc	tccattcaaa	1560
agcagtatat	gcaacaactg	tcaacttccc	tcggcttaaa	cacttacaac	gaggaacgta	1620
attcaacttc	tactaaaaac	acgagttctg	aagattatag	tccaaggcag	tctaaacaca	1680
cacaaagcca	tggccttaaa	gatatctccg	gaaatttcca	ttctcatgga	gttaatggag	1740

gtgtttcgaa catgtcattc tataatacgc cttcgccagt ggctgcacag gtaatgtcac	1800
acaattgtcg tactgtcttt ttatgtaata caactatata tccatctgtt gatcacacat	1860
tctgtagtac ttaggagatt tgtgcatcat ggggtgtgat ttcacagcgt ttgtatctgt	1920
tttttctata tctgttatgc caaaagaatg gggtgtctat tcttttgact attaaaaatg	1980
gggtcttcat tatgttttag tgtctttggt ttggcttggt aattttatca accttttag	2040
ttatctgaat aataacagct gtaagtaaatt gcttttttgt atttttgaaa ttgtagctat	2100
ccggtatagc tccaccacca cttttccgga attttcagcc agctgttgca aaccctaaact	2160
cccttattac tgacagttct ccaaagtcca ctgttaactc tactcttcaa gcacctagaa	2220
gaaagtttgt agatgaagga aagttacgta aggtaggatt cacataatca catatctcta	2280
cttgacatca tcaaatacata attttgaatt attggtcttt ctctgtaata gtctatttctg	2340
tactcgggat gaaattttct ataccaactt tcttaccgtg agtgcattgtc tcttatgttt	2400
gcagatttct ggcagactat tttctgatcc tgggtccagc cggagttcaa gactgtctgc	2460
tgattcaggg gcaaactata attcaagtgt tgcaacagta agcggaaatg tgaacaacgc	2520
ttccaagtat ttgggagggt ctaaattgag ttctttggca ctctgttctg taacacttctg	2580
gaagggacac tcctgggcaa atgaaaacat ggatgaagggt tgtgacattc catgcactat	2640
accactatat tgtttgaaat ctgcccttgt gtgactattg ttatcatgcc ttctattttt	2700
gggtgtctgca tatttgtaat accgtcattc tgatgggttt aggggtccgt ggggaacctt	2760
ttgatgattc aaggcctaatt actgcctcaa cgactgggtc tatggcttcc aatgatcaag	2820
aagacgaaac aatgtcgatt ggtggcatag caatgagttc tcaaacaatc acaattgggtg	2880
tttcggaaat tttaaacttc cttaggacac tcggagaagg gtgtagactt tcatacatgt	2940
acaggtgtca ggtaggcata ttattgttct cgtgaattat gcaagtgagg tgaacctata	3000
taggccttata tcattgtctc cttctgcttc tgggtcgttc aggaggcact ggatacgtat	3060
atgaaacttc cacataagca ttataatata ggatgggttc tttcccagggt aactagtgc	3120
tctttctctt ttaggctgcc atatatggat atagcctgaa tcagttttac tctagtggcc	3180
tgtgatagtt attgttgaaa ggtttatata cacatactat ggctattaaa tgtaggtcgg	3240
gaaagcatac tttgaactaa ttgactatct agaggctgaa aaggcattcc gtcttgccc	3300
tctggcttct ccttattgct tagaaggaat ggatatatac tctacggtcc tctatgtaag	3360
tgtattatcc tgggtttctaa acatgcaatc tcggatgagt gcggaaagaa atcacattta	3420
tgtaaaatttt tcatcagcaa gatatgatat ttatttgcag catttgaagg aagacatgaa	3480
gctgagttac ttggctcagg aactaatatc aaccgatcgc ttagctcctt aatcttggtta	3540
ttttttgtcg aagttgtttt tctgattaac gttttcattt attgttggta ataagagaaa	3600
taagcaatca attatgtagg tgtgctatgg gaaattgcta tagcttgcaa aaggaccatg	3660

```

agaccgcact gaagaatttc ctacgagctg ttcaactgaa tccaagattt gcatatgcac 3720
ataccttatg tggccacgag taagagagcc tctatccatt tgactttgtc ttgcacaatg 3780
tgcttaaaat tatctgggta ttgggtctaata tgacactttc tatctttact gtctctgtag 3840
atacacaact cttgaggatt ttgagaacgg aatgaaaagt taccaaaacg cacttcgtgt 3900
agatacaaga cactacaacg catggtacgg gcttggaatg atatatctac gccaaagaaa 3960
gttagagttc tcagagcatc acttcagaat ggctttccta ataaaccga gttcctctgt 4020
tataatgtct tatttaggga catctttgca tgccttgaag gttatcttat tactttcatc 4080
ttatcagggtc tacaagaaaa acaatctttg aagaatgact aaatgcttct tcttgttttg 4140
tgtaataaga gaagttagga agcactagag ataattggagc aagccatagt agcagataga 4200
aaaaaccctc ttccaatgta ccagaaagct aacatacttg tctgcttaga aagattagat 4260
gaagctctag aagttcttga ggagctcaa gagtatgccc cttcagagag cagcgtttac 4320
gctttaatgg gcaggatcta taagcggcga aacatgcacg ataaagccat gcttcatttc 4380
ggcttagctt tagatatgaa accgcctgca actgacgttg ctgcaataaa ggttcgagtc 4440
tttaaaacag agtcgtccaa tgatgggttt taaatctgaa aattcaagga ttcatagctt 4500
aaactgggta ttattgtctg aaacaggctg caatggagaa attgcatgtt ccagatgaga 4560
tcgatgagag cccgtga 4577

```

<210> 16

<211> 4577

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 16

```

atggaagcta tgcttggtga ctgtgtaaac aacagtcttc gtcattttgt ctacaaaaat 60
gctattttca tgtgcgagcg tctctgcgct gagtttctt ctgaggtaat caccctcttc 120
tttactcttc tctctctgat ttacctctc taattcaaat tctgtaaata gaagctcttg 180
gaatggtaaa ttgatattt ttgggtttgt aattcctctg ggtatctatg aattcgtcga 240
aagtgcgtct ctttttggtt ttggaattcg atagcttcac tgtgttcttc gagattgatt 300
ttgggtttct acccttttagc cctttgtttt caagatccgt gtgttcaatt aggagatgaa 360
ttcgtgttct tttctctctc ttgttgaaat tgttttctct agtagctgtg ctcaatgctc 420
attactgatt tgggtctttg aaaatttgca ttttgagggt taatgacttt tgtccatata 480
tgtgatctca agtttaagta ttattatcc ttggaactta gctatgagtc aactgttaga 540
ggaatgtctc tgggattatc tcaagctttg ttaaaatttg ggtaataca gcttcaatag 600
tagttgagaa agtattcatt cattcagcct ttggctctga atattttcaa cattcgtagt 660
ggttggtccag tttctagctt cagtttagtag aaatcatgtc aataaatgat tggccttttt 720

```

gtttgatcac tttctgaatt ttcctcttat ataggttaat ttgcagctat tagccaccag	780
ctacctgcag aataatcaag cttacagtgc atatcatctg ctaaaggggtg cgtggcattg	840
tttcttgact tgttgcttgt tagcctttta gtcagaattt tgcaccttct tttgttaggt	900
cgttttgatt atctttgtat atatatTTTT tttttgttat gtaaaggaac acaaatggct	960
cagtcccgat acttggtcgc attatcatgc ttccagatgg accttctcaa tgaagctgaa	1020
tctgcactct gccctgttaa tgaacctggg gcggagggtat ttaatgttct ctggatTTTT	1080
gcctttattc gcttactgaa tgtcatttta caaaaacagt gtgtcagttt ctggacctta	1140
tttattgatt tagttcagtg aagataacaa catgcttctg attattgtgc agatcccaaa	1200
tgggtgcagca ggccattacc ttcttggact tatttacaag tacgtttttt gttctgtcta	1260
tgcattTTTT ctgtattctg aatggccttag atgagatgat tctcatata taacagtgac	1320
cttttaggta tactgataga aggaagaatg ctgctcaaca atttaaacag tccttgacaa	1380
tagacctctc actttgggct gcatatgagg aattatgtat attaggtgaa cataatccgt	1440
tttctgcata cttcacagat atgttatggg tctcttacac tttctgtctc gctcaacttt	1500
cagggtctgc tgaggaagca actgcagttt ttgggtgaaac agctgctctc tccattcaaa	1560
agcagtatat gcaacaactg tcaacttccc tcggcttaaa cacttacaac gaggaacgta	1620
attcaacttc tactaaaaac acgagttctg aagattatag tccaaggcag tctaaacaca	1680
cacaaagcca tggccttaaa gatatctccg gaaatttcca ttctcatgga gttaatggag	1740
gtgtttcgaa catgtcatc tataatacgc cttcgccagt ggctgcacag gtaatgtcac	1800
acaattgtcg tactgttttt ttatgtaata caactatata tccatctgtt gatcacacat	1860
tctgtagtac ttaggagatt tgtgcatcat ggggtgtgat ttcacagcgt ttgtatctgt	1920
tttttctata tctgttatgc caaaagaatg ggttgtctat tcttttgaat attaaaaatg	1980
gggtcttcat tatgttttag tgtctttggg ttggcttgtt aattttatca accttttag	2040
ttatctgaat aataacagct gtaagtaaat gcttttttgt atttttgaaa ttgtagctat	2100
ccggtatagc tccaccacca cttttccgga attttcagcc agctgttgca aacccaaact	2160
cccttattac tgacagttct ccaaagtcca ctgttaactc tactcttcaa gcacctagaa	2220
gaaagtttgt agatgaagga aagttacgta aggtaggatt cacataatca catatctcta	2280
cttgacatca tcaaatcata attttgaatt attggctctt ctctgtaata gtctatttcg	2340
tactcgggat gaaattttct ataccaactt tcttaccgtg agtgcattgc tcttatgttt	2400
gcagatttct ggcagactat tttctgattc tgggtccacga cggagttcaa gactgtctgc	2460
tgattcaggg gcaaacatta attcaagtgt tgcaacagta agcggaaatg tgaacaacgc	2520
ttccaagtat ttgggaggtt ctaaattgag ttctttggca cttcgttctg taacacttcg	2580

gaagggacac tcctgggcaa atgaaaacat ggatgaaggt tgtgacattc catgcactat 2640
 accactatat tgtttgaaat ctgcccttgt gtgactattg ttatcatgcc ttctattttt 2700
 ggtgtctgca tatttgtaat accgtcattc tgatgggttt aggggtccgt ggggaacctt 2760
 ttgatgattc aaggcctaact actgcctcaa cgactgggtc tatggcttcc aatgatcaag 2820
 aagacgaaac aatgtcgatt ggtggcatag caatgagttc tcaaacaatc acaattgggtg 2880
 tttcggaaat tttaaacctc cttaggacac tcggagaagg gtgtagactt tcatacatgt 2940
 acagggtgtca ggtaggcata ttattgttct cgtgaattat gcaagtgagg tgaacctata 3000
 taggcttattc tcattgtctc cttctgttcc tgggtcgttc aggaggcact ggatacgtat 3060
 atgaaacttc cacataagca ttataatata ggatgggttc tttcccagggt aactagtgtac 3120
 tctttctctt ttaggctgcc atatatggat atagcctgaa tcagttttac tctagtggcc 3180
 tgtgatagtt attgttgaaa ggtttatata cacatactat ggctattaaa tgtaggctcg 3240
 gaaagcatac tttgaaacta ttgactattt agaggctgaa aaggcattcc gtcttgccc 3300
 tctggcttct ccttattgct tagaaggaat ggatatatac tctacgggtc tctatgtaag 3360
 tgtattatcc tggtttctaa acatgcaatc tcggatgagt gcggaagaa atcacattta 3420
 tgtaaatttt tcacagcaa gatatgatat ttatttgag catttgagg aagacatgaa 3480
 gctgagttac ttggctcagg aactaatatc aaccgatcgc ttagctcctc aatcttggt 3540
 tttttgtcg aagttgtttt tctgattaac gttttcattt attgttggt ataagagaaa 3600
 taagcaatca attatgtagg tgtgctatgg gaaattgcta tagcttgcaa aaggaccatg 3660
 agaccgtact gaagaatttc ctacgagctg ttcaactgaa tccaagattt gcatatgcac 3720
 ataccttatg tggccacgag taagagagcc tctatccatt tgactttgtc ttgcacaatg 3780
 tgcttaaaat tatctggtta ttggtcta atgacactttc tatctttact gtctctgtag 3840
 atacacaact cttgaggatt ttgagaacgg aatgaaaagt taccaaaacg cacttcgtgt 3900
 agatacaaga cactacaacg catggtacgg gcttggaaatg atatatctac gccaaagaa 3960
 gttagagttc tcagagcatc acttcagaat ggctttccta ataaaccga gtctctctgt 4020
 tataatgtct tatttaggga catctttgca tgccttgaag gttatcttat tactttcatc 4080
 ttatcaggtc tacaagaaaa acaatctttg aagaatgact aaatgcttct tcttggtttg 4140
 tgttaataga gaagttagga agcactagag ataattggagc aagccatagt agcagataga 4200
 aaaaacctc ttccaatgta ccagaaagct aacatacttg tctgcttaga aagattagat 4260
 gaagctctag aagttcttga ggagctcaa gagtatgagc cttcagagag cagcgtttac 4320
 gctttaatgg gcaggatcta taagcggcga aacatgcacg ataaagccat gcttcatttc 4380
 ggtctagctt tagatatgaa accgcctgca actgacgttg ctgcaataaa ggttcgagtc 4440
 tttaaaacag agtcgtccaa tgatgggttt taaatctgaa aattcaagga ttcatagctt 4500
 aaactgggtta ttattgtctg aaacaggctg caatggagaa attgcatgtt ccagatgaga 4560
 tcgatgagag cccgtga 4577

<210> 17

<211> 2235

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 17

atggaagcta	tgcttggtga	ctgtgtaaac	aacagtcttc	gtcattttgt	ctacaaaaat	60
gttattttca	tgtgcgagcg	tctctgcgct	gagtttcctt	ctgagggtta	tttgcagcta	120
ttagccacca	gctacctgca	gaataatcaa	gcttacagt	catatcatct	gctaaaggga	180
acacaaatgg	ctcagtcctg	atacttgctc	gcattatcat	gcttcagat	ggacctcttc	240
aatgaagctg	aatctgcact	ctgcctgtt	aatgaacctg	gtgcggagat	cccaaatggt	300
gcagcaggcc	attaccttct	tggacttatt	tacaagtata	ctgatagaag	gaagaatgct	360
gctcaacaat	ttaaacagtc	cttgacaata	gacctctac	tttgggctgc	atatgaggaa	420
ttatgtatat	taggtgctgc	tgaggaagca	actgcagttt	ttggtgaaac	agctgctctc	480
tccattcaaa	agcagtatat	gcaacaactg	tcaacttccc	tcggcttaaa	cacttacaac	540
gaggaacgta	attcaacttc	tactaaaaac	acgagttctg	aagattatag	tccaaggcag	600
tctaaacaca	cacaagcca	tggccttaaa	gatctctccg	gaaatttcca	ttctcatgga	660
gttaatggag	gtgtttcgaa	catgtcattc	tataatacgc	cttcgccagt	ggctgcacag	720
ctatccggta	tagctccacc	accacttttc	cggaattttc	agccagctgt	tgcaaaccce	780
aactccctta	ttactgacag	ttctccaaag	tccactgtta	actctactct	tcaagcacct	840
agaagaaagt	ttgtagatga	aggaaagtta	cgtaagattt	ctggcagact	attttctgat	900
tctgggtccac	gacggagttc	aagactgtct	gctgattcag	gggcaaacat	taattcaagt	960
gttgcaacag	taagcggaaa	tgtgaacaac	gcttccaagt	atgtgggagg	ttctaatttg	1020
agttcttttg	cacttcgttc	tgtaacactt	cggaaggagc	actcctgggc	aaatgaaaac	1080
atggatgaag	gggtccgtgg	ggaacctttt	gatgattcaa	ggcctaatac	tgcttcaacg	1140
actggttcta	tggcttccaa	tgtacaagaa	gacgaaacaa	tgtcgattgg	tggcatagca	1200
atgagttctc	aaacaatcac	aattgggtgt	tcggaaattt	taaacctcct	taggacactc	1260
ggagaagggg	gtagactttc	atacatgtac	aggtgtcagg	aggcactgga	tacgtatatg	1320
aaacttccac	ataagcatta	taatacagga	tgggttcttt	cccaggctcg	gaaagcatac	1380
tttgaactaa	ttgactatct	agaggctgaa	aaggcattcc	gtcttgcccg	tctggcttct	1440
ccttattgct	tagaaggaat	ggatatatac	tctacggtcc	tctatcattt	gaaggaagac	1500
atgaagctga	gttacttggc	tcaggaacta	atatcaaccg	atcgcttagc	tcctcaatct	1560
tggtgtgcta	tgggaaattg	ctatagcttg	caaaaggacc	atgagaccgc	actgaagaat	1620
ttcctacgag	ctgttcaact	gaatccaaga	tttgcataat	cacatacctt	atgtggccac	1680
gaatacacaa	ctcttgagga	ttttgagaac	ggaatgaaaa	gttaccaaaa	cgcacttcgt	1740
gtagatacaa	gacactacaa	cgcatggtac	gggcttgga	tgatatactt	acgccaaag	1800
aagtttagagt	tctcagagca	tcacttcaga	atggcttttc	taataaaccc	gagttcctct	1860
gttataatgt	cttatttagg	gacatctttg	catgccttga	agagaagtga	ggaagcacta	1920
gagataatgg	agcaagccat	agtagcagat	agaaaaaac	ctcttccaat	gtaccagaaa	1980
gctaacatac	ttgtctgctt	agaaagatta	gatgaagctc	tagaagttct	tgaggagctc	2040
aaagagtatg	cgccttcaga	gagcagcgtt	tacgctttta	tgggcaggat	ctataagcgg	2100
cgaaacatgc	acgataaagc	catgcttcat	ttcggctctag	cttttagatat	gaaaccgcct	2160
gcaactgacg	ttgctgcaat	aaaggctgca	atggagaaat	tgcatgttcc	agatgagatc	2220
gatgagagcc	cgtga					2235

<210> 18

5 <211> 2313

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 18

```

atggaagcta tgcttgtgga ctgtgtaaac aacagtcttc gtcattttgt ctacaaaaat    60
gctattttca tgtgcgagcg tctctgcgct gagtttcctt ctgagggttaa tttgcagcta    120
ttagccacca gctacctgca gaataatcaa gcttacagtg catatcatct gctaaaggga    180
acacaaatgg ctccagtcgg atacttgttc gcattatcat gcttccagat ggaccttctc    240
aatgaagctg aatctgcact ctgccctgtt aatgaacctg gtgcggagat cccaaatggt    300
gcagcaggcc attaccttct tggacttatt tacaagtata ctgatagaag gaagaatgct    360
gctcaacaat taaacagtc cttgacaata gacctctac tttgggctgc atatgaggaa    420
ttatgtatat taggtgaaca taatccgttt tctgcatact tcacagatat gttatggttc    480
tcttacactt ttctgtctgc tcaactttca agtgctgctg aggaagcaac tgcagttttt    540
ggtgaaacag ctgctctctc cattcaaaag cagtatatgc aacaactgtc aacttccctc    600
ggcttaaaca cttacaacga ggaacgtaat tcaacttcta ctaaaaacac gagttctgaa    660
gattatagtc caaggcagtc taaacacaca caaagccatg gccttaaaga tatctccgga    720
aatttccatt ctcatggagt taatggaggt gtttcgaaca tgtcattcta taatacgctt    780
tcgccagtgg ctgcacagct atccggtata gctccaccac cacttttccg gaattttcag    840
ccagctgttg caaacccaaa ctcccttatt actgacagtt ctcaaagtc cactgttaac    900
tctactcttc aagcacctag aagaaagttt gtagatgaag gaaagttacg taagatttct    960

ggcagactat tttctgattc tggttccaga cggagttcaa gactgtctgc tgattcaggg    1020
gcaaacatta attcaagtgt tgcaacagta agcggaaatg tgaacaacgc ttccaagtat    1080
ttgggaggtt cttaattgag ttcttttgca cttcgttctg taacacttcg gaagggacac    1140
tcctgggcaa atgaaaacat ggatgaaggg gtccgtgggg aaccttttga tgattcaagg    1200
cctaatactg cctcaacgac tggttctatg gcttccaatg atcaagaaga cgaacaatg    1260
tcgattgggtg gcatagcaat gagttctcaa acaatcacia ttggtgtttc ggaaatttta    1320
aacctcctta ggacactcgg agaaggggtg agactttcat acatgtacag gtgtcaggag    1380
gcactggata cgtatatgaa acttccacat aagcattata atacaggatg ggttctttcc    1440
caggtcggga aagcatactt tgaactaatt gactatttag aggctgaaa ggcatccgtt    1500
cttgcccgtc tggcttctcc ttattgctta gaaggaatgg atatatactc tacggtcttc    1560
tatcatttga aggaagacat gaagctgagt tacttggttc aggaactaat atcaaccgat    1620
cgcttagctc ctcaatcttg gtgtgctatg ggaaattgct atagcttgca aaaggacat    1680
gagaccgcac tgaagaattt cctacgagct gttcaactga atccaagatt tgcatatgca    1740
cataccttat gtggccacga atacacaact cttgaggatt ttgagaacgg aatgaaaagt    1800
taccaaaacg cacttcgtgt agatacaaga cactacaacg catggtacgg gcttggaatg    1860
atatatctac gccaaagagaa gttagagttc tcagagcadc acttcagaat ggctttccta    1920
ataaaccgga gttcctctgt tataatgtct tatttaggga catcttttga tgccttgaag    1980
agaagtgagg aagcactaga gataatggag caagccatag tagcagatag aaaaaaccct    2040
cttccaatgt accagaaagc taacatactt gtctgcttag aaagattaga tgaagctcta    2100
gaagtctctg aggagctcaa agagtatgag ccttcagaga gcagcgttta cgctttaatg    2160
ggcaggatct ataagcggcg aaacatgcac gataaagcca tgcttcattt cggctctagct    2220
ttagatatga aaccgcctgc aactgacgtt gctgcaataa aggctgcaat ggagaaattg    2280
catgttccag atgagatcga tgagagcccg tga                                2313

```

<210> 19

<211> 2235

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

5 <400> 19

```

atggaagcta tgcttgtgga ctgtgtaaac aacagtcttc gtcattttgt ctacaaaaat    60
gctattttca tgtgcgagcg tctctgcgct gagtttcctt ctgagggtta tttgcagcta    120
ttagccacca gctacctgca gaataatcaa gcttacagtg catatcatct gctaaaggga    180
acacaaatgg ctcagtcocg atacttggtc gcattatcat gcttcagat ggaccttctc    240
aatgaagctg aatctgcact ctgccctggt aatgaacctg gtgcggagat cccaaatggt    300

```

```

gcagcaggcc attaccttct tggacttatt tacaagtata ctgatagaag gaagaatgct 360
gtcaacaat ttaaacagtc cttgacaata gaccctctac tttgggctgc atatgaggaa 420
ttatgtatat taggtgctgc tgaggaagca actgcagttt ttggtgaaac agctgctctc 480
tccattcaaa agcagtatat gcaacaactg tcaacttccc tcggcttaaa cacttacaac 540
gaggaacgta attcaacttc tactaaaaac acgagttctg aagattatag tccaaggcag 600
tctaaacaca cacaagcca tggccttaaa gatattctcg gaaatttcca ttctcatgga 660
gttaatggag gtgtttcgaa catgtcattc tataatacgc cttegccagt ggctgcacag 720
ctatccggtg tagctccacc accacttttc cggaattttc agccagctgt tgcaaaccga 780
aactccctta ttactgacag ttctccaaag tccactgtta actctactct tcaagcacct 840
agaagaaagt ttgtagatga aggaaagtta cgtaagattt ctggcagact attttctgat 900
tctggctcac gacggagttc aagactgtct gctgattcag gggcaaacat taattcaagt 960
gttgcaacag taagcggaaa tgtgaacaac gcttccaagt atttgggagg ttctaaattg 1020
agttctttgg cacttcgttc tgtaacactt cggaaggagc actcctgggc aaatgaaaac 1080
atggatgaag gggtcctggt ggaacctttt gatgattcaa ggctaatac tgcctcaacg 1140
actggttcta tggcttccaa tgatcaagaa gacgaacaa tgtcgattgg tggcatagca 1200
atgagttctc aaacaatcac aattggtgtt tcggaaattt taaacctcct taggacactc 1260
agagaagggg gtgacttttc atacatgtac aggtgtcagg aggcactgga tacgtatatg 1320
aaacttcac ataagcatta taatacagga tgggttcttt ccaggtcgg gaaagcatac 1380
tttgaactaa ttgactattt agaggctgaa aaggcattcc gtcttgcccg tctggcttct 1440
ccttattgct tagaaggaat ggatatatac tctacggtcc tctatcattt gaaggaagac 1500
atgaagctga gttacttggc tcaggaacta atatcaaccg atcgcttagc tcctcaatct 1560
tgggtgtgcta tgggaaattg ctatagcttg caaaaggacc atgagaccgc actgaagaat 1620
ttcctacgag ctgttcaact gaatccaaga tttgcatatg cacatacctt atgtggccac 1680
gaatacacia ctcttgagga ttttgagaac ggaatgaaaa gttacaaaaa cgcacttcgt 1740
gtagatacaa gacactacaa cgcattggtac gggcttggaa tgatatatct acgccaagag 1800
aagttagagt tctcagagca tcaactcaga atggctttcc taataaacc gagttcctct 1860
gttataatgt cttatttagg gacatctttg catgccttga agagaagtga ggaagcacta 1920
gagataatgg agcaagccat agtagcagat agaaaaaac ctcttccaat gtaccagaaa 1980
gctaacatac ttgtctgctt agaaagatta gatgaagctc tagaagttct tgaggagctc 2040
aaagagtatg cgccttcaga gagcagcgtt tacgctttaa tgggcaggat ctataagcgg 2100
cgaaacatgc acgataaagc catgcttcat ttcggtctag ctttagatat gaaaccgcct 2160

gcaactgacg ttgctgcaat aaaggctgca atggagaaat tgcattgttc agatgagatc 2220
gatgagagcc cgtga 2235

```

<210> 20

<211> 2169

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 20

atggaagcta	tgcttgtgga	ctgtgtaaac	aacagtcttc	gtcattttgt	ctacaaaaat	60
gctattttca	tgtagcgagcg	tctctgcgct	gagtttcctt	ctgagggttaa	tttgcagcta	120
ttagccacca	gctacctgca	gaataatcaa	gcttacagt	catatcatct	gctaaaggga	180
acacaaatgg	ctcagtcgccg	atacttgttc	gcattatcat	gcttcagat	ggacottctc	240
aatgaagctg	aatctgcact	ctgccctgtt	aatgaacctg	gtgcggagat	cccaaagggt	300
gcagcaggcc	attaccttct	tggacttatt	tacaagtata	ctgatagaag	gaagaatgct	360
gctcaacaat	ttaaacagtc	cttgacaata	gacctcttac	tttgggctgc	atatgaggaa	420
ttatgtatat	taggtgctgc	tgaggaaagca	actgcagttt	ttggtgaaac	agctgctctc	480
tccattcaaa	agcagtatat	gcaacaactg	tcaacttccc	tcggcttaaa	cacttacaac	540
gaggaaagcta	attcaacttc	tactaaaaac	acgagttctg	aagattatag	tccaaggcag	600
tctaaacaca	cacaaagcca	tggccttaaa	gatctctccg	gaaatttcca	ttctcatgga	660
gttaatggag	gtgtttcgaa	catgtcattc	tataatacgc	cttcgccagt	ggctgcacag	720
ctatccggta	tagtccacc	accacttttc	cggaattttc	agccagctgt	tgcaaaccga	780
aactccctta	ttactgacag	ttctccaaag	tccactgtta	actctactct	tcaagcacct	840
agaagaaagt	ttgtagatga	aggaaagtta	cgtaagattt	ctggcagact	attttctgat	900
tctgggtccac	gacggagttc	aagactgtct	gctgattcag	gggcaaaca	taattcaagt	960
gttgcaacag	taagcggaaa	tgtgaacaac	gcttccaagt	atttgggagg	ttctaaattg	1020
agttcttttg	cacttcgttc	tgtaacactt	cggaaggagc	actcctgggc	aaatgaaaac	1080
atggatgaag	gggtccgtgg	ggaacctttt	gatgattcaa	ggcctaatac	tgccccaacg	1140
actggttcta	tggcttccaa	tgatcaagaa	gacgaaacaa	tgtcgattgg	tggcatagca	1200
atgagttctc	aaacaatcac	aattgggtgt	tcggaaattt	taaacctcct	taggacactc	1260
ggagaagggt	gtagactttc	atacatgtac	aggtgtcagg	tcgggaaagc	atactttgaa	1320
ctaattgact	atttagaggc	tgaaaaggca	ttccgtcttg	cccgtctggc	ttctccttat	1380
tgcttagaag	gaatggatat	atactctacg	gtcctctatc	atttgaagga	agacatgaag	1440
ctgagttact	tggctcagga	actaatatca	accgatcgct	tagctcctca	atcttgggtg	1500
gctatgggaa	attgctatag	cttgcaaaag	gaccatgaga	ccgcactgaa	gaatttccta	1560
cgagctgttc	aactgaatcc	aagatttgca	tatgcacata	ccttatgtgg	ccacgaatac	1620
acaactcttg	aggattttga	gaacggaatg	aaaagttacc	aaaacgcact	tcgtgtagat	1680
acaagacact	acaacgcatg	gtacgggctt	ggaatgatat	atctacgcca	agagaagtta	1740
gagttctcag	agcatcactt	cagaatggct	ttcctaataa	acccgagttc	ctctgttata	1800
atgtcttatt	tagggacatc	tttgcatgcc	ttgaagagaa	gtgaggaagc	actagagata	1860
atggagcaag	ccatagtagc	agatagaaaa	aacctcttc	caatgtacca	gaaagctaac	1920
atacttgtct	gcttagaaaag	attagatgaa	gctctagaag	ttcttgaggga	gctcaaagag	1980
tatgcgctt	cagagagcag	cgtttacgct	ttaatgggca	ggatctataa	gcggcgaaac	2040
atgcacgata	aagccatgct	tcatttcggt	ctagctttag	atatgaaacc	gcctgcaact	2100
gacgttgctg	caataaaggc	tgcaatggag	aaattgcatg	ttccagatga	gatcgatgag	2160
agcccgtga						2169

<210> 21

<211> 2115

5 <212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 21

atggaagcta	tgcttgtgga	ctgtgtaaac	aacagtcttc	gtcattttgt	ctacaaaaat	60
gctattttca	tgtgcgagcg	tctctgcgct	gagtttcctt	ctgagggtta	tttgcagcta	120
ttagccacca	gctacctgca	gaataatcaa	gcttacagt	catatcatct	gctaaagggg	180
acacaaatgg	ctcagtcccg	atacttggtc	gcattatcat	gcttccagat	ggaccttctc	240
aatgaagctg	aatctgcact	ctgccctgtt	aatgaacctg	gtgcggagat	cccaaattggt	300
gcagcaggcc	attaccttct	tggacttatt	tacaagtata	ctgatagaag	gaagaatgct	360
gctcaacaat	ttaaacagtc	cttgacaata	gacctctctac	tttgggctgc	atatgaggaa	420
ttatgtatat	taggtgctgc	tgaggaagca	actgcagttt	ttgggtgaaac	agctgctctc	480
tccattcaaa	agcagtatat	gcaacaactg	tcaacttccc	tcggcttaaa	cacttacaac	540
gaggaacgta	attcaacttc	tactaaaaac	acgagttctg	aagattatag	tccaaggcag	600
tctaaacaca	cacaaagcca	tggccttaaa	gatattctcc	gaaatttcca	ttctcatgga	660
gttaatggag	gtgtttcgaa	catgtcattc	tataatacgc	cttcgccagt	ggctgcacag	720
ctatccggta	tagctccacc	accacttttc	cggaattttc	agccagctgt	tgcaaaccca	780
aactccctta	ttactgacag	ttctccaaag	tccactgtta	actctactct	tcaagcacct	840
agaagaaagt	ttgtagatga	aggaaagtta	cgtaagattt	ctggcagact	atthttctgat	900
tctggtccac	gacggagttc	aagactgtct	gctgattcag	gggcaaacat	taattcaagt	960
gttgcaacag	taagcggaaa	tgtgaacaac	gcttccaagt	atttgggagg	ttctaaattg	1020
agttcttttg	cacttcgttc	tgtaacactt	cggaaggggac	actcctgggc	aaatgaaaac	1080
atggatgaag	gggtccgtgg	ggaacctttt	gatgattcaa	ggcctaatac	tgccctcaacg	1140
actggttcta	tggcttccaa	tgatcaagaa	gacgaaacaa	tgtcgattgg	tggcatagca	1200
atgagttctc	aaacaatcac	aattgggtgt	tcggaaattt	taaacctcct	taggacactc	1260
ggagaagggt	gtagactttc	atacatgtac	aggtgtcagg	aggcactgga	tacgtatatg	1320
aaacttccac	ataagcatta	taatacagga	tgggttcttt	cccagcattt	gaaggaagac	1380
atgaagctga	gttacttggc	tcaggaacta	atatcaaccg	atcgcttagc	tcctcaatct	1440
tgggtgtgcta	tgggaaattg	ctatagcttg	caaaaggacc	atgagaccgc	actgaagaat	1500
ttctctacgag	ctgttcaact	gaatccaaga	tttgcatatg	cacatacctt	atgtggccac	1560
gaatacacaa	ctcttgagga	ttttgagaac	ggaatgaaaa	gttaccaaaa	cgcacttcgt	1620
gtagatacaa	gacactacaa	cgcatggtac	gggcttggaa	tgatatatct	acgccaagag	1680
aagttagagt	tctcagagca	tcacttcaga	atggctttcc	taataaaccc	gagttcctct	1740
gttataatgt	cttatttagg	gacatctttg	catgccttga	agagaagtga	ggaagcacta	1800
gagataatgg	agcaagccat	agtagcagat	agaaaaaac	ctcttccaat	gtaccagaaa	1860
gctaacatac	ttgtctgctt	agaaagatta	gatgaagctc	tagaagttct	tgaggagctc	1920
aaagagtatg	cgccttcaga	gagcagcgtt	tacgctttaa	tgggcaggat	ctataagcgg	1980
cgaaacatgc	acgataaagc	catgcttcat	ttcgggtctag	cttttagatat	gaaaccgcct	2040
gcaactgacg	ttgctgcaat	aaaggctgca	atggagaaat	tgcattgttc	agatgagatc	2100
gatgagagcc	cgtga					2115

<210> 22

5 <211> 1557

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 22

atggaagcta tgcttgtgga ctgtgtaaac aacagtcctc gtcattttgt ctacaaaaat 60
gctattttca tgtgcgagcg tctctgcgct gagtttcctt ctgagggttaa tttgcagcta 120
ttagccacca gctacctgca gaataatcaa gcttacagtg catatcatct gctaaaggga 180
acacaaatgg ctgagtcctg atacttgctt gcattatcat gcttccagat ggaccttctc 240
aatgaagctg aatctgcact ctgccctggt aatgaacctg gtgcggagat cccaaatggg 300
gcagcaggcc attaccttct tggacttatt tacaagtata ctgatagaag gaagaatgct 360
gctcaacaat ttaaacagtc cttgacaata gacctctac tttgggctgc atatgaggaa 420
ttatgtatat taggtgctgc tgaggaagca actgcagttt ttgggtgaaac agctgctctc 480
tccattcaaa agcagtatat gcaacaactg tcaacttccc tcggcttaaa cacttacaac 540

gaggaacgta attcaacttc tactaaaaac acgagttctg aagattatag tccaaggcag 600
tctaaacaca cacaaagcca tggccttaaa gatctctccg gaaatttcca ttctcatgga 660
gttaatggag gtgtttcgaa catgtcattc tataatacgc ctctgccagt ggctgcacag 720
ctatccggta tagctccacc accacttttc cggaattttc agccagctgt tgcaaaccce 780
aactccctta ttactgacag ttctccaaag tccactgtta actctactct tcaagcacct 840
agaagaaagt ttgtagatga aggaaagtta cgtaagattt ctggcagact attttctgat 900
tctgggtccac gacggagttc aagactgtct gctgattcag gggcaaacat taattcaagt 960
gttgcaacag taagcggaaa tgtgaacaac gcttccaagt atttgggagg ttctaaattg 1020
agttcttttg cacttcgttc tgtaacactt cggaaggggc actcctgggc aaatgaaaac 1080
atggatgaag gggtcctggt ggaacctttt gatgattcaa ggcctaatac tgccctaacg 1140
actggttcta ttgcttccaa tgatcaagaa gacgaaacaa tgctcgattg tgccatagca 1200
atgagttctc aaacaatcac aattggtgtt tcggaaattt taaacctcct taggacactc 1260
ggagaagggt gtagactttc atacatgtac aggtgtcagg aggcactgga tacgtatatg 1320
aaacttccac ataagcatta taatacagga tgggttcttt ccaggtcgg gaaagcatac 1380
tttgaactaa ttgactattt agaggctgaa aaggcattcc gtcttgcccg tctggcttct 1440
ccttattgct tagaaggaat ggatatatac tctacggtcc tctatcattt gaaggaagac 1500
atgaagctga gttacttggc tcaggaacta atatcaaccg atcgcttagc tccttaa 1557

<210> 23

<211> 2235

5 <212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 23

atggaagcta	tgettgtgga	ctgtgtaaac	aacagtcttc	gtcattttgt	ctacaaaaat	60
gctattttca	tgtgcgagcg	tctctgcgct	gagtttccct	ctgagggttaa	tttgagcta	120
ttagccacca	gctacctgca	gaataatcaa	gcttacagt	catatcatct	gctaaagga	180
acacaaatgg	ctcagtcocg	atacttggtc	gcattatcat	gcttcagat	ggaccttctc	240
aatgaagctg	aatctgcact	ctgccctgtt	aatgaacctg	gtgcggagat	cccaaagggt	300
gcagcaggcc	attaccttct	tggacttatt	tacaagtata	ctgatagaag	gaagaatgct	360
gctcaacaat	ttaaacagtc	cttgacaata	gacctctac	tttgggctgc	atatgaggaa	420
ttatgtatat	taggtgctgc	tgaggaagca	actgcagttt	ttggtgaaac	agctgctctc	480
tccattcaaa	agcagtatat	gcaacaactg	tcaacttccc	tccgcttaaa	catttacaac	540
gaggaacgta	attcaacttc	tactaaaaac	acgagttctg	aagattatag	tccaaggcag	600
tctaaacaca	cacaaagcca	tggccttaaa	gatattctcg	gaaatttcca	ttctcatgga	660
gttaatggag	gtgtttcgaa	catgtcattc	tataatacgc	cttcgccagt	ggctgcacag	720
ctatccggta	tagctccacc	accacttttc	cggaattttc	agccagctgt	tgcaaaccce	780
aactccctta	ttactgacag	ttctccaaag	tccactgtta	actctactct	tcaagcacct	840
agaagaaagt	ttgtagatga	aggaaagtta	cgtaagattt	ctggcagact	atthttctgat	900
tctgggccac	gacggagttc	aagactgtct	gctgattcag	gggcaaacat	taattcaagt	960
gttgcaacag	taagcggaaa	tgtgaacaac	gcttccaagt	atttgggagg	ttctaaattg	1020
agttcttttg	cacttcgttc	tgtaacactt	cggaaggggac	actcctgggc	aaatgaaaac	1080
atggatgaag	gggtccgtgg	ggaacctttt	gatgattcaa	ggcctaatac	tgccctaacg	1140
actggttcta	tggcttccaa	tgatcaagaa	gacgaaacaa	tgtcgattgg	tggcatagca	1200
atgagttctc	aaacaatcac	aattggtgtt	tccgaaattt	taaacctcct	taggacactc	1260
ggagaagggg	gtagactttc	atacatgtac	aggtgtcagg	aggcactgga	tacgtatatg	1320
aaacttccac	ataagcatta	taatacagga	tgggttcttt	cccaggctcg	gaaagcatac	1380
tttgaactaa	ttgactatth	agaggctgaa	aaggcattcc	gtcttgcccg	tctggcttct	1440
ccttattgct	tagaaggaat	ggatatatac	tctacggtcc	tctatcattt	gaaggaagac	1500
atgaagctga	gttacttggc	tcaggaaact	atatcaaccg	atcgcttagc	tcctcaatct	1560
tgggtgtgcta	tgggaaattg	ctatagcttg	caaaaggacc	atgagaccgt	actgaagaat	1620
ttctacgag	ctgttcaact	gaatccaaga	tttgcataat	cacatacctt	atgtggccac	1680
gaatacacaa	ctcttgagga	ttttgagaac	ggaatgaaaa	gttaccaaaa	cgcacttcgt	1740
gtagatacaa	gacactacaa	cgcattggtac	gggcttgga	tgatatactc	acgccaagag	1800
aagtttagagt	tctcagagca	tcacttcaga	atggcttttc	taataaaacc	gagttctctc	1860
gttataatgt	cttatttagg	gacatctttg	catgccttga	agagaagtga	ggaagcacta	1920
gagataatgg	agcaagccat	agtagcagat	agaaaaaacc	ctcttccaat	gtaccagaaa	1980
gctaacatac	ttgtctgctt	agaaagatta	gatgaagctc	tagaagttct	tgaggagctc	2040
aaagagtatg	cgccttcaga	gagcagcgtt	tacgctttaa	tgggcaggat	ctataagcgg	2100
cgaacatgc	acgataaagc	catgcttcat	ttcggcttag	ctttagatat	gaaaccgcct	2160
gcaactgacg	ttgctgcaat	aaaggctgca	atggagaaat	tgcatgttcc	agatgagatc	2220
gatgagagcc	cgtga					2235

<210> 24

<211> 743

5 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 24

Met Glu Ala Met Leu Val Asp Cys Val Asn Asn Ser Leu Arg His Phe

1 5 10 15

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

Val Ala Asn Pro Asn Ser Leu Ile Thr Asp Ser Ser Pro Lys Ser Thr
 260 265 270
 Val Asn Ser Thr Leu Gln Ala Pro Arg Arg Lys Phe Val Asp Glu Gly
 275 280 285
 Lys Leu Arg Lys Ile Ser Gly Arg Leu Phe Ser Asp Ser Gly Pro Arg
 290 295 300
 Arg Ser Ser Arg Leu Ser Ala Asp Ser Gly Ala Asn Ile Asn Ser Ser
 305 310 315 320
 Val Ala Thr Val Ser Gly Asn Val Asn Asn Ala Ser Lys Tyr Leu Gly
 325 330 335
 Gly Ser Lys Leu Ser Ser Leu Ala Leu Arg Ser Val Thr Leu Arg Lys
 340 345 350
 Gly His Ser Trp Ala Asn Glu Asn Met Asp Glu Gly Val Arg Gly Glu
 355 360 365
 Pro Phe Asp Asp Ser Arg Pro Asn Thr Ala Ser Thr Thr Gly Ser Met
 370 375 380
 Ala Ser Asn Asp Gln Glu Asp Glu Thr Met Ser Ile Gly Gly Ile Ala
 385 390 395 400
 Met Ser Ser Gln Thr Ile Thr Ile Gly Val Ser Glu Ile Leu Asn Leu
 405 410 415
 Leu Arg Thr Leu Gly Glu Gly Cys Arg Leu Ser Tyr Met Tyr Arg Cys
 420 425 430
 Gln Glu Ala Leu Asp Thr Tyr Met Lys Leu Pro His Lys His Tyr Asn
 435 440 445
 Thr Gly Trp Val Leu Ser Gln Val Gly Lys Ala Tyr Phe Glu Leu Ile
 450 455 460
 Asp Tyr Leu Glu Ala Glu Lys Ala Phe Arg Leu Ala Arg Leu Ala Ser
 465 470 475 480
 Pro Tyr Cys Leu Glu Gly Met Asp Ile Tyr Ser Thr Val Leu Tyr His
 485 490 495
 Leu Lys Glu Asp Met Lys Leu Ser Tyr Leu Ala Gln Glu Leu Ile Ser
 500 505 510

Thr Asp Arg Leu Ala Pro Gln Ser Trp Cys Ala Met Gly Asn Cys Tyr
515 520 525

Ser Leu Gln Lys Asp His Glu Thr Ala Leu Lys Asn Phe Leu Arg Ala
530 535 540

Val Gln Leu Asn Pro Arg Phe Ala Tyr Ala His Thr Leu Cys Gly His
545 550 555 560

Glu Tyr Thr Thr Leu Glu Asp Phe Glu Asn Gly Met Lys Ser Tyr Gln
565 570 575

Asn Ala Leu Arg Val Asp Thr Arg His Tyr Asn Ala Trp Tyr Gly Leu
580 585 590

Gly Met Ile Tyr Leu Arg Gln Glu Lys Leu Glu Phe Ser Glu His His
595 600 605

Phe Arg Met Ala Phe Leu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Val Ile Met Ser
610 615 620

Tyr Leu Gly Thr Ser Leu His Ala Leu Lys Arg Ser Glu Glu Ala Leu
625 630 635 640

Glu Ile Met Glu Gln Ala Ile Val Ala Asp Arg Lys Asn Pro Leu Pro
645 650 655

Met Tyr Gln Lys Ala Asn Ile Leu Val Cys Leu Glu Arg Leu Asp Glu
660 665 670

Ala Leu Glu Val Leu Glu Glu Leu Lys Glu Tyr Ala Pro Ser Glu Ser
675 680 685

Ser Val Tyr Ala Leu Met Gly Arg Ile Tyr Lys Arg Arg Asn Met His
690 695 700

Asp Lys Ala Met Leu His Phe Gly Leu Ala Leu Asp Met Lys Pro Pro
705 710 715 720

Ala Thr Asp Val Ala Ala Ile Lys Ala Ala Met Glu Lys Leu His Val
725 730 735

Pro Asp Glu Ile Asp Glu Ser
740

<210> 25

<211> 770

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 25

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

Asn Phe His Ser His Gly Val Asn Gly Gly Val Ser Asn Met Ser Phe
 245 250 255
 Tyr Asn Thr Pro Ser Pro Val Ala Ala Gln Leu Ser Gly Ile Ala Pro
 260 265 270
 Pro Pro Leu Phe Arg Asn Phe Gln Pro Ala Val Ala Asn Pro Asn Ser
 275 280 285
 Leu Ile Thr Asp Ser Ser Pro Lys Ser Thr Val Asn Ser Thr Leu Gln
 290 295 300
 Ala Pro Arg Arg Lys Phe Val Asp Glu Gly Lys Leu Arg Lys Ile Ser
 305 310 315 320
 Gly Arg Leu Phe Ser Asp Ser Gly Pro Arg Arg Ser Ser Arg Leu Ser
 325 330 335
 Ala Asp Ser Gly Ala Asn Ile Asn Ser Ser Val Ala Thr Val Ser Gly
 340 345 350
 Asn Val Asn Asn Ala Ser Lys Tyr Leu Gly Gly Ser Lys Leu Ser Ser
 355 360 365
 Leu Ala Leu Arg Ser Val Thr Leu Arg Lys Gly His Ser Trp Ala Asn
 370 375 380
 Glu Asn Met Asp Glu Gly Val Arg Gly Glu Pro Phe Asp Asp Ser Arg
 385 390 395 400
 Pro Asn Thr Ala Ser Thr Thr Gly Ser Met Ala Ser Asn Asp Gln Glu
 405 410 415
 Asp Glu Thr Met Ser Ile Gly Gly Ile Ala Met Ser Ser Gln Thr Ile
 420 425 430
 Thr Ile Gly Val Ser Glu Ile Leu Asn Leu Leu Arg Thr Leu Gly Glu
 435 440 445
 Gly Cys Arg Leu Ser Tyr Met Tyr Arg Cys Gln Glu Ala Leu Asp Thr
 450 455 460
 Tyr Met Lys Leu Pro His Lys His Tyr Asn Thr Gly Trp Val Leu Ser
 465 470 475 480
 Gln Val Gly Lys Ala Tyr Phe Glu Leu Ile Asp Tyr Leu Glu Ala Glu

485										490										495											
Lys	Ala	Phe	Arg	Leu	Ala	Arg	Leu	Ala	Ser	Pro	Tyr	Cys	Leu	Glu	Gly																
			500					505							510																
Met	Asp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Val	Leu	Tyr	His	Leu	Lys	Glu	Asp	Met	Lys																
		515					520								525																
Leu	Ser	Tyr	Leu	Ala	Gln	Glu	Leu	Ile	Ser	Thr	Asp	Arg	Leu	Ala	Pro																
		530				535									540																
Gln	Ser	Trp	Cys	Ala	Met	Gly	Asn	Cys	Tyr	Ser	Leu	Gln	Lys	Asp	His																
					550										560																
Glu	Thr	Ala	Leu	Lys	Asn	Phe	Leu	Arg	Ala	Val	Gln	Leu	Asn	Pro	Arg																
				565					570						575																
Phe	Ala	Tyr	Ala	His	Thr	Leu	Cys	Gly	His	Glu	Tyr	Thr	Thr	Leu	Glu																
			580					585							590																
Asp	Phe	Glu	Asn	Gly	Met	Lys	Ser	Tyr	Gln	Asn	Ala	Leu	Arg	Val	Asp																
		595					600								605																
Thr	Arg	His	Tyr	Asn	Ala	Trp	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Ile	Tyr	Leu	Arg																
		610				615									620																
Gln	Glu	Lys	Leu	Glu	Phe	Ser	Glu	His	His	Phe	Arg	Met	Ala	Phe	Leu																
		625			630										640																
Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Met	Ser	Tyr	Leu	Gly	Thr	Ser	Leu																
				645					650						655																
His	Ala	Leu	Lys	Arg	Ser	Glu	Glu	Ala	Leu	Glu	Ile	Met	Glu	Gln	Ala																
			660					665							670																
Ile	Val	Ala	Asp	Arg	Lys	Asn	Pro	Leu	Pro	Met	Tyr	Gln	Lys	Ala	Asn																
		675					680								685																
Ile	Leu	Val	Cys	Leu	Glu	Arg	Leu	Asp	Glu	Ala	Leu	Glu	Val	Leu	Glu																
		690				695									700																
Glu	Leu	Lys	Glu	Tyr	Ala	Pro	Ser	Glu	Ser	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu	Met																
		705			710										720																
Gly	Arg	Ile	Tyr	Lys	Arg	Arg	Asn	Met	His	Asp	Lys	Ala	Met	Leu	His																
				725					730						735																
Phe	Gly	Leu	Ala	Leu	Asp	Met	Lys	Pro	Pro	Ala	Thr	Asp	Val	Ala	Ala																
			740					745							750																
Ile	Lys	Ala	Ala	Met	Glu	Lys	Leu	His	Val	Pro	Asp	Glu	Ile	Asp	Glu																
		755					760								765																
Ser	Pro																														
		770																													

<210> 26

<211> 744

5 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 26

```

Met Glu Ala Met Leu Val Asp Cys Val Asn Asn Ser Leu Arg His Phe
 1          5          10          15

Val Tyr Lys Asn Ala Ile Phe Met Cys Glu Arg Leu Cys Ala Glu Phe
 20          25          30

Pro Ser Glu Val Asn Leu Gln Leu Leu Ala Thr Ser Tyr Leu Gln Asn
 35          40          45

Asn Gln Ala Tyr Ser Ala Tyr His Leu Leu Lys Gly Thr Gln Met Ala
 50          55          60

Gln Ser Arg Tyr Leu Phe Ala Leu Ser Cys Phe Gln Met Asp Leu Leu
 65          70          75          80

Asn Glu Ala Glu Ser Ala Leu Cys Pro Val Asn Glu Pro Gly Ala Glu
 85          90          95

Ile Pro Asn Gly Ala Ala Gly His Tyr Leu Leu Gly Leu Ile Tyr Lys
100          105          110

Tyr Thr Asp Arg Arg Lys Asn Ala Ala Gln Gln Phe Lys Gln Ser Leu
115          120          125

Thr Ile Asp Pro Leu Leu Trp Ala Ala Tyr Glu Glu Leu Cys Ile Leu
130          135          140

Gly Ala Ala Glu Glu Ala Thr Ala Val Phe Gly Glu Thr Ala Ala Leu
145          150          155          160

Ser Ile Gln Lys Gln Tyr Met Gln Gln Leu Ser Thr Ser Leu Gly Leu
165          170          175

```

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

Gln Glu Ala Leu Asp Thr Tyr Met Lys Leu Pro His Lys His Tyr Asn
 435 440 445
 Thr Gly Trp Val Leu Ser Gln Val Gly Lys Ala Tyr Phe Glu Leu Ile
 450 455 460
 Asp Tyr Leu Glu Ala Glu Lys Ala Phe Arg Leu Ala Arg Leu Ala Ser
 465 470 475 480
 Pro Tyr Cys Leu Glu Gly Met Asp Ile Tyr Ser Thr Val Leu Tyr His
 485 490 495
 Leu Lys Glu Asp Met Lys Leu Ser Tyr Leu Ala Gln Glu Leu Ile Ser
 500 505 510
 Thr Asp Arg Leu Ala Pro Gln Ser Trp Cys Ala Met Gly Asn Cys Tyr
 515 520 525
 Ser Leu Gln Lys Asp His Glu Thr Ala Leu Lys Asn Phe Leu Arg Ala
 530 535 540
 Val Gln Leu Asn Pro Arg Phe Ala Tyr Ala His Thr Leu Cys Gly His
 545 550 555 560
 Glu Tyr Thr Thr Leu Glu Asp Phe Glu Asn Gly Met Lys Ser Tyr Gln
 565 570 575
 Asn Ala Leu Arg Val Asp Thr Arg His Tyr Asn Ala Trp Tyr Gly Leu
 580 585 590
 Gly Met Ile Tyr Leu Arg Gln Glu Lys Leu Glu Phe Ser Glu His His
 595 600 605
 Phe Arg Met Ala Phe Leu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Val Ile Met Ser
 610 615 620
 Tyr Leu Gly Thr Ser Leu His Ala Leu Lys Arg Ser Glu Glu Ala Leu
 625 630 635 640
 Glu Ile Met Glu Gln Ala Ile Val Ala Asp Arg Lys Asn Pro Leu Pro
 645 650 655
 Met Tyr Gln Lys Ala Asn Ile Leu Val Cys Leu Glu Arg Leu Asp Glu
 660 665 670
 Ala Leu Glu Val Leu Glu Glu Leu Lys Glu Tyr Ala Pro Ser Glu Ser
 675 680 685
 Ser Val Tyr Ala Leu Met Gly Arg Ile Tyr Lys Arg Arg Asn Met His
 690 695 700
 Asp Lys Ala Met Leu His Phe Gly Leu Ala Leu Asp Met Lys Pro Pro
 705 710 715 720
 Ala Thr Asp Val Ala Ala Ile Lys Ala Ala Met Glu Lys Leu His Val
 725 730 735
 Pro Asp Glu Ile Asp Glu Ser Pro
 740

<210> 27

<211> 722

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 27

```

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

```

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

405 410 415
 Leu Arg Thr Leu Gly Glu Gly Cys Arg Leu Ser Tyr Met Tyr Arg Cys
 420 425 430
 Gln Val Gly Lys Ala Tyr Phe Glu Leu Ile Asp Tyr Leu Glu Ala Glu
 435 440 445
 Lys Ala Phe Arg Leu Ala Arg Leu Ala Ser Pro Tyr Cys Leu Glu Gly
 450 455 460
 Met Asp Ile Tyr Ser Thr Val Leu Tyr His Leu Lys Glu Asp Met Lys
 465 470 475 480
 Leu Ser Tyr Leu Ala Gln Glu Leu Ile Ser Thr Asp Arg Leu Ala Pro
 485 490 495
 Gln Ser Trp Cys Ala Met Gly Asn Cys Tyr Ser Leu Gln Lys Asp His
 500 505 510
 Glu Thr Ala Leu Lys Asn Phe Leu Arg Ala Val Gln Leu Asn Pro Arg
 515 520 525
 Phe Ala Tyr Ala His Thr Leu Cys Gly His Glu Tyr Thr Thr Leu Glu
 530 535 540
 Asp Phe Glu Asn Gly Met Lys Ser Tyr Gln Asn Ala Leu Arg Val Asp
 545 550 555 560
 Thr Arg His Tyr Asn Ala Trp Tyr Gly Leu Gly Met Ile Tyr Leu Arg
 565 570 575
 Gln Glu Lys Leu Glu Phe Ser Glu His His Phe Arg Met Ala Phe Leu
 580 585 590
 Ile Asn Pro Ser Ser Ser Val Ile Met Ser Tyr Leu Gly Thr Ser Leu
 595 600 605
 His Ala Leu Lys Arg Ser Glu Glu Ala Leu Glu Ile Met Glu Gln Ala
 610 615 620
 Ile Val Ala Asp Arg Lys Asn Pro Leu Pro Met Tyr Gln Lys Ala Asn
 625 630 635 640
 Ile Leu Val Cys Leu Glu Arg Leu Asp Glu Ala Leu Glu Val Leu Glu
 645 650 655

 Glu Leu Lys Glu Tyr Ala Pro Ser Glu Ser Ser Val Tyr Ala Leu Met
 660 665 670
 Gly Arg Ile Tyr Lys Arg Arg Asn Met His Asp Lys Ala Met Leu His
 675 680 685
 Phe Gly Leu Ala Leu Asp Met Lys Pro Pro Ala Thr Asp Val Ala Ala
 690 695 700
 Ile Lys Ala Ala Met Glu Lys Leu His Val Pro Asp Glu Ile Asp Glu
 705 710 715 720

 Ser Pro

<210> 28

<211> 704

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 28

```

Met Glu Ala Met Leu Val Asp Cys Val Asn Asn Ser Leu Arg His Phe
 1          5          10          15

Val Tyr Lys Asn Ala Ile Phe Met Cys Glu Arg Leu Cys Ala Glu Phe
          20          25          30

Pro Ser Glu Val Asn Leu Gln Leu Leu Ala Thr Ser Tyr Leu Gln Asn
          35          40          45

Asn Gln Ala Tyr Ser Ala Tyr His Leu Leu Lys Gly Thr Gln Met Ala
          50          55          60

Gln Ser Arg Tyr Leu Phe Ala Leu Ser Cys Phe Gln Met Asp Leu Leu
          65          70          75          80

Asn Glu Ala Glu Ser Ala Leu Cys Pro Val Asn Glu Pro Gly Ala Glu
          85          90          95

Ile Pro Asn Gly Ala Ala Gly His Tyr Leu Leu Gly Leu Ile Tyr Lys
          100          105          110

Tyr Thr Asp Arg Arg Lys Asn Ala Ala Gln Gln Phe Lys Gln Ser Leu
          115          120          125

Thr Ile Asp Pro Leu Leu Trp Ala Ala Tyr Glu Glu Leu Cys Ile Leu
          130          135          140

```

Gly Ala Ala Glu Glu Ala Thr Ala Val Phe Gly Glu Thr Ala Ala Leu
145 150 155 160

Ser Ile Gln Lys Gln Tyr Met Gln Gln Leu Ser Thr Ser Leu Gly Leu
165 170 175

Asn Thr Tyr Asn Glu Glu Arg Asn Ser Thr Ser Thr Lys Asn Thr Ser
180 185 190

Ser Glu Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Ser Lys His Thr Gln Ser His Gly
195 200 205

Leu Lys Asp Ile Ser Gly Asn Phe His Ser His Gly Val Asn Gly Gly
210 215 220

Val Ser Asn Met Ser Phe Tyr Asn Thr Pro Ser Pro Val Ala Ala Gln
225 230 235 240

Leu Ser Gly Ile Ala Pro Pro Pro Leu Phe Arg Asn Phe Gln Pro Ala
245 250 255

Val Ala Asn Pro Asn Ser Leu Ile Thr Asp Ser Ser Pro Lys Ser Thr
260 265 270

Val Asn Ser Thr Leu Gln Ala Pro Arg Arg Lys Phe Val Asp Glu Gly
275 280 285

Lys Leu Arg Lys Ile Ser Gly Arg Leu Phe Ser Asp Ser Gly Pro Arg
290 295 300

Arg Ser Ser Arg Leu Ser Ala Asp Ser Gly Ala Asn Ile Asn Ser Ser
305 310 315 320

Val Ala Thr Val Ser Gly Asn Val Asn Asn Ala Ser Lys Tyr Leu Gly
325 330 335

Gly Ser Lys Leu Ser Ser Leu Ala Leu Arg Ser Val Thr Leu Arg Lys
340 345 350

Gly His Ser Trp Ala Asn Glu Asn Met Asp Glu Gly Val Arg Gly Glu
355 360 365

Pro Phe Asp Asp Ser Arg Pro Asn Thr Ala Ser Thr Thr Gly Ser Met
370 375 380

Ala Ser Asn Asp Gln Glu Asp Glu Thr Met Ser Ile Gly Gly Ile Ala
385 390 395 400

Met Ser Ser Gln Thr Ile Thr Ile Gly Val Ser Glu Ile Leu Asn Leu
405 410 415

Leu Arg Thr Leu Gly Glu Gly Cys Arg Leu Ser Tyr Met Tyr Arg Cys
420 425 430

Gln Glu Ala Leu Asp Thr Tyr Met Lys Leu Pro His Lys His Tyr Asn
435 440 445

Thr Gly Trp Val Leu Ser Gln His Leu Lys Glu Asp Met Lys Leu Ser
450 455 460

Tyr Leu Ala Gln Glu Leu Ile Ser Thr Asp Arg Leu Ala Pro Gln Ser
465 470 475 480

Trp Cys Ala Met Gly Asn Cys Tyr Ser Leu Gln Lys Asp His Glu Thr
485 490 495

Ala Leu Lys Asn Phe Leu Arg Ala Val Gln Leu Asn Pro Arg Phe Ala
500 505 510

Tyr Ala His Thr Leu Cys Gly His Glu Tyr Thr Thr Leu Glu Asp Phe
515 520 525

Glu Asn Gly Met Lys Ser Tyr Gln Asn Ala Leu Arg Val Asp Thr Arg
530 535 540

His Tyr Asn Ala Trp Tyr Gly Leu Gly Met Ile Tyr Leu Arg Gln Glu
545 550 555 560

Lys Leu Glu Phe Ser Glu His His Phe Arg Met Ala Phe Leu Ile Asn
565 570 575

Pro Ser Ser Ser Val Ile Met Ser Tyr Leu Gly Thr Ser Leu His Ala
580 585 590

Leu Lys Arg Ser Glu Glu Ala Leu Glu Ile Met Glu Gln Ala Ile Val
595 600 605

Ala Asp Arg Lys Asn Pro Leu Pro Met Tyr Gln Lys Ala Asn Ile Leu
610 615 620

Val Cys Leu Glu Arg Leu Asp Glu Ala Leu Glu Val Leu Glu Glu Leu
625 630 635 640

Lys Glu Tyr Ala Pro Ser Glu Ser Ser Val Tyr Ala Leu Met Gly Arg
645 650 655

Ile Tyr Lys Arg Arg Asn Met His Asp Lys Ala Met Leu His Phe Gly
660 665 670

Leu Ala Leu Asp Met Lys Pro Pro Ala Thr Asp Val Ala Ala Ile Lys
675 680 685

Ala Ala Met Glu Lys Leu His Val Pro Asp Glu Ile Asp Glu Ser Pro
690 695 700

<210> 29

<211> 518

5 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 29

```

Met Glu Ala Met Leu Val Asp Cys Val Asn Asn Ser Leu Arg His Phe
 1          5          10          15

Val Tyr Lys Asn Ala Ile Phe Met Cys Glu Arg Leu Cys Ala Glu Phe
 20          25          30

Pro Ser Glu Val Asn Leu Gln Leu Leu Ala Thr Ser Tyr Leu Gln Asn
 35          40          45

Asn Gln Ala Tyr Ser Ala Tyr His Leu Leu Lys Gly Thr Gln Met Ala
 50          55          60

Gln Ser Arg Tyr Leu Phe Ala Leu Ser Cys Phe Gln Met Asp Leu Leu
 65          70          75          80

Asn Glu Ala Glu Ser Ala Leu Cys Pro Val Asn Glu Pro Gly Ala Glu
 85          90          95

Ile Pro Asn Gly Ala Ala Gly His Tyr Leu Leu Gly Leu Ile Tyr Lys
100          105          110

Tyr Thr Asp Arg Arg Lys Asn Ala Ala Gln Gln Phe Lys Gln Ser Leu
115          120          125

Thr Ile Asp Pro Leu Leu Trp Ala Ala Tyr Glu Glu Leu Cys Ile Leu
130          135          140

Gly Ala Ala Glu Glu Ala Thr Ala Val Phe Gly Glu Thr Ala Ala Leu
145          150          155          160

Ser Ile Gln Lys Gln Tyr Met Gln Gln Leu Ser Thr Ser Leu Gly Leu
165          170          175

```

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

420 425 430
 Gln Glu Ala Leu Asp Thr Tyr Met Lys Leu Pro His Lys His Tyr Asn
 435 440 445
 Thr Gly Trp Val Leu Ser Gln Val Gly Lys Ala Tyr Phe Glu Leu Ile
 450 455 460
 Asp Tyr Leu Glu Ala Glu Lys Ala Phe Arg Leu Ala Arg Leu Ala Ser
 465 470 475 480
 Pro Tyr Cys Leu Glu Gly Met Asp Ile Tyr Ser Thr Val Leu Tyr His
 485 490 495
 Leu Lys Glu Asp Met Lys Leu Ser Tyr Leu Ala Gln Glu Leu Ile Ser
 500 505 510
 Thr Asp Arg Leu Ala Pro
 515

<210> 30

<211> 744

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 30

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

115	120	125
Thr Ile Asp Pro Leu Leu Trp Ala Ala Tyr Glu Glu Leu Cys Ile Leu 130 135 140		
Gly Ala Ala Glu Glu Ala Thr Ala Val Phe Gly Glu Thr Ala Ala Leu 145 150 155 160		
Ser Ile Gln Lys Gln Tyr Met Gln Gln Leu Ser Thr Ser Leu Gly Leu 165 170 175		
Asn Thr Tyr Asn Glu Glu Arg Asn Ser Thr Ser Thr Lys Asn Thr Ser 180 185 190		
Ser Glu Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Ser Lys His Thr Gln Ser His Gly 195 200 205		
Leu Lys Asp Ile Ser Gly Asn Phe His Ser His Gly Val Asn Gly Gly 210 215 220		
Val Ser Asn Met Ser Phe Tyr Asn Thr Pro Ser Pro Val Ala Ala Gln 225 230 235 240		
Leu Ser Gly Ile Ala Pro Pro Pro Leu Phe Arg Asn Phe Gln Pro Ala 245 250 255		
Val Ala Asn Pro Asn Ser Leu Ile Thr Asp Ser Ser Pro Lys Ser Thr 260 265 270		
Val Asn Ser Thr Leu Gln Ala Pro Arg Arg Lys Phe Val Asp Glu Gly 275 280 285		
Lys Leu Arg Lys Ile Ser Gly Arg Leu Phe Ser Asp Ser Gly Pro Arg 290 295 300		
Arg Ser Ser Arg Leu Ser Ala Asp Ser Gly Ala Asn Ile Asn Ser Ser 305 310 315 320		
Val Ala Thr Val Ser Gly Asn Val Asn Asn Ala Ser Lys Tyr Leu Gly 325 330 335		
Gly Ser Lys Leu Ser Ser Leu Ala Leu Arg Ser Val Thr Leu Arg Lys 340 345 350		
Gly His Ser Trp Ala Asn Glu Asn Met Asp Glu Gly Val Arg Gly Glu 355 360 365		

Pro Phe Asp Asp Ser Arg Pro Asn Thr Ala Ser Thr Thr Gly Ser Met
 370 375 380
 Ala Ser Asn Asp Gln Glu Asp Glu Thr Met Ser Ile Gly Gly Ile Ala
 385 390 395 400
 Met Ser Ser Gln Thr Ile Thr Ile Gly Val Ser Glu Ile Leu Asn Leu
 405 410 415
 Leu Arg Thr Leu Gly Glu Gly Cys Arg Leu Ser Tyr Met Tyr Arg Cys
 420 425 430
 Gln Glu Ala Leu Asp Thr Tyr Met Lys Leu Pro His Lys His Tyr Asn
 435 440 445
 Thr Gly Trp Val Leu Ser Gln Val Gly Lys Ala Tyr Phe Glu Leu Ile
 450 455 460
 Asp Tyr Leu Glu Ala Glu Lys Ala Phe Arg Leu Ala Arg Leu Ala Ser
 465 470 475 480
 Pro Tyr Cys Leu Glu Gly Met Asp Ile Tyr Ser Thr Val Leu Tyr His
 485 490 495
 Leu Lys Glu Asp Met Lys Leu Ser Tyr Leu Ala Gln Glu Leu Ile Ser
 500 505 510
 Thr Asp Arg Leu Ala Pro Gln Ser Trp Cys Ala Met Gly Asn Cys Tyr
 515 520 525
 Ser Leu Gln Lys Asp His Glu Thr Val Leu Lys Asn Phe Leu Arg Ala
 530 535 540
 Val Gln Leu Asn Pro Arg Phe Ala Tyr Ala His Thr Leu Cys Gly His
 545 550 555 560
 Glu Tyr Thr Thr Leu Glu Asp Phe Glu Asn Gly Met Lys Ser Tyr Gln
 565 570 575
 Asn Ala Leu Arg Val Asp Thr Arg His Tyr Asn Ala Trp Tyr Gly Leu
 580 585 590
 Gly Met Ile Tyr Leu Arg Gln Glu Lys Leu Glu Phe Ser Glu His His
 595 600 605
 Phe Arg Met Ala Phe Leu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Val Ile Met Ser
 610 615 620

Tyr Leu Gly Thr Ser Leu His Ala Leu Lys Arg Ser Glu Glu Ala Leu
625 630 635 640

Glu Ile Met Glu Gln Ala Ile Val Ala Asp Arg Lys Asn Pro Leu Pro
645 650 655

Met Tyr Gln Lys Ala Asn Ile Leu Val Cys Leu Glu Arg Leu Asp Glu
660 665 670

Ala Leu Glu Val Leu Glu Glu Leu Lys Glu Tyr Ala Pro Ser Glu Ser
675 680 685

Ser Val Tyr Ala Leu Met Gly Arg Ile Tyr Lys Arg Arg Asn Met His
690 695 700

Asp Lys Ala Met Leu His Phe Gly Leu Ala Leu Asp Met Lys Pro Pro
705 710 715 720

Ala Thr Asp Val Ala Ala Ile Lys Ala Ala Met Glu Lys Leu His Val
725 730 735

Pro Asp Glu Ile Asp Glu Ser Pro
740

<210> 31

<211> 29

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<223> cebador

<400> 31

10 gaagaaaggc aacaactatg gaagctatg 29

<210> 32

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<221> misc_feature

<223> cebador

<400> 32

gaactgtcag taataaggga gtttggttt 30

20 <210> 33

<211> 25

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <223> cebador
 <400> 33
 atgcaacaac tgtcaacttc cctcg 25
 <210> 34
 <211> 31
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> cebador
 15 <400> 34
 tatccattcc ttctaagcaa taaggagaag c 31
 <210> 35
 <211> 29
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> cebador
 <400> 35
 25 aaattttaa cctccttagg acactcgga 29
 <210> 36
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>

	<221> misc_feature	
	<223> cebador	
	<400> 36	
	tcacgggctc tcatcgatct catct	25
5	<210> 37	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<223> cebador	
	<400> 37	
	gttcttgagg agctcaaaga gtatg	25
	<210> 38	
15	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<221> misc_feature	
20	<223> cebador	
	<400> 38	
	gctttaatgg gcaggatcta taag	24
	<210> 39	
	<211> 32	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> cebador	
30	<400> 39	

	tattcaaatg gtcaattata aagcccaata ag	32
	<210> 40	
	<211> 25	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> cebador	
	<400> 40	
10	acatgaaaat agcatttttg tagac	25
	<210> 41	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> cebador	
	<400> 41	
	agagtgacct acttactaca ttgtacaaa acc	33
20	<210> 42	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<223> cebador	
	<400> 42	
	cccattaaag cgtaaacgct gctctctgaa g	31
	<210> 43	
30	<211> 32	

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <223> cebador
 <400> 43
 tattcaaatg gtcaattata aagccaata ag 32
 <210> 44
 <211> 32
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> cebador
 15 <400> 44
 tgaatgaata cttctcaac tactattgaa gc 32
 <210> 45
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> cebador
 <400> 45
 25 tatgagtcaa ctgtagagg aatgtctctg 30
 <210> 46
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>

<221> misc_feature
 <223> cebador
 <400> 46
 gaagttgaca gttgttgc atactgc 27
 5 <210> 47
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <223> cebador
 <400> 47
 ttctacactt ttctgtctgc tcaacttca 30
 <210> 48
 15 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <223> cebador
 <400> 48
 caaagaactc aatttagaac ctcccaaata c 31
 <210> 49
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> cebador
 30 <400> 49

	cagatttctg gcagactatt ttctgattct	30
	<210> 50	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<221> mise_feature	
	<223> cebador	
	<400> 50	
10	aagtaactca gcttcattgc ttcttcaaa	30
	<210> 51	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> cebador	
	<400> 51	
	gatatttatt tgcagcattt gaaggaagac	30
20	<210> 52	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<223> cebador	
	<400> 52	
	gaatttcag atttaaaaac catcattgga	30
	<210> 53	
30	<211> 29	

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <223> cebador
 <400> 53
 agtctttaa acagagtcgt ccaatgatg 29
 <210> 54
 <211> 30
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> cebador
 15 <400> 54
 atattgcgat taggtagtgt tacggacaac 30
 <210> 55
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> cebador
 <400> 55
 25 gaagtcgaca caaactatgg aagct 25
 <210> 56
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>

<221> mise_feature
 <223> cebador
 <400> 56
 aatcatatccc aaggatcctg gag 23
 5 <210> 57
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <223> cebador
 <400> 57
 gcaacaactg tcaactccc tcggctt 27
 <210> 58
 15 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <223> cebador
 <400> 58
 agaaccagtc gttgaggcag tattaggcc 29
 <210> 59
 <211> 26
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> cebador
 30 <400> 59

	atgatggaga atctactggc gaattg	26
	<210> 60	
	<211> 25	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> cebador	
	<400> 60	
10	catcgaggaa agagaaggtg catag	25
	<210> 61	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> cebador	
	<400> 61	
	atcctagtga atcttccccg gatcg	25
20	<210> 62	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<223> cebador	
	<400> 62	
	agccagttga aattgatgct gcg	23
	<210> 63	
30	<211> 26	

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <223> cebador
 <400> 63
 gatgcagaga gatgctaccg gaaggc 26
 <210> 64
 <211> 26
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> cebador
 15 <400> 64
 gatgcagaga gatgctaccg gaaggc 26
 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> cebador
 <400> 65
 25 tcttcccggt ggagatacag 20
 <210> 66
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>

<221> misc_feature

<223> cebador

<400> 66

gcccattgga aaagagctga 20

5 REFERENCIAS

- Abel, S., Nguyen, M. D., and Theologis, A. (1995). The PS-IAA4/5-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *J.Mol.Biol.* 251, 533-549.
- Abel, S., Oeller, P. W., and Theologis, A. (1994). Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91, 326-330.
- 10 Ainley, W. M., Walker, J. C., Nagao, R. T., and Key, J. L. (1988). Sequence and characterization of two auxin-regulated genes from soybean. *J. Biol. Chem.* 263, 10658-10666.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (1994). "Molecular Biology of the Cell." Garland Publishing Inc..
- 15 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.
- 20 Aukerman, M. J., Lee, I., Weigel, D., and Amasino, R. M. (1999). The *Arabidopsis* flowering-time gene *LUMINIDEPENDENS* is expressed primarily in regions of cell proliferation and coding a nuclear protein that regulates *HOJAY* expression. *Plant J.* 18, 195-203.
- Banerjee, A., Pramanik, A., Bhattacharjya, S., and Balaram, P. (1996). Omega aminoacids in peptide design: incorporation into helices. *Biopolymers* 39, 769-777.
- 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.
- 25 Bartel, P. L. and Fields, S. (1997). "The Yeast Two-Hybrid System." Oxford University Press.
- Bechtold, N. and Pelletier, G. (1998). In plant *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol.Biol.* 82, 259-266.
- Benfey, P. N. (1999). Is the shoot a root with a view? *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 39-43.
- 30 Benfey, P. N., Ren, L., and Chua, N. H. (1990). Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J.* 9, 1677-1684.
- 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.
- 35 Berry, A. and Brenner, S. E. (1994). A prototype computer system for de novo protein design. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 1033-1036.
- Bowman, J.L., Smydh, D.R. and Meyerowitz, E.M. (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant cell* 1, 37-52
- Bowman, J. L. and Eshed, I. (2000). Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends Plant Sci.* 5, 110-115.

- Brandeis, M. and Hunt, T. (1996). The proteolysis of cyclin mitotics in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *EMBO J.* 15, 5280-5289.
- Carabelli M, Morelli G, Whitelam G and Ruberti I (1996). Twiluz-zone and canopy shade induction of the *Athb-2* homeosecuencia gene in green plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3530-3535.
- 5 Chang, C., Bowman, J.L., DeJohn, A.W., Lander, E.S. and Meyerowitz, E.M. (1988) Restriction length polymorphism linkage map of *Arabidopsis thaliana* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6856-6860.
- 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.
- 10 Clark, S. E., Running, M. P., and Meyerowitz, E. M. (1995). *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development* 121, 1567-1575.
- Conner, T. W., Goekjian, V. H., LaFayette, P. R., and Key, J. L. (1990). Structure and expression of two auxin-inducible genes from *Arabidopsis*. *Plant Mol.Biol.* 15, 623-632.
- 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.
- 15 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.
- del Pozo, J. C. and Estelle, M. (1999). Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *Trends Plant Sci.* 4, 107-112.
- 20 Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M. G., Feldmann, K. A., and Benfey, P. N. (1996). The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86, 423-433.
- Dodds, J. H. (1985). "Plant genetic engineering." Cambridge University Press.
- Doerner, P. (1999). Shoot meristems: Intercellular signals keep the balance. *Curr. Biol.* 9, R377-R380.
- 25 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.
- 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.
- 30 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.
- Ficcadenti, N., Sestili, S., Pandolfini, T., Cirillo, D., Rotino, G. L., and Spena, A. (1999). Genetic engineering of parthenocarpic fruits development in tomato. *Mol. Breeding* 5, 463-470.
- 35 Fromm, M., Taylor, L. P., and Walbot, V. (1985). Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 82, 5824-5828.
- Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F, and Goodman, H.F. (1992) Isolation of the *Arabidopsis* *ABI3* gene by positional cloning. *Plant cell* 4: 1251-1261.
- 40 Gray, W. M. and Estelle, I. (2000). Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *Trends Biochem. Sci.* 25, 133-138.
- Guilfoyle, T.J., Ulmasov, T., and Hagen, G. (1998). The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone - responsive transcription. *Cell Mol. Life Sci.* 54, 619-627.

- Hamann, T., Mayer, U., and Jurgens, G. (1999a). The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the Arabidopsis embryos. *Development* 126, 1387-1395.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol.Biol* 166, 557-580.
- 5 Hansen, G. and Chilton, M. D. (1996). "Agrolistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated in plant. *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.
- 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 Sequences T- DNA. *Plant J.* 19, 727-734.
- 10 Hardtke, C.S. and Berleth, T. (1998). The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J.* 17, 1405-1411.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). "Antibodies: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C., and Hodge, S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 2122-2127.
- 15 Hauge, B., Hanley, S., Cartinhours, S et al. (1993) An integrated genetic/RFLP map of the Arabidopsis thaliana genome. *The Plant Journal*, 395, 745-754.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M. T., and Benfey, P. N. (2000). The SHORT-RAÍZ gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell* 101, 555-567.
- 20 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.
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M., and Schell, J. (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303, 209-213.
- 25 Hirano, T., Hiraoka, Y., Yanagida, M. (1988). A temperature-sensitive mutation of the Schizosaccharomyces pombe gene nuc2+ that encodes a nuclear scaffold-like protein blocks spindle elongation in mitotic anaphase. *J. Cell Biol.* Apr; 106(4): 1171-83.
- Hirano, T., Kinoshita, N., Morikawa, K., Yanagida, M. (1990) Snap helix with knob and hole: essential repeats in S. pombe nuclear protein nuc2+. *Cell.* Jan 26; 60(2): 319-28.
- 30 Hobbie, L., McGovern, M., Hurwitz, L.R., Pierro, A., Lieu, N.Y., Bandyopadhyay, A., and Estelle, M. (2000). The axr6 mutants of Arabidopsis thaliana defines a gene involved in auxin response and early development. *Development* 127, 23-32.
- 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.
- 35 Joung, J. K., Ramm, E. I., and Pabo, C. O. (2000). A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 7382-7387.
- Kim, J., Harter, K., and Theologis, A. (1997). Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94,11786-11791.
- 40 King, R. W., Peters, J. M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., and Kirschner, M. W. (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 81, 279-288.
- Klein, R. M., Wolf, E. D., Wu, R., and Sanford, J. C. (1992). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987 [classical article]. *Biotechnology* 24, 384-386.

- Koornneef, M. and Stam, P. (1992). Genetic Analysis. In "Methods in Arabidopsis Research" (C. C. N. H. Koncz and J. Schell, Eds.), pp. 85-99. World Scientific, Singapore.
- 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.
- 5 Lamb, J. R., Michaud, W. A., Sikorski, R. S., and Hieter, P. A. (1994). Cdc16p, Cdc23p and Cdc27p form a complex essential for mitosis. *EMBO J.* 13, 4321-4328.
- Langdale, J. A. (1998). Cellular differentiation in the leaf. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 734-738.
- Lenhard, M. and Laux, T. (1999). Shoot meristem formation and maintenance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 44-50.
- 10 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.
- 15 Leyser, H.M., Pickett, F.B., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (1996). Mutations in the AXR3 gene of Arabidopsis result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter. *Plant J.* 10, 403-143.
- Liddle, J. E. and Cryer, A. (1991). "A Practical Guide to Monoclonal Antibodies." Wiley New York.
- 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.
- 20 Long J.A. and Barton, M.K. (1998). The development of apical embrionesnic pattern in Arabidopsis. *Development* 125, 3027-3035.
- Malamy, J. E. and Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development* 124, 33-44.
- Martinez-Garcia, J.F., Monte, E. and Quail, P.H. 1999. A simple, rapid and quantitative method for preparing Arabidopsis protein extracts for immunoblot analysis. *Plant J.* 20 : 251-257.
- 25 Masucci, J.D., Rerie, W.G., Foreman, D.R., Zhang M., Galway, M.E., Marks, M.D., and Schiefelbein, J.W. (1996). The homeobox gene GLABRA2 is required for position-dependent cell differentiation in the raiz epidermis of Arabidopsis thaliana. *Development* 122, 1253-1260.
- Maundrell K. (1990). nmt1 of fission yeast. *J. Biol. Chem.* 265: 10857-10864.
- 30 Mayer, U., Torres Ruiz, R., Berleth, T., Misera, S., and Jürgens, G. (1991). Mutations affecting body organization in the Arabidopsis embriones. *Nature* 353, 402-407.
- McSteen, P. and Hake, S. (1998). Genetic control of plant development. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 189-195.
- Merrifield, R. B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J.Amer.Chem.Soc.* 85, 2149-2154.
- 35 Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M., and Inze, D. (1999). Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- the nexus. *Plant Cell* 11, 509-522.
- 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.
- Morelli, G. and Ruberti, I. (2000). Shade avoidance responses. Driving auxin along lateral routes. *Plant Physiol* 122, 621-626.
- 40 Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991). Molecular Genetic Analysis of fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Methods in Enzimol.* 194, 795-823.

- 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.
- Nam, H-G., Giraudat, J., den Boer, B., Moonan, F., Loos, W.D.B., Hauge, B.M. and Goodman, H (1989) Restriction fragment length polymorphism linkage map of *Arabidopsis thaliana* Plant Cell, 1, 699-705.
- 5 Nemhauser, J. L., Zambryski, P. C., and Roe, J. L. (1998). Auxin signaling in *Arabidopsis* flower development? *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 531-535.
- Okasaki, K., Okasaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K. And Okayama, H. (1990). Highfrequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNA by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucl. Acids Res.* 18, 6485-6489.
- 10 Olszewski, K. A., Kolinski, A., and Skolnick, J. (1996). Folding simulations and computer redesign of protein A three-helix bundle motifs. *Proteins* 25, 286-299.
- Onouchi, H., Nishihama, R., Kudo, M., Machida, Y., and Machida, C. (1995). Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 247, 653-660.
- 15 Onouchi, H., Yokoi, K., Machida, C., Matsuzaki, H., Oshima, Y., Matsuoka, K., Nakamura, K., and Machida, Y. (1991). Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucleic Acids Res.* 19, 6373-6378.
- 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.
- 20 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.
- 25 Palme, K. and Galweiler, L. (1999). PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 375-381.
- Paszkowski, 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.
- 30 Peleman, J., Boerjan, W., Engler, G., Seurinck, J., Botterman, J., Alliotte, T., Van Montagu, M., and Inze, D. (1989). Strong cellular preference in the expression of a housekeeping gene of *Arabidopsis thaliana* encoding S-adenosylmethionine synthetase. *Plant Cell* 1, 81-93.
- 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.
- Peters, J. M., King, R. W., Hoog, C., and Kirschner, M. W. (1996). Identification of BIME as a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science* 274, 1199-1201.
- 35 Pnueli, L., Carmel-Goren, L., Hareven, D., Gutfinger, T., Alvarez, J., Ganai, M., Zamir, D., and Lifschitz, E. (1998). The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development* 125, 1979-1989.
- Ouellet, F., Overvoorde, P.J. and Theologis, A. 2001. IAA17/AXR3: biochemical insight into an auxin mutant phenotype. *Plant Cell* 13 : 829-841.
- 40 Reed, S. I. (1996). G1/S regulatory mechanisms from yeast to man. *Prog. Cell Cycle Res.* 2, 15-27.
- Reiter, R.S., Williams, J.G., Feldman, K.A., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. and Scolnik, P.A. (1992) Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNA's. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1477-1481

- 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.
- 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.
- 5 Rotino, G. L., Perri, E., Zottini, M., Sommer, H., and Spena, A. (1997). Genetic engineering of parthenocarpic plants [véase comentarios]. *Nat. Biotechnol.* 15, 1398-1401.
- Rouse, D., Mackay, P., Stirnberg, P., Estelle, M., and Leyser, O. (1998). Changes in auxin response from mutations in an AUX/IAA gene. *Science* 279, 1371-1373.
- 10 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.
- Sabatini, S., Beis, D., Wokenfelt, H., Murfett J., Guilfoyle, T., Malamy J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* 99, 463-472.
- 15 Sambrook, J., and Russel (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 20 Scheres, B. and Berleth, T. (1998). Root development: new meanings for raíz canals? *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 32-36.
- Scheres, B., Di Laurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M.-T., Janmaat, K., Weisbeek, P., and Benfey, P. N. (1995). Mutations affecting the radial organisation of the Arabidopsis root display specific defects throughout the embrionesnic axis. *Development* 121, 53-62.
- 25 Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C., and Weisbeek, P. (1994). Embrionesnic origin of the Arabidopsis primary root and root meristems initials. *Development* 120, 2475-2487.
- Schlappi, M., Smith, D., and Fedoroff, N. (1993). TnpA trans-activates metilated maize Suppressor-mutator transposable elements in transgenic tobacco. *Genetics* 133, 1009-1021.
- 30 Semler, B. L., Anderson, C. W., Hanecak, R., Dorner, L. F., and Wimmer, E. (1982). A membrane-associated precursor to poliovirus VPg identified by immunoprecipitation with antibodies directed against a synthetic heptapeptide. *Cell* 28, 405-412.
- Sessions, A., Nemhauser, J. L., McColl, A., Roe, J. L., Feldmann, K. A., and Zambryski, P. C. (1997). ETTIN patterns the Arabidopsis floral meristem and reproductive organs. *Development* 124, 4481-4491.
- 35 Shioda, T., Andriole, S., Yahata, T., and Isselbacher, K. J. (2000). A green fluorescent protein-reporter mammalian two-hybrid system with extrachromosomal maintenance of a prey expression plasmid: Application to interaction screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 5220-5224.
- Small, I. D. and Peeters, N. (2000). The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem. Sci.* 25, 46-47.
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C. L., Paris, S., Galweiler, L., Palme, K., and Jurgens, G. (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 286, 316-318.
- 40 Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Herskho, J., Luca, F. C., Ruderman, J. V., and Herskho, A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cycline-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclines for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell* 6, 185-197.

- Sugita, K., Kasahara, T., Matsunaga, E., and Ebinuma, H. (2000). Technical advance: A transformation vector for the production of marker- free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency [In Process Citation]. *Plant J.* 22, 461-469.
- 5 Talon, M., Koornneef, M. And Zeevaart, J.A. (199) Endogenous gibberilins in *Arabidopsis thaliana* and possible steps blocked in the biosynthetic pathway of the semidwarf *ga4* and *ga5* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7983-7987.
- 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.
- 10 Theologis, A., Huynh, T. V., and Davis, R. W. (1985). Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. *J. Mol. Biol.* 183, 53-68.
- Trieu, A. T., Burleigh, S. H., Kardailsky, I. V., Maldonado-Mendoza, I. E., Versaw, W. K., Blaylock, L. A., Shin, H., Chiou, T. J., Katagi, H., Dewbre, G. R., Weigel, D., and Harrison, M. J. (2000). Technical Advance: Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J.* 22, 531-541.
- 15 Tyers, M. and Jorgensen, P. (2000). Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 54-64.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9, 1963-1971.
- Ulmasov, T., Hagen G., and Guilfoyle, T.J. (1997b). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276, 1865-1868.
- 20 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.
- 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.
- Walker, L. and Estelle, M. (1998). Molecular mechanisms of auxin action. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 434-439.
- 25 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.
- Wang, M. and Sternberg, P.W. (1999). Competence and commitment of *Caenorhabditis elegans* vulval precursor cells. *Dev. Biol.* 212, 12-24.
- 30 Wilkinson, D.G. and Nieto, M.A. (1993). Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tejido sections and whole mounts. *Methods Enzymol.* 225, 361-373.
- Willemsen, V., Wolkenfelt, H., de Vrieze, G., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1998). The HOBBIT gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 125, 521-531.
- Wodak, S. J. (1987). Computer-aided design in protein engineering. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 501, 1-13.
- 35 Worley, C. K., Zenser, N., Ramos, J., Rouse, D., Leyser, O., Theologis, A., and Callis, J. (2000). Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin signalling. *Plant J.* 21, 553-562.
- 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.
- 40 Yamamoto, K. T., Mori, H., and Imaseki, H. (1992). Novel mRNA sequences induced by indole-3-acetic acid in sections of elongating hypocotyls of mung bean (*Vigna radiata*). *Plant Cell. Physiol.* 33, 13-20.
- 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 aumentar la producción de semilla en una planta o para formar más raíces laterales en una planta, comparado con una planta tipo natural, que comprende la expresión ectópica de la proteína cdc27B de planta en células, dominios, tejidos u órganos de una planta, en donde dicha proteína cdc27B de planta se selecciona del grupo que consiste de:
5 (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se da en cualquiera de la SEQ ID NO: 8 o 9,
(b) un polipéptido con una secuencia como se da en cualquiera de la SEQ ID NO: 8 o 9, y
(c) un polipéptido con una secuencia que es por lo menos 90 % o 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos como se da en cualquiera de la SEQ ID NO: 8 o 9.
- 10 2. Una proteína que regula el desarrollo de la planta aislada que comprende uno de los polipéptidos seleccionados del grupo que consiste de:
(a) un polipéptido con una secuencia como se da en cualquiera de la SEQ ID NO: 8 o 9, y
(b) un polipéptido con una secuencia que es por lo menos 90 %, o 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos como se da en cualquiera de la SEQ ID NO: 8 o 9.
- 15 3. Un mutante funcionalmente inactivo de la proteína como se define en la reivindicación 2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 24 a 30 o se codifica por cualquiera de los ácidos nucleicos como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 10 a 23.
4. Un ácido nucleico aislado que codifica una proteína que regula el desarrollo de la planta o un mutante funcionalmente inactivo del mismo como se define en las reivindicaciones 2 o 3 seleccionados del grupo que
20 consiste de:
(a) un ácido nucleico que consiste de la secuencia de ADN como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 2 a 3 o 10 a 23, o el complemento del mismo,
(b) un ácido nucleico que consiste de las secuencias de ARN que corresponden a cualquiera de las SEQ ID NOs 2 a 3 o 17 a 23, o el complemento del mismo,
- 25 (c) un ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 8, 9, o 24 a 30,
(d) un ácido nucleico que se degenera como resultado del código genético con relación a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína como se da en cualquiera de la SEQ ID NOs 8, 9 o 24 a 30 o con relación a una secuencia de ácidos nucleicos como se define en (a) a (c),
- 30 (e) un ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90 % o 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos como se da en la SEQ ID NO: 8, 9 o 24 a 30, y
(f) un ácido nucleico que diverge debido a las diferencias en el uso de codón entre los organismos con relación a las secuencias de nucleótidos que codifican una proteína como se da en cualquiera de la SEQ ID NO: 8 o 9 o con relación a una secuencia de ácidos nucleicos como se define en (a) a (e).
- 35 5. Un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Un vector de acuerdo con la reivindicación 5 que es un vector de expresión en donde dicha secuencia de ácidos nucleicos se vincula funcionalmente a una o más secuencias de control que permiten la expresión en células anfitrionas procarióticas y/o eucarióticas.
7. Una célula anfitriona que contiene una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, o que
40 contiene un vector de acuerdo con la reivindicación 5 o 6.
8. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha célula anfitriona es una célula bacteriana, de insecto, fúngica, de planta o animal.

9. Un método para producir un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3 que comprende cultivar una célula anfitriona de la reivindicación 7 u 8 bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido y recuperar dicho polipéptido producido del cultivo.
- 5 10. Un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína que regula el desarrollo de la planta o un mutante funcionalmente inactivo del mismo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3 o que reconoce inmunológicamente partes activas o epítomos específicos del mismo.
- 10 11. Un método para efectuar la expresión de una proteína que regula el desarrollo de la planta como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3 que comprende la introducción de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3 directamente dentro de una célula, un tejido o un órgano de una planta.
12. Un método para la producción de plantas transgénicas, células de planta o tejidos de planta que comprende la introducción de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 en un formato que se puede expresar o un vector de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 en dicha planta, célula de planta o tejido de planta.
- 15 13. Un método para efectuar la expresión de una proteína que regula el desarrollo de la planta como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3 que comprende la introducción de un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 vinculado funcionalmente a una o más secuencias de control o un vector de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, y en donde dicho ácido nucleico se integra establemente dentro del genoma de una célula de planta.
- 20 14. El método de la reivindicación 13 que comprende adicionalmente regenerar una planta de dicha célula de planta.
15. Una célula de planta transgénica que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 4, que se vincula funcionalmente a elementos reguladores que permiten la transcripción y la expresión de dicho ácido nucleico en células de planta y en donde dicho ácido nucleico se integra establemente dentro del genoma de dicha célula de planta.
- 25 16. Una planta transgénica o tejido de planta que comprende una célula de planta transgénica de la reivindicación 15.
17. Una parte que se puede cosechar o un propágulo de una planta de la reivindicación 16 en donde en dicha parte que se puede cosechar de dicho propágulo comprende una célula de planta transgénica de la reivindicación 15.
- 30 18. La parte que se puede cosechar de la reivindicación 17 que se selecciona del grupo que consiste de semillas, hojas, frutos, cultivos de tallo, rizomas, tubérculos y bulbos.
19. La progenie derivada de una planta o partes de planta o propágulos de la reivindicación 16 o 17, que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4.

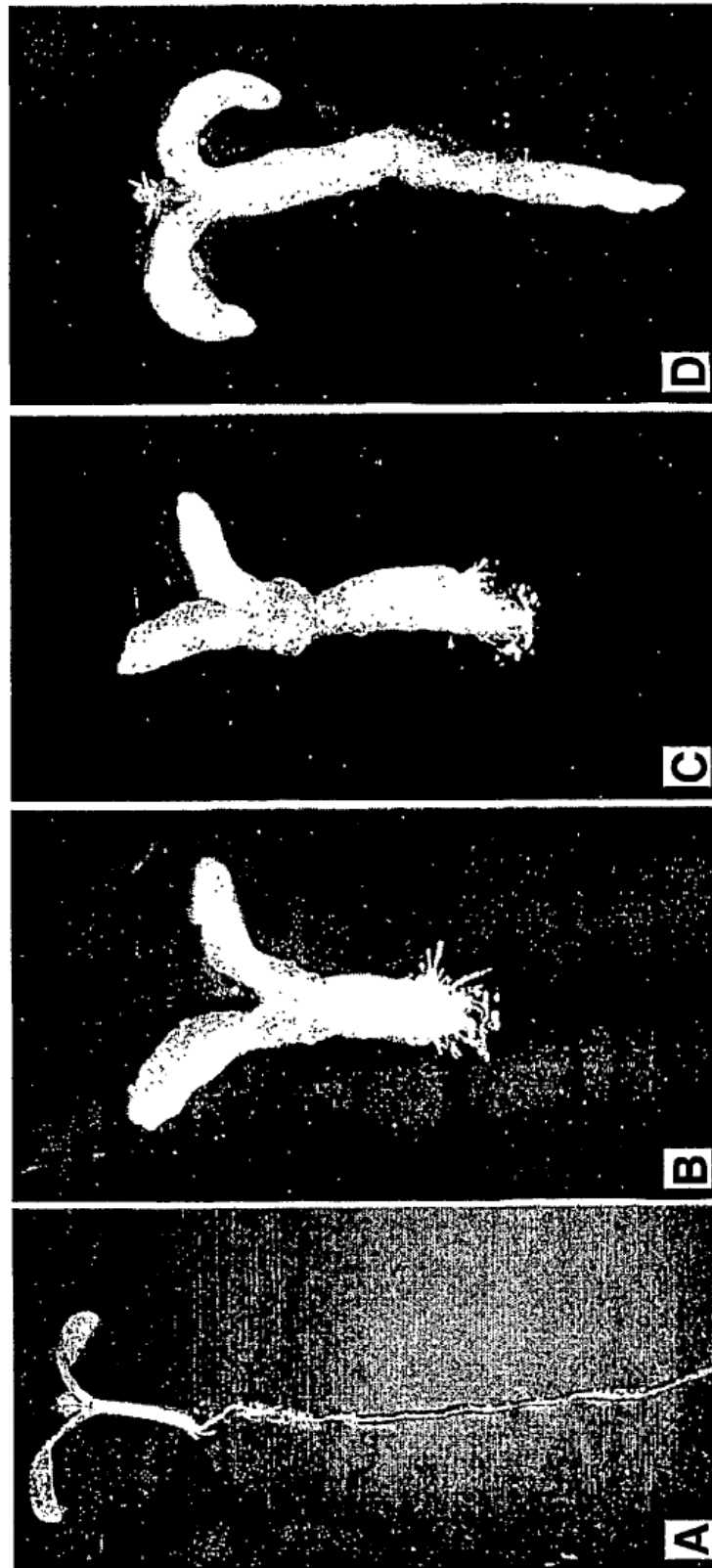


FIGURA 1

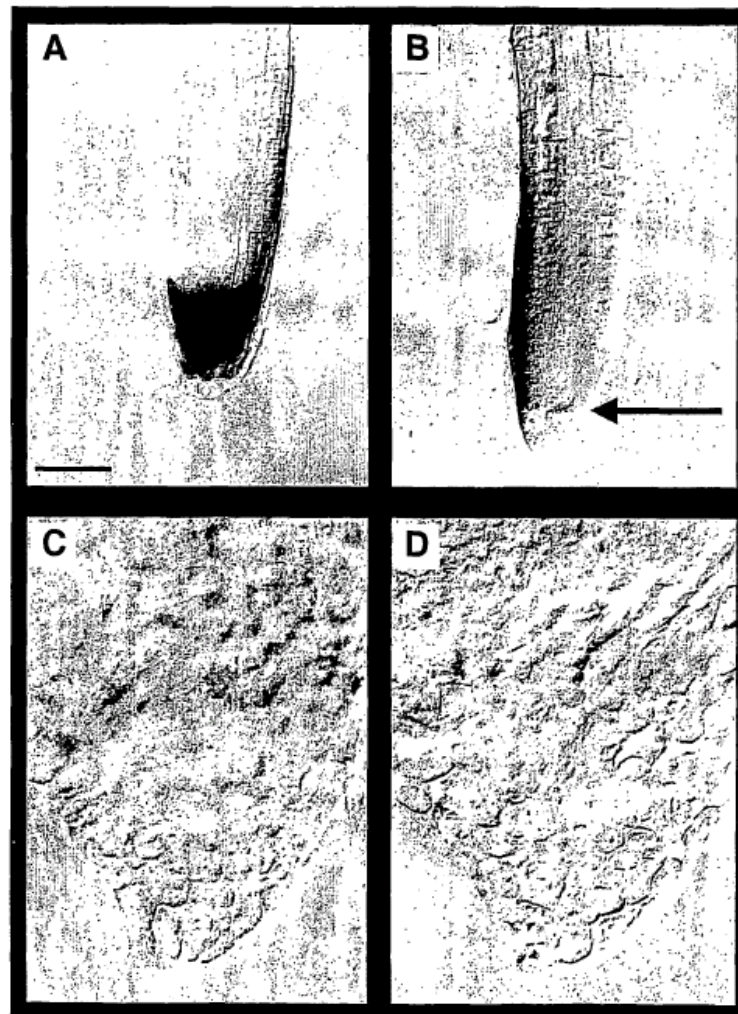


FIGURA 2

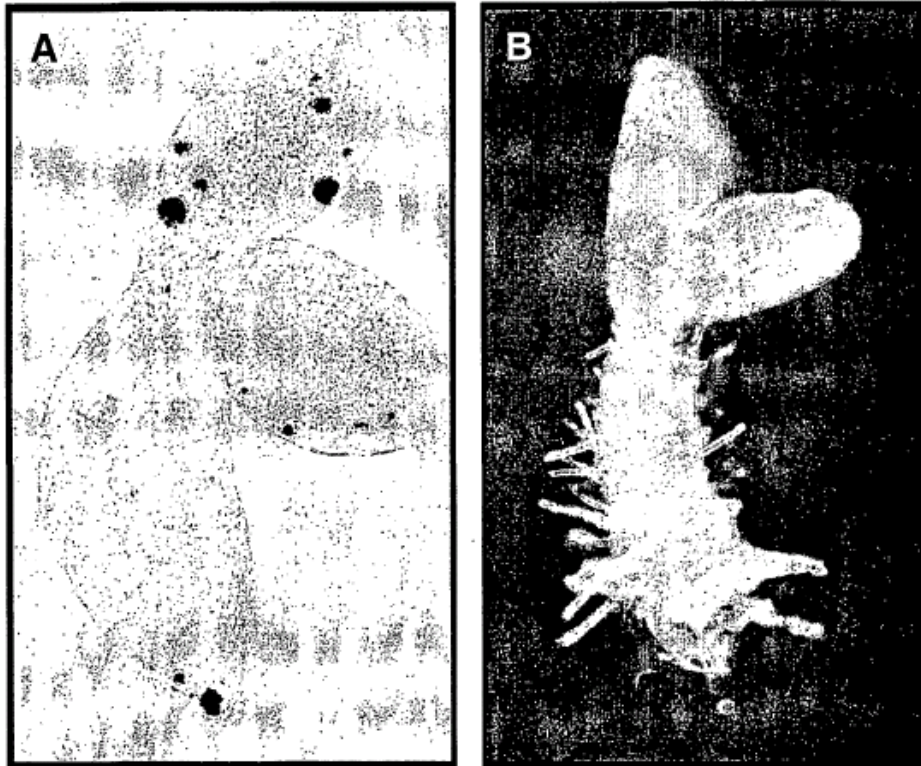


FIGURA 3

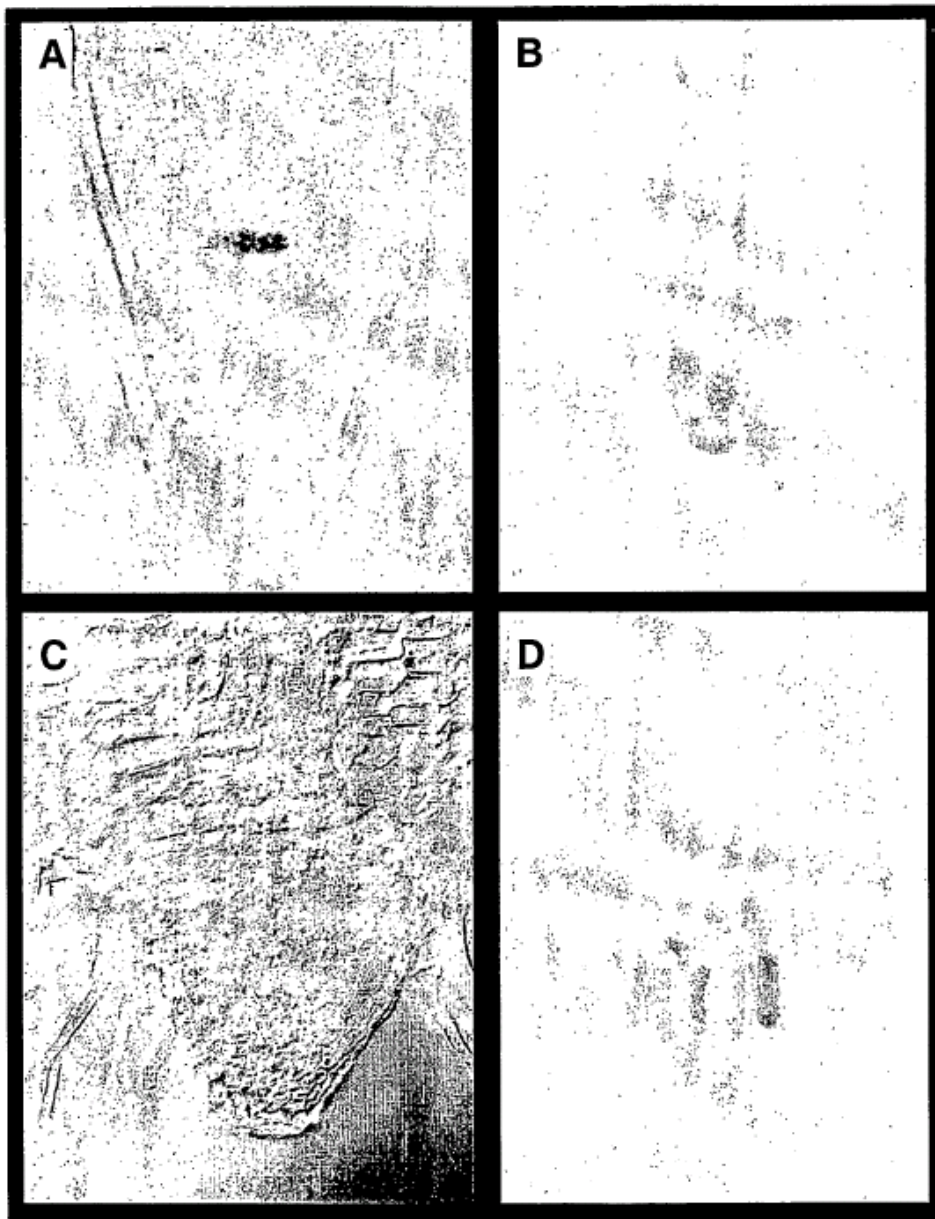


FIGURA 4

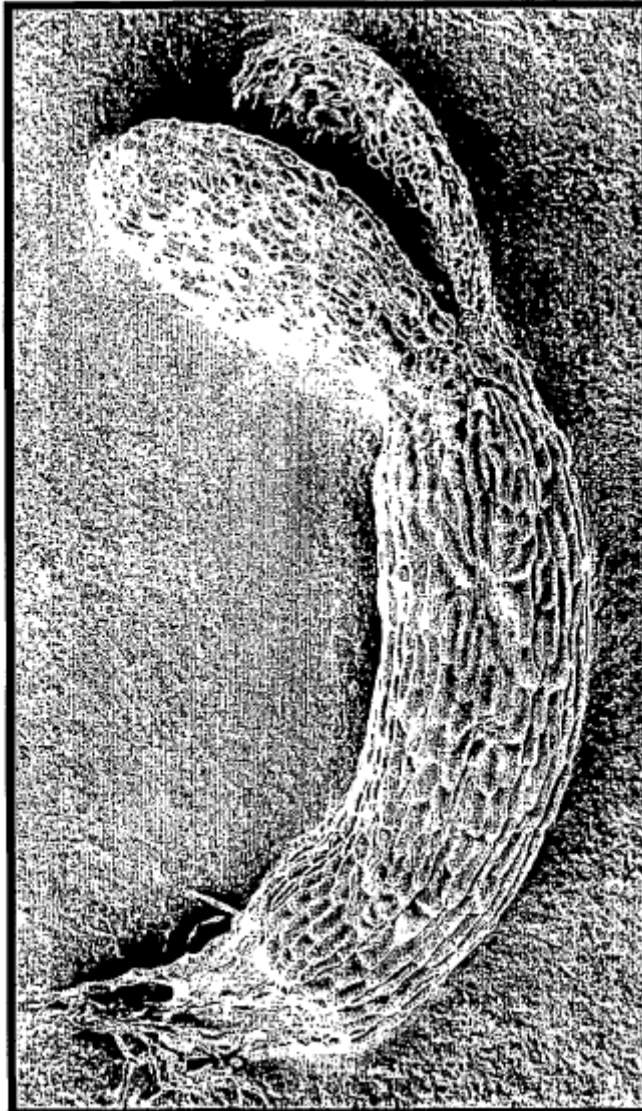


FIGURA 5

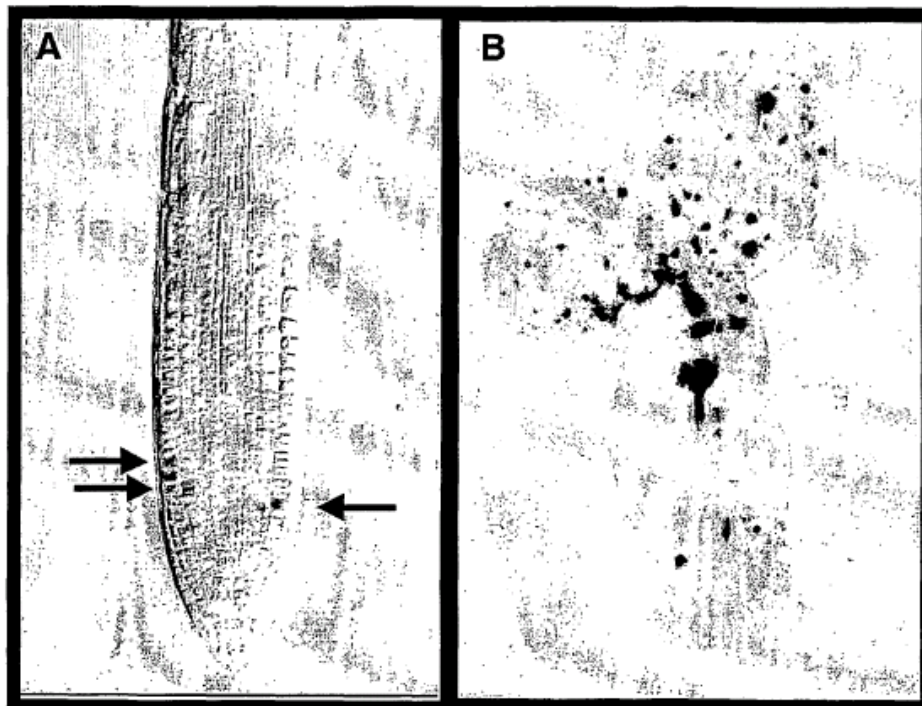


FIGURA 6

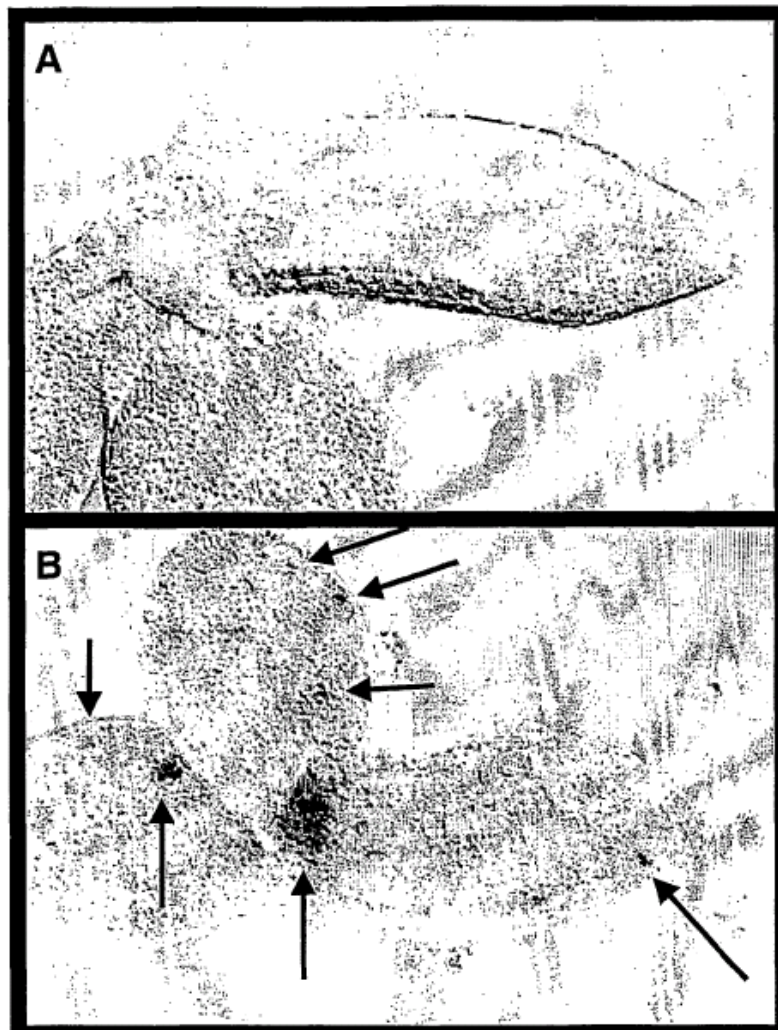


FIGURA 7

Cdc27A 1- MMENLLANCVQKNLNHFMFTNAIFLCBLLLAQFPSE-----
HBT/Cdc27B 1- MEAMLV-DCVNNSLRHFVYKNAIFMCERLCAEFPSEVNLQLLATSYLQNN

SEQ ID NO 3

Cdc27A 37- -----SRYLFAFSCFKLDLLGEAEALLP-CEDYABEVP
HBT/Cdc27B 50- QAYSAYHLLKGTQMAQSRYLFAFSCFQMDLLNEAESALCPVNEPGAE-ID

SEQ ID NO 3

Cdc27A 71- GGAAGHYLLGLIYRYSGRKNCSIQOFRMALSFDPLCWEAYGELCSLGNNK
HBT/Cdc27B 99- NGAAGHYLLGLIY---KRKNAA-QQFKQSLTIDPLLWAAEELCLG---

SEQ ID NO 3

Cdc27A 121- FNSLQWRSVITFSGAABEASTVFCNVASQRLOKTCVEORISFSEC-ATID
HBT/Cdc27B 141- -----AABEATAVFGETAALSIQKQYMOQ-LSTSLGLNTYN

SEQ ID NO 3

Cdc27A 170- Q--ITDSKAL--KDTGLSQTETHIPGENQQDLKIMQQPGDIPPNTRQLS
HBT/Cdc27B 177- EERNSTSTKNTSSSEDYSPROSKHTQSHGLKDTSGNFHSHGVNGGV---S

Cdc27A 214- TNGWDLNTPSPVLLQVMD-ALPPLLLKNMRRPAV-EG-SLMS-----V
HBT/Cdc27B 223- NMSFY-NTPSPVAAQLSGIAPPPL-FRNFQ-PAVANPNSLITDSSPKSTV

Cdc27A 264- HG-VRVRRRNFSE-----ELSAEAQEESE-RRRSARIAA-----RKKN
HBT/Cdc27B 270- NSTLQAPRRKFVDEGKLRKISGRLFSDSGPRR-SSRLSADSGANINSSVA

Cdc27A 300- PMSQSFQKDSHWHLSPSESNYAPSLSSMIGKCRLOSSK-----EVLIPD
HBT/Cdc27B 319- TVSGNVNNASKYLGGSK-----LSSLALRS-VTLRKGHSWANENM-D

Cdc27A 341- -TV-----TLNDPATTSGQSVSDIGSSVDDEKSNPSE--SSPDRFS
HBT/Cdc27B 359- EGVRGEFFDDSRPNTASTTGSMSAND----QEDETMSIGGIAMSSQT---

Cdc27A 376- LIS-GISEVLSLLKILGDCRRHLHMYKQEAALLAYOKLSQKQYNTHWVLM
HBT/Cdc27B 402- -IPIGVSEILNLLRTLGEGRLSYMYRCQEAALDTYMKLPHKHYNTHGWVLS

Cdc27A 423- QVGKAYFELQDYFNADSSFTLAHQKYPVALEGMDTYSTVLYHLKEEMRLG
HBT/Cdc27B 451- QVGKAYFELIDYLEAKAFRLARLASPYCLEGMDIYSTVLYHLKEDMKLS

Cdc27A 473- YLAQELISVDRLSPESWCAGNCYSLRKDHDOTALKMFORATQLNERFTYA
HBT/Cdc27B 500- YLAQELISTDRLEPQSWCAGNCYSLQKDHDOTALKNFRAVQLNPRRAYA

Cdc27A 523- HTLCGHEFAALEEFEDAERCYRKALGIDTRHYNAWYGLGMIYLRQEKLEF
HBT/Cdc27B 551- HTLCGHEXTTLEDFENGMKSYQNALRVDRHYNAWYGLGMIYLRQEKLEF

Cdc27A 573- AQHOFQLALQINPRSSVIMCYGIALHESKRNDALAMMEKAVLTDAKNP
HBT/Cdc27B 601- SEHEFRMAFLINPSSSVIMSILGTSLSHAKRSEEALEIMEQAIVADRNKP

Cdc27A 623- LPKYMKAHILTSFGDYHKAQKVLLEELKECAPOESSVHASL-GKIYNQLKQ
HBT/Cdc27B 651- LPMYOKANILVCLERLDEALEVLEELKEYAESSESVYA-LMGRIYKRRNM

Cdc27A 673- YDKAVLHFGIALDLSPSPSDAVKIKVNYSFVVFASQASINVTFCI-739
HBT/Cdc27B 700- HDKAVLHFGIALDMKEPATDVAAIKAAAMEKLHVPDEIDESP-740

FIGURA 8

```

ATG GAA GCT ATG CTT GTG GAC TGT GTA AAC AAC AGT CTT CGT CAT TTT GTC TAC
M E A M L V D C V N N S L R H F V Y -18
AAA AAT GCT ATT TTC ATG TGC GAG CGT CTC TGC GCT GAG TTT CCT TCT GAG GTT
K N A I F M C E R L C A E F P S E V -36
AAT TTG CAG CTA TTA GCC ACC AGC TAC CTG CAG AAT AAT CAA GCT TAC AGT GCA
N L Q L L A T S Y L Q N N Q A Y S A -54
TAT CAT CTG CTA AAG GGA ACA CAA ATG GCT CAG TCC CGA TAC TTG TTC GCA TTA
Y H L L K G T Q M V Q S R Y L F A L -72
hbt5421
TCA TGC TTC CAG ATG GAC CTT CTC AAT GAA GCT GAA TCT GCA CTC TGC CCT GTT
S C F Q M D L L N E A E S A L C P V -90
AAT GAA CCT GGT GCG GAG ATC CCA AAT GGT GCA GCA GGC CAT TAC CTT CTT GGA
N E P G A E I P N G A A G H Y L G -108
CTT ATT TAC AAA AGG AAT GCT GCT CAA CAA TTT AAA CAG TCC TTG ACA ATA
L I Y K R K N A A Q Q F K Q S L T I -126
GAC CCT CTA CTT TGG GCT GCA TAT GAG GAA TTA TGT ATA TTA GGT GCT GCT GAG
D P L W A A Y E E L C I L G A A E -144
GAA GCA ACT GCA GTT TTT GGT GAA ACA GCT GCT CTC TCC ATT CAA AAG CAG TAT
E A T A V F G E T A A L S I Q K Q Y -162
ATG CAA CAA CTG TCA ACT TCC CTC GGC TTA AAC ACT TAC AAC GAG GAA CGT AAT
M Q Q L S T S L G L N T Y N E E R N -180
TCA ACT TCT ACT AAA AAC ACG AGT TCT GAA GAT TAT AGT CCA AGG CAG TCT AAA
S T S T K N T S S E D Y S P R Q S K -198
CAC ACA CAA AGC CAT GGC CTT AAA GAT ATC TCC GGA AAT TTC CAT TCT CAT GGA
H T Q S H G L K D I S G N F H S H G -216
GTT AAT GGA GGT GTT TCG AAC ATG TCA TTC TAT AAT ACG CCT TCG CCA GTG GCT
V N G G V S N M S F Y N T P S P V A -234
GCA CAG CTA TCC GGT ATA GCT CCA CCA CCA CTT TTC CGG AAT TTT CAG CCA GCT
A Q L S G I A P P P L F R N F Q P A -252
hbt5422; hbt5423; hbt5859; hbt9624
GTT GCA AAC CCA AAC TCC CTT ATT ACT GAC AGT TCT CCA AAG TCC ACT GTT AAC
V A N P N S L I T D S S P K S T V N -270
TCT ACT CTT CAA GCA CCT AGA AGA AAG TTT GTA GAT GAA GGA AAG TTA CGT AAG
S T L Q A P R R K F V D E G K L R K -288
ATT TCT GGC AGA CTA TTT TCT GAT TCT GGT CCA CGA CGG AGT TCA AGA CTG TCT
I S G R L F S D S G P R R S S R L S -306
GCT GAT TCA GGG GCA AAC ATT AAT TCA AGT GTT GCA ACA GTA AGC GGA AAT GTG
A D S G A N I N S S V A T V S G N V -324
AAC AAC GCT TCC AAG TAT TTG GGA GGT TCT AAA TTG AGT TCT TTG GCA CTT CGT
N N A S K Y L G G S K L S S L A L R -342
TCT GTA ACA CTT CGG AAG GGA CAC TCC TGG GCA AAT GAA AAC ATG GAT GAA GGG
S V T L R K G H S W A N E N M D E G -360
GTC CGT GGG GAA CCT TTT GAT GAT TCA AGG CCT AAT ACT GCC TCA ACG ACT GGT
V R G E P F D D S R P N T A S T T G -378
TCT ATG GCT TCC AAT GAT CAA GAA GAC GAA ACA ATG TCG ATT GGT GGC ATA GCA
S M A S N D Q E D E T M S I G G I A -396
ATG AGT TCT CAA ACA ATC ACA ATT GGT GTT TCG GAA ATT TTA AAC CTC CTT AGG
M S S Q T I T I G V S E I L N L L R -414
ACA CTC GGA GAA GGG TGT AGA CTT TCA TAC ATG TAC AGG TGT CAG GAG GCA CTG
T L G E G C R L S Y M Y R C Q E A L -432
hbt1611
hbt9620

```

FIGURA 9-1

```

GAT ACG TAT ATG AAA CTT CCA CAT AAG CAT TAT AAT ACA GGA TGG GTT CTT TCC
D T Y M K L P H K H Y N T [G W V L S -450
CAG GTC GGG AAA GCA TAC TTT GAA CTA ATT GAC TAT TTA GAG GCT GAA AAG GCA
Q V G K A Y F E L I D Y L E A E K A -468
hbt9620 hbt5721
TTC CGT CTT GCC CGT CTG GCT TCT CCT TAT TGC TTA GAA GGA ATG GAT ATA TAC
F R L A R L A S P Y C [L E G M D I Y -486
TCT ACG GTC CTC TAT CAT TTG AAG GAA GAC ATG AAG CTG AGT TAC TTG GCT CAG
S T V L Y H L K E D M K L S Y L A Q -504
hbt5721
GAA CTA ATA TCA ACC GAT CGC TTA GCT CCT CAA TCT TGG TGT GCT ATG GGA AAT
E L I S T D R L A [P C S W C A M G N -522
hbt2311
TGC TAT AGC TTG CAA AAG GAC CAT GAG ACC GCA CTG AAG AAT TTC CTA CGA GCT
C Y S L Q K D H E T A L K N F L R A -540
hbt8052
GTT CAA CTG AAT CCA AGA TTT GCA TAT GCA CAT ACC TTA TGT GGC CAC GAA TAC
V Q L N P R F [A Y A H T L C G H E Y -558
ACA ACT CTT GAG GAT TTT GAG AAC GGA ATG AAA AGT TAC CAA AAC GCA CTT CGT
T T L E D F E N G M K S Y Q N A L R -576
GTA GAT ACA AGA CAC TAC AAC GCA TGG TAC GGG CTT GGA ATG ATA TAT CTA CGC
V D T R H [Y N A W Y G L G M I Y L R -594
CAA GAG AAG TTA GAG TTC TCA GAG CAT CAC TTC AGA ATG GCT TTC CTA ATA AAC
Q E K L E F S E H E F R M A E L I N -612
CCG AGT TCC TCT GTT ATA ATG TCT TAT TTA GGG ACA TCT TTG CAT GCC TTG AAG
P S S [S V I M S Y L G T S L H A L K -630
AGA AGT GAG GAA GCA CTA GAG ATA ATG GAG CAA GCC ATA GTA GCA GAT AGA AAA
R S E E A L E I M E Q A I V A D R R -648
AAC CCT CTT CCA ATG TAC CAG AAA GCT AAC ATA CTT GTC TGC TTA GAA AGA TTA
N [P L P M Y Q K A N I L V C L E R L -666
GAT GAA GCT CTA GAA GTT CTT GAG GAG CTC AAA GAG TAT GCG CCT TCA GAG AGC
D E A L E V L E E L K E Y A P S E [S -684
AGC GTT TAC GCT TTA ATG GGC AGG ATC TAT AAG CGG CGA AAC ATG CAC GAT AAA
S V Y A L M G R I Y K R R N M H D K -702
GCC ATG CTT CAT TTC GGT CTA GCT TTA GAT ATG AAA CCG CCT GCA ACT GAC GTT
A M L H F G L A L D M K P P A T D V -720
GCT GCA ATA AAG GCT GCA ATG GAG AAA TTG CAT GTT CCA GAT GAG ATC GAT GAG
A A I K A A M E K L H V P D E I D E -738
AGC CCG TGA
S P *

```

FIGURA 9-2

ATGGAAGCTA	TGCTTGTGGA	CTGTGTAAC	AACAGTCTTC	GTCATTTTGT	-50
CTACAAAAAT	GCTATTTTCA	TGTGCGAGCG	TCTCTGCGCT	GAGTTTCCTT	-100
CTGAGGTAAT	CACCCCTCTC	TTTCACTCTC	TCTCTCTGAT	TTTACCTCTC	-150
TAATTCAAAT	TCTGTAAATC	GAAGCTCTTG	GAATGGTAAA	TTTGATATTT	-200
TTGGGTTTGT	AATTCCTCTG	GGTATCTATG	AATTCGTCGA	AAGTGCCTCT	-250
CTTTTGTGGAT	TTGGAATTCG	ATAGCTTCAC	TGTGTTCTTC	GAGATTGATT	-300
TTGGTTTCTT	ACCTTTTAGC	CCTTGTTTTT	CAAGATCCGT	GTGTTCAATT	-350
AGGAGATGAA	TTCGTGTTCT	TTTCTCTCTC	TTGTTGAATT	TGTTTTCTCT	-400
AGTAGCTGTG	CTCAATGCTC	ATTACTGATT	TGGTCTTTGG	AAAAATTGCA	-450
TTTGAGGGGT	TAATGACTTT	TGTCCATATA	TGTGATCTCA	AGTTAAAGTA	-500
TTTATTATCC	TTGGAACCTA	GCTATGAGTC	AACTGTTAGA	GGAATGTCTC	-550
TTGGATTATC	TCAAGCTTTG	TTAAAATTTG	GGTTAATACA	GCTCAATAG	-600
TAGTTGAGAA	AGTATTCATT	CATTCAGCCT	TTGGTCTGGA	ATATTTTCAA	-650
CATTTCGTAGT	GGTTGTCCAG	TTTCTAGCTT	CAGTTAGTAG	AAATCATGTC	-700
AATAAATGAT	TGGCCTTTTT	GTTTGATCAC	TTTCTGAATT	TTCTCTTTAT	-750
ATAGGTTAAT	TTGCAGCTAT	TAGCCACCAG	CTACCTGCAG	AATAATCAAG	-800
CTTACAGTGC	ATATCATCTG	CTAAAGGGTG	CGTGGCATTG	TTTCTTGACT	-850
TGTTGCTTGT	TAGCCTTTTA	GTGAGAAATTT	TGCACCTTCT	TTTGTTAGGT	-900
CGTTTTGATT	ATCTTTGTAT	ATATATTTTT	TTTTTGTAT	GTAAGGAAC	-950
ACAAATGGCT	CAGTCCCGAT	ACTTGTTCGC	ATTATCATGC	TTCCAGATGG	-1000
hbt5421					
ACCTTCTCAA	TGAAGCTGAA	TCTGCACTCT	GCCCTGTAA	TGAACCTGGT	-1050
GCGGAGGTAT	TTAATGTTCT	CTGGTATTTT	GCCTTTATTC	GCTTACTGAA	-1100
TGTCATTTTA	CAAAAACAGT	GTGTCAGTTT	CTGGACCTTA	TTTATTGATT	-1150
TAGTTTCAGTG	AAGATAACAA	CATGCTTCTG	ATTATTGTGC	AGATCCCAAA	-1200
TGGTGCAGCA	GGCCATTACC	TTCTTGGACT	TATTTACAAG	TACGTTTTTT	-1250
GTTCTGTCTA	TGCATTTTTT	CTTGATTCTG	AATGGCTTAG	ATGAGATGAT	-1300
TCCTCATATA	TAACAGTGAC	CTTTTAGGTA	TACTGATAGA	AGGAAGAATG	-1350
CTGCTCAACA	ATTTAAACAG	TCCTTGACAA	TAGACCCTCT	ACTTTGGGCT	-1400
GCAATATGAGG	AATTATGTAT	ATTAGGTGAA	CATAATCCGT	TTTCTGCATA	-1450
CTTCACAGAT	ATGTTATGGT	TCTCTTACAC	TTTTCTGTCT	GCTCAACTTT	-1500
CAGGTGCTGC	TGAGGAAGCA	ACTGCAGTTT	TTGGTGA AAC	AGCTGCTCTC	-1550
TCCATTCAAA	AGCAGTATAT	GCAACAACCTG	TCAACTTCCC	TCGGCTTAAA	-1600
CACTTACAAC	GAGGAACGTA	ATTCAACTTC	TACTAAAAAC	ACGAGTTCTG	-1650
AAGATTATAG	TCCAAGGCAG	TCTAAACACA	CACAAAGCCA	TGGCCTTAAA	-1700
GATATCTCCG	GAAATTTCCA	TTCTCATGGA	GTTAATGGAG	GTGTTTCGAA	-1750
CATGTCATTTC	TATAATACGC	CTTCGCCAGT	GGCTGCACAG	GTAATGTCAC	-1800
ACAATTGTCTG	TACTGCTTTT	TTATGTAATA	CAACTATATC	TCCATCTGTT	-1850
GATCACACAT	TCTGTAGTAC	TTAGGAGATT	TGTGCATCAT	GGGTGTTGAT	-1900
TTACAGCGT	TTGTATCTGT	TTTTTCTATA	TCTGTTATGC	CAAAAGAATG	-1950
GGTTGTCTAT	TCTTTTGACT	ATTAAAAATG	GGGTCTTCAT	TATGTTTTAG	-2000
TGCTTTTGGT	TTGGCTTGTT	AATTTTATCA	ACCTTTTTAG	TTATCTGAAT	-2050
AATAACAGCT	GTAAGTAAAT	GCTTTTTTGT	ATTTTTGAAA	TTGTAGCTAT	-2100
CCGGTATAGC	TCCACCACCA	CFTTTCCGGA	ATTTTTCAGCC	AGCTGTTGCA	-2150
hbt5422, hbt5423, hbt5859, hbt9624					
AACCCAAACT	CCCTTATTAC	TGACAGTTCT	CCAAAGTCCA	CTGTTAACTC	-2200
TACTCTTCAA	GCACCTAGAA	GAAAGTTTGT	AGATGAAGGA	AAGTTACGTA	-2250
AGGTAGGATT	CACATAATCA	CATATCTCTA	CTTGACATCA	TCAATCATA	-2300
ATTTTGAATT	ATTGGTCTTT	CTCTGTAATA	GTCTATTTCTG	TACTCGGGAT	-2350
GAAATTTTCT	ATACCAACTT	TCTTACCGTG	AGTGCATGTC	TCTTATGTTT	-2400
GCAGATTTCT	GGCAGACTAT	TTTCTGATTCT	TGGTCCACGA	CGGAGTTCAA	-2450

FIGURA 10-1

GACTGTCTGC TGATTCAGGG GCAAACATTA ATTCAAGTGT TGCAACAGTA -2500
 AGCGGAAATG TGAACACGC TTCCAGTAT TTGGGAGGTT CTAAATTGAG -2550
 TTCTTTGGCA CTTCGTTCTG TAACACTTCG GAAGGGACAC TCCTGGGCAA -2600
 ATGAAACAT GGATGAAGGT TGTGACATTC CATGCACTAT ACCACTATAT -2650
 TGTTTGAAAT CTGCCCTTGT GTGACTATTG TTATCATGCC TTCTATTTT -2700
 GGTGCTCTGCA TATTTGTAAT ACCGTCATTG TGATGGGTTT AGGGGTCCGT -2750
 GGGGAACCTT TTGATGATTC AAGGCCTAAT ACTGCCTCAA CGACTGGTTC -2800
 TATGGCTTCC AATGATCAAG AAGACGAAAC AATGTCGATT GGTGGCATAG -2850
 CAATGAGTTC TCAACAATC ACAATTGGTG TTTCGGAAAT TTTAAACCTC -2900
 CTTAGGACAC TCGGAGAAGG GTGTAGACTT TCATACATGT ACAGGTGTCA -2950
 hbt1611
 GGTAGGCATA TTATTGTTCT CGTGAATTAT GCAAGTGAGG TGAACCTATA -3000
 TAGGCATTATC TCATTGTCTC CTTCTGCTTC TGGGTGCTTC AGGAGGCACT -3050
 hbt9620
 GGATACGTAT ATGAACCTTC CACATAAGCA TTATAATACA GGATGGGTTTC -3100
 TTTCCAGGT AACTAGTGAC TCTTCTCTT TTAGGCTGCC ATATATGGAT -3150
 ATAGCCTGAA TCAGTTTAC TCTAGTGCC TGTGATAGTT ATTGTTGAAA -3200
 GGTATATATA CACATACTAT GGCTATTAAA TGTAGGTCGG GAAAGCATAC -3250
 TTTGAACCTAA TTGACTATT AGAGGCTGAA AAGGCATTCC GTCTTGCCCG -3300
 TCTGGCTTCT CCTTATTGCT TAGAAGGAAT GGATATATAC TCTACGGTCC -3350
 TCTATGTAAG TGTATTATCC TGGTTCTAA ACATGCAATC TCGGATGAGT -3400
 hbt5721
 GCGGAAAGAA ATCACATTTA TGTAAATTT TCATCAGCAA GATATGATAT -3450
 TTATTGCAAG CATTTGAGG AAGACATGAA GCTGAGTTAC TTGCTCAGG -3500
 AACTAATATC AACCGATCGC TTAGCTCCTC AATCTTGGTA TTTTGTGCG -3550
 hbt2311
 AAGTGTGTTT TCTGATTAAC GTTTCATT ATGTTGGTA ATAAGAGAAA -3600
 TAAGCAATCA ATTATGTAGG TGTGCTATGG GAAATTGCTA TAGCTTGCAA -3650
 AAGGACCATG AGACCGCACT GAAGAATTTC CTACGAGCTG TTCAACTGAA -3700
 hbt8052
 TCCAAGATTT GCATATGCAC ATACCTTATG TGGCCACGAG TAAGAGAGCC -3750
 TCTATCCATT TGACTTTGTC TTGCACAATG TGCTTAAAT TATCTGGTTA -3800
 TTGGTCTAAT TGACACTTTC TATCTTTACT GTCTCTGTAG ATACACAAC -3850
 CTTGAGGATT TTGAGAACGG AATGAAAAGT TACCAAACG CACTTCGTGT -3900
 AGATACAAGA CACTACAACG CATGGTACGG GCTTGGAAAT ATATATCTAC -3950
 GCCAAGAGAA GTTAGAGTTC TCAGAGCATC ACTTCAGAAAT GGCTTCCCTA -4000
 ATAAACCCGA GTTCCTCTGT TATAATGCTT TATTAGGGA CATCTTTGCA -4050
 TGCCTTGAA GTTATCTTAT TACTTTCATC TTATCAGGTC TACAGAGAAA -4100
 ACAATCTTTG AAGAATGACT AAATGCTTCT TCTGTTTTG TGTTAATAGA -4150
 GAAGTGAGGA AGCACTAGAG ATAATGGAGC AAGCCATAGT AGCAGATAGA -4200
 AAAAAACCTC TTCCAATGTA CCAGAAAGCT AACATACTTG TCTGCTTAGA -4250
 AAGATTAGAT GAAGCTCTAG AAGTCTTGA GGAGCTCAA GAGTATGCGC -4300
 CTTACAGAGAG CAGCGTTTAC GCTTTAATGG GCAGGATCTA TAAGCGGCGA -4350
 AACATGCACG ATAAAGCCAT GCTTCATTTC GGTCTAGCTT TAGATATGAA -4400
 ACCGCCTGCA ACTGACGTTG CTGCAATAAA GGTTCGAGTC TTTAAAACAG -4450
 AGTCGTCCAA TGATGGTTT TAAATCTGAA AATTCAGGA TTCRTAGCTT -4500
 AAATGGTTA TTATTGCTCG AAACAGGCTG CAATGGAGAA ATTGCATGTT -4550
 CCAGATGAGA TCGATGAGAG CCCGTGA

FIGURA 10-2

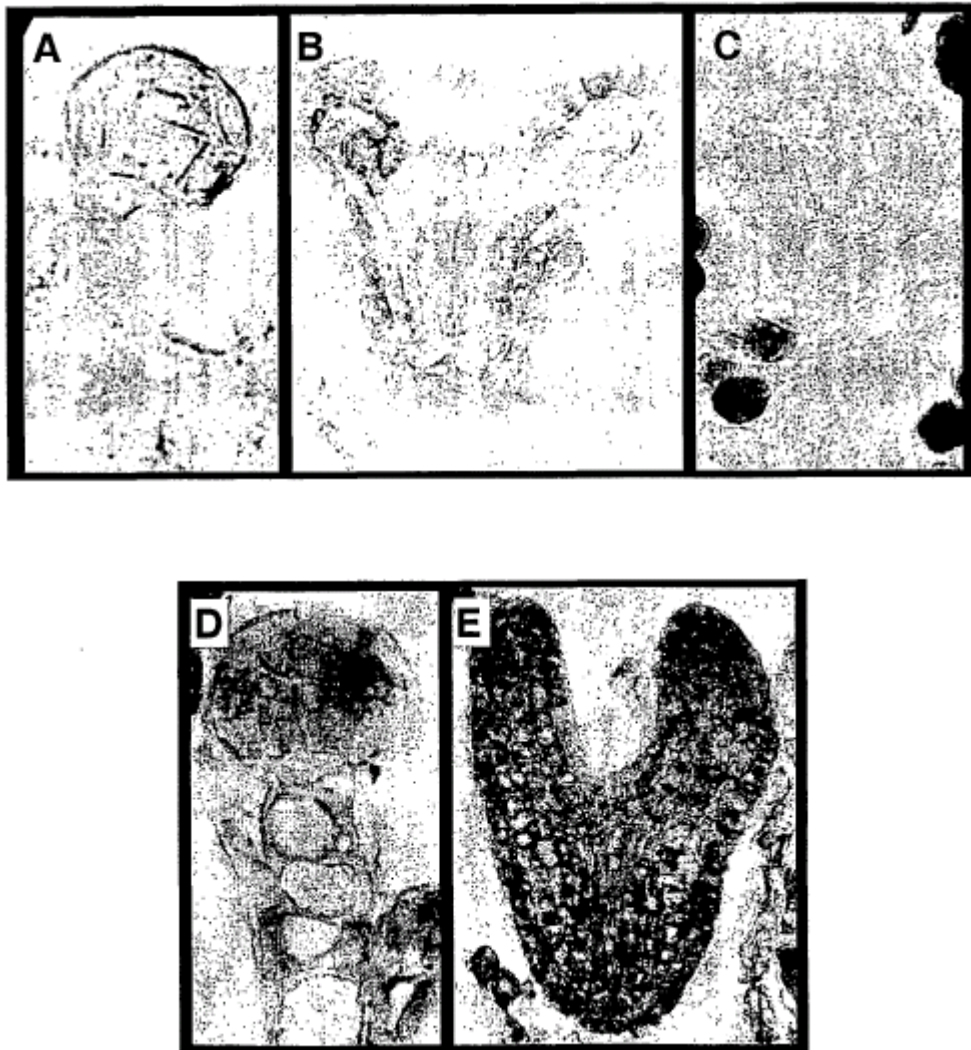


FIGURA 11

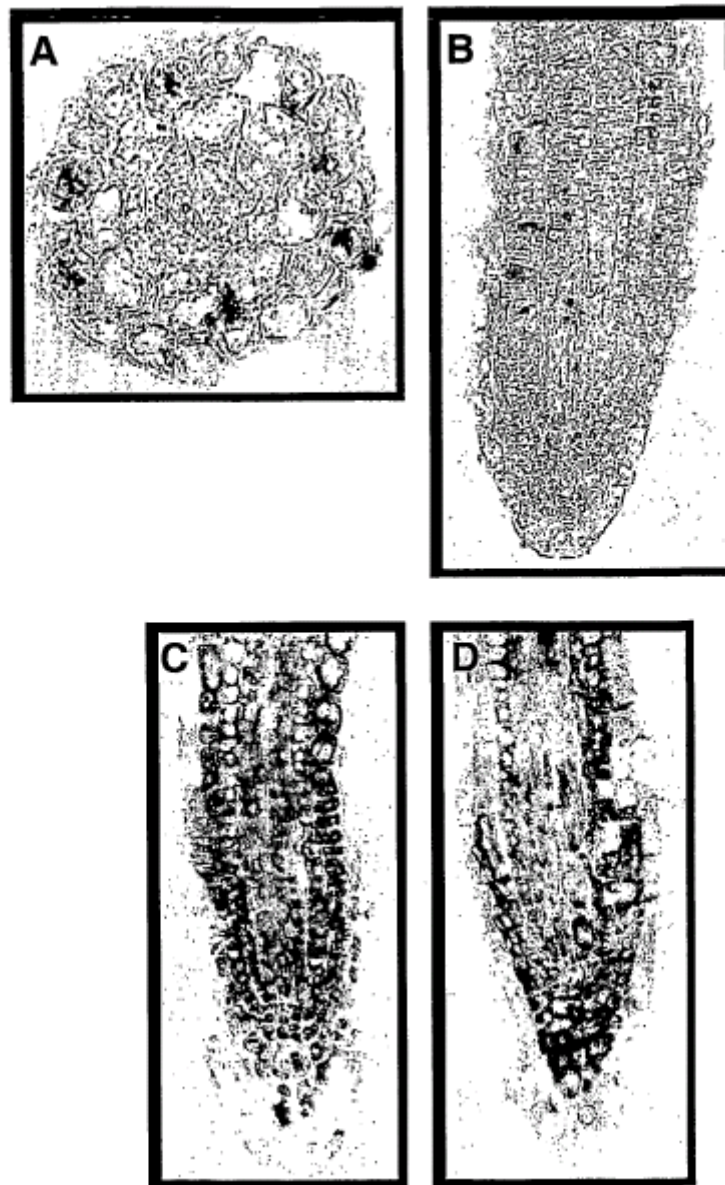


FIGURA 12

FIGURA 13-1

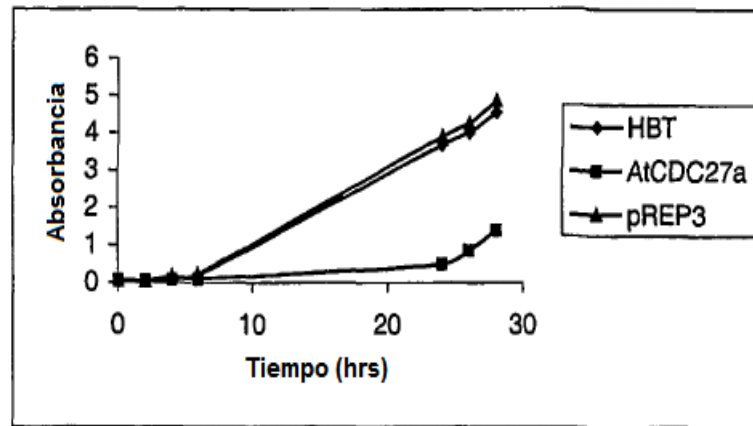
SEQ ID Nr. 31: HBT 1F GAAGAAAGGCAACAACTATGGAAGCTATG
 SEQ ID Nr. 32: HBT 1R: GAACTGTCAGTAATAAGGGAGTTTGGGTTT
 SEQ ID Nr. 33: HBT 2F: ATGCAACAACTGTCAACTTCCCTCG
 SEQ ID Nr. 34: HBT 2R: TATCCATTCCCTTCTAAGCAATAAGGAGAAGC
 SEQ ID Nr. 35: HBT 3F: AAATTTTAAACCTCCTTAGGACACTCGGA
 SEQ ID Nr. 36: HBT 3R: TCACGGGCTCTCATCGATCTCATCT
 SEQ ID Nr. 37: HBT 3'2F: GTTCTTGAGGAGCTCAAAGAGTATG
 SEQ ID Nr. 38: HBT 3'1F: GCTTTAATGGGCAGGATCTATAAG
 SEQ ID Nr. 39: HBT BF: TATTCAAATGGTCAATTATAAAGCCCAATAAG
 SEQ ID Nr. 40: HBT 5'1R: ACATGAAAATAGCATTTTTGTAGAC
 SEQ ID Nr. 41: HBT AF: AGAGTGACCTACTTACTACATTGGTACAAAACC
 SEQ ID Nr. 42: HBT AR: CCCATTAAAGCGTAAACGCTGCTCTCTGAAG
 SEQ ID Nr. 43: HBT BF: TATTCAAATGGTCAATTATAAAGCCCAATAAG
 SEQ ID Nr. 44: HBT BR: TGAATGAATACTTTCTCAACTACTATTGAAGC
 SEQ ID Nr. 45: HBT CF: TATGAGTCAACTGTTAGAGGAATGTCTCTG
 SEQ ID Nr. 46: HBT CR: GAAGTTGACAGTTGTTGCATATACTGC
 SEQ ID Nr. 47: HBT DF: TCTTACACTTTTCTGTCTGCTCAACTTTCA
 SEQ ID Nr. 48: HBT DR: CAAAGAACTCAATTTAGAACCTCCCAAATAC
 SEQ ID Nr. 49: HBT EF: CAGATTTCTGGCAGACTATTTTCTGATTCT
 SEQ ID Nr. 50: HBT ER: AAGTAACTCAGCTTCATGTCTTCCTTCAA
 SEQ ID Nr. 51: HBT FF: GATATTTATTTGCAGCATTTGAAGGAAGAC
 SEQ ID Nr. 52: HBT FR: GAATTTTCAGATTTAAAAACCATCATTGGA
 SEQ ID Nr. 53: HBT GF: AGTCTTTAAACAGAGTCGTCCAATGATG
 SEQ ID Nr. 54: HBT GR: ATATTGCGATTAGGTAGTGTTACGGACAAC
 SEQ ID Nr. 55: YC F: GAAGTCGACACAACTATGGAAGCT
 SEQ ID Nr. 56: YC R: AATCATACCCAAGGATCCTGGAG

FIGURA 13-2

SEQ ID Nr. 57: HBT NF: GCAACAACTGTCAACTTCCCTCGGCTT
SEQ ID Nr. 58: HBT NR: AGAACCAGTCGTTGAGGCAGTATTAGGCC
SEQ ID Nr. 59: CDC27 1F: ATGATGGAGAATCTACTGGCGAATTG
SEQ ID Nr. 60: CDC27 1R: CATCGAGGAAAGAGAAGGTGCATAG
SEQ ID Nr. 61: CDC27 2F: ATCCTAGTGAATCTTCCCCGGATCG
SEQ ID Nr. 62: CDC27 2R: AGCCAGTTGAAATTGATGCTGCG
SEQ ID Nr. 63: CDC27 3F: GATGCAGAGAGATGCTACCGGAAGGC
SEQ ID Nr. 64: CDC27 3R: CTAAATGCAAAATGTGACCATGATTG

SEQ ID Nr. 65: AXR3-F: TCT TCC CGG TGG AGA TAC AG
SEQ ID Nr. 66: AXR3-R:GCC CAT GGT AAA AGA GCT GA

A



B

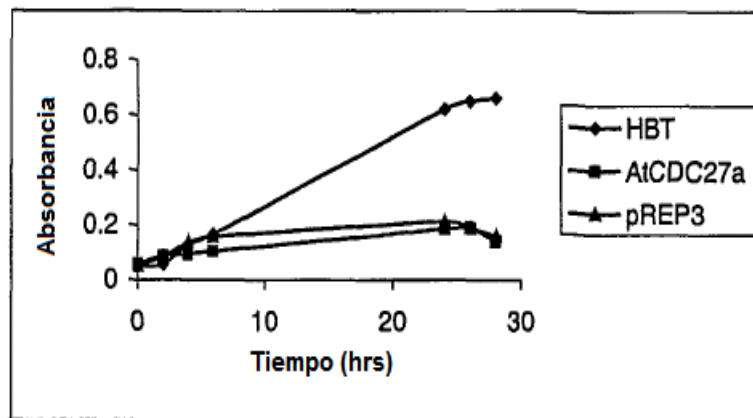


FIGURA 15

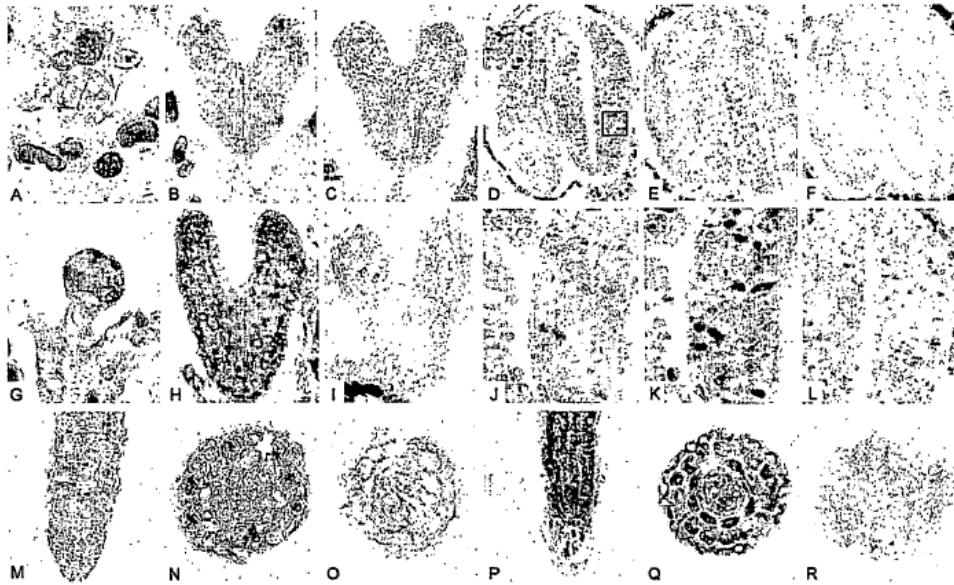


FIGURA 16

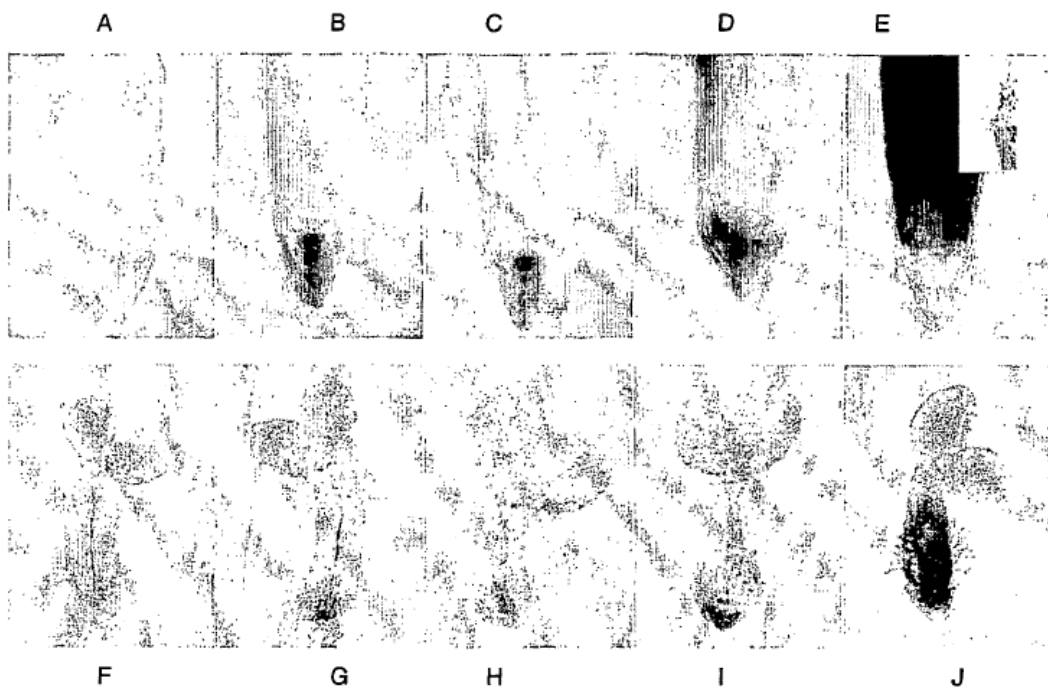
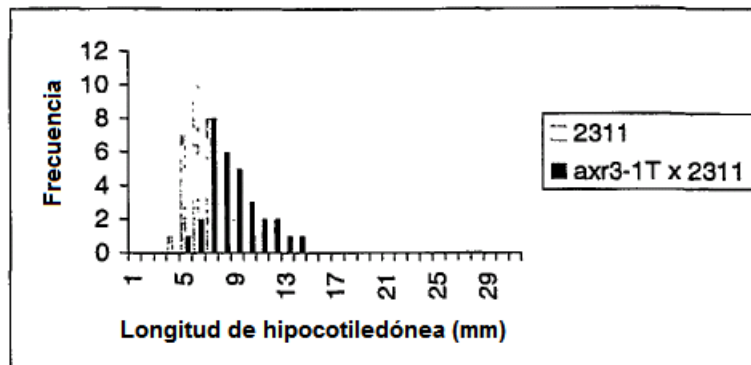
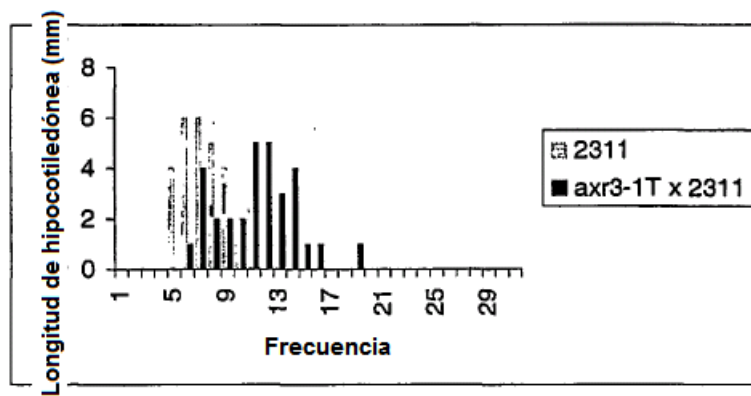


FIGURA 17

A



B



C

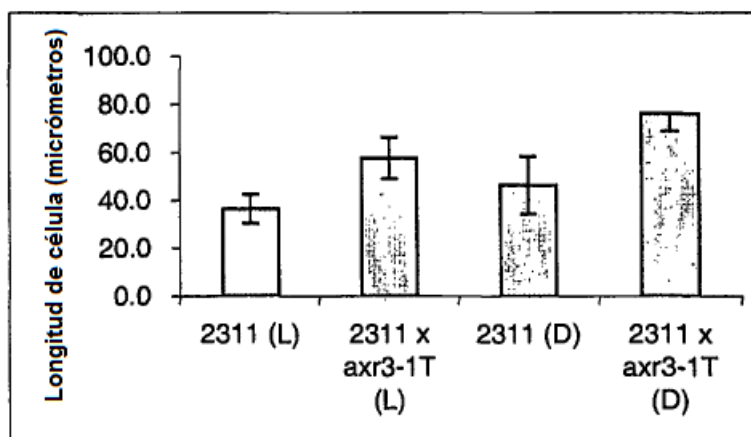


FIGURA 18

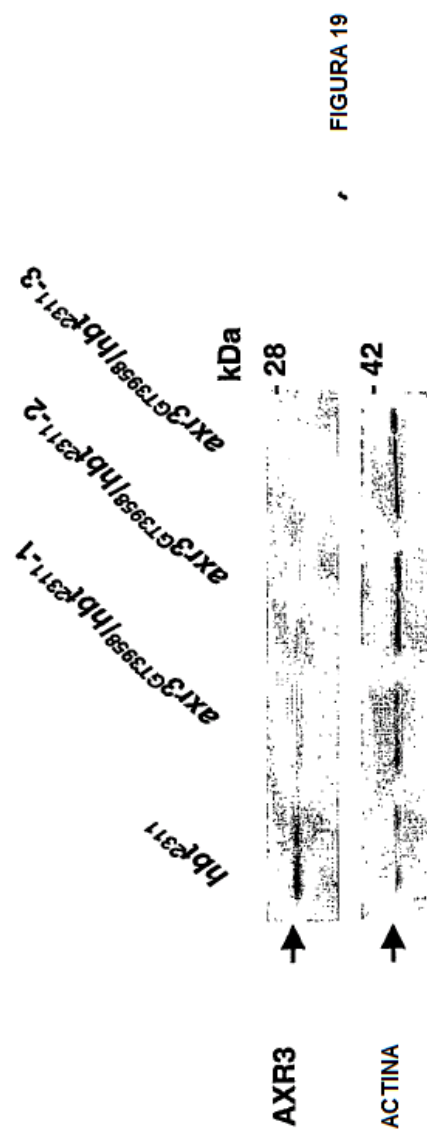
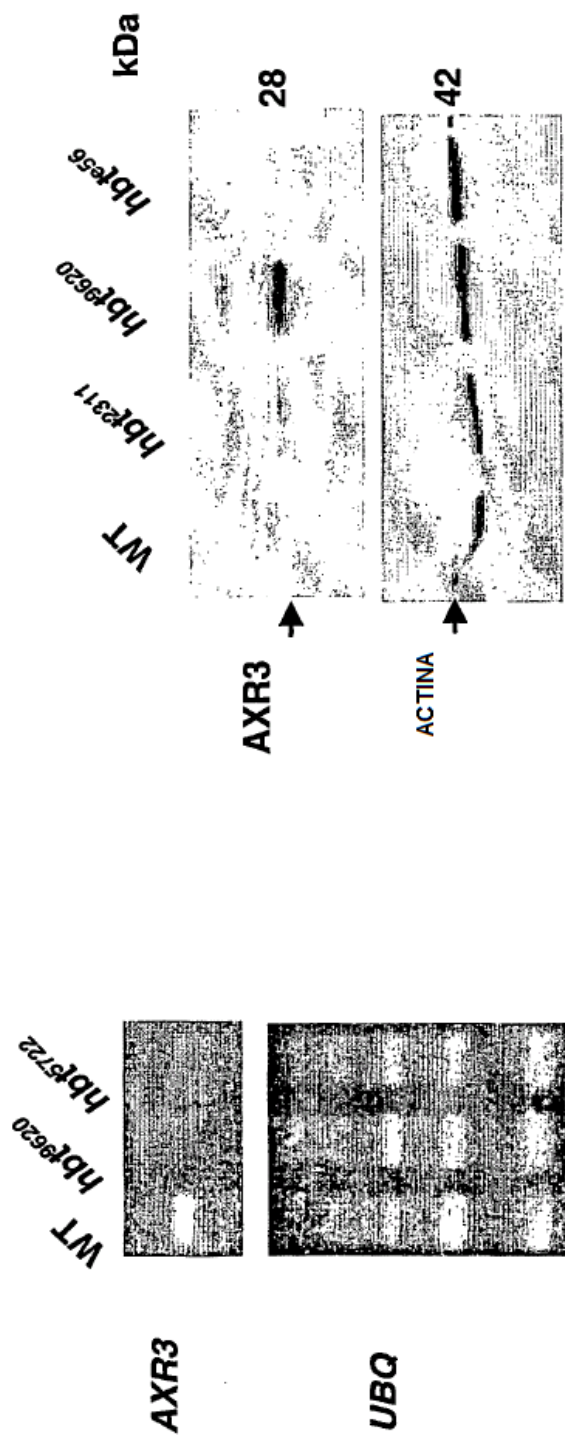


FIGURA 19

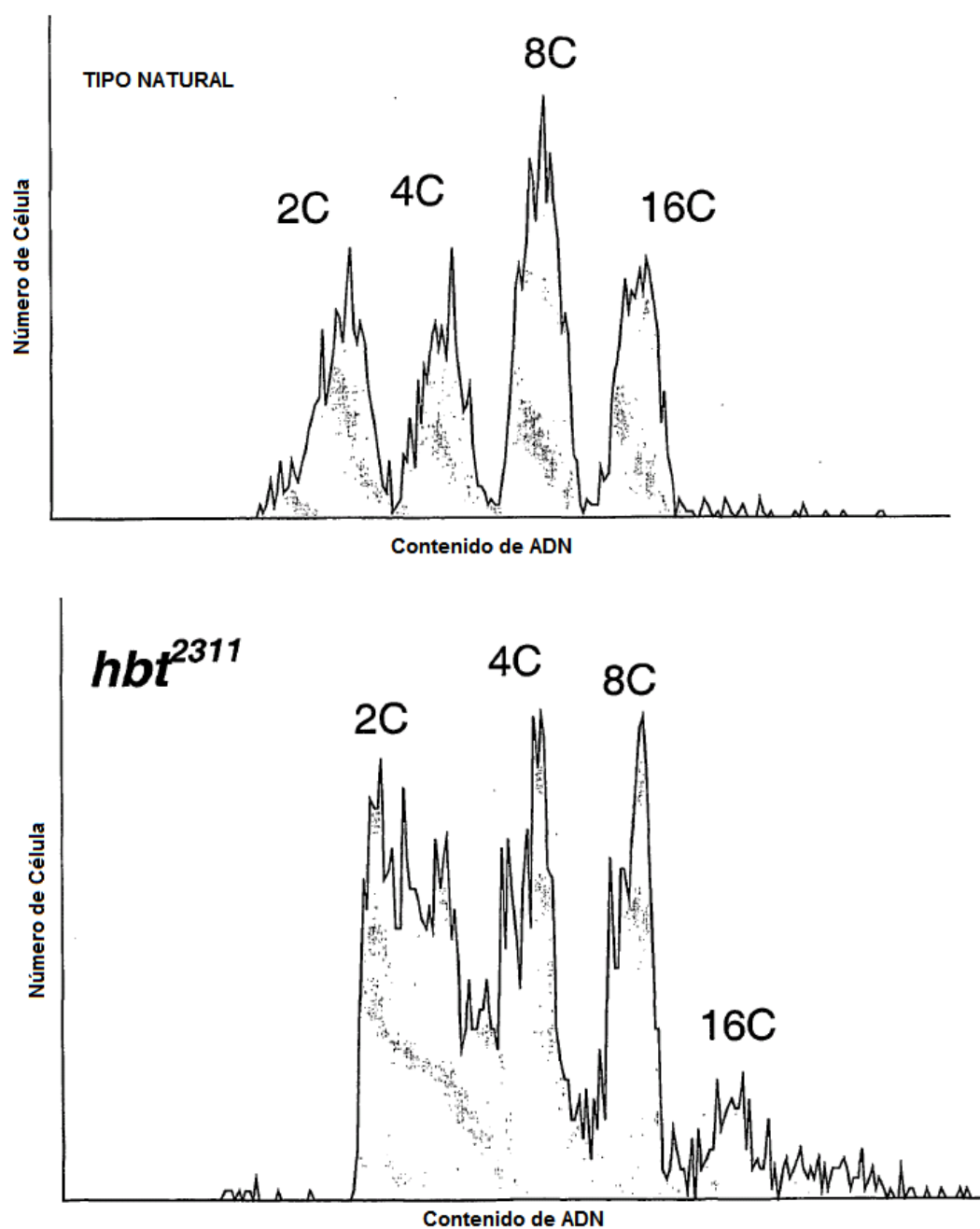


FIGURA 20