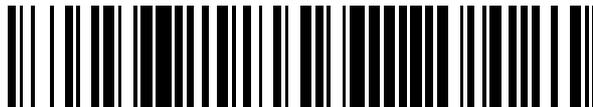


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 577**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

A01N 65/00 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2006 E 06787071 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1907552**

54 Título: **Aumento del rendimiento en plantas que sobreexpresan los genes de ACCDP**

30 Prioridad:

18.07.2005 US 700096 P

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

13.01.2014

73 Titular/es:

**BASF PLANT SCIENCE GMBH (100.0%)
CARL-BOSCH-STRASSE 38
67056 LUDWIGSHAFEN, DE**

72 Inventor/es:

**SARRIA-MILLAN, RODRIGO;
GARR, ERIC R.;
HAERTEL, JAMIE;
ALLEN, DAMIAN y
MCKERSIE, BRYAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 437 577 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

Aumento del rendimiento en plantas que sobreexpresan los genes de ACCDP

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad respecto de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° de Serie 60/700.096 presentada el 18 de julio de 2005.

Antecedentes de la Invención

Campo de la invención

10 La presente divulgación se refiere en general a secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos que están asociados con el desarrollo de las raíces, que contribuyen al crecimiento vegetal y, en última instancia, afectan a la producción vegetal (es decir rendimiento) bajo condiciones de tensión abiótica o sin tensión. En particular, la presente divulgación se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos que confieren a la planta aumento del crecimiento de la raíz, aumento del rendimiento y/o de tolerancia a la sequía, el frío y/o la salinidad, y el uso de dichos ácidos nucleicos aislados.

Técnica antecedente

15 El rendimiento de las plantas de cultivo es central para el bienestar de los seres humanos y está afectado directamente por el crecimiento de plantas en el ambiente físico. Tensiones ambientales abióticas, tales como tensión por sequía, tensión por salinidad, tensión por calor y tensión por frío, son factores limitantes importantes del crecimiento y la productividad vegetal. Las pérdidas de cultivo y pérdidas de rendimiento de cultivos importantes tales como soja, arroz, maíz, algodón y trigo provocadas por estas tensiones representan un factor económico y político significativo y contribuyen a escasez de alimentos en muchos países en desarrollo.

25 La biomasa vegetal es el rendimiento total para cultivos de forraje como alfalfa, maíz de silage y heno. Se han usado muchas representaciones para el rendimiento en cultivos de grano. Las principales entre estas son las estimaciones del tamaño de la planta. El tamaño de la planta puede medirse de muchas maneras dependiendo de la especie y estadio del desarrollo, pero incluyen el peso seco total de la planta, el peso seco por encima del suelo, el peso en fresco por encima del suelo, área de la hoja, volumen del tallo, altura de la planta, diámetro de la roseta, longitud de la hoja, longitud de la raíz, masa de la raíz, número de brotes y número de hojas. Muchas especies mantienen una relación conservativa entre el tamaño de diferentes partes de la planta en un estadio del desarrollo dado. Estas relaciones alométricas se usan para extrapolar a partir de una de estas medidas de tamaño a otra. El tamaño de la planta en un estadio del desarrollo temprano se correlacionará típicamente con el tamaño de la planta más tarde en el desarrollo. Una planta mayor con una mayor área de hoja puede típicamente absorber más luz y dióxido de carbono que una planta más pequeña y por lo tanto aumentará probablemente más en tamaño durante el mismo periodo. Es decir además de la continuación potencial de la ventaja microambiental o genética la planta tenía que conseguir el mayor tamaño inicialmente. Hay un fuerte componente genético para el tamaño de la planta y la velocidad de crecimiento y por lo tanto para una serie de genotipos diversos el tamaño de la planta en una condición ambiental probablemente se correlacione con el tamaño en otra. De este modo se usa un ambiente convencional con una representación para los diversos y dinámicos ambientes encontrados en diferentes localizaciones y momentos por los cultivos en el campo.

40 El índice de cosecha, la relación de producción de semilla y peso seco por encima del suelo, es relativamente estable en muchas condiciones ambientales y por lo tanto puede obtenerse con frecuencia una correlación robusta entre el tamaño de la planta y la producción de grano. Estos procesos están ligados intrínsecamente porque la mayor parte de la biomasa del grano depende de la productividad fotosintética actual o almacenada por las hojas y el tallo de la planta. Por lo tanto, la selección del tamaño de la planta, incluso en estadios tempranos del desarrollo, se ha usado como un indicador para el potencial futuro. Cuando se ensaya con respecto al impacto de las diferencias genéticas en la tolerancia a la tensión, la capacidad para normalizar propiedades del suelo, temperatura, agua y disponibilidad de nutrientes e intensidad de luz es una ventaja intrínseca de ambientes de invernadero o cámara de crecimiento de plantas en comparación con el campo. Sin embargo, las limitaciones artificiales en el rendimiento debido a la escasa polinización debido a la ausencia de viento o insectos, o insuficiente espacio para crecimiento de cubierta o raíz madura, pueden restringir el uso de estos ambientes controlados para ensayar diferencias de rendimiento. Por lo tanto, las mediciones del tamaño de la planta en el desarrollo temprano, en condiciones normalizadas en una cámara de cultivo o invernadero, son prácticas convencionales para proporcionar indicios de potenciales ventajas para el rendimiento genético.

55 Durante el ciclo de vida, las plantas se exponen típicamente a condiciones de contenido de agua ambiental reducido. La mayoría de las plantas tienen estrategias evolucionadas para protegerse contra estas condiciones de desecación. Sin embargo, si la gravedad y duración de las condiciones de sequía son demasiado grandes, los efectos sobre el desarrollo, crecimiento, tamaño vegetal y rendimiento de la mayoría de las plantas de cultivo son profundos. La exposición continua a condiciones de sequía provoca alteraciones importantes en el metabolismo de las plantas que conducen en última instancia a la muerte celular y en consecuencia a pérdidas de rendimiento.

El desarrollo de plantas tolerantes a tensión es por lo tanto una estrategia que tiene el potencial de resolver o mediar en al menos algunos de estos problemas. Sin embargo, las estrategias de cultivo de plantas tradicionales para desarrollar nuevas líneas de plantas que muestren resistencia y/o tolerancia a estos tipos de tensiones son relativamente lentas y requieren líneas resistentes específicas para cruzar con la línea deseada. Los recursos limitados de germoplasma para tolerancia a la tensión e incompatibilidad en cruces entre especies vegetales distantemente relacionadas representan problemas significativos encontrados en el cultivo convencional. Adicionalmente, los procesos celulares que conducen a tolerancia a la sequía, frío y salinidad en plantas tolerantes a sequía, frío y/o salinidad modelo son de naturaleza compleja e implican múltiples mecanismos de adaptación celular y numerosas rutas metabólicas. Esta naturaleza multicomponente de la tolerancia a la tensión no solo ha hecho el cultivo con respecto a tolerancia en gran medida infructuoso, sino que también ha limitado la capacidad de obtener por ingeniería genética plantas tolerantes a tensión usando procedimientos biotecnológicos.

Por lo tanto, se necesita la identificación de los genes y proteínas implicados en estos procesos multicomponentes que conducen a aumento del crecimiento y/o aumento de la tolerancia a la tensión. Dilucidar la función de genes expresados en plantas tolerantes a tensión no solamente potenciará nuestro entendimiento de la adaptación vegetal y tolerancia a tensiones ambientales, sino que también puede proporcionar información importante para diseñar nuevas estrategias para la mejora de cultivos.

Las raíces son un órgano importante de las plantas superiores. Los sistemas de las raíces vegetales son fundamentales para el crecimiento y desarrollo apropiado de todas las especies vegetales terrestres. Además de captar agua y nutrientes y proporcionar soporte físico, las raíces median en un intercambio complejo pero escasamente entendido de comunicación entre microbios del suelo y otras plantas. En sistemas agrónomos, la producción se ve afectada por la disponibilidad de agua y nutrientes en el suelo: el crecimiento de las raíces tiene una influencia directa o indirecta en el crecimiento y producción de órganos aéreos, particularmente en condiciones de limitación de nutrientes. Las raíces también son relevantes para la producción de productos vegetales secundarios, tales como compuestos de defensa y hormonas vegetales. El establecimiento de la arquitectura de raíz apropiada es un factor importante para que la planta use eficazmente el agua y los nutrientes disponibles en el ambiente y para maximizar el crecimiento y producción vegetal. Además, en condiciones de sequía, las raíces pueden adaptarse para continuar el crecimiento produciendo y enviando a la vez señales de advertencia tempranas a brotes que inhiben el crecimiento vegetal por encima del suelo.

Además, el crecimiento de raíces mejorado de las plantas de cultivo también potenciará la competitividad con plantas de maleza y mejorará el crecimiento en áreas áridas, aumentando la accesibilidad y captación de agua. El crecimiento de la raíz mejorado también es relevante para fines ecológicos, tales como bio-remediación y prevención/detención de la erosión del suelo. Las raíces más largas pueden aliviar no solamente los efectos del agotamiento del agua del suelo sino también mejorar el anclaje de las plantas y su resistencia al volcado reduciendo de este modo su caída. Además, las raíces más largas tienen la capacidad de cubrir un volumen mayor de suelo y mejorar la captación de nutrientes. Por lo tanto, la alteración de la biomasa de las raíces, y en particular el aumento de la longitud de las raíces, mejorará el crecimiento de la planta así como aumentará el rendimiento del cultivo.

Las raíces también son órganos de almacenamiento en varios cultivos de primera necesidad importantes, por ejemplo, en remolacha azucarera, patata, mandioca (yuca), ñames y boniato (batata). Las raíces también son el órgano relevante para consumo en varias verduras (por ejemplo zanahorias, rábano), hierbas (por ejemplo jengibre, kukuma) y plantas medicinales (por ejemplo ginseng). Además, algunos de los productos vegetales secundarios hallados en las raíces tienen importancia económica para la industria química y farmacéutica, por ejemplo, las moléculas básicas para la síntesis de hormonas esteroideas se encuentran en ñames, y las raíces de *Lithospermum erythrorhizon* producen shikonina, que se usa ampliamente debido a sus propiedades antiinflamatorias, antitumorales y de curación de heridas.

La arquitectura de la raíz es un área que ha permanecido en general inexplorada mediante cultivo clásico debido a las dificultades en la evaluación de este rasgo en el campo. Por lo tanto, la biotecnología podría tener un impacto significativo en la mejora de este rasgo.

La estructura de los sistemas de las raíces resulta de una combinación de predisposición genética y ambiente físico. Adicionalmente, los microbios del suelo también pueden tener un efecto beneficioso en el crecimiento de las plantas reduciendo los efectos deletéreos de otros microbios patógenos, produciendo compuestos que promuevan el crecimiento vegetal o aumentando la eficacia de captación de nutrientes del ambiente. Un microbio puede usar uno o todos de estos mecanismos en diferentes estadios del ciclo de vida de la planta.

La hormona vegetal etileno se ha implicado en un amplio espectro de procesos de crecimiento y desarrollo vegetal. En plantas, 1- minociclopropano- 1-carboxilato (ACC) es un precursor biosintético esencial del etileno. Los estudios de finales de los años 70 revelaron que las bacterias del suelo que expresan una ACC desaminasa pueden reducir los niveles de etileno en las plantas conduciendo de este modo a elongación de las raíces (Brown, 1974, Ann. Rev. Phytopathol. 12: 181- 197; Honma y Shimomura, 1978, Agric. Biol. Chem. 42: 1825- 1831). Estos resultados se apoyaron por experimentos en los que se movilizaron genes que codificaban ACC desaminasa en bacterias no promotoras del crecimiento que a su vez conferían un efecto promotor del crecimiento (Shah y col., 1998, Can. J. Microbiol. 44: 833- 843). Más recientemente, se han expresado genes microbianos que codifican ACC desaminasa

directamente en plantas transgénicas y se ha mostrado que promueven la elongación de las raíces (Klee y col., 1991, Plant Cell 3 (11): 1187- 93; Reed y col., 1996, J. Ag. Food Chem. 44 (1): 388- 394) o el crecimiento en presencia de metales pesados (Grichko V P y col.; Journal of Biotechnology 2000), vol. 81, nº 1; Steams y col. Plant Physiology And Biochemistry, (2005) vol. 43, nº 7).

- 5 Aunque se han caracterizado algunos genes que están implicados en las respuestas a tensión en plantas, la caracterización y clonación de genes vegetales que confieren tolerancia a la tensión siguen siendo en gran medida incompletas y fragmentadas. Por ejemplo, ciertos estudios han indicado que la tensión de sequía y salinidad en algunas plantas puede deberse a efectos génicos aditivos, a diferencia de otra investigación que indica que se activan transcripcionalmente genes específicos en tejido vegetativo de plantas en condiciones de tensión osmótica.
- 10 Aunque generalmente se asume que las proteínas inducidas por tensión tienen un papel en la tolerancia, aún faltan pruebas directas, y las funciones de muchos genes sensibles a tensión se desconocen.

- 15 Existe una necesidad, por lo tanto, de identificar genes adicionales expresados en plantas tolerantes a tensión que tengan la capacidad de conferir mayor crecimiento de la raíz, mayor rendimiento y/o tolerancia a la tensión a su planta huésped y a otras especies vegetales. Las plantas tolerantes a tensión de nueva generación tendrán muchas ventajas, tales como un mayor intervalo en el que las plantas de cultivo pueden cultivarse, por ejemplo, reduciendo los requisitos de agua de una especie vegetal.

Sumario de la invención

- 20 La divulgación se refiere a ácidos nucleicos aislados que codifican polipéptidos capaces de modular el crecimiento de la raíz, el crecimiento de la planta, el rendimiento y/o la tolerancia a la tensión en condiciones normales o de tensión en comparación con una variedad natural de la planta. La invención se refiere al uso de los ácidos nucleicos aislados que codifican Polipéptidos de tipo 1-AminoCiclopropano- 1-Carboxilato Desaminasa (ACCDP) seleccionados del grupo que consiste en

- 25 a. un polinucleótido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID Nº: 1;
 b. un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID Nº: 2;
 c. un polinucleótido que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con el polinucleótido de a);
 d. un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con el polipéptido de b); y
 e. un polinucleótido cuya secuencia puede derivar de una secuencia polipeptídica codificada por cualquier molécula de ácido nucleico de a) a d) anterior, debido a la degeneración del código genético;

- 30 para aumentar en plantas de cultivo el crecimiento de la raíz y/o el rendimiento en condiciones normales o de tensión y/o la tolerancia a la tensión ambiental en comparación con una variedad natural no transformada de la planta, en el que la tensión ambiental se selecciona de una o más del grupo que consiste en salinidad, sequía o temperatura, o combinaciones de las mismas.

- 35 Por lo tanto, en una primera realización, la invención se refiere a una planta de cultivo transgénica transformada con, que comprende y sobreexpresa un ácido nucleico, en la que el ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un Polipéptido de tipo 1-Aminociclopropano-1-carboxilato Desaminasa (ACCDP) seleccionado del grupo que consiste en:

- 40 a. un polinucleótido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID Nº: 1;
 b. un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID Nº: 2;
 c. un polinucleótido que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con el polinucleótido de a) anterior;
 d. un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido de b) anterior; y
 e. un polinucleótido cuya secuencia puede derivar de una secuencia polipeptídica codificada por cualquier molécula de ácido nucleico de a) a d) anterior, debido a la degeneración del código genético;

- 45 y en el que el polinucleótido codifica un ACCDP vegetal, y en el que la expresión del polinucleótido en la planta da como resultado

- 50 1. aumento de la tolerancia a la tensión para una tensión ambiental en comparación con la planta de cultivo natural no transformada, en el que la tensión ambiental se selecciona de una o más del grupo que consiste en salinidad, sequía o temperatura, o combinaciones de las mismas; o
 2. aumento del crecimiento de las raíces en condiciones normales o de tensión en comparación con la planta de cultivo natural no transformada, o
 3. aumento del rendimiento en condiciones normales o de tensión en comparación con la planta de cultivo natural no transformada,

- 55 en el que la planta se selecciona del grupo que consiste en maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, sorgo, mijo, caña de azúcar, soja, cacahuete, algodón, colza, canola, *Manihot*, pimiento, girasol, *Tagetes*, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especies de *Vicia*, guisante, alfalfa, café, cacao, té, especies de *Salix*, palma aceitera, coco, hierba perenne y una planta de cultivo de forraje.

Preferentemente, el ACCDP es de *Arabidopsis thaliana*, canola, soja, arroz, trigo, linaza, cebada, girasol o maíz.

En otra realización, la invención se refiere a plantas de cultivo transgénicas que sobreexpresan el ácido nucleico que codifica ACCDP y demuestran un aumento de la longitud de la raíz en condiciones normales o de tensión en comparación con una variedad natural de la planta. En una realización, la sobreexpresión del ácido nucleico que codifica ACCDP en la planta de cultivo demuestra una mayor tolerancia a una tensión ambiental en comparación con una variedad natural de la planta. En otra realización más, la sobreexpresión del ácido nucleico que codifica ACCDP en la planta de cultivo demuestra mayor rendimiento en comparación con una variedad natural de la planta. Se proporciona que la tensión ambiental se selecciona de una o más del grupo que consiste en salinidad, sequía o temperatura, o combinaciones de las mismas. Preferentemente, la tensión ambiental es tensión por sequía.

- 5
- 10 En otra realización más, la invención se refiere a una semilla producida por una planta de cultivo transgénica transformada por un ácido nucleico que codifica ACCDP, en la que la planta es genéticamente pura con respecto a mayor crecimiento de la raíz, mayor rendimiento y/o mayor tolerancia a la tensión ambiental en comparación con una variedad natural de la planta.

Además la divulgación se refiere a un procedimiento para cultivar plantas de cultivo en una localización agrícola, en el que el procedimiento comprende obtener la planta de cultivo transgénica anteriormente mencionada y cultivar la planta en una localización agrícola.

En un aspecto adicional más, la divulgación se refiere a producto producido por o de las planta transgénicas, sus partes vegetales, o sus semillas, tales como un producto alimentario, pienso, complemento alimentario, complemento de pienso, producto cosmético o producto farmacéutico.

- 20 En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento para aumentar el crecimiento de la raíz, el rendimiento y/o aumentar la tolerancia a la tensión para una tensión ambiental de una planta de cultivo en condiciones normales o de tensión en comparación con una variedad natural de la planta, en el que el procedimiento comprende aumentar la expresión de un Polipéptido de tipo 1-Aminociclopropano-1-carboxilato Desaminasa (ACCDP) transformando la planta de cultivo con y sobreexpresión de un ácido nucleico que codifica el ACCDP, en el que el ACCDP se codifica por un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- 25
- a. un polinucleótido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID N°: 1;
 - b. un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID N°: 2;
 - c. un polinucleótido que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con el polinucleótido de a);
 - d. un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con el polipéptido de b); y
 - e. un polinucleótido cuya secuencia puede derivar de una secuencia polipeptídica codificada por cualquier molécula de ácido nucleico de a) a d) anterior, debido a la degeneración del código genético;

en el que la tensión ambiental se selecciona de una o más del grupo que consiste en salinidad, sequía o temperatura, o combinaciones de las mismas.

- 35 En otra realización más, la divulgación se refiere a un procedimiento para producir la planta de cultivo transgénico anteriormente mencionada, en el que el procedimiento comprende (a) transformar una célula vegetal con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica ACCDP y (b) generar a partir de la célula vegetal la planta de cultivo transgénica que expresa el polipéptido codificado. Preferentemente, el polinucleótido está unido operativamente a una o más secuencias reguladoras, y la expresión del polinucleótido en la planta da como resultado aumento del crecimiento de la raíz, aumento del rendimiento, y/o aumento de la tolerancia a la tensión ambiental en condiciones normales o de tensión en comparación con una variedad natural de la planta. Preferentemente, la o las secuencias reguladoras incluyen un promotor. Más preferentemente, el promotor es un promotor específico de tejido o regulado por el desarrollo.

- 40
- 45 En una variación adicional, la divulgación se refiere un ácido que codifica un ACCDP nuevo, aislado, en el que el ácido nucleico comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un polinucleótido que tiene una secuencia como se expone en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 2;
- b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como se expone en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 2;
- 50 c) un polinucleótido que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con un polinucleótido que tiene una secuencia como se expone en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 2;
- d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene una secuencia como se expone en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 2;
- 55 e) un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con el complemento de cualquiera de los polinucleótidos de a) a d) anteriores; y
- f) un polinucleótido complementario de cualquiera de los polinucleótidos de a) a d) anteriores.

En otra realización, la invención se refiere a una planta de cultivo transgénica transformada con, que comprende y que sobreexpresa dichos ácidos nucleicos aislados, y una semilla producida por dicha planta transgénica, en la que la planta transgénica expresa dichos ácidos nucleicos aislados para alterar el fenotipo de las plantas en relación con plantas naturales no transformadas, de modo que la planta transgénica muestre aumento del crecimiento de la raíz, del crecimiento de la planta, del rendimiento y/o de la tolerancia a la tensión en condiciones normales o de tensión en comparación con una variedad natural de la planta.

En otra variación más, la divulgación se refiere a un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica ACCDP aislado, en el que el ácido nucleico comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un polinucleótido que tiene una secuencia como se expone en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2;
- b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como se expone en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2;
- c) un polinucleótido que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con un polinucleótido que tiene una secuencia como se expone en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2;
- d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene una secuencia como se expone en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2;
- e) un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con el complemento de cualquiera de los polinucleótidos de a) a d) anteriores; y
- f) un polinucleótido complementario de cualquiera de los polinucleótidos de a) a d) anteriores.

Preferentemente, el polinucleótido está unido operativamente a una o más secuencias reguladoras. Más preferentemente, la o las secuencias reguladoras incluyen un promotor. Más preferentemente, el promotor es un promotor específico de tejido o regulado por el desarrollo.

En una realización adicional, la divulgación se refiere a una planta transgénica que comprende dicho vector recombinante. Preferentemente, la expresión del ácido nucleico que codifica ACCDP en la planta da como resultado aumento del crecimiento de la raíz, aumento del rendimiento y/o aumento de la tolerancia a la tensión ambiental en comparación con una variedad natural de la planta.

- La memoria descriptiva describe un procedimiento para identificar un nuevo ACCDP, que comprende (a) elevar una respuesta de anticuerpo específica a un ACCDP, o fragmento del mismo, como se describe posteriormente; (b) explorar material de ACCDP potencial con el anticuerpo, en el que la unión específica del anticuerpo con el material indica la presencia de un ACCDP potencialmente nuevo; y (c) identificar a partir del material unido un nuevo ACCDP en comparación con un ACCDP conocido. Como alternativa, la hibridación con sondas de ácido nucleico como se describe posteriormente puede usarse para identificar nuevos ácidos nucleicos de ACCDP.

En una realización adicional, la invención también se refiere a procedimientos para modificar el crecimiento de la raíz, el rendimiento y/o la tolerancia a la tensión de una planta que comprenden modificar la expresión de un ácido nucleico que codifica ACCDP en la planta. Preferentemente, dicha modificación da como resultado aumento o reducción del crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a la tensión en comparación con una variedad natural de la planta. Preferentemente, el crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a la tensión aumentan en una planta mediante aumento de la expresión de un ácido nucleico que codifica ACCDP.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos del gen de AtACCD (SEC ID N°: 1; At1g48420) usado para la transformación de *Arabidopsis*, que es de 1246 pb de longitud. La región codificante del gen es de 1203 pb de longitud con el codón de inicio (es decir ATG) y el codón de parada (es decir TAG) subrayados.

La Figura 2 muestra la secuencia de 401 aminoácidos predicha del gen de AtACCD (SEC ID N°: 2) usado para la transformación de *Arabidopsis*.

La Figura 3 muestra un esquema del ADN-T de vector binario usado para transformar el gen de AtACCD (SEC ID N°: 1). LB, límite izquierdo, pAHAS, promotor de AHAS de *Arabidopsis*; 3' AHAS, señal de terminación de AHAS; SP, Superpromotor; AtACCD, ADNc de AtACCD; 3' NOS, señal de terminación; RB, Límite Derecho.

Las Figuras 4A y 4B muestran un análisis de placa de las plantas transgénicas para AtACCD de *Arabidopsis* (SEC ID N°: 1). 4A demuestra que todas las líneas mostraron un fenotipo de longitud de raíz aumentada. Las líneas 2, 3, 5, 6 y 9 mostraron un aumento de longitud de raíz más significativo en comparación con los controles naturales. 4B muestra el análisis de nivel génico de las plantas transgénicas para AtACCD que confirma que las plantas de AtACCD mostraron un fenotipo de longitud de raíz aumentada. Basándose en este análisis, las plantas transgénicas para AtACCD mostraron un aumento del 13,8 % en la longitud de la raíz. Tanto en 4A como en 4B, las tablas adjuntas muestran los valores medios reales usados para generar los diagramas de barras.

La Figura 5 muestra el análisis en suelo de raíces de las plantas de AtACCD (SEC ID N°: 1), en el que se midió la longitud de la raíz de líneas de *Arabidopsis* de AtACCD.

La Figura 6 muestra el análisis de ANOVA del nivel génico de las plantas transgénicas para AtACCD (SEC ID N°: 1). Los datos de análisis de todas las líneas transgénicas se combinó para determinar el rendimiento génico global.

5 La Figura 7 muestra el análisis de ANOVA del nivel génico de pesos secos de roseta en las plantas transgénicas para AtACCD (SEC ID N°: 1).

La Figura 8 muestra los resultados de análisis de tblastn de AtACCD (SEC ID N°: 2) frente a la base de datos de la secuencia de cultivo patentada. La tabla muestra el porcentaje de identidad de secuencias entre las secuencias de aminoácidos de AtACCD (SEC ID N° 2) y GmACCD-1 (SEC ID N°: 355), OsACCD (SEC ID N°: 353), ZmACCD-1
10 (SEC ID N°: 351) o TaACCD (SEC ID N° 357).

La Figura 9 muestra el alineamiento de Blast entre las secuencias de aminoácidos de AtACCD (SEC ID N°: 2, "Consulta") y GmACCD (SEC ID N°: 355, "Sujeto").

La Figura 10 muestra el alineamiento de Blast entre las secuencias de aminoácidos de AtACCD (SEC ID N°: 2, "Consulta") y OsACCD (SEC ID N°: 353, "Sujeto").

15 La Figura 11 muestra el alineamiento de Blast entre las secuencias de aminoácidos de AtACCD (SEC ID N°: 2, "Consulta") y ZmACCD (SEC ID N°: 351, "Sujeto").

La Figura 12 muestra el alineamiento de Blast entre las secuencias de aminoácidos de AtACCD (SEC ID N°: 2, "Consulta") y TaACCD (SEC ID N°: 357, "Sujeto").

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención puede entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención y los Ejemplos incluidos en el presente documento. Sin embargo, antes de que se desvelen y describan los presentes compuestos, composiciones y procedimientos, debe entenderse que la presente divulgación no se limita a ácidos nucleicos específicos, polipéptidos específicos, tipos celulares específicos, células huésped específicas, condiciones específicas o procedimientos específicos, etc., ya que estos pueden, por
25 supuesto, variar, y las numerosas modificaciones y variaciones en los mismos resultarán evidentes para los expertos en la materia. Debe entenderse también que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones específicas solamente y no se pretende que sea limitante.

La presente divulgación se refiere a ACCDP y ácidos nucleicos que codifican ACCDP que son importantes en el aumento del crecimiento de las raíces de las plantas, rendimiento y/o para modular la respuesta de una planta a una
30 tensión ambiental. Más particularmente, la sobreexpresión de estos ácidos nucleicos que codifican ACCDP en una planta de cultivo da como resultado modulación (aumento o reducción, preferentemente aumento) del crecimiento de la raíz, aumento del rendimiento y/o aumento de la tolerancia a una tensión ambiental. Son miembros representativos del género ACCDP AtACCD, ZmACCD, OsACCD, GmACCD y TaACCD. En una realización preferida, todos los miembros del género son enzimas biológicamente activas que pueden convertir ACC a α -
35 ketobutirato y amoniaco.

En consecuencia, la presente divulgación abarca una planta de cultivo transgénica que comprende secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas de ACCDP y un procedimiento para producir dicha planta de cultivo transgénica, en la que la expresión del polipéptido ACCDP en la planta da como resultado aumento del crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a una tensión ambiental. En una realización, las secuencias de ACCDP empleadas en los
40 procedimientos, plantas de cultivo y semillas de la invención son de una planta, preferentemente de una planta de *Arabidopsis*, una planta de canola, una planta de soja, una planta de arroz, una planta de cebada, una planta de girasol, una planta de linaza, una planta de trigo o una planta de maíz. En otra variación de la divulgación, las secuencias de ACCDP son los genes que se resumen en la Tabla 1 y la Tabla 2. Preferentemente, las secuencias de ACCDP desveladas tienen porcentaje de identidad significativo con enzimas de ACCDP conocidas.

45 Tabla 1. Genes de ACCDP, su origen, secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos correspondiente, y su porcentaje de identidad compartida con AtACCD (SEC ID N°: 2) en el nivel de aminoácidos (algoritmo de Needleman-Wunsch para alineamiento de secuencias global, J. Mol. Biol. 48(3): 443-53; Matriz: Blosum 62; Penalización de apertura de hueco: 10,0; Penalización de extensión de hueco: 2,0)

Columna N° 1	Columna N° 2	Columna N° 3	Columna N° 4	Columna N° 5
Nombre del gen	Organismo	SEC ID N° de Nucleótidos	SEC ID N° de Aminoácidos	Identidad con AtACCD (%)
AtACCD	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	2	100

ES 2 437 577 T3

(continuación)

Columna N° 1	Columna N° 2	Columna N° 3	Columna N° 4	Columna N° 5
Nombre del gen	Organismo	SEC ID N° de Nucleótidos	SEC ID N° de Aminoácidos	Identidad con AtACCD (%)
BPS_WIPO_PROT SL 000001.11101	<i>Arabidopsis thaliana</i>		3	70
BPS_WIPO_PROT US 20040123343A1.1594 74	<i>Oryza sativa</i>	4	5	31
BPS_WIPO_PROT US 20040214272A1.2274 58	<i>Zea mays</i>	6	7	35
BPS_WIPO_PROT US 20040214272A1.2274 58	<i>Zea mays</i>	8	9	69
AP_002534	<i>Escherichia coli</i>	10	11	29
NP_142071	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	12	13	30
NP_281783	<i>Campylobacter jejuni</i>	14	15	20
NP_288380	<i>Escherichia coli</i>	16	17	31
NP_420839	<i>Caulobacter crescentus</i>	18	19	30
NP_456516	<i>Salmonella enterica</i>	20	21	29
NP_460906	<i>Salmonella typhimurium</i>	22	23	30
NP_488487	<i>Nostoc sp.</i>	24	25	22
NP_577739	<i>Pyrococcus furiosus</i>	26	27	30
NP_669768	<i>Yersinia pestis</i>	28	29	28
NP_707806	<i>Shigella flexneri</i> cepa 2a	30	31	30
NP_744159	<i>Pseudomonas putida</i>	32	33	20
NP_754225	<i>Escherichia coli</i>	34	35	29
NP_794910	<i>Pseudomonas syringae</i>	36	37	27
NP_822695	<i>Streptomyces avermitilis</i>	38	39	29
NP_824185	<i>Streptomyces avermitilis</i>	40	41	21
NP_832957	<i>Bacillus cereus</i>	42	43	30
NP_845541	<i>Bacillus anthracis</i>	44	45	30
NP_891079	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	46	47	29
NP_917071	<i>Oryza sativa</i>	48	49	21
NP_979563	<i>Bacillus cereus</i>	50	51	29
XP_366736	<i>Magnaporthe grisea</i>	52	53	28
XP_382854	<i>Gibberella zeae</i>	54	55	24
XP_468034	<i>Oryza sativa</i>	56	57	68

ES 2 437 577 T3

(continuación)

Columna N° 1	Columna N° 2	Columna N° 3	Columna N° 4	Columna N° 5
Nombre del gen	Organismo	SEC ID N° de Nucleótidos	SEC ID N° de Aminoácidos	Identidad con AtACCD (%)
XP_682168	<i>Aspergillus nidulans</i>	58	59	23
XP_748001	<i>Aspergillus fumigatus</i>	60	61	26
XP_749239	<i>Aspergillus fumigatus</i>	62	63	25
XP_782004	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	64	65	37
XP_783308	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	66	67	38
XP_787534	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	68	69	39
XP_797948	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	70	71	38
XP_959200	<i>Neurospora crassa</i>	72	73	24
YP_011858	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	74	75	26
YP_037315	<i>Bacillus thuringiensis</i>	76	77	30
YP_045480	<i>Acinetobacter</i> sp.	78	79	23
YP_049633	<i>Erwinia carotovora</i>	80	81	31
YP_065241	<i>Desulfotalea psychrophila</i>	82	83	27
YP_065245	<i>Desulfotalea psychrophila</i>	84	85	28
YP_070243	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	86	87	28
YP_084517	<i>Bacillus cereus</i>	88	89	30
YP_103707	<i>Burkholderia mallei</i>	90	91	27
YP_109214	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	92	93	27
YP_150207	<i>Salmonella enterica</i>	94	95	30
YP_164989	<i>Silicibacter pomeroyi</i>	96	97	32
YP_167867	<i>Silicibacter pomeroyi</i>	98	99	33
YP_216944	<i>Salmonella enterica</i>	100	101	30
YP_233469	<i>Pseudomonas syringae</i>	102	103	27
YP_234762	<i>Pseudomonas syringae</i>	104	105	21
YP_234886	<i>Pseudomonas syringae</i>	106	107	24
YP_257395	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	108	109	27
YP_264886	<i>Psychrobacter arcticus</i>	110	111	29
YP_271227	<i>Colwellia psychrerythraea</i>	112	113	23

ES 2 437 577 T3

(continuación)

Columna N° 1	Columna N° 2	Columna N° 3	Columna N° 4	Columna N° 5
Nombre del gen	Organismo	SEC ID N° de Nucleótidos	SEC ID N° de Aminoácidos	Identidad con AtACCD (%)
YP_272646	<i>Pseudomonas syringae</i>	114	115	27
YP_273913	<i>Pseudomonas syringae</i>	116	117	22
YP_273996	<i>Pseudomonas syringae</i>	118	119	24
YP_297784	<i>Ralstonia eutropha</i>	120	121	26
YP_300428	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	122	123	32
YP_310154	<i>Shigella sonnei</i>	124	125	29
YP_321891	<i>Anabaena variabilis</i>	126	127	23
YP_335503	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	128	129	24
YP_341190	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	130	131	24
YP_345978	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	132	133	27
YP_366559	<i>Burkholderia</i> sp.	134	135	30
YP_373615	<i>Burkholderia</i> sp.	136	137	25
YP_389072	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	138	139	28
YP_391222	<i>Thiomicrospira crunogena</i>	140	141	22
YP_402750	<i>Shigella dysenteriae</i>	142	143	30
YP_407560	<i>Shigella boydii</i>	144	145	31
YP_435720	<i>Hahella chejuensis</i>	146	147	22
YP_439298	<i>Burkholderia thailandensis</i>	148	149	24
YP_454591	<i>Sodalis glossinidius</i>	150	151	26
YP_464642	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	152	153	32
YP_510818	<i>Jannaschia</i> sp.	154	155	26
YP_527135	<i>Saccharophagus degradans</i>	156	157	34
YP_527202	<i>Saccharophagus degradans</i>	158	159	23
YP_541124	<i>Escherichia coli</i>	160	161	29
YP_548994	<i>Polaromonas</i> sp.	162	163	26
YP_550624	<i>Polaromonas</i> sp.	164	165	25
YP_554094	<i>Burkholderia xenovorans</i>	166	167	24

ES 2 437 577 T3

(continuación)

Columna Nº 1	Columna Nº 2	Columna Nº 3	Columna Nº 4	Columna Nº 5
Nombre del gen	Organismo	SEC ID Nº de Nucleótidos	SEC ID Nº de Aminoácidos	Identidad con AtACCD (%)
YP_581089	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	168	169	29
ZP_00105754	<i>Nostoc punctiforme</i>	170	171	22
ZP_00204949	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	172	173	21
ZP_00235416	<i>Bacillus cereus</i>	174	175	30
ZP_00241961	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	176	177	24
ZP_00308173	<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	178	179	24
ZP_00378456	<i>Brevibacterium linens</i>	180	181	30
ZP_00378517	<i>Brevibacterium linens</i>	182	183	25
ZP_00422441	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	184	185	24
ZP_00452460	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	186	187	24
ZP_00619434	<i>Kineococcus radiotolerans</i>	188	189	29
ZP_00655563	<i>Nocardioides</i> sp.	190	191	26
ZP_00655579	<i>Nocardioides</i> sp.	192	193	24
ZP_00666038	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	194	195	28
ZP_00686013	<i>Burkholderia ambifaria</i>	196	197	24
ZP_00695539	<i>Shigella boydii</i>	198	199	29
ZP_00704208	<i>Escherichia coli</i>	200	201	30
ZP_00706049	<i>Escherichia coli</i>	202	203	29
ZP_00715158	<i>Escherichia coli</i>	204	205	29
ZP_00774185	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	206	207	22
ZP_00774405	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	208	209	32
ZP_00777501	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	210	211	28
ZP_00791500	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	212	213	28
ZP_00799744	<i>Alkaliphilus metalliredigenes</i>	214	215	35
ZP_00808738	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	216	217	30
ZP_00861350	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	218	219	24

ES 2 437 577 T3

(continuación)

Columna Nº 1	Columna Nº 2	Columna Nº 3	Columna Nº 4	Columna Nº 5
Nombre del gen	Organismo	SEC ID Nº de Nucleótidos	SEC ID Nº de Aminoácidos	Identidad con AtACCD (%)
ZP_00923697	<i>Escherichia coli</i>	220	221	29
ZP_00944339	<i>Ralstonia solanacearum</i>	222	223	24
ZP_00959540	<i>Roseovarius nubinhibens</i>	224	225	25
ZP_00961132	<i>Roseovarius nubinhibens</i>	226	227	30
ZP_00968640	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	228	229	21
ZP_00974363	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	230	231	21
ZP_00976764	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	232	233	22
ZP_00978652	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	234	235	25
ZP_00983649	<i>Burkholderia dolosa</i>	236	237	25
ZP_01019104	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	238	239	26
ZP_01027677	<i>Burkholderia mallei</i>	240	241	27
ZP_01035983	<i>Roseovarius</i> sp.	242	243	29
ZP_01037089	<i>Roseovarius</i> sp.	244	245	32
ZP_01050656	<i>Cellulophaga</i> sp.	246	247	24
ZP_01053873	<i>Tenacibaculum</i> sp.	248	249	25
ZP_01060636	<i>Flavobacterium</i> sp.	250	251	24
ZP_01070075	<i>Campylobacter jejuni</i>	252	253	20
ZP_01074915	<i>Marinomonas</i> sp.	254	255	20
ZP_01102706	<i>gamma proteobacterium</i>	256	257	30
ZP_01104195	<i>gamma proteobacterium</i>	258	259	26
ZP_01107544	<i>Flavobacteriales bacterium</i>	260	261	25
ZP_01110185	<i>Alteromonas macleodii</i>	262	263	21
ZP_01116950	<i>Polaribacter irgensii</i>	264	265	24
ZP_01120549	<i>Robiginitalea biformata</i>	266	267	23
ZP_01129787	<i>marine actinobacterium</i>	268	269	24
ZP_01150242	<i>Desulfotomaculum reducens</i>	270	271	28
ZP_01150249	<i>Desulfotomaculum reducens</i>	272	273	29
ZP_01168090	<i>Oceanospirillum</i> sp.	274	275	21
ZP_01184367	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	276	277	31

ES 2 437 577 T3

(continuación)

Columna Nº 1	Columna Nº 2	Columna Nº 3	Columna Nº 4	Columna Nº 5
Nombre del gen	Organismo	SEC ID Nº de Nucleótidos	SEC ID Nº de Aminoácidos	Identidad con AtACCD (%)
ZP_01196859	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	278	279	26
ZP_01200770	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	280	281	27
ZP 01201978	<i>Flavobacteria bacterium</i>	282	283	24
ZP_01223813	<i>marine gamma</i>	284	285	34
ZP_01246005	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	286	287	24
ZP_01252717	<i>Psychroflexus torques</i>	288	289	24
ZP_01296455	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	290	291	21
Q1WLF4_RHIME	<i>Rhizobium meliloti</i>	292	293	24
Q2U8N3_ASPOR	<i>Aspergillus oryzae</i>	294	295	27
Q2UA44_ASPOR	<i>Aspergillus oryzae</i>	296	297	25
Q872C9_NEUCR	<i>Neurospora crassa</i>	298	299	26
Q8KJA8_RHILO	<i>Rhizobium loti</i>	300	301	24
Q8W4C7_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	302	303	95
Q9P964_PENCI	<i>Penicillium citrinum</i>	304	305	25
Q9SX74_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	306	307	96
1A1D_BRAJA	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	308	309	24
1A1D_BURMA	<i>Burkholderia mallei</i>	310	311	24
1A1D_CRYNE	<i>Cryptococcus neoformans</i>	312	313	25
1A1D_ENTCL	<i>Enterobacter cloacae</i>	314	315	23
1A1D_PSEFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	316	317	25
1A1D_PSEPU	<i>Pseudomonas putida</i>	318	319	24
1A1D_PSESO	<i>Pseudomonas sp pseudomonas</i>	320	321	24
1A1D_PSESM	<i>Pseudomonas syringae</i>	322	323	24
1A1D_PSEUD	<i>Pseudomonas sp</i>	324	325	24
1A1D_PYRAB	<i>Pyrococcus abyssi</i>	326	327	30
1A1D_RALSO	<i>Ralstonia solanacearum</i>	328	329	24
1A1D_RHILO	<i>Rhizobium loti</i>	330	331	23
1A1D_RHILV	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	332	333	24

(continuación)

Columna N° 1	Columna N° 2	Columna N° 3	Columna N° 4	Columna N° 5
Nombre del gen	Organismo	SEC ID N° de Nucleótidos	SEC ID N° de Aminoácidos	Identidad con AtACCD (%)
1A1D_SCHPO	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	334	335	27
1A1D_THEMA	<i>Thermotoga maritima</i>	336	337	32
1A1D_VARPD	<i>Variovorax paradoxus</i>	338	339	23
DCYD_YERPE	<i>Yersinia pestis</i>	340	341	28

Tabla 2. Genes de ACCDP nuevos, su origen, secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos correspondiente, y su porcentaje de identidad compartido con AtACCD (SEC ID N°: 2) al nivel de aminoácidos (algoritmo de Needleman-Wunsch para alineamiento de secuencia global, J. Mol. Biol. 48(3): 443-53; Matriz: Blosum 62; Penalización de apertura de hueco: 10,0; Penalización de extensión de hueco: 2,0)

Columna N° 1	Columna N° 2	Columna N° 3	Columna N° 4	Columna N° 5
Nombre del gen	Organismo	SEC ID N° de Nucleótidos	SEC ID N° de Aminoácidos	Identidad con AtACCD (%)
GmACCD-2 (48982441_singleclone)	<i>Glycine max</i>	342	343	72
BnACCD (49287365_singleclone)	<i>Brassica napus</i>	344	345	86
ZmACCD-2 (62053108_singleclone)	<i>Zea mays</i>	346	347	68
ZmACCD-3 (62053108_singlecloneDLM)	<i>Zea mays</i>	348	349	57
ZmACCD-1	<i>Zea mays</i>	350	351	69
OsACCD	arroz	352	353	69
GmACCD-1	<i>Glycine max</i>	354	355	74
TaACCD	trigo	356	357	67

- 5 La presente divulgación abarca además nuevas secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas de ACCDP y su uso para aumentar el crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a una tensión ambiental de una planta. En esta variación de la divulgación, las secuencias de ACCDP son de canola, soja, arroz, trigo o maíz, u homólogos de las mismas. Preferentemente en esta variación de la divulgación, las secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas de ACCDP son las de canola, soja, arroz, trigo o maíz como se expone en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en las Columnas N° 3 y 4 de la Tabla 2.

10 La presente invención proporciona una planta de cultivo transgénica transformada por un ácido nucleico que codifica ACCDP, en la que la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la planta da como resultado aumento del crecimiento de la raíz, aumento del rendimiento y/o aumento de la tolerancia a una tensión ambiental en comparación con una variedad natural de la planta. En particular, el aumento del crecimiento de la raíz es un aumento en la longitud de las raíces. Puede entenderse que el término "planta" como se usa en el presente documento, dependiendo del contexto, se refiere a plantas completas, células vegetales y partes de plantas incluyendo semillas. Las partes de plantas incluyen, pero sin limitación, tallos, raíces, óvulos, estambres, hojas, embriones, regiones meristémicas, tejido calloso, gametofitos, esporofitos, polen, microsporas y similares. En una variación de la divulgación, la planta transgénica es masculina estéril. También se proporciona una semilla de planta de cultivo producida por una planta transgénica transformada por un ácido nucleico que codifica ACCDP, en la que la semilla contiene el ácido nucleico que codifica ACCDP, y en la que la planta es genéticamente pura con respecto a aumento del crecimiento de la raíz, aumento del rendimiento y/o aumento de la tolerancia a la tensión ambiental en comparación con una variedad natural de la planta. La invención proporciona además una semilla producida por una planta de cultivo transgénica que expresa un ACCDP, en la que la semilla contiene el ACCDP, y en la que la planta

es genéticamente pura con respecto a aumento del crecimiento de la raíz, aumento del rendimiento y/o aumento de la tolerancia a la tensión ambiental en comparación con una variedad natural de la planta. La divulgación también proporciona un producto producido por o de las plantas transgénicas que expresan el ácido nucleico que codifica ACCDP, sus partes vegetales o sus semillas. El producto puede obtenerse usando diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Como se usa en el presente documento, la palabra “producto” incluye, pero sin limitación, un producto alimentario, pienso, un complemento alimentario, complemento de pienso, producto cosmético o producto farmacéutico. Los productos alimentarios se consideran composiciones usadas para nutrición. Estos también incluyen composiciones para complementar la nutrición. Los piensos animales y complementos de piensos animales, en particular, se consideran productos alimentarios. La divulgación proporciona además un producto agrícola producido por cualquiera de las plantas transgénicas, partes de plantas y semillas de plantas. Los productos agrícolas incluyen, pero sin limitación, extractos vegetales, proteínas, aminoácidos, carbohidratos, grasas, aceites, polímeros, vitaminas y similares.

Como se usa en el presente documento, el término “variedad” se refiere a un grupo de plantas dentro de una especie que comparten caracteres constantes que los separan de la forma típica y de otras posibles variedades dentro de esa especie. Aunque posee al menos un rasgo distintivo, una variedad también se caracteriza por cierta variación entre los individuos dentro de la variedad, basándose principalmente en la segregación Mendeliana de rasgos entre la descendencia de generaciones sucesivas. Se considera que una variedad es “genéticamente pura” para un rasgo particular si es genéticamente homocigota para ese rasgo en la medida en que, cuando la variedad genéticamente pura se autopoliniza, no se observa una cantidad significativa de segregación independiente del rasgo entre la descendencia. En la presente invención, el rasgo surge de la expresión transgénica de una o más secuencias de ADN introducidas en una variedad vegetal.

Se entiende que las plantas de cultivo de acuerdo con la invención incluyen plantas de cultivo dicotiledóneas tales como, por ejemplo, de las familias de las Leguminosas tales como guisante, alfalfa y soja; la familia de las Umbelíferas, particularmente el género *Daucus* (muy particularmente la especie *carota* (zanahoria)) y *Apium* (muy particularmente la especie *graveolens* variedad dulce (apio)) y muchas otras; la familia de las Solanáceas, particularmente el género *Lycopersicon*, muy particularmente la especie *esculentum* (tomate) y el género *Solanum*, muy particularmente la especie *tuberosum* (patata) y *melongena* (berenjena), tabaco y muchas otras; y el género *Capsicum*, muy particularmente la especie *annum* (pimiento) y muchas otras; la familia de las Leguminosas, particularmente el género *Glycine*, muy particularmente la especie *max* (soja) y muchas otras; y la familia de las Crucíferas, particularmente el género *Brassica*, muy particularmente la especie *napus* (colza), *campestris* (remolacha), *oleracea* cv Tastie (repollo), *oleracea* cv Snowball Y (coliflor) y *oleracea* cv Emperor (brócoli); y el género *Arabidopsis*, muy particularmente la especie *thaliana* y muchas otras; la familia de las Compuestas, particularmente el género *Lactuca*, muy particularmente la especie *sativa* (lechuga) y muchas otras; y la familia de las Malváceas, particularmente el género *Gossypium*, muy particularmente la especie conocida como algodón; y la familia de las Fabáceas, particularmente el género *Arachis*, muy particularmente la especie *hypogaea* (cacahuete).

Las plantas de cultivo de acuerdo con la invención también incluyen plantas de cultivo monocotiledóneas, tales como, por ejemplo, cereales tales como trigo, cebada, sorgo y mijo, centeno, triticale, maíz, arroz o avena, y caña de azúcar. Se prefieren además árboles tales como manzano, peral, membrillo, ciruelo, cerezo, melocotonero, nectarina, albaricoquero, papaya, mango y otras especies leñosas incluyendo coníferas y árboles de hoja caduca tales como álamo, pino, secuoya, cedro, roble, etc. Se prefieren especialmente *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, colza, soja, maíz, trigo, linaza, patata y *Tagetes*.

La presente invención describe por primera vez que el ACCDP es útil para aumentar el crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a la tensión ambiental de una planta de cultivo. Como se usa en el presente documento, el término polipéptido se refiere a una cadena de al menos cuatro aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. La cadena puede ser lineal, ramificada, circular, o combinaciones de las mismas. En consecuencia, la presente divulgación posibilita el uso en plantas de cultivo de ACCDP aislados seleccionados de cualquiera de los organismos proporcionados en la Columna N° 2 de la Tabla 1 y la Tabla 2, y homólogos de los mismos. En realizaciones preferidas de la invención, el ACCDP se selecciona de: 1) los polipéptidos de ACCDP de SEC ID N°: 2; y 2) homólogos y ortólogos de los mismos. Se definen posteriormente homólogos y ortólogos de las secuencias de aminoácidos.

Los ACCDP de la presente divulgación se producen preferentemente por técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, se clona una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido en un vector de expresión (como se describe posteriormente), se introduce el vector de expresión en una célula huésped (como se describe posteriormente) y el ACCDP se expresa en la célula huésped. El ACCDP puede después aislarse de las células por un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de polipéptidos convencionales. Para los fines de la invención, la expresión “polinucleótido recombinante” se refiere a un polinucleótido que se ha alterado, reordenado o modificado por ingeniería genética. Los ejemplos incluyen cualquier polinucleótido clonado, y polinucleótidos que se han ligado o unido a secuencias heterólogas. El término “recombinante” no se refiere a alteraciones de polinucleótidos que resultan de acontecimientos de origen natural, tales como mutaciones espontáneas. Como alternativa a la expresión recombinante, un ACCDP, o péptido del mismo, puede sintetizarse químicamente usando técnicas de síntesis peptídica convencionales. Además, puede aislarse ACCDP nativo de células (por ejemplo, células de *Arabidopsis thaliana*), por ejemplo usando un anticuerpo anti-ACCDP, que puede

producirse por técnicas convencionales utilizando un ACCDP o fragmento del mismo.

Como se usa en el presente documento, la expresión “tensión ambiental” se refiere a tensión ambiental seleccionada de una o más del grupo que consiste en salinidad, sequía o temperatura, o combinaciones de las mismas, y en particular, puede seleccionarse de una o más del grupo que consiste en alta salinidad, bajo contenido en agua (sequía) o baja temperatura. En una realización más preferida, la tensión ambiental es tensión por sequía. Como se usa también en el presente documento, la expresión “eficacia en el uso de agua” se refiere a la cantidad de materia orgánica producida por una planta dividida por la cantidad de agua usada por la planta para producirla, es decir, el peso seco de una planta en relación con el uso de agua de la planta. Como se usa en el presente documento, la expresión “peso seco” se refiere a todo en la planta distinto del agua, e incluye, por ejemplo, carbohidratos, proteínas, aceites y nutrientes minerales. También debe entenderse que como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, “un” o “una” puede significar uno o más, dependiendo del contexto en el que se use. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “una célula” puede significar que puede utilizarse al menos una célula.

Como se usa también en el presente documento, la expresión “ácido nucleico” y “polinucleótido” se refieren a ARN o ADN que es lineal o ramificado, mono o bicatenario, o un híbrido de los mismos. La expresión también abarca híbridos de ARN/ADN. Estos términos también abarcan una secuencia no traducida localizada en los extremos tanto 3' y 5' de la región codificante del gen: al menos aproximadamente 1000 nucleótidos de secuencia cadena arriba desde el extremo 5' de la región codificante y al menos aproximadamente 200 nucleótidos de secuencia cadena abajo desde el extremo 3' de la región codificante del gen. También pueden usarse bases menos comunes, tales como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras para emparejamiento de ribozimas, ARNbc y antisentido. Por ejemplo, se ha mostrado que los polinucleótidos que contienen análogos de propina C-5 de uridina y citidina se unen a ARN con alta afinidad y que son potentes inhibidores antisentido de la expresión génica. También pueden realizarse otras modificaciones, tales como modificación de la cadena principal de fosfodiéster, o el hidroxil-2' en el grupo de azúcar ribosa del ARN. Los polinucleótidos antisentido y ribozimas pueden consistir enteramente en ribonucleótidos, o pueden contener ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos mezclados. Los polinucleótidos de la divulgación pueden producirse por cualquier medio, incluyendo preparaciones genómicas, preparaciones de ADNc, síntesis *in vitro*, RT-PCR y transcripción *in vitro* o *in vivo*.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una que está sustancialmente separada de otras moléculas de ácido nucleico, que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico (es decir, secuencias que codifican otros polipéptidos). Preferentemente, un ácido “nucleico” aislado está sin algunas de las secuencias, que flanquean de forma natural el ácido nucleico (es decir secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en su replicón de origen natural. Por ejemplo, un ácido nucleico clonado se considera aislado. En diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica ACCDP aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en ADN genómico de la célula de la que deriva el ácido nucleico (por ejemplo, una célula de *Arabidopsis thaliana*). Un ácido nucleico también se considera aislado si se ha alterado por intervención humana, o se ha situado en un locus o localización que no es un sitio natural, o si se introduce en una célula por agroinfección. Además, una molécula de ácido nucleico “aislada”, tal como una molécula de ADNc, puede estar sin algo del otro material celular con el que se asocia de forma natural, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente.

Se excluyen específicamente de la definición de “ácidos nucleicos aislados”: cromosomas de origen natural (tales como extensiones cromosómicas), bibliotecas de cromosomas artificiales, bibliotecas genómicas y bibliotecas de ADNc que existen como una preparación de ácido nucleico *in vitro* o como una preparación de células huésped transfectadas/transformadas, en la que las células huésped son una preparación heterogénea *in vitro* o están sembradas en placas como una población heterogénea de colonias individuales. También se excluyen específicamente las bibliotecas anteriores en las que un ácido nucleico específico compone menos del 5 % del número de insertos de ácido nucleico en las moléculas de vector. Se excluyen además específicamente preparaciones de ADN genómico de células completas o ARN de células completas (incluyendo preparaciones de células completas que se cortan mecánicamente o se digieren enzimáticamente). Se excluyen aún más específicamente las preparaciones celulares completas halladas como una preparación *in vitro* o como una mezcla heterogénea separada por electroforesis en las que el ácido nucleico de la divulgación no se ha separado adicionalmente de los ácidos nucleicos heterólogos en el medio de electroforesis (por ejemplo, separando adicionalmente mediante escisión una única banda de una población de bandas heterogénea en un gel de agarosa o transferencia de nailon).

Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos como se expone en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2, o una parte de la misma, puede aislarse usando técnicas de biología molecular convencionales y la información de secuencia proporcionada en el presente documento. Por ejemplo, puede aislarse un ADNc de ACCDP de cualquier biblioteca de cultivo usando toda o una parte de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2. Además, una molécula de ácido nucleico que abarca toda o una parte de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2 puede aislar por la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores oligonucleotídicos diseñados basándose en esta secuencia. Por ejemplo, puede aislarse ARNm de células vegetales (por ejemplo, por el

procedimiento de extracción de guanidinio-tiocianato de Chirgwin y col., 1979, Biochemistry 18: 5294- 5299) y puede prepararse ADNc usando transcriptasa inversa (por ejemplo, transcriptasa de MLV de Moloney, disponible de Gibco/BRL, Bethesda, MD; o transcriptasa inversa de AMV, disponible de Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Pueden diseñarse cebadores oligonucleotídicos sintéticos para amplificación por reacción en cadena de la polimerasa basándose en la secuencia de nucleótidos como se expone en cualquiera de las secuencias mostradas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2. Puede amplificarse una molécula de ácido nucleico de la invención usando ADNc o, como alternativa, ADN genómico, como un molde y cebadores oligonucleotídicos apropiados de acuerdo con técnicas de amplificación por PCR convencionales. La molécula de ácido nucleico amplificada de este modo puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de secuencia de ADN. Además, pueden prepararse oligonucleótidos correspondientes a una secuencia de nucleótidos de ACCDP por técnicas sintéticas convencionales, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automático.

Una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la divulgación comprende las secuencias de nucleótidos expuestas en cualquiera de las secuencias mostradas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2. Estos ADNc pueden comprender secuencias que codifican los ACCDP (es decir, la "región codificante"), así como secuencias no traducidas 5' y secuencias no traducidas 3'. Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender solamente la región codificante de cualquiera de las secuencias proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2, o pueden contener fragmentos genómicos completos aislados de ADN genómico. La presente divulgación también incluye ácidos nucleicos codificantes de ACCDP que codifican ACCDP descritos en el presente documento. Se prefiere un ácido nucleico que codifica ACCDP que codifica ACCDP como se muestra en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2.

Además, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación puede comprender una parte de la región codificante de cualquiera de las secuencias proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2, por ejemplo, un fragmento que puede usarse como una sonda o cebador o un fragmento que codifica una parte biológicamente activa de un ACCDP. Las secuencias de nucleótidos determinadas a partir de la clonación del gen de ACCDP de cualquiera de los organismos proporcionados en la Tabla 1 y la Tabla 2 permiten la generación de sondas y cebadores diseñados para su uso en la identificación y/o clonación de homólogos de ACCDP en otros tipos celulares y organismos, así como homólogos de ACCDP de plantas de cultivo y especies relacionadas. La parte de la región codificante también puede codificar un fragmento biológicamente activo de un ACCDP.

Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "parte biológicamente activa de" un ACCDP incluya una parte, por ejemplo, un dominio/motivo de un ACCDP que participa en la modulación del crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a la tensión en una planta, y más preferentemente, tolerancia a la sequía. Para los fines de la presente invención, la modulación del crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a la tensión se refiere a al menos un aumento o reducción del 10 % en el crecimiento de las raíces, rendimiento y/o tolerancia a la tensión de una planta transgénica que comprende un casete de expresión de ACCDP (o vector de expresión) en comparación con el crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a la tensión de una planta de control no transgénica. Se proporcionan procedimientos para cuantificar el crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a la tensión al menos en los Ejemplos 5, 6 y 17-19 posteriores. En una realización preferida, la parte biológicamente activa de un ACCDP aumenta el crecimiento de la raíz de una planta, preferentemente aumentando la longitud de la raíz.

Las partes biológicamente activas de un ACCDP incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de aminoácidos de un ACCDP, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2, o la secuencia de aminoácidos de un polipéptido idéntico a un ACCDP, que incluye menos aminoácidos que un ACCDP de longitud completa o el polipéptido de longitud completa que es idéntico a un ACCDP, y muestra al menos una actividad de un ACCDP. Típicamente, las partes biológicamente activas (por ejemplo, péptidos que son, por ejemplo, de 5, 10, 15, 20 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100, o más aminoácidos de longitud) comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de un ACCDP. Además, otras partes biológicamente activas en las que se suprimen otras regiones del polipéptido pueden prepararse por técnicas recombinantes y evaluarse con respecto a una o más de las actividades descritas en el presente documento. Preferentemente, la parte biológicamente activa de un ACCDP incluye uno o más dominios/motivos seleccionados o partes de los mismos que tienen función para convertir ACC en un ketobutirato y amoniaco.

La divulgación también proporciona polipéptidos de fusión o quiméricos de ACCDP. Como se usa en el presente documento, un "polipéptido quimérico" o "polipéptido de fusión" de ACCDP comprende un ACCDP unido operativamente a un no ACCDP. Un ACCDP se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un ACCDP, mientras que un no ACCDP se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un polipéptido que no es sustancialmente idéntico al ACCDP, por ejemplo, un polipéptido que es diferente del ACCDP y deriva del mismo o un organismo diferente. Con respecto al polipéptido de fusión, la expresión "unido operativamente" pretende indicar que el ACCDP y el no ACCDP están fusionados entre sí de modo que ambas secuencias cumplen la función propuesta atribuida a la secuencia usada. El no ACCDP puede fusionarse con el extremo N terminal o C terminal del ACCDP. Por ejemplo, en una variación de la divulgación, el polipéptido de fusión es un polipéptido de fusión de GST-ACCDP en el que las secuencias de ACCDP están

fusionadas con el extremo C terminal de las secuencias de GST. Dichos polipéptidos de fusión pueden facilitar la purificación de ACCDP recombinantes. En otra variación de la divulgación, el polipéptido de fusión es un ACCDP que contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N terminal. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero), la expresión y/o secreción de un ACCDP puede aumentarse mediante el uso de una

5

Preferentemente, se produce un polipéptido quimérico o de fusión de ACCDP de la divulgación mediante técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, se ligan entre sí en fase fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias polipeptídicas de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, empleando extremos romos o escalonados para ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar unión no deseable y ligación enzimática. En otra variación de la divulgación, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automáticos. Como alternativa, puede llevarse a cabo amplificación por PCR de fragmentos génicos usando cebadores de anclaje que den lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden posteriormente hibridarse y volver a amplificarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel y col. John Wiley & Sons: 1992). Además, están disponibles en el mercado muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido de GST). Puede clonarse un ácido nucleico que codifica ACCDP en dicho vector de expresión de modo que el resto de fusión esté ligado en fase con el ACCDP.

10

15

20

25

30

Además de los fragmentos y polipéptidos de fusión de los ACCDP descritos en el presente documento, la presente divulgación incluye homólogos y análogos de ACCDP de origen natural y ácidos nucleicos que codifican ACCDP en una planta. "Homólogos" se define en el presente documento como dos ácidos nucleicos o polipéptidos que tienen secuencias de nucleótidos o aminoácidos similares o "idénticas", respectivamente. Los homólogos incluyen variantes alélicas, ortólogos, parálogos, agonistas y antagonistas de ACCDP como se definen posteriormente en el presente documento. El término "homólogo" abarca además moléculas de ácido nucleico que difieren de la secuencia de nucleótidos que se expone en cualquiera de la SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2 (y partes de las mismas) debido a la degeneración del código genético y por lo tanto codifican el mismo ACCDP que se codifica por la secuencia de nucleótidos correspondiente como se expone en dicha SEC ID N° proporcionada en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2. Como se usa en el presente documento, un ACCDP de "origen natural" se refiere a una secuencia de aminoácidos de ACCDP que aparece en la naturaleza. Preferentemente, un ACCDP de origen natural comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2.

35

Un agonista del ACCDP puede conservar sustancialmente las mismas, o un subconjunto, de las actividades biológicas del ACCDP. Un antagonista del ACCDP puede inhibir una o más de las actividades de la forma de origen natural del ACCDP.

40

45

50

Las moléculas de ácido nucleico que corresponden a variantes alélicas naturales y análogos, ortólogos y parálogos de un ADNc de ACCDP pueden aislarse basándose en su identidad con los ácidos nucleicos de ACCDP descritos en el presente documento usando ADNc de ACCDP, o una parte de los mismos, como una sonda de hibridación de acuerdo con técnicas de hibridación convencionales en condiciones de hibridación rigurosas. En una variación alternativa de la divulgación, pueden identificarse homólogos del ACCDP explorando bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, mutantes de truncamiento, del ACCDP con respecto a actividad agonista o antagonista de ACCDP. En una variación de la divulgación, se genera una biblioteca abigarrada de variantes de ACCDP por mutagénesis combinatoria en el nivel de ácido nucleico y se codifica por una biblioteca génica abigarrada. Una biblioteca abigarrada de variantes de ACCDP puede producirse, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de modo que sea expresable un conjunto degradado de secuencias de ACCDP potenciales como polipéptidos individuales, o como alternativa, como un conjunto de polipéptidos de fusión mayores (por ejemplo, para presentación de fagos) que contenga el conjunto de secuencias de ACCDP en los mismos. Hay una diversidad de procedimientos que pueden usarse para producir bibliotecas de homólogos de ACCDP potenciales de una secuencia de oligonucleótidos degradada. Puede realizarse síntesis química de una secuencia génica degradada en un sintetizador de ADN automático y el gen sintético se liga después en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degradado de genes posibilita la aportación, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias de ACCDP potenciales. Se conocen en la técnica procedimientos para sintetizar oligonucleótidos degradados.

55

60

Además, pueden usarse bibliotecas de fragmentos de las regiones codificantes de ACCDP para generar una población abigarrada de fragmentos de ACCDP para exploración y posterior selección de homólogos de un ACCDP. En una variación de la divulgación, puede generarse una biblioteca de fragmentos de secuencia codificante tratando un fragmento de PCR bicatenario de una secuencia codificante de ACCDP con una nucleasa en condiciones en las que se produce muesca solamente aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN bicatenario, renaturalizando el ADN para formar ADN bicatenario, que puede incluir pares sentido/antisentido con diferentes productos con muescas, retirando partes monocatenarias de dobles cadenas reformadas mediante tratamiento con nucleasa S1, y ligando la biblioteca de fragmento resultante en un vector de expresión. Por este procedimiento, puede derivarse una biblioteca de expresión que codifica fragmentos N terminales, C terminales e internos de

diversos tamaños del ACCDP.

Se conocen en este campo diversas técnicas para explorar productos génicos de bibliotecas combinatorias realizadas mediante mutaciones puntuales o truncamiento, y para explorar bibliotecas de ADNc con respecto a productos génicos que tengan una propiedad seleccionada. Dichas técnicas son adaptables para exploración rápida de las bibliotecas génicas generadas por la mutagénesis combinatoria de homólogos de ACCDP. Las técnicas más ampliamente usadas, que son susceptibles de análisis de alto rendimiento, para explorar bibliotecas génicas grandes típicamente incluyen clonar la biblioteca génica en vectores de expresión replicables, transformar células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y expresar los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se ha detectado. Puede usarse mutagénesis de conjunto recursiva (REM), una técnica que potencia la frecuencia de mutaciones funcionales en las bibliotecas, en combinación con los ensayos de exploración para identificar homólogos de ACCDP (Arkin y Yourvan, 1992, PNAS 89: 7811- 7815; Delgrave y col., 1993, Polypeptide Engineering 6 (3): 327- 331). En otra variación de la divulgación, pueden aprovecharse ensayos basados en células para analizar una biblioteca de ACCDP abigarrada, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. La presente divulgación proporciona además un procedimiento para identificar un nuevo ACCDP, que comprende (a) elevar una respuesta de anticuerpo específica a un ACCDP, o un fragmento del mismo, como se describe en el presente documento; (b) explorar material de ACCDP potencial con el anticuerpo, en el que la unión específica del anticuerpo con el material indica la presencia de un ACCDP potencialmente nuevo; y (c) analizar el material unido en comparación con ACCDP conocido, para determinar su novedad.

Como se ha indicado anteriormente, la presente divulgación se refiere a ACCDP y homólogos de los mismos. Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de dos secuencias de aminoácidos (por ejemplo, la secuencia de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2; y una forma mutante de la misma), las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de un polipéptido para alineamiento óptimo con el otro polipéptido o ácido nucleico). Después se comparan los restos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes. Cuando una posición en una secuencia (por ejemplo, la secuencia de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2) está ocupada por el mismo resto de aminoácido que la posición correspondiente en la otra secuencia (por ejemplo, la secuencia de una forma mutante de la SEC ID N° correspondiente proporcionada en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2), entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Puede realizarse el mismo tipo de comparación entre dos secuencias de ácido nucleico.

El porcentaje de identidad de secuencia entre las dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad de secuencia = números de posiciones idénticas/números totales de posiciones x 100). Preferentemente, los homólogos de aminoácidos aislados útiles en la presente invención son al menos 70-75 %, 75-80 %, 80-85 %, 85-90 % o 90-95 %, y más preferentemente al menos 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más idénticos a una secuencia de aminoácidos completa mostrada en SEC ID N°: 2. En otra realización más, los homólogos de aminoácidos aislados útiles en la presente invención son al menos 70-75 %, 75-80 %, 80-85 %, 85-90 % o 90-95 %, y más preferentemente al menos 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más idénticos a una secuencia de aminoácidos completa codificada por una secuencia de ácido nucleico mostrada en SEC ID N°: 2.

En otra realización preferida, un homólogo de ácido nucleico aislado usado en la invención comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 70-75 %, 75-80 %, 80-85 %, 85-90 % o 90-95 %, y aún más preferentemente al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más idéntica a una secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°: 1. La longitud preferible de comparación de secuencia para ácidos nucleicos es de al menos 75 nucleótidos, más preferentemente al menos 100 nucleótidos, y más preferentemente la longitud completa de la región codificante. Es aún más preferible que los homólogos de ácido nucleico codifiquen proteínas que tengan homología con SEC ID N°: 2.

Se prefiere además que el homólogo de ácido nucleico aislado usado en los procedimientos, plantas de cultivo o semilla de la invención codifique un ACCDP que sea al menos 80 % idéntico a una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, y que actúe como un modulador del crecimiento de la raíz, rendimiento y/o una respuesta a la tensión ambiental en una planta, en el que la sobreexpresión del homólogo de ácido nucleico en una planta aumenta el crecimiento de la raíz de la planta, rendimiento y/o la tolerancia de la planta a una tensión ambiental. En una realización preferida adicional, el homólogo de ácido nucleico codifica un ACCDP que puede convertir ACC en α -ketobutirato y amoniaco.

Para los fines de la invención, el porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido se determina usando el paquete de software Vector NTI 9.0 (PC) (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA92008). Se usan una penalización de apertura de hueco de 15 y de una penalización de extensión de hueco de 6,66 para determinar el porcentaje de identidad de dos ácidos nucleicos. Se usan una penalización de apertura de hueco de 10 y una penalización de extensión de hueco de 0,01 para determinar el porcentaje de identidad de dos polipéptidos. Todos los otros parámetros se establecen en los ajustes por defecto. Para fines de un alineamiento múltiple (algoritmo de Clustal W), la penalización de apertura de hueco es 10 y la penalización de extensión de hueco es 0,05 con matriz blosum62. Debe entenderse que para los fines de determinar la identidad de

secuencia cuando se compara una secuencia de ADN con una secuencia de ARN, un nucleótido de timidina es equivalente a un nucleótido de uracilo.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que hibrida con el polinucleótido de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2 en condiciones rigurosas. Más particularmente, una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la divulgación es de al menos 15 nucleótidos de longitud e hibrida en condiciones rigurosas con la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2. En otra variación de las divulgaciones, el ácido nucleico es de al menos 30, 50, 100, 250 o más nucleótidos de longitud. Preferentemente, un homólogo de ácido nucleico aislado de la divulgación comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones altamente rigurosas con la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2 y actúa como un modular del crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a la tensión en una planta. En una variación preferida adicional de la divulgación, la sobreexpresión del homólogo de ácido nucleico aislado en una planta aumenta el crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a una tensión ambiental de una planta. En una variación preferida aún más de la divulgación, el homólogo de ácido nucleico aislado codifica un ACCDP que puede convertir ACC a α -ketobutirato y amoniaco.

Como se usa en el presente documento con respecto a hibridación para ADN con una mancha de transferencia de ADN, la expresión "condiciones rigurosas" puede referirse a hibridación durante una noche a 60 °C en solución de Denhart 10X, SSC 6X, SDS 0,5 % y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml. Las manchas de transferencia se lavan secuencialmente a 62 °C durante 30 minutos cada vez en SSC 3X/SDS 0,1 %, seguido de SSC 1X/SDS 0,1 % y finalmente SSC 0,1X/SDS 0,1 %. En una variación preferida de la divulgación, la frase "condiciones rigurosas" se refiere a hibridación en una solución de SSC 6X a 65 °C. También como se usa en el presente documento, "condiciones altamente rigurosas" se refiere a hibridación durante una noche a 65 °C en solución de Denhart 10X, SSC 6X, SDS 0,5 % y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml. Las manchas de transferencia se lavan secuencialmente a 65 °C durante 30 minutos cada vez en SSC 3X/SDS 0,1 %, seguido de SSC 1X/SDS 0,1 %, y finalmente SSC 0,1X/SDS 0,1 %. Se describen procedimientos para hibridaciones de ácido nucleico en Meinkoth y Wahl, 1984, Anal. Biochem. 138: 267-284; Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2, Ausubel y col. Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, 1995; y Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2, Elsevier, Nueva York, 1993. Preferentemente una molécula de ácido nucleico aislada de la divulgación que hibrida en condiciones rigurosas o altamente rigurosas con una secuencia de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2 corresponde a una molécula de ácido nucleico de origen natural. Como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico de "origen natural" se refiere a una molécula de ARN o ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que aparece en la naturaleza (por ejemplo, codifica un polipéptido natural). En una realización, el ácido nucleico codifica un ACCDP de origen natural.

Usando los procedimientos anteriormente descritos, y otros conocidos por los expertos en la materia, un experto habitual en la materia puede aislar homólogos de los ACCDP que comprenden secuencias de aminoácidos mostradas en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2. Un subconjunto de estos homólogos son las variantes alélicas. Como se usa en el presente documento, la expresión "variante alélica" se refiere a una secuencia de nucleótidos que contiene polimorfismos que conducen a cambios en la secuencia de aminoácidos de un ACCDP y que existen dentro una población natural (por ejemplo, una especie o variedad vegetal). Dichas variaciones alélicas naturales pueden dar como resultado típicamente 1-5 % de varianza en un ácido nucleico de ACCDP. Las variantes alélicas pueden identificarse secuenciando la secuencia de ácido nucleico de interés en varias plantas diferentes, lo que puede llevarse a cabo fácilmente usando sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético de ACCDP en esas plantas. Se pretende que todas y cada una de dichas variaciones de ácido nucleico y polimorfismos o variaciones de aminoácidos resultantes en un ACCDP que son el resultado de variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional de un ACCDP, estén dentro del alcance de la divulgación.

Además, se pretende que las moléculas de ácido nucleico que codifican ACCDP de la misma u otra especie tales como análogos, ortólogos y parálogos de ACCDP, estén dentro del alcance de la presente divulgación. Como se usa en el presente documento, el término "análogos" se refiere a dos ácidos nucleicos que tienen la misma o similar función, pero que han evolucionado por separado en organismos no relacionados. Como se usa en el presente documento, el término "ortólogos" se refiere a dos ácidos nucleicos de especies diferentes, pero que han evolucionado desde un gen ancestral común por especiación. Normalmente, los ortólogos codifican polipéptidos que tienen las mismas o similares funciones. También como se usa en el presente documento, el término "parálogos" se refiere a dos ácidos nucleicos que están relacionados por duplicación dentro de un genoma. Los parálogos tienen habitualmente diferentes funciones, pero estas funciones pueden estar relacionadas (Tatusov, R.L. y col., 1997, Science 278 (5338): 631- 637). Los análogos, ortólogos y parálogos de un ACCDP de origen natural pueden diferir del ACCDP de origen natural por modificaciones postraduccionales, por diferencias de secuencia de aminoácidos, o por ambas. Las modificaciones postraduccionales incluyen derivatización química *in vivo* e *in vitro* de los polipéptidos, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación o glucosilación, y dichas modificaciones pueden producirse durante la síntesis de polipéptidos o procesamiento o después del tratamiento con enzimas modificadoras

aisladas. En particular, los ortólogos útiles en los procedimientos y plantas de cultivos y semillas de cultivo de la invención generalmente mostrarán al menos 80-85 %, más preferentemente, 85-90 % o 90-95 %, y más preferentemente 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o incluso 99 % de identidad, o 100 % de identidad de secuencia, con toda la secuencia de aminoácidos de ACCDP de origen natural proporcionada en la SEC ID N° 2, y mostrarán una función similar a un ACCDP y actúan como un modulador del crecimiento y/o una respuesta de tensión ambiental en una planta y/o convierte ACC a α -ketobutirato y amoniaco, en los que dicho ortólogo de ACCDP aumenta el crecimiento y/o la tolerancia a la tensión de una planta. En una realización, los ortólogos de ACCDP pueden convertir ACC a α -ketobutirato y amoniaco.

Además de variantes de origen natural de una secuencia de ACCDP que puede existir en la población, el experto en la materia apreciará adicionalmente que pueden introducirse cambios por mutación en una secuencia de nucleótidos de cualquiera de la SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2, conduciendo de este modo a cambios en la secuencia de aminoácidos del ACCDP codificado, sin alterar la actividad funcional del ACCDP. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de nucleótidos que conduzcan a sustituciones de aminoácidos en restos de aminoácidos "no esenciales" en una secuencia de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2. Un resto de aminoácido "no esencial" es un resto que puede alterarse de la secuencia natural de una de las ACCDP sin alterar la actividad de dicha ACCDP, mientras que un resto de aminoácido "esencial" se requiere para actividad ACCDP. Otros restos de aminoácidos, sin embargo, (por ejemplo, los que no están conservados o están solamente semi-conservados en el dominio que tiene actividad ACCDP) pueden no ser esenciales para la actividad y por lo tanto probablemente sean susceptibles de alteración sin alterar la actividad de ACCDP.

En consecuencia, otro aspecto de la divulgación se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican ACCDP que contienen cambios en restos de aminoácidos que no son esenciales para la actividad de ACCDP. Dichos ACCDP difieren en la secuencia de aminoácidos de una secuencia contenida en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2, pero conservan al menos una de las actividades de ACCDP descritas en el presente documento. En una variación de la divulgación, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, en la que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 50-60 % idéntica a la secuencia de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2, más preferentemente al menos aproximadamente 60-70 % idénticas de la secuencia de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2, aún más preferentemente al menos aproximadamente 70-75 %, 75-80 %, 80-85 %, 85-90 % o 90-95 % idénticas a la secuencia de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2, y más preferentemente al menos aproximadamente 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la secuencia de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2. Los homólogos de ACCDP preferidos de la presente invención preferentemente participan en un crecimiento de la raíz, rendimiento y/o una respuesta de tolerancia a la tensión de una planta en una planta, o más particularmente, pueden convertir ACC a α -ketobutirato y amoniaco.

Puede crearse una molécula de ácido nucleico aislada que codifique un ACCDP que tenga identidad de secuencia con una secuencia polipeptídica de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y de la Tabla 2 introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en una secuencia de nucleótidos de cualquiera las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2, de modo que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en el polipéptido codificado. Pueden introducirse mutaciones en la secuencia de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2 por técnicas convencionales, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Preferentemente, se realizan sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más restos de aminoácidos no esenciales predichos. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que el resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que tenga una cadena lateral similar.

Se ha definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto de aminoácido no esencial predicho en un ACCDP se reemplaza preferentemente con otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Como alternativa, en otra variación de la divulgación, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente en toda o parte de una secuencia codificante de ACCDP, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden explorarse con respecto a una actividad ACCDP descrita en el presente documento para identificar mutantes que conservan actividad ACCDP. Después de la mutagénesis de la secuencia de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2 el polipéptido codificado puede expresarse de forma recombinante y la actividad del polipéptido puede determinarse analizando el crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a la tensión de una planta que expresa el polipéptido descrito al menos en los Ejemplos 5, 6 y 17-19.

Adicionalmente, pueden crearse ácidos nucleicos de ACCDP optimizados. Preferentemente, un ácido nucleico de

ACCDP optimizado codifica un ACCDP que modula el crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a una tensión ambiental de una planta, y más preferentemente aumenta el crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a una tensión ambiental de una planta tras su sobreexpresión en la planta. Como se usa en el presente documento, "optimizado" se refiere a un ácido nucleico que está modificado por ingeniería genética para aumentar su expresión en una planta o animal dado. Para proporcionar ácidos nucleicos de ACCDP optimizados para planta, la secuencia de ADN del gen puede modificarse para 1) comprender codones preferidos por genes vegetales altamente expresados; 2) comprender un contenido de A+T en composición de bases nucleotídicas para el hallado sustancialmente en plantas; 3) formar una secuencia de inicio de la planta; o 4) eliminar secuencias que provoquen desestabilización, poliadenilación inapropiada, degradación y terminación de ARN, o que formen horquillas de estructura secundaria o sitios de corte y empalme de ARN. El aumento de la expresión de ácidos nucleicos de ACCDP en plantas puede conseguirse utilizando la frecuencia de distribución de uso codónico en plantas en general o en una planta particular. Pueden encontrarse procedimientos para optimizar la expresión de ácidos nucleicos en plantas en los documentos EPA 0359472; EPA 0385962; Solicitud de PCT N° WO 91/16432; Patente de Estados Unidos N° 5.380.831; Patente de Estados Unidos N° 5.436.391; Perlack y col., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3324-3328; y Murray y col., 1989, Nucleic Acids Res. 17: 477-498.

Como se usa en el presente documento, "frecuencia de uso codónico preferido" se refiere a la preferencia mostrada por una célula huésped específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Para determinar la frecuencia de uso de un codón particular en un gen, se divide el número de apariciones de ese codón en el gen por el número total de apariciones de todos los codones que especifican el mismo aminoácido en el gen. De forma similar, la frecuencia de uso codónico preferido mostrada por una célula huésped puede calcularse promediando la frecuencia de uso codónico preferido en un gran número de genes expresados por la célula huésped. Es preferible que este análisis se limite a genes que se expresan en gran medida por la célula huésped. El porcentaje de desviación de la frecuencia de uso codónico preferido para un gen sintético del empleado por una célula huésped se calcula en primer lugar determinando el porcentaje de desviación de la frecuencia de uso de un único codón desde la célula huésped seguido de obtener la desviación media de todos los codones. Como se define en el presente documento, este cálculo incluye codones únicos (es decir, ATG y TGG). En términos generales, la desviación media global del uso codónico de un gen optimizado del de una célula huésped se calcula usando la ecuación $1A = n \frac{1}{Z} X_n - Y_n X_n$ por 100 Z, en la que X_n = frecuencia de uso para el codón n en la célula huésped; Y_n = frecuencia de uso para el codón n en el gen sintético; n representa un codón individual que especifica un aminoácido; y el número total de codones es Z. La desviación global de la frecuencia de uso codónico, A, para todos los aminoácidos debería ser preferentemente menor de aproximadamente 25 %, y más preferentemente menor de aproximadamente el 10 %.

Por lo tanto, un ácido nucleico de ACCDP puede optimizarse de modo que su frecuencia de distribución de uso codónico se desvíe, preferentemente, no más del 25 % de la de genes vegetales altamente expresados y, más preferentemente, no más de aproximadamente el 10 %. Además, se tiene en consideración el porcentaje de contenido de G+C de la tercera base degradada (parece que las monocotiledóneas favorecen G+C en esta posición, mientras que las dicotiledóneas no). También se reconoce que el nucleótido XCG (en el que X es A, T, C o G) es el codón menos preferido en dicotiledóneas mientras que el codón XTA se evita tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Los ácidos nucleicos de ACCDP optimizados de la presente divulgación también tienen preferentemente índices de evitación de doblete CG y TA que se aproximan mucho a los de la planta huésped seleccionada (por ejemplo, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, etc.). Más preferentemente estos índices se desvían del huésped en no más de aproximadamente 10-15 %.

Además de las moléculas de ácido nucleico que codifican los ACCDP descritos anteriormente, otro aspecto de la divulgación se refiere a moléculas de ácido nucleico aislado que son antisentido de las mismas. Se cree que los polinucleótidos antisentido inhiben la expresión génica de un polinucleótido diana uniéndose específicamente con el polinucleótido diana e interfiriendo con la transcripción, corte y empalme, transporte, traducción y/o estabilidad del polinucleótido diana. Se describen procedimientos en la técnica anterior para dirigir el polinucleótido antisentido al ADN cromosómico, a un transcrito de ARN primario o a un ARNm procesado. Preferentemente, las regiones diana incluyen sitios de corte y empalme, codones de inicio de la traducción, codones de terminación de la traducción, y otras secuencias dentro de la fase abierta de lectura.

El término "antisentido", para los fines de la divulgación, se refiere a un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que es suficientemente complementario de todo o una parte del gen, transcrito primario, o ARNm procesado, para interferir con la expresión del gen endógeno. Los polinucleótidos "complementarios" son los que son capaces de formar pares de bases de acuerdo con las reglas de complementariedad de Watson-Crick convencionales. Específicamente, las purinas formarán pares de bases con pirimidinas para formar una combinación de guanina emparejada con citosina (G:C) y adenina emparejada con timina (A:T) en el caso del ADN, o adenina emparejada con uracilo (A:U) en el caso de ARN. Se entiende que dos polinucleótidos pueden hibridar entre sí incluso si no son completamente complementarios entre sí, siempre que cada uno tenga al menos una región que sea sustancialmente complementaria del otro. La expresión "ácido nucleico antisentido" incluye ARN monocatenario así como casetes de expresión de ADN bicatenario que pueden transcribirse para producir un ARN antisentido. Los ácidos nucleicos antisentido "activos" son moléculas de ARN antisentido que son capaces de hibridar selectivamente con un transcrito primario o ARNm que codifica un polipéptido que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2.

El ácido nucleico antisentido puede ser complementario de una cadena codificante de ACCDP completa, o de solamente una parte de la misma. En una variación de la divulgación, una molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido de una "región codificante" de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica un ACCDP. La expresión "región codificante" se refiere a la región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que se traducen a restos de aminoácidos. En otra variación de la divulgación, la molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido de una "región no codificante" de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica un ACCDP. La expresión "región no codificante" se refiere a secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante que no se traducen a aminoácidos (es decir, también denominadas regiones no traducidas 5' y 3'). La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria de la región codificante completa de ARNm de ACCDP, pero más preferentemente es un oligonucleótido que es antisentido solamente de una parte de la región codificante o no codificante de ARNm de ACCDP. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario de la región que rodea el sitio de inicio de la traducción de ARNm de ACCDP. Un oligonucleótido antisentido puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud. Típicamente, las moléculas antisentido de la presente divulgación comprenden un ARN que tiene 60-100 % de identidad de secuencia con al menos 14 nucleótidos consecutivos de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2 o un polinucleótido que codifica un polipéptido de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2. Preferentemente, la identidad de secuencia será al menos 70 %, más preferentemente al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % y más preferentemente 99 %.

Un ácido nucleico antisentido de la divulgación puede construirse usando reacciones de síntesis química y ligamiento enzimático usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados de formas diversas diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física de la doble cadena formada entre los ácidos nucleicos antisentido y con sentido, por ejemplo, pueden usarse derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metil uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3) w y 2,6-diaminopurina. Como alternativa, el ácido nucleico antisentido puede producirse de forma biológica usando un vector de expresión en el que se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito de ácido nucleico insertado será de una orientación antisentido para un ácido nucleico de interés, descrito adicionalmente en la siguiente subsección).

En otra variación más de la divulgación, la molécula de ácido nucleico antisentido de la divulgación es una molécula de ácido nucleico α -anomérica. Una molécula de ácido nucleico α -anomérica forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en el que, a diferencia de las unidades β habituales, las cadenas se sitúan paralelas entre sí (Gaultier y col., 1987, Nucleic Acids. Res. 15: 6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido también puede comprender un 2'-O-metilribonucleótido (Inoue y col., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 6131-6148) o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue y col., 1987, FEBS Lett. 215: 327-330).

Las moléculas de ácido nucleico antisentido de la divulgación se administran típicamente a una célula o se generan *in situ* de modo que hibriden con o se unan a ARNm celular y/o ADN genómico que codifica un ACCDP para inhibir de este modo la expresión del polipéptido, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción. La hibridación puede ser por complementariedad de nucleótidos convencional para formar una doble cadena estable o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se une a dobles cadenas de ADN, mediante interacciones específicas en el surco principal de la doble hélice. La molécula antisentido puede modificarse de modo que se una específicamente a un receptor o un antígeno expresado en una superficie celular seleccionada, por ejemplo, ligando la molécula de ácido nucleico antisentido con un péptido o un anticuerpo que se une a un receptor de superficie celular o antígeno. La molécula de ácido nucleico antisentido puede suministrarse también a células usando los vectores descritos en el presente documento. Para conseguir suficientes concentraciones intracelulares de las moléculas antisentido, se prefieren construcciones de vector en las que la molécula de ácido nucleico antisentido se sitúa bajo el control de un promotor procarionta, viral o eucariota (incluyendo vegetal) fuerte.

Como alternativa a polinucleótidos antisentido, pueden usarse ribozimas, polinucleótidos con sentido o ARN bicatenario (ARNbc) para reducir la expresión de un polipéptido de ACCDP. Como se usa en el presente documento, el término "ribozima" se refiere a una enzima basada en ARN catalítico con actividad ribonucleasa que es capaz de escindir un ácido nucleico monocatenario, tal como un ARNm, con el que tiene una región complementaria. Pueden usarse ribozimas (por ejemplo, ribozimas de cabeza de martillo descritas en Haselhoff y Gerlach, 1988, Nature 334: 585-591) para escindir catalíticamente transcritos de ARNm de ACCDP para inhibir de este modo la traducción de ARNm de ACCDP. Una ribozima que tenga especificidad por un ácido nucleico que codifica ACCDP puede

diseñarse basándose en la secuencia de nucleótidos de un ADNc de ACCDP, como se desvela en el presente documento (es decir, cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2) o basándose en una secuencia heteróloga para aislar de acuerdo con procedimientos enseñados en la presente divulgación. Por ejemplo, puede construirse un derivado de un ARN de L-19 IVS de *Tetrahymena* en el que la secuencia de nucleótidos del sitio activo es complementaria de la secuencia de nucleótidos para escindir en un ARNm que codifica ACCDP. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 4.987.071 y 5.116.742 de Cech y col. Como alternativa, puede usarse ARNm de ACCDP para seleccionar un ARN catalítico que tenga una actividad ribonucleasa específica de un grupo de moléculas de ARN. Véase, por ejemplo, Bartel, D. y Szostak, J.W., 1993, Science 261: 1411-1418. En una variación preferida de las divulgaciones, la ribozima contendrá una parte que tiene al menos 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 nucleótidos, y más preferentemente 7 u 8 nucleótidos, que tienen 100 % de complementariedad con una parte del ARN diana. Los expertos en la materia conocen procedimientos para preparar ribozimas. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 6.025.167; 5.773.260; y 5.496.698.

El término "ARNbc", como se usa en el presente documento, se refiere a híbridos de ARN que comprenden dos cadenas de ARN. Los ARNbc pueden ser de estructura lineal o circular. En una variación preferida de la divulgación, el ARNbc es específico de un polinucleótido que codifica el polipéptido de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2 o un polipéptido que tenga al menos 80 % de identidad de secuencia con un polipéptido de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2. Los ARN que hibridan pueden ser sustancial o completamente complementarios. Por "sustancialmente complementarios", se entiende que cuando los dos ARN que hibridan se alinean de forma óptima usando el programa BLAST como se ha descrito anteriormente, las partes que hibridan son al menos 95 % complementarias. Preferentemente, el ARNbc será de al menos 100 pares de bases de longitud. Típicamente, los ARN que hibridan serán de identidad longitud sin extremos salientes 5' o 3' y sin huecos. Sin embargo, pueden usarse ARNbc que tengan salientes 5' o 3' de hasta 100 nucleótidos en los procedimientos de la divulgación.

El ARNbc puede comprender ribonucleótidos, análogos de ribonucleótidos tales como restos de 2'-O-metil ribosilo, o combinaciones de los mismos. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 4.130.641 y 4.024.222. Se describe un ARNbc ácido polirribonucleosídico: ácido polirribocitidílico en la Patente de Estados Unidos 4.283.393. Se conocen en la técnica procedimientos para preparar y usar ARNbc. Un procedimiento comprende la transcripción simultánea de dos cadenas de ADN complementarias, *in vivo*, o en una única mezcla de reacción *in vitro*. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.795.715. En una variación de la divulgación, puede introducirse ARNbc en una planta o célula vegetal directamente por procedimientos de transformación convencionales. Como alternativa, puede expresarse ARNbc en una célula vegetal transcribiendo dos ARN complementarios.

Otros procedimientos para la inhibición de expresión génica endógena, tales como formación de triple hélice (Moser y col., 1987, Science 238: 645-650 y Cooney y col., 1988, Science 241:456-459) y co-supresión (Napoli y col., 1990, The Plant Cell 2: 279-289) se conocen en la técnica. Se han usado ADNc parciales y de longitud completa para la co-supresión de genes vegetales endógenos. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 4.801.340, 5.034.323, 5.231.020 y 5.283.184; Van der Kroll y col., 1990, The Plant Cell 2: 291-299; Smith y col., 1990, Mol. Gen. Genetics 224: 477-481; y Napoli y col., 1990, The Plant Cell 2: 279-289.

Para la supresión con sentido, se cree que la introducción de un polinucleótido con sentido bloquea la transcripción del gen diana correspondiente. El polinucleótido con sentido tendrá al menos 65 % de identidad de secuencia con el gen o ARN vegetal diana. Preferentemente, el porcentaje de identidad es al menos 80 %, 90 %, 95 % o más. El polinucleótido con sentido introducido no necesita ser de longitud completa en relación con el gen o transcrito diana. Preferentemente, el polinucleótido con sentido tendrá al menos 65 % de identidad de secuencia con al menos 100 nucleótidos consecutivos de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2. Las regiones de identidad pueden comprender intrones y/o exones y regiones no traducidas. El polinucleótido con sentido introducido puede estar presente en la célula vegetal de forma transitoria o puede estar integrado de forma estable en un cromosoma vegetal o replicón extracromosómico.

Como alternativa, la expresión génica de ACCDP puede inhibirse dirigiendo secuencias de nucleótidos complementarias de la región reguladora de una secuencia de nucleótidos de ACCDP (por ejemplo, un promotor y/o potenciador de ACCDP) para formar estructuras helicoidales triples que eviten la transcripción de un gen de ACCDP en células diana. Véase en general, Helene, C., 1991, Anticancer Drug Des. 6 (6): 569- 84; Helene, C. y col., 1992, Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 27- 36; y Maher, L.J., 1992, Bioassays 14 (12): 807- 15.

Además de los ácidos nucleicos y polipéptidos de ACCDP descritos anteriormente, la presente divulgación abarca estos ácidos nucleicos y polipéptidos unidos a un resto. Estos restos incluyen, pero sin limitación, restos de detección, restos de hibridación, restos de purificación, restos de suministro, restos de reacción, restos de unión y similares. Un grupo típico de ácidos nucleicos que tienen restos unidos son las sondas y los cebadores. Las sondas y cebadores típicamente comprenden un oligonucleótido sustancialmente aislado. El oligonucleótido típicamente comprende una región de secuencia de nucleótidos que hibriden en condiciones rigurosas con al menos aproximadamente 12, preferentemente aproximadamente 25, más preferentemente aproximadamente 40, 50 o 75 nucleótidos consecutivos de una cadena con sentido de la secuencia expuesta en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2; una secuencia antisentido de la secuencia expuesta en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2; o mutantes de origen

natural de las mismas. Pueden usarse cebadores basados en una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2 en reacciones de PCR para clonar homólogos de ACCDP. Pueden usarse sondas basadas en las secuencias de nucleótidos de ACCDP para detectar transcritos o secuencias genómicas que las codifican o polipéptidos sustancialmente idénticos. En una variación preferida de las divulgaciones, la sonda comprende además un grupo marcador unido a la misma, por ejemplo, el grupo marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un co-factor enzimático. Dichas sondas pueden usarse como parte de un kit de ensayo de marcador genómico para identificar células que expresan un ACCDP, tal como midiendo un nivel de un ácido nucleico que codifica ACCDP, en una muestra de células, por ejemplo, detectando de niveles de ARNm de ACCDP o determinando si un gen de ACCDP genómico se ha mutado o suprimido.

En particular, un procedimiento útil para determinar el nivel de transcripción del gen (un indicador de la cantidad de ARNm disponible para traducción al producto génico) es realizar una transferencia de Northern (para referencia, véase, por ejemplo, Ausubel y col., 1988, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: Nueva York). La información de una transferencia de Northern demuestra al menos parcialmente el grado de transcripción del gen transformado. Puede prepararse ARN celular total a partir de células, tejidos u órganos por varios procedimientos, todos bien conocidos en la técnica, tales como el descrito en Bormann, E.R. y col., 1992, *Mol. Microbiol.* 6: 317-326. Para evaluar la presencia o cantidad relativa de polipéptido traducido a partir de este ARNm, pueden emplearse técnicas convencionales, tales como una transferencia de Western. Estas técnicas se conocen bien por los expertos habituales en este campo. (Véase, por ejemplo, Ausubel y col., 1988, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: Nueva York).

La divulgación proporciona además un vector de expresión recombinante aislado que comprende un ácido nucleico de ACCDP, en el que la expresión del vector en una célula huésped da como resultado aumento del crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a la tensión ambiental en comparación con una variedad natural de la célula huésped. Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transformar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicar de forma autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) se integran en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión útiles en técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar de forma intercambiable ya que el plásmido es la forma de vector usada más habitualmente. Sin embargo, se pretende que la divulgación incluya otras formas de vectores de expresión tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos para replicación, adenovirus y virus adenoasociados) que cumplen funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinante de la divulgación comprenden un ácido nucleico de la divulgación en una forma adecuada para expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células huésped para usar para expresión, que están unidas operativamente a la secuencia de ácido nucleico para expresar. Como se usa en el presente documento con respecto a un vector de expresión recombinante, se pretende que "unido operativamente" signifique que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a la secuencia o las secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando el vector se introduzca en la célula huésped). Se pretende que la expresión "secuencia reguladora" incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) y Gruber y Crosby, en: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, eds. Glick y Thompson, Capítulo 7, 89-108, CRC Press: Boca Raton, Florida, incluyendo las referencias en las mismas. Las secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solamente en ciertas células huésped o en ciertas condiciones. Se apreciará por los expertos en la materia que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped para transformar, el nivel de expresión del polipéptido deseado, etc. Los vectores de expresión de la divulgación pueden introducirse en células huésped para producir de este modo polipéptidos o péptidos, incluyendo polipéptidos o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describen en el presente documento (por ejemplo, ACCDP, formas mutantes de ACCDP, polipéptidos de fusión, etc.).

Los vectores de expresión recombinantes de la divulgación pueden diseñarse para expresión de ACCDP en células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, pueden expresarse genes de ACCDP en células bacterianas tales como *C. glutamicum*, células de insecto (usando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura y otras fúngicas (Véase Romanos, M.A. y col., 1992, *Foreign gene expression in yeast: a review*, *Yeast* 8: 423-488; van den Hondel,

C.A.M.J.J. y col., 1991, Heterologous gene expression in filamentous fungi, en: More Gene Manipulations in Fungi, J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., páginas 396-428: Academic Press: San Diego; y van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J., 1991, Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, en: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F. y col., eds., páginas. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), algas (Falciatore y col., 1999, Marine Biotechnology 1 (3): 239-251), ciliados de los tipos: *Holotrichia*, *Peritrichia*, *Spirotrichia*, *Suctorina*, *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Colpidium*, *Glaucoma*, *Platyophrya*, *Potomacus*, *Pseudocohnilembus*, *Euplotes*, *Engelmanniella* y *Stylonychia*, especialmente del género *Stylonychia lemnae* con vectores siguiendo un procedimiento de transformación como se describe en la Solicitud de PCT N° WO 98/01572, y células vegetales multicelulares (Véase Schmidt, R. y Willmitzer, L., 1988, High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants, Plant Cell Rep. 583-586; Plant Molecular Biology and Biotechnology, C Press, Boca Raton, Florida, capítulo 6/7, S. 71-119 (1993); F.F. White, B. Jenes y col., Techniques for Gene Transfer, en: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. Kung y R. Wu, 128-43, Academic Press: 1993; Potrykus, 1991, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42: 205-225 y referencias citadas en las mismas) o células de mamífero. Se analizan células huésped adecuadas adicionalmente en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press: San Diego, CA (1990). Como alternativa, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo usando secuencias reguladoras promotoras T7 y T7 polimerasa.

La expresión de polipéptidos en procariotas se lleva a cabo más frecuentemente con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de polipéptidos de fusión o no de fusión. Los vectores de fusión añaden varios aminoácidos a un polipéptido codificado en los mismos, habitualmente al extremo amino terminal del polipéptido recombinante pero también al extremo C terminal o fusionado dentro de regiones adecuadas en los polipéptidos. Dichos vectores de fusión típicamente cumplen tres fines: 1) aumentar la expresión de un polipéptido recombinante; 2) aumentar la solubilidad de un polipéptido recombinante; y 3) ayudar a la purificación de un polipéptido recombinante actuando como un ligando en purificación de afinidad. Con frecuencia, en vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en el punto de unión del resto de fusión y el polipéptido recombinante para permitir la separación del polipéptido recombinante del resto de fusión posterior a la purificación del polipéptido de fusión. Dichas enzimas, y sus secuencias de reconocimiento afines, incluyen Factor Xa, trombina y enteroquinasa.

Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. y Johnson, K.S., 1988, Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan glutatión S-transferasa (GST), polipéptido de unión a maltosa E o polipéptido A, respectivamente, con el polipéptido recombinante diana. En una variación de la divulgación, la secuencia codificante del ACCDP se clona en un vector de expresión pGEX para crear un vector que codifica un polipéptido de fusión que comprende, del extremo N al C, GST-sitio de escisión de trombina-polipéptido X. El polipéptido de fusión puede purificarse por cromatografía de afinidad usando resina de glutatión-agarosa. Puede recuperarse ACCDP recombinante no fusionado con GST mediante escisión del polipéptido de fusión con trombina.

Los ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* no de fusión inducibles adecuados incluyen pTrc (Amann y col., 1988, Gene 69: 301-315) y pET 11d (Studier y col., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89). La expresión génica diana del vector pTrc se basa en la transcripción por ARN polimerasa del huésped de un promotor de fusión trp-lac híbrido. La expresión de gen diana del vector pET 11d se basa en la transcripción de un promotor de fusión T7 gn10-lac mediado por una ARN polimerasa viral co-expresada (T7 gn1). Esta polimerasa viral se proporciona por las cepas huésped BL21(DE3) o HMS174(DE3) de un profago residente que alberga un gen T7 gn1 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5.

Una estrategia para maximizar la expresión del polipéptido recombinante es expresar el polipéptido en una bacteria huésped con una capacidad alterada para escindir proteolíticamente el polipéptido recombinante (Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128). Otra estrategia es alterar la secuencia del ácido nucleico para insertar en un vector de expresión de modo que los codones individuales para cada aminoácido sean los utilizados preferentemente en la bacteria elegida para expresión, tal como *C. glutamicum* (Wada y col., 1992, Nucleic Acids Res. 20: 2111-2118). Dicha alteración de secuencias de ácido nucleico de la divulgación puede llevarse a cabo por técnicas de síntesis de ADN convencionales.

En otra variación de la divulgación, el vector de expresión de ACCDP es un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari, y col., 1987, EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, 1982, Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz y col., 1987, Gene 54: 113-123) y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los vectores y procedimientos para construcción de vectores apropiados para su uso en otros hongos, tales como los hongos filamentosos, incluyen los detallados en: C.A.M.J.J. y Punt, P.J., 1991, "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", en: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy, y col., eds., páginas 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

En la presente divulgación, los ACCDP pueden expresarse en plantas y células vegetales tales como células de plantas unicelulares (por ejemplo algas) (Véase Falciatore y col., 1999, Marine Biotechnology 1 (3): 239-251 y

referencias en la misma) y células vegetales de plantas superiores (por ejemplo, los espermatofitos, tales como plantas de cultivo). Puede "introducirse" un ACCDP en una célula vegetal por cualquier medio, incluyendo transfección, transformación o transducción, electroporación, bombardeo de partículas, agroinfección y similares. Un procedimiento de transformación conocido por los expertos en la materia es la inmersión de una planta en floración en una solución de *Agrobacterium*, en la que la *Agrobacterium* contiene el ácido nucleico de ACCDP, seguido de cultivo de los gametos transformados.

Otros procedimientos adecuados para transformar o transfectar células huésped incluyendo células vegetales pueden encontrarse en Sambrook, y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. última ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros manuales de laboratorio tales como Methods in Molecular Biology, 1995, Vol. 44, *Agrobacterium* protocols, ed: Gartland y Davey, Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Ya que el aumento del crecimiento y aumento de la tolerancia a la tensión biótica y abiótica son rasgos generales que se desea que se hereden en una amplia diversidad de plantas como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, sorgo, mijo, caña de azúcar, soja, cacahuete, algodón, colza y canola, *Manihot*, pimiento, girasol y *Tagetes*, plantas solanáceas como patata, tabaco, berenjena y tomate, especies de *Vicia*, guisante, alfalfa, plantas arbustivas (café, cacao, té), especies de *Salix*, árboles (palma aceitera, coco), hierbas perennes y cultivos de forraje, estas plantas de cultivo también son plantas diana preferidas para una modificación por ingeniería genética como una realización más de la presente invención. Los cultivos de forraje incluyen, pero sin limitación, Hierba de Trigo, *Phalaris*, Bromo, *Leimus*, Poa, *Dactylis*, Alfalfa, Salfoin, *Notus*, Trébol Negro, Trébol Rojo y Meliloto.

En una realización de la presente invención, la transfección de un ACCDP en una planta de cultivo se consigue mediante transferencia génica mediada por *Agrobacterium*. Puede realizarse transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* usando por ejemplo la cepa GV3101 (pMP90) (Koncz y Schell, 1986, Mol. Gen. Genet. 204: 383-396) o LBA4404 (Clontech) de *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación puede realizarse mediante técnicas de transformación y regeneración convencionales (Deblaere y col., 1994, Nucl. Acids. Res. 13: 4777-4788; Gelvin, Stanton B. y Schilperoort, Robert A, Plant Molecular Biology Manual, 2ª Ed.-Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995.-en Secc., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R.; Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). Por ejemplo, la colza puede transformarse mediante transformación de cotiledones o hipocótilo (Moloney y col., 1989, Plant Cell Report 8: 238-242; De Block y col., 1989, Plant Physiol. 91: 694-701). El uso de antibióticos para *Agrobacterium* y selección de plantas dependen del vector binario y la cepa de *Agrobacterium* usados para transformación. Normalmente se realiza selección de colza usando kanamicina como el marcador de plantas seleccionable. Puede realizarse transferencia génica mediada por *Agrobacterium* a lino usando, por ejemplo, una técnica descrita por Mlynarova y col., 1994, Plant Cell Report 13: 282-285. Adicionalmente, puede realizarse transformación de soja usando por ejemplo una técnica descrita en la Patente Europea N° 0424 047, Patente de Estados Unidos N° 5.322.783, Patente Europea N° 0397 687, Patente de Estados Unidos N° 5.376.543 o Patente de Estados Unidos N° 5.169.770. Puede conseguirse transformación de maíz por bombardeo de partículas, captación de ADN mediada por polietilenglicol o mediante la técnica de fibra de carburo de silicio. (Véase, por ejemplo, Freeling y Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: Nueva York (1993) ISBN 3-540-97826-7). Se encuentra un ejemplo específico de transformación de maíz en la Patente de Estados Unidos N° 5.990.387 y puede encontrarse un ejemplo específico de transformación de trigo en la Solicitud de PCT N° WO 93/07256.

De acuerdo con la presente invención, el ACCDP introducido puede mantenerse en la célula vegetal de forma estable si se incorpora en un replicón autónomo no cromosómico o se integra en los cromosomas vegetales. Como alternativa, el ACCDP introducido puede estar presente en un vector no replicante extracromosómico y puede expresarse de forma transitoria o estar activo de forma transitoria.

En una variación de la divulgación, puede crearse un microorganismo recombinante homólogo en el que el ACCDP está integrado en un cromosoma, se prepara un vector que contiene al menos una parte de un gen de ACCDP en el que se ha introducido una delección, adición o sustitución para de este modo alterar, por ejemplo, interrumpir funcionalmente, el gen de ACCDP. Preferentemente, el gen de ACCDP es cualquiera de los genes de ACCDP proporcionados en la Tabla 1 y la Tabla 2, pero puede ser un homólogo de una planta o levadura relacionada, o incluso de una fuente de mamífero o insecto. En una variación de la divulgación, el vector se diseña de modo que, tras la recombinación homóloga, el gen de ACCDP endógeno se interrumpe funcionalmente (es decir, ya no codifica un polipéptido funcional; también denominado un vector de supresión). Como alternativa, el vector puede diseñarse de modo que, tras la recombinación homóloga, el gen de ACCDP endógeno se muta o altera de otro modo pero codifica aún un polipéptido funcional (por ejemplo, la región reguladora cadena arriba puede alterarse para alterar de este modo la expresión del ACCDP endógeno). Para crear una mutación puntual mediante recombinación homóloga, pueden usarse híbridos de ADN-ARN en una técnica conocida quimeroplastia (Cole-Strauss y col., 1999, Nucleic Acids Research 27 (5): 1323-1330 y Kmiec, 1999, Gene Therapy American Scientist 87 (3): 240-247). Se conocen bien en la técnica procedimientos de recombinación homóloga en *Arabidopsis thaliana*, por ejemplo, y se contemplan para su uso en el presente documento.

Mientras que en el vector de recombinación homóloga, la parte alterada del gen de ACCDP está flanqueada en sus extremos 5' y 3' por una molécula de ácido nucleico adicional del gen de ACCDP para posibilitar que se produzca recombinación homóloga entre el gen de ACCDP exógeno portado por el vector y un gen de ACCDP endógeno, en

un microorganismo o planta. La molécula de ácido nucleico de ACCDP flanqueante adicional es de suficiente longitud para recombinación homóloga exitosa con el gen endógeno. Típicamente, se incluyen en el vector desde varios cientos de pares de bases hasta kilobases de ADN flanqueante (en los extremos tanto 5' como 3') (Véase por ejemplo, Thomas, K.R., y Capecchi, M.R., 1987, Cell 51: 503 para una descripción de vectores de recombinación homóloga). El vector se introduce en un microorganismo o célula vegetal (por ejemplo, mediante ADN mediado por polietilenglicol) y se seleccionan usando técnicas conocidas en este campo células en las que el gen de ACCDP introducido se ha recombinado de forma homóloga con el gen de ACCDP endógeno.

En otra variación de la divulgación, pueden producirse microorganismos recombinantes que contienen sistemas seleccionados que permiten la expresión regulada del gen introducido. Por ejemplo, la inclusión de un gen de ACCDP en un vector colocándolo bajo el control del operón lac permite la expresión del gen de ACCDP solamente en presencia de IPTG. Dichos sistemas reguladores se conocen bien en la técnica.

Bien si está presente en un vector no replicante extra-cromosómico o un vector que está integrado en un cromosoma, el polinucleótido ACCDP reside preferentemente en un casete de expresión vegetal. Un casete de expresión vegetal contiene preferentemente secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión génica en células vegetales que están unidas operativamente de modo que cada secuencia puede cumplir su función, por ejemplo, terminación de la transcripción por señales de poliadenilación. Son señales de poliadenilación preferidas las que se originan de ADN-t de *Agrobacterium tumefaciens* tales como el gen 3 conocido como octopina sintasa del plásmido Ti pTiACH5 (Gielen y col., 1984, EMBO J. 3: 835) o equivalentes funcionales del mismo, pero también son adecuados todos los otros terminadores funcionalmente activos en plantas. Como la expresión génica en plantas con mucha frecuencia no está limitada en los niveles de la transcripción, un casete de expresión vegetal preferentemente contiene otras secuencias unidas operativamente como potenciadores de la traducción tales como la secuencia overdrive que contiene la secuencia líder no traducida 5' del virus del mosaico del tabaco que potencia la relación de polipéptido por ARN (Gallie y col., 1987, Nucl. Acids Research 15: 8693-8711). Los ejemplos de vectores de expresión vegetales incluyen los detallados en: Becker, D., Kemper, E., Schell, J. y Masterson, R., 1992, New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border, Plant Mol. Biol. 20: 1195-1197; y Bevan, M.W., 1984, Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation, Nucl. Acid. Res. 12: 8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; en: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds.: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

La expresión génica de plantas debería estar unida operativamente a un promotor apropiado que confiere expresión génica de una manera oportuna, específica de célula o específica de tejido. Los promotores útiles en los casetes de expresión empleados en los procedimientos, plantas de cultivo y semillas de la invención incluyen cualquier promotor que sea capaz de iniciar la transcripción en una célula vegetal. Dichos promotores incluyen, pero sin limitación, los que pueden obtenerse de plantas, virus vegetales y bacterias que contienen genes que se expresan en plantas, tales como *Agrobacterium* y *Rhizobium*.

El promotor puede ser constitutivo, inducible, con preferencia de estadio del desarrollo, preferencia de tipo celular, preferencia de tejido o preferencia de órgano. Los promotores constitutivos están activos en la mayoría de las condiciones. Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen los promotores 19S y 35S de CaMV (Odell y col., 1985, Nature 313: 810-812), el promotor 35S de sX CaMV (Kay y col., 1987, Science 236: 1299-1302) el promotor Sep1, el promotor de actina de arroz (McElroy y col., 1990, Plant Cell 2: 163-171), el promotor de actina de *Arabidopsis*, el promotor de ubiquitina (Christensen y col., 1989, Plant Molec. Biol. 18: 675-689), pEmu (Last y col., 1991, Theor. Appl. Genet. 81: 581-588), el promotor 35S de virus del mosaico de *Scrophularia*, el promotor Smas (Velten y col., 1984, EMBO J 3: 2723-2730), el superpromotor (Patente de Estados Unidos N° 5.955.646), el promotor GRP1-8, el promotor de cinamil alcohol deshidrogenasa (Patente de Estados Unidos N° 5.683.439), promotores del ADN-T de *Agrobacterium*, tales como el promotor de manopina sintasa, nopalina sintasa y octopina sintasa, la subunidad pequeña de ribulosa bifosfato carboxilasa (ssuRUBISCO), y similares.

Los promotores inducibles están preferentemente activos en ciertas condiciones ambientales, tales como la presencia o ausencia de un nutriente o metabolito, calor o frío, luz, ataque por patógenos, condiciones anaerobias y similares. Por ejemplo, el promotor hsp80 de *Brassica* se induce por choque térmico; el promotor PPK se induce por luz; el promotor PR-1 del tabaco, *Arabidopsis*, y maíz es inducible por infección con un patógeno; y el promotor Adh1 se induce por hipoxia y tensión de frío. La expresión génica vegetal también puede facilitarse mediante un promotor inducible (Para una revisión, véase Gatz, 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 89-108). Los promotores inducibles químicamente son especialmente adecuados si se quiere que la expresión génica se produzca de una manera específica de tiempo. Son ejemplos de dichos promotores un promotor inducible por ácido salicílico (Solicitud de PCT N° WO 95/19443), un promotor inducible por tetraciclina (Gatz y col., 1992, Plant J. 2: 397-404), y un promotor inducible por etanol (Solicitud de PCT N° WO 93/21334).

En una realización preferida de la presente invención, el promotor inducible es un promotor inducible por tensión. Para los fines de la invención, los promotores inducibles por tensión están preferentemente activos en una o más de las siguientes tensiones: condiciones subóptimas asociadas con tensiones por salinidad, sequía, temperatura, metales, químicos, patógenos y oxidativos. Los promotores inducibles por tensión incluyen, pero sin limitación, Cor78 (Chak y col., 2000, Planta 210: 875-883; Hovath y col., 1993, Plant Physiol. 103: 1047-1053), Cor15a (Artus y col., 1996, PNAS 93 (23): 13404-09), Rci2A (Medina y col., 2001, Plant Physiol. 125: 1655-66; Nylander y col., 2001,

Plant Mol. Biol. 45: 341-52; Navarre y Goffeau, 2000, EMBO J. 19: 2515-24; Capel y col., 1997, Plant Physiol. 115: 569-76), Rd22 (Xiong y col., 2001, Plant Cell 13: 2063-83; Abe y col., 1997, Plant Cell 9: 1859-68; Iwasaki y col., 1995, Mol. Gen. Genet. 247: 391-8), cDet6 (Lang y Palve, 1992, Plant Mol. Biol. 20: 951-62), ADH1 (Hoeren y col., 1998, Genetics 149: 479-90), KAT1 (Nakamura y col., 1995, Plant Physiol. 109: 371-4), KST1 (Müller-Röber y col., 1995, EMBO 14: 2409-16), Rha1 (Terryn y col., 1993, Plant Cell 5: 1761-9; Terryn y col., 1992, FEBS Lett. 299 (3): 287-90), ARSK1 (Atkinson y col., 1997, N° de Referencia de GenBank L22302 y Solicitud de PCT N° WO 97/20057), PtxA (Plesch y col., N° de Referencia de GenBank X67427), SbHRGP3 (Ahn y col., 1996, Plant Cell 8: 1477-90), GH3 (Liu y col., 1994, Plant Cell 6: 645-57), el promotor del gen PRP1 inducible por patógeno (Ward y col., 1993, Plant. Mol. Biol. 22: 361-366), el promotor de hsp80 inducible por calor del tomate (Patente de Estados Unidos N° 5187267), promotor de alfa-amilasa inducible por frío de la patata (Solicitud de PCT N° WO 96/12814), o el promotor pinII inducible por herida (Patente Europea N° 375091). Para otros ejemplos de promotores inducibles por sequía, frío y salinidad, tales como el promotor RD29A, véase Yamaguchi-Shinozaki y col., 1993, Mol. Gen. Genet. 236: 331-340.

Los promotores con preferencia del estadio del desarrollo se expresan preferentemente en ciertos estadios del desarrollo. Los promotores con preferencia de tejido y órgano incluyen los que se expresan preferentemente en ciertos tejidos u órganos, tales como hojas, raíces, semillas o xilema. Los ejemplos de promotores con preferencia de tejido y preferencia de órgano incluyen, pero sin limitación, con preferencia de fruto, preferencia de óvulo, preferencia de tejido masculino, preferencia de semilla, preferencia de integumento, preferencia de tubérculo, preferencia de tallo, preferencia de pericarpio y preferencia de hoja, preferencia de estigma, preferencia de polen, preferencia de antera, preferencia de pétalo, preferencia de sépalo, preferencia de pedicelo, preferencia de silicua, preferencia de tronco, preferencia de raíz, preferencia y similares. Los promotores con preferencia de semillas se expresan preferentemente durante el desarrollo y/o germinación de la semilla. Por ejemplo, los promotores con preferencia de semilla pueden tener preferencia de embrión, preferencia de endospermo y preferencia de tegumento. Véase, Thompson y col., 1989, BioEssays 10: 108. Los ejemplos de promotores con preferencia de semilla incluyen, pero sin limitación, celulosa sintasa (celA), Cim1, gamma-zeína, globulina 1, zeína de 19 kD de maíz (cZ19B1) y similares.

Otros promotores adecuados con preferencia de tejido o preferencia de órgano incluyen el promotor del gen de napina de colza (Patente de Estados Unidos N° 5.608.152), el promotor de USP de *Vicia faba* (Baeumlein y col., 1991, Mol. Gen. Genet. 225 (3): 459-67), el promotor de oleosina de *Arabidopsis* (Solicitud de PCT N° WO 98/45461), el promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (Patente de Estados Unidos N° 5.504.200), el promotor de Bce4 *Brassica* (Solicitud de PCT N° WO 91/13980), o el promotor de legumina B4 (LeB4; Baeumlein y col., 1992, Plant Journal, 2 (2): 233-9), así como promotores que confieren expresión específica de semilla en plantas monocotiledóneas como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz, etc. Son promotores adecuados importantes el promotor del gen lpt2 o lpt1 de la cebada (Solicitud de PCT N° WO 95/15389 y Solicitud de PCT N° 95/23230) o los descritos en la Solicitud de PCT N° WO 99/16890 (promotores del gen de hordeína de cebada, gen de glutelina de arroz, gen de orizina de arroz, gen de prolamina de arroz, gen de gliadina de trigo, gen de glutelina de trigo, gen de glutelina de avena, gen de kasirina de sorgo y gen de secalina de centeno).

Otros promotores útiles en los casetes de expresión empleados en los procedimientos, plantas de cultivo o semillas de la invención incluyen, pero sin limitación, el promotor de proteína de unión a/b de clorofila mayor, promotores de histonas, el promotor de Ap3, el promotor de β -conglucina, el promotor de napina, el promotor de lecitina de soja, el promotor de zeína de 15 kD de maíz, el promotor de zeína de 22 kD, el promotor de zeína de 27 kD, el promotor de zeína g, los promotores Waxy, shrunken 1, shrunken 2 y bronze, el promotor Zm13 (Patente de Estados Unidos N° 5.086.169), los promotores de poligalacturonasa de maíz (PG) (Patentes de Estados Unidos N° 5.412.085 y 5.545.546) y el promotor de SGB6 (Patente de Estados Unidos N° 5.470.359), así como promotores sintéticos u otros naturales.

Puede obtenerse flexibilidad adicional en el control de la expresión génica heteróloga en plantas usando dominios de unión de ADN y elementos de respuesta de fuentes heterólogas (es decir, dominios de unión de ADN de fuentes no vegetales). Un ejemplo de dicho dominio de unión a ADN heterólogo es el dominio de unión a ADN LexA (Brent y Ptashne, 1985, Cell 43: 729-736).

La divulgación proporciona además un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN de ACCDP de la divulgación clonada en el vector de expresión en una orientación antisentido. Es decir, la molécula de ADN está unida operativamente a una secuencia reguladora de una manera que permite la expresión (mediante transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido de un ARNm de ACCDP. Pueden seleccionarse secuencias reguladoras unidas operativamente a una molécula de ácido nucleico clonada en la orientación antisentido que dirigen la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en una diversidad de tipo celulares. Por ejemplo, pueden seleccionarse promotores y/o potenciadores virales, o secuencias reguladoras que dirigen la expresión constitutiva directa, específica de tejido o específica de tipo celular de ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en el que se producen ácidos nucleicos antisentido bajo el control de una región reguladora de alta eficacia. La actividad de la región reguladora puede determinarse por el tipo celular en el que se introduce el vector. Para un análisis de la regulación de la expresión génica usando genes antisentido, véase Weintraub, H. y col., 1986, Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1), y Mol y col., 1990, FEBS Letters

268:427-430.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a células huésped en las que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la divulgación. Las expresiones “célula huésped” y “célula huésped recombinante” se usan de forma intercambiable en el presente documento. Se entiende que dichas expresiones se refieren no solamente a la célula objeto particular sino que también se aplican a la descendencia o descendencia potencial de dicha célula. Debido a que pueden realizarse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a la mutación o las influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero estar incluida aún dentro del alcance de la expresión como se usa en el presente documento. Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un ACCDP puede expresarse en células bacterianas tales como *C. glutamicum*, células de insecto, células fúngicas o células de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS), algas, ciliados, células vegetales, hongos u otros microorganismos como *C. glutamicum*. Se conocen por los expertos en la materia otras células huésped adecuadas.

Una célula huésped de la divulgación, tal como una célula huésped procariota o eucariota en cultivo, puede usarse para producir (es decir, expresar) un ACCDP. En consecuencia, la divulgación proporciona además procedimientos para producir ACCDP que usan las células huésped de la divulgación. En una variación de la divulgación, el procedimiento comprende cultivar la célula huésped de la divulgación (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica un ACCDP o en cuyo genoma se ha introducido un gen que codifica un ACCDP natural o alterado) en un medio adecuado hasta que se produce el ACCDP. En otra variación de la divulgación, el procedimiento comprende además aislar ACCDP del medio o la célula huésped.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a ACCDP aislados y partes biológicamente activas de los mismos. Un polipéptido “aislado” o “purificado” o parte biológicamente activa del mismo está sin parte del material celular cuando se produce por técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La frase “sustancialmente sin material celular” incluye preparaciones de ACCDP en las que el polipéptido está separado de parte de los componentes celulares de las células en las que se produce de forma natural o recombinante. En una variación de la divulgación, la frase “sustancialmente sin material celular” incluye preparaciones de un ACCDP que tiene menos de aproximadamente el 30 % (en peso seco) de material no ACCDP (también denominado en el presente documento “polipéptido contaminante”), más preferentemente menos de aproximadamente el 20 % de material no ACCDP, aún más preferentemente menos de aproximadamente el 10 % de material no ACCDP, y más preferentemente menos de aproximadamente el 5 % de material no ACCDP.

Las moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, homólogos de polipéptidos, polipéptidos de fusión, cebadores, vectores y células huésped descritos en el presente documento pueden usarse en uno o más de los siguientes procedimientos: identificación de cualquiera de los organismos proporcionados en la Columna N° 2 de la Tabla 1 y la Tabla 2 y organismos relacionados; mapeo de organismos relacionados con cualquiera de los organismos proporcionados en la Columna N° 2 de la Tabla 1 y la Tabla 2; identificación y localización de las secuencias de interés de cualquiera de los organismos proporcionados en la Columna N° 2 de la Tabla 1 y la Tabla 2; estudios evolutivos; determinación de regiones de ACCDP requeridas para la función; modulación de una actividad de ACCDP; modulación del metabolismo de una o más funciones celulares; modulación del transporte transmembrana de uno o más compuestos; modulación de la resistencia a tensión; y modulación de la expresión de ácidos nucleicos de ACCDP. En una realización de estos procedimientos, el ACCDP puede convertir ACC en α -ketobutirato y amoníaco.

Las moléculas de ácido nucleico de ACCDP de acuerdo con la divulgación tienen una diversidad de usos. Lo que es más importante, las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos usadas en la presente invención pueden usarse para transformar plantas, particularmente plantas de cultivo, induciendo de este modo tolerancia a tensiones tales como sequía, alta salinidad y frío. La presente invención proporciona por lo tanto una planta de cultivo transgénico transformada por un ácido nucleico de ACCDP, en la que la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la planta da como resultado aumento del crecimiento de la raíz y/o tolerancia a la tensión ambiental en comparación con una variedad natural de la planta. La planta de cultivo transgénico puede ser una monocotiledónea o una dicotiledónea. La invención proporciona además que la planta pueda seleccionarse de maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, sorgo, mijo, caña de azúcar, soja, cacahuete, algodón, colza, canola, *Manihot*, pimiento, girasol, *Tagetes*, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especies de *Vicia*, guisante, alfalfa, café, cacao, té, especies de *Salix*, palma aceitera, coco, hierba perenne y cultivos de forraje, por ejemplo.

En particular, la presente invención describe el uso de la expresión de ácidos nucleicos que codifican ACCDP para modificar por ingeniería genética plantas con crecimiento de la raíz aumentado, rendimiento aumentado y/o que son tolerantes a la sequía, tolerantes a salinidad y/o tolerantes al frío. Esta estrategia se ha demostrado en el presente documento usando AtACCD (SEC ID N°: 1) en *Arabidopsis thaliana* y maíz, pero su aplicación no se restringe a este gen o a estas plantas. En consecuencia, la invención proporciona una planta de cultivo transgénico que contiene un ACCDP como se define en SEC ID N°: 2 o un homólogo del mismo como se define en el presente documento, en el que la planta tiene crecimiento de la raíz aumentado, rendimiento aumentado y/o tolerancia aumentada a una tensión ambiental seleccionada de una o más del grupo que consiste en sequía, salinidad aumentada o temperatura aumentada o reducida. En realizaciones preferidas, la tensión ambiental es sequía. En otras realizaciones preferidas, el crecimiento de la raíz aumentado es un aumento de la longitud de la raíz, preferentemente en

condiciones limitantes de agua.

La divulgación también proporciona un procedimiento para producir una planta de cultivo transgénico que contiene un ácido nucleico que codifica ACCDP, en el que la expresión del ácido o los ácidos nucleicos en la planta da como resultado aumento del crecimiento de la raíz, aumento del rendimiento y/o aumento de la tolerancia a la tensión ambiental en comparación con una variedad natural de la planta que comprende: a) introducir en una célula vegetal un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de ACCDP y b) generar a partir de la célula vegetal una planta transgénica con un aumento del crecimiento de la raíz, aumento del rendimiento y/o aumento de la tolerancia a la tensión ambiental en comparación con una variedad natural de la planta. La célula vegetal incluye, pero sin limitación, un protoplasto, célula productora de gametos y una célula que regenera una planta completa. Como se usa en el presente documento, el término "transgénico" se refiere a cualquier planta, célula vegetal, callo, tejido vegetal o parte de planta que contiene todo o parte de al menos un polinucleótido recombinante. En muchos casos, todo o parte del polinucleótido recombinante está integrado de forma estable en un cromosoma o elemento extracromosómico estable, de modo que se pasa a generaciones sucesivas. En una variación preferida, el ácido nucleico de ACCDP codifica una proteína que comprende el polipéptido de cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2.

La presente invención también proporciona un procedimiento para modular el crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a la tensión ambiental de una planta que comprende modificar la expresión de un ácido nucleico que codifica ACCDP en la planta en el que el crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a la tensión ambiental de la planta aumentan aumentando la expresión de un ACCDP como se ha descrito anteriormente en el presente documento. La expresión de un ACCDP puede modificarse por cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia. La planta de cultivo puede transformarse con un vector que contenga cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican ACCDP descritos anteriormente. La invención posibilita que dicho promotor pueda tener preferencia de tejido, estar regulado por el desarrollo, ser inducible por tensión, o una combinación de los mismos. La expresión de ACCDP como se define en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 4 de la Tabla 1 y la Tabla 2 en plantas diana puede conseguirse, pero sin limitación, por uno de los siguientes ejemplos: (a) promotor constitutivo, (b) promotor inducible por tensión, (c) promotor inducido por producto químico y (d) sobreexpresión de promotor modificado por ingeniería genética con, por ejemplo, factores de transcripción derivados de dedos de cinc (Greisman y Pabo, 1997, Science 275: 657).

La transcripción del ACCDP puede modularse usando patrones de transcripción derivados de dedos de cinc (ZFP) como se describe en Greisman y Pabo, 1997, Science 275: 657 y fabricados por Sangamo Biosciences, Inc. Estos ZFP comprenden tanto un dominio de reconocimiento de ADN como un dominio funcional que provoca activación o represión de un ácido nucleico diana tal como un ácido nucleico de ACCDP. Por lo tanto, pueden crearse ZFP activadores y represores que reconocen específicamente los promotores de ACCDP descritos anteriormente y usarse para aumentar o reducir la expresión de ACCDP en una planta, modulando de este modo el rendimiento y/o la tolerancia a la tensión de la planta. La presente divulgación también incluye identificación de los homólogos de ácidos nucleicos que codifican ACCDP como se define en cualquiera de las SEC ID N° proporcionadas en la Columna N° 3 de la Tabla 1 y la Tabla 2 en una planta diana, así como el promotor del homólogo. La divulgación también proporciona un procedimiento para aumentar la expresión de un gen de interés dentro de una célula huésped en comparación con una variedad natural de la célula huésped, en el que el gen de interés se transcribe en respuesta a un ACCDP, que comprende: (a) transformar la célula huésped con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica ACCDP y (b) expresar el ACCDP dentro de la célula huésped, aumentando de este modo la expresión del gen transcrito en respuesta al ACCDP, en comparación una variedad natural de la célula huésped.

Además de introducir las secuencias de ácido nucleico de ACCDP en plantas transgénicas, estas secuencias también pueden usarse para identificarse que un organismo es cualquiera de los organismos proporcionadas en la Columna N° 2 de la Tabla 1 y la Tabla 2, o un pariente cercano de los mismos. Además, pueden usarse para identificar la presencia de cualquiera de los organismos proporcionados en la Columna N° 2 de la Tabla 1 y la Tabla 2, o un pariente de los mismos en una población mixta de organismos. La divulgación se refiere a las secuencias de ácido nucleico de varios genes de cualquiera de los organismos proporcionados en la Columna N° 2 de la Tabla 1 y la Tabla 2; explorando el ADN genómico extraído de un cultivo de una población única o mixta de organismos en condiciones rigurosas con una sonda que abarca una región de un gen particular que es único para el organismo correspondiente de acuerdo con la Tabla 1 y la Tabla 2, se puede determinar si este organismo está presente.

Además, las moléculas de ácido nucleico y polipéptidos de acuerdo con la divulgación pueden actuar como marcadores para las regiones específicas del genoma. Esto tiene utilidad no solamente en el mapeado del genoma, sino también en estudios funcionales de los polipéptidos codificados por dicho genoma. Por ejemplo, para identificar la región del genoma a la que se une un polipéptido de unión a ADN de un organismo particular, el genoma del organismo podría digerirse, y los fragmentos incubarse con el polipéptido de unión a ADN. Los fragmentos que se unan al polipéptido pueden explorarse adicionalmente con las moléculas de ácido nucleico de la divulgación, preferentemente con marcadores fácilmente detectables. La unión de dicha molécula de ácido nucleico con el fragmento del genoma permite la localización del fragmento en el mapa genómico de dicho organismo y, cuando se realice múltiples veces con diferentes enzimas, facilita una determinación rápida de la secuencia de ácido nucleico a la que se une el polipéptido. Además, las moléculas de ácido nucleico de la divulgación pueden ser suficientemente

idénticas a las secuencias de especies relacionadas de modo que estas moléculas de ácido nucleico pueden actuar como marcadores para la construcción de un mapa genómico en plantas relacionadas.

Las moléculas de ácido nucleico de ACCDP de la divulgación también son útiles para estudios estructurales polipeptídicos y evolutivos. Los procesos de conversión de aminoácidos en los que participan las moléculas de la divulgación se utilizan por una amplia diversidad de células procariotas y eucariotas; comparando las secuencias de las moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación con las que codifican enzimas similares de los organismos, puede evaluarse la relación evolutiva de los organismos. De forma similar, dicha comparación permite una evaluación de qué regiones de la secuencia se conservan y cuáles no, que puede ayudar a determinar las regiones del polipéptido que son esenciales para el funcionamiento de la enzima. Este tipo de determinación es valiosa para estudios de ingeniería de polipéptidos y puede proporcionar un indicio de lo que el polipéptido puede tolerar con respecto a mutagénesis sin perder función.

La manipulación de las moléculas de ácido nucleico de ACCDP de la divulgación puede dar como resultado la producción de ACCDP que tienen diferencias funcionales de los ACCDP naturales. Estos polipéptidos pueden mejorarse en eficacia o actividad, pueden estar presentes en mayores números en la célula de lo que es habitual, o pueden reducirse en eficacia o actividad.

Hay varios mecanismos por los que la alteración de un ACCDP útil en los procedimientos, plantas de cultivo o semillas de la invención puede afectar directamente al crecimiento de la raíz, rendimiento y/o respuesta a la tensión y/o tolerancia a la tensión. En el caso de plantas que expresan ACCDP, la enzima podría actuar para estimular la elongación de la raíz secuestrando e hidrolizando ACC de semillas en germinación, reduciendo de este modo el nivel de ACC y en consecuencia reduciendo el nivel de etileno en las semillas. Para muchas plantas, el etileno estimula la germinación. Se ha observado que si la concentración de etileno permanece alta después de la germinación, se inhibe la elongación de las raíces (Jackson (1991), páginas 159-181 en A.K. Matoo y J.C. Suttle (ed.) *The Plant Hormone Ethylene*, CRC Press, Boca Raton, FL). Por lo tanto, la reducción de las concentraciones de etileno en semillas después de la germinación conduce a un aumento de la longitud de las raíces, y mejora de la eficacia en el uso del agua de las plantas.

El efecto de la modificación genética de las plantas, *C. glutamicum*, hongos, algas o ciliados en el crecimiento de la raíz y/o de la tolerancia a la tensión puede evaluarse cultivando el microorganismo modificado o la planta en condiciones no idóneas y analizando después las características de crecimiento y/o el metabolismo de la planta. Dichas técnicas de análisis se conocen bien por los expertos en la materia, e incluyen peso seco, peso húmedo, síntesis de polipéptidos, síntesis de carbohidratos, síntesis de lípidos, velocidades de evapotranspiración, rendimiento de planta y/o cultivo general, floración, reproducción, formación de semillas, crecimiento de la raíz, velocidades de respiración, velocidades de fotosíntesis, etc. (Applications of HPLC in Biochemistry en: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 17; Rehm y col., 1993 *Biotechnology*, vol. 3, Capítulo III: *Product recovery and purification*, páginas 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A. y col., 1988, *Bioseparations: downstream processing for biotechnology*, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F. y Cabral, J.M.S., 1992, *Recovery processes for biological materials*, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A. y Henry, J.D., 1988, *Biochemical separations*, en: *Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, vol. B3, Capítulo 11, páginas 1-27, VCH: Weinheim; y Dechow, F.J., 1989, *Separation and purification techniques in biotechnology*, Noyes Publications).

Por ejemplo, los vectores de expresión de levaduras que comprenden los ácidos nucleicos desvelados en el presente documento, o fragmentos de los mismos, pueden construirse y transformarse en *Saccharomyces cerevisiae* usando protocolos convencionales. Las células transgénicas resultantes pueden ensayarse después con respecto a fallo o alteración de su aumento de crecimiento y/o tolerancia a tensiones de sequía, salinidad y temperatura. De forma similar, pueden construirse vectores de expresión vegetales que comprenden los ácidos nucleicos desvelados en el presente documento, o fragmentos de los mismos, y transformarse en una célula vegetal apropiada tal como *Arabidopsis*, soja, colza, maíz, trigo, *Medicago truncatula*, etc. usando protocolos convencionales. Las células transgénicas resultantes y/o plantas derivadas de las mismas pueden ensayarse después con respecto a fallo o alteración de su aumento de crecimiento de la raíz y/o tolerancia a tensiones de sequía, salinidad y temperatura.

Adicionalmente, las secuencias desveladas en el presente documento, o fragmentos de las mismas, pueden usarse para generar mutaciones de supresión en los genomas de diversos organismos, tales como bacterias, células de mamífero, células de levadura y células vegetales (Girke, T., 1998, *The Plant Journal* 15: 39-48). Las células con supresión resultantes pueden después evaluarse con respecto a su capacidad para tolerar diversas condiciones de tensión, su respuesta a diversas condiciones de tensión y los efectos sobre el fenotipo y/o genotipo de la mutación. Para otros procedimientos de inactivación génica, véase Patente de Estados Unidos N° 6.004.804 "Non-Chimeric Mutational Vectors" y Puttaraju y col., 1999, *Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy*, *Nature Biotechnology* 17: 246-252.

No se pretende que las estrategias de mutagénesis anteriormente mencionadas para ACCDP que dan como resultado aumento del crecimiento de la raíz, rendimiento y/o tolerancia a la tensión sean limitantes; resultarán fácilmente evidentes para un experto en la materia variaciones sobre estas estrategias. Usando dichas estrategias, e incorporando los mecanismos desvelados en el presente documento, las moléculas de ácidos nucleicos y

polipéptidos de la divulgación pueden utilizarse para generar algas, ciliados, plantas, hongos u otros microorganismos como *C. glutamicum* que expresan moléculas de ácido nucleico y polipéptidos de ACCDP mutado de modo que se mejoren el crecimiento de la raíz y/o la tolerancia a la tensión.

5 La presente divulgación también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a un ACCDP, o una parte del mismo, como se codifica por un ácido nucleico descrito en el presente documento. Pueden realizarse anticuerpos por muchos procedimientos bien conocidos (Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies; A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, (1988)). Brevemente, puede inyectarse antígeno purificado en un mamífero en una cantidad y en intervalos suficientes para inducir una respuesta inmunitaria. Los anticuerpos pueden purificarse directamente, o pueden obtenerse células del bazo del animal. Las células pueden fusionarse después con una línea celular inmortal y explorarse con respecto a secreción de anticuerpos. Los anticuerpos pueden usarse para explorar bibliotecas de clones de ácido nucleico con respecto a células que secretan el antígeno. Después pueden secuenciarse los clones positivos. (Véase, por ejemplo, Kelly y col., 1992, *Bio/Technology* 10: 163-167; Bebbington y col., 1992, *Bio/Technology* 10: 169-175).

15 Las expresiones "se une selectivamente" y "se une específicamente" con el polipéptido se refieren a una reacción de unión que es determinante de la presencia del polipéptido en una población heterogénea de polipéptidos y otros productos biológicos. Por lo tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos específicos unidos a un polipéptido particular no se unen en una cantidad significativa con otros polipéptidos presentes en la muestra. La unión selectiva de un anticuerpo en dichas condiciones puede requerir un anticuerpo que se selecciona con respecto a su especificidad por un polipéptido particular. Puede usarse una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos que se unen selectivamente con un polipéptido particular. Por ejemplo, se usan de forma rutinaria inmunoensayos de ELISA de fase sólida para seleccionar anticuerpos selectivamente inmunorreactivos con un polipéptido. Véase Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988), para una descripción de formatos de inmunoensayo y condiciones que podrían usarse para determinar la unión selectiva.

25 En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales de diversos huéspedes. Puede encontrarse una descripción de técnicas para preparar dichos anticuerpos monoclonales en Stites y col., eds., "Basic and Clinical Immunology," (Lange Medical Publications, Los Altos, Calif., Cuarta Edición) y referencias citadas en la misma, y en Harlow y Lane, "A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, 1988.

30 En la presente solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones. Las divulgaciones de todas estas publicaciones y las referencias citadas dentro de esas publicaciones en sus totalidades son útiles para describir más completamente el estado de la técnica a la que concierne la presente invención.

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse de ningún modo como limitantes del alcance de la misma.

Ejemplos

35 Ejemplo 1

Aislamiento de ADN total de material vegetal

Los detalles para el aislamiento de ADN total se refieren al desarrollo de un gramo de peso en fresco del material vegetal. Los materiales usados incluyen los siguientes tampones: tampón de CTAB: bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio (CTAB) 2 % (p/v); Tris HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; tampón de N-Laurilsarcosina: N-laurilsarcosina 10 % (p/v); Tris HCl 100 mM pH 8,0; y EDTA 20 mM.

45 El material vegetal se trituró en nitrógeno líquido en un mortero para proporcionar un polvo fino y se transfirió a recipientes de Eppendorf de 2 ml. El material vegetal congelado se cubrió después con una capa de 1 ml de tampón de descomposición (1 ml de tampón de CTAB; 100 µl de tampón de N-laurilsarcosina, 20 µl de β-mercaptoetanol y 10 µl de solución de proteinasa K, 10 mg/ml) y se incubó a 60 °C durante una hora con agitación continua. El homogeneizado obtenido se distribuyó en dos recipientes Eppendorf (2 ml) y se extrajo dos veces agitando con el mismo volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Para separación de fases, se llevó a cabo centrifugación a 8000 x g y temperatura ambiente durante 15 minutos en cada caso. El ADN se precipitó después a -70 °C durante 30 minutos usando isopropanol helado. El ADN precipitado se sedimentó a 4 °C y 10.000 g durante 30 minutos y se resuspendió en 180 µl de tampón TE (Sambrook y col., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6). Para purificación adicional, el ADN se trató con NaCl (concentración final 1,2 M) y se precipitó de nuevo a -70 °C durante 30 minutos usando dos veces el volumen de etanol absoluto. Después de una etapa de lavado con etanol a 70 %, el ADN se secó y se captó posteriormente en 50 µl de H₂O + RNAsa (concentración final de 50 mg/ml). El ADN se disolvió durante una noche a 4 °C, y la digestión con RNAsa se llevó a cabo posteriormente a 37 °C durante 1 hora. El almacenamiento del ADN tuvo lugar a 4 °C.

55 Ejemplo 2

Preparación de ARN total y ADNc de material vegetal de Arabidopsis

Se aisló AtACCD preparando ARN de hojas de *Arabidopsis* usando el minikit de aislamiento de ARN (kit Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizaron reacciones de transcripción inversa y amplificación del ADNc como se describe a continuación.

- 5 1. Usar 2 \cdot l de preparación de ARN (0,5 – 2,0 \cdot g) en una reacción de Dnasa de 10 \cdot l, mover el tubo a 37 $^{\circ}$ C durante 15 minutos, añadir 1 \cdot l de EDTA 25 mM, y después calentar la reacción a 65 $^{\circ}$ C durante 15 minutos.
 - a. Tampón (10X: Tris 200 mM, KCl 500 mM, MgCl₂ 20 mM) – 1 \cdot l
 - b. ARN – 2 \cdot l
 - c. Dnasa (10 U/ \cdot l)- 1 \cdot l
 - d. H₂O – 6 \cdot l
- 10 2. Usar 1 \cdot l de la reacción anterior en una reacción a temperatura ambiente, y calentar a 65 $^{\circ}$ C durante 5 minutos.
 - a. ARN cortado con Dnasa (0,025-0,1 \cdot g dependiendo de la cantidad de partida)- 1 \cdot l
 - b. dNTP 10 mM – 1 \cdot l
 - c. Cebador (10 \cdot M)- 1 \cdot l
 - d. H₂O – hasta 10 \cdot l
- 15 3. Preparar una mezcla de reacción con restos reactivos en un tubo separado
 - a. Tampón SuperScript II RT (10X)- 2 \cdot l
 - b. MgCl₂ 25 mM – 4 \cdot l
 - c. DTT (0,1 M) – 2 \cdot l
 - d. Inhibidor de Rnasa Rnase Out (40 U/ \cdot l)- 1 \cdot l
- 20 4. Añadir la mezcla de reacción de 9 \cdot l a la solución de ARN desnaturalizada y mantener a 42 $^{\circ}$ C durante 2 minutos.
 5. Añadir 1 \cdot l de SuperScript II RT (50 U/ \cdot l) e incubar a 42 $^{\circ}$ C durante 50 minutos.
 5. Terminar la reacción a 70 $^{\circ}$ C durante 15 minutos.
 7. Opcional: añadir 1 \cdot l de RNasaH a la reacción para retirar el ARN.
 8. Realizar PCR como se haría usando 1-2 \cdot l del nuevo ADNc.

25 Recogida de tejido, aislamiento ARN y construcción de biblioteca de ADNc

Se cultivaron plantas de cultivo en una diversidad de condiciones y tratamientos, y se recogieron diferentes tejidos en diversos estadios del desarrollo. El cultivo de la planta y la recogida se realizó de una manera estratégica de modo que la probabilidad de recoger todos los genes expresables en al menos una o más de las bibliotecas resultantes se maximiza. El ARNm se aisló como se ha descrito anteriormente de cada una de las muestras recogidas y se construyeron bibliotecas de ADNc. No se usaron etapas de amplificación en el procedimiento de producción de biblioteca para minimizar la redundancia de los genes dentro de la muestra y conservar información de expresión. Todas las bibliotecas se generaron 3' del ARNm purificado en columnas de oligo dT. Se seleccionaron aleatoriamente colonias de la transformación de la biblioteca de ADNc en *E. coli* y se colocaron en placas de microtitulación.

35 Amplificación por PCR de insertos de ADNc y aplicación puntual

Los insertos de ADNc de cada clon de las placas de microtitulación se amplificaron por PCR. Se aisló ADN plasmídico de las colonias de *E. coli* y después se aplicaron puntualmente las membranas. No fue necesaria etapa de purificación antes de aplicar puntualmente muestras a membranas de nailon.

Ejemplo 3

40 *Clonación de AtACCD*

El ADNc aislado como se ha descrito en el Ejemplo 2 se usó para clonar el gen de AtACCD por RT-PCR. Se usaron los siguientes cebadores: El cebador directo fue 5' - 5' GGGGTCGACGAAGCAATGAGAGGACGAAGCT - 3' (SEC ID N $^{\circ}$: 358). El cebador inverso fue 5' - GGGTTAATTAACAGATTTTGTGTGCTAGAAC - 3' (SEC ID N $^{\circ}$: 359). Las reacciones de PCR para la amplificación incluyeron: tampón de PCR 1x, dNTP 0,2 mM, 100 ng de ADN de *Arabidopsis thaliana*, 25 pmol de cebador inverso, 2,5 u de ADN polimerasa Pfu o Herculasa.

Se realizó PCR de acuerdo con condiciones convencionales y los protocolos del fabricante (Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2 $^{\text{a}}$ Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, termociclador Biometra T3). Los parámetros para la reacción fueron: 1 ciclo de 3 minutos a 94 $^{\circ}$ C; seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 94 $^{\circ}$ C, 30 segundos a 55 $^{\circ}$ C y 1,5 minutos a 72 $^{\circ}$ C.

- 50 Los fragmentos amplificados se extrajeron después del gel de agarosa con un Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen) y se ligaron en el vector TOPO pCR 2.1 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transformaron vectores recombinantes en células Top10 (Invitrogen) usando condiciones convencionales (Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2 $^{\text{a}}$ Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

Harbor, NY). Se seleccionaron células transformadas en agar LB que contenía carbenicilina 100 µg/ml, 0,8 mg de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) y 0,8 mg de IPTG (isopropiltio-β-D-galactósido) cultivadas durante una noche a 37 °C. Se seleccionaron colonias blancas y se usaron para inocular 3 ml de LB líquido que contenía ampicilina 100 µg/ml y se cultivaron durante una noche a 37 °C. Se extrajo el ADN plasmídico usando el Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron análisis de clones posteriores y mapeo de restricción de acuerdo con técnicas de biología molecular convencionales (Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Los clones se secuenciaron, lo que confirmó que la identidad del gen clonado era idéntica a la secuencia depositada en la base de datos de *Arabidopsis thaliana* (SEC ID N°: 1). La secuencia de aminoácidos deducida de AtACCD se muestra en la SEC ID N°: 2.

El gen de AtACCD se clonó después en un vector binario y se expresó bajo el Superpromotor (Figura 3). El Superpromotor es constitutivo, pero preferente en raíces (Patentes de Estados Unidos N° 5.428.147 y 5.217.903).

Ejemplo 4

Transformación de plantas de Arabidopsis

Se generaron plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénica (Col) por el procedimiento de infiltración por inmersión (Bechtold y col., Sci. Paris Life Sci. 316: 1194-1199). Los vectores binarios se transformaron en cepa de *Agrobacterium* C58C1 o pMP90 usando electroporación. Se dejó crecer un cultivo de las *Agrobacterium* transformadas, y las bacterias se resuspendieron en medio de infiltración por inmersión (MS 1/2, sacarosa 5 %, MES 0,5 mg/ml, pH 5,7 y con 200 ppm de Silwet L-77 (Semillas de Lehle) añadidas). Cada cultivo se usó para transformar 3 macetas de plantas *Arabidopsis* Col0 de aproximadamente 5 semanas de edad sumergiendo las macetas 5 minutos cada una en cultivos de *Agrobacterium* resuspendidos. Las plantas se cultivaron después para siembra en condiciones de *Arabidopsis* convencionales (23 °C día/20 °C noche, 18 horas días y 65 % de humedad). Se exploraron las semillas T1 en placas de MS usando Pursuit 100 nM (BASF).

Exploración de plantas transformadas

Las semillas T1 se esterilizaron de acuerdo con protocolos convencionales (Xiong y col., 1999, Plant Molecular Biology Reporter 17: 159-170). Las semillas se seleccionaron en medio Murashige ½ y Skoog (MS) (Sigma-Aldrich), agar 0,6 % y complementado con sacarosa 1 % y benomilo 2 µg/ml (Sigma-Aldrich). Las semillas en las placas se vernalizaron durante cuatro días a 4 °C. Las semillas se germinaron en una cámara climática a una temperatura del aire de 22 °C e intensidad de la luz de 40 micromoles⁻¹m² (luz blanca; tubo fluorescente Philips TL 65W/25) y ciclo de longitud del día de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Las plántulas transformadas se seleccionaron después de 14 días y se transfirieron a medio MS ½ complementado con agar 0,5 %, sacarosa 1 % y se permitió que se recuperaran durante cinco a siete días.

Las semillas de la generación T2 se usaron para análisis de raíces vegetales en suelo e *in vitro*.

Ejemplo 5

Análisis de raíz in vitro de plantas de Arabidopsis transformadas

Para el análisis de la raíz *in vitro* de las plantas transformadas, se usaron placas cuadradas que medían 12 cm x 12 cm. Para cada placa, se usaron 52 ml de medio MS (sales de MS 0,5X, sacarosa 0,5 %, tampón MES 0,5 g/l, Phytagar 1 %) sin selección. Se permitió que las placas se secaran en la campana estéril durante una hora para reducir la condensación futura.

Se esterilizaron alícuotas de semillas en frascos de vidrio con etanol durante 5 minutos, se retiró el etanol y se permitió que las semillas se secaran en la campana estéril durante una hora. Las semillas se aplicaron puntualmente en las placas usando el Dispositivo Vacuseed (Lehle). En el diseño experimental, cada placa contenía plantas transgénicas tanto naturales como AtACCD. Por lo tanto, cada línea se comparó siempre con los controles cultivados en la misma o las mismas placas para explicar la variación microambiental. Después de aplicar las semillas puntualmente en las placas, las placas se envolvieron con Ventwrap y se colocaron verticalmente en rejillas en la oscuridad a 4 °C durante cuatro días para estratificar las semillas. Las placas se transfirieron a una Cámara de Cultivo Percival C5 y se colocaron verticalmente durante 14 días. Las condiciones de la cámara de cultivo fueron de 23 °C día/21 °C noche y 16 horas día/8 horas noche.

Para la recogida de datos se usó un explorador de lecho plano de alta resolución. Se realizó análisis de las raíces usando el paquete de software WinRhizo.

Los resultados de estos experimentos también se analizaron al nivel génico. Para hacer esto, se promedió la longitud de la raíz de todas las plantas para todas las líneas transgénicas y se comparó frente a la media de las plantas naturales. La presencia del transgén y el número de copias de los acontecimientos se determinaron dirigiendo el terminador NOS en PCR a tiempo real. Los Cebadores NOS usados para el análisis fueron: cebador

Directo 5'- TCCCCGATCGTTCAAACATT- 3' (SEC ID N°: 360), cebador Inverso 5'- CCATCTCATAAATAACGTCATGCAT- 3' (SEC ID N°: 361). Las reacciones se procesaron en una placa óptica de 96 pocillos (Applied Biosystems, 4314320) y las reacciones de control endógeno y gen de interés se procesaron en la misma placa simultáneamente. Se realizó una mezcla maestra para ambos conjuntos de cebadores. Las mezclas maestras y la placa de 96 pocillos para el ensayo deberían mantenerse en hielo. Se incluyen cálculos para 52 reacciones, lo que es adecuado para la mitad de la placa con uso de un pipeteador multicanal. Se usó el kit Eurogentec, (cat N° RTSNRT032X-1) y las reacciones se prepararon usando las recomendaciones del fabricante. Se usó un GeneAmp 5700 para procesar las reacciones y recoger datos.

Resultados

10 Los resultados muestran que las plantas de AtACCD transgénicas evaluadas en las placas tienen un fenotipo de raíz más larga. La Figura 4A muestra los resultados de las plantas cultivadas en placas verticales por cada línea. La mayoría de las líneas transgénicas de AtACCD exploradas mostraron un fenotipo de raíz más larga en comparación con raíces de planta de control natural. El fenotipo se observó más claramente en las líneas 2, 3, 5, 6 y 9.

15 El análisis a nivel génico de las plantas transgénicas para AtACCD, como se ve en la Figura 4B, confirmó que las plantas de AtACCD mostraron un fenotipo de longitud de raíz aumentada. Basándose en este análisis, las plantas de *Arabidopsis* transgénicas para ACCDP mostraron un aumento del 13,8 % en la longitud de la raíz.

Ejemplo 6

Análisis de raíz en suelo de plantas de Arabidopsis transformadas

20 Para análisis de raíz en suelo, las semillas se incluyeron a 4 °C durante 2 días en agua y se plantaron directamente en el suelo sin selección. Se usaron Deepots (Hummert D40) con un sedimento de turba saturado (Jiffy 727) en la base y se llenaron con Metromix saturada de agua. Después de plantar, las macetas se cubrieron con envoltura de plástico para evitar el secado. Las plantas se cultivaron usando solamente agua presente en la preparación del medio, ya que el agua en el suelo de estas macetas grandes es suficiente para 3 semanas de crecimiento, y promueve el crecimiento rápido de la raíz. La envoltura de plástico de las macetas se retiró después de 12 días y se documentaron los datos morfológicos. El día 17 se recogieron las partes aéreas de la planta, se secaron a 65 °C durante 2 días y se midió el peso seco. Para examinar las raíces, el sedimento de turba se empujó hacia la parte superior de la maceta para retirar el suelo y las raíces como una unidad. Después se separó el suelo de las raíces en una bandeja y se midió la longitud máxima de la raíz.

30 Para determinar el impacto del fenotipo de la raíz en los tejidos sobre el suelo de las plantas transgénicas, se midió el peso seco de la roseta y se comparó frente a las plantas naturales.

Resultados

35 También se evaluaron las raíces de las líneas de AtACCD en suelo como se ha descrito anteriormente. Los resultados indicaron que las plantas transgénicas mostraban un fenotipo de raíz más larga cuando las plantas se cultivan en suelo (Figuras 5 y 6). En general, todas las líneas de AtACCD analizadas mostraron aumento del crecimiento en el ensayo basado en el suelo. Las líneas 2, 4, 7, 10 y 11 mostraron el mayor aumento en la longitud de la raíz (Figura 5). La Figura 6 muestra la ANOVA del rendimiento global del gen de AtACCD, que demuestra que las plantas transgénicas para AtACCD rindieron significativamente mejor que los controles naturales.

40 Se midió el peso seco de la roseta y se muestra el análisis de ANOVA de los resultados en la Figura 7. No se observaron diferencias significativas entre las plantas transgénicas y los controles naturales. Por lo tanto, la biomasa de la roseta no parece estar afectada por la sobreexpresión del gen de AtACCD.

Ejemplo 7

Identificación de homólogos para AtACCD

45 Los algoritmos usados en la presente invención incluyen: FASTA (Búsquedas de bases de datos de secuencias muy sensibles con estimaciones de la significación estadística; Pearson, 1990, Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA, *Methods Enzymol.* 183: 63-98); BLAST (Búsquedas de bases de datos de secuencias muy sensibles con estimaciones de significación estadística; Altschul y col., Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology* 215: 403-10); PREDATOR (Predicción de estructura secundaria de alta precisión de secuencias individuales y múltiples; Frishman y Argos, 1997, 75 % accuracy in protein secondary structure prediction. *Proteins* 27: 329-335); CLUSTALW (Alineamiento de múltiples secuencias; Thompson y col., 1994, CLUSTALW (improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice), *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680); TMAP (Predicción de región transmembrana de múltiples secuencias alineadas; Persson y Argos, 1994, Prediction of transmembrane segments in proteins utilizing multiple sequence alignments, *J. Mol. Biol.* 237:182-192); ALOM2 (Predicción de región transmembrana de secuencias individuales; Klein y col., Prediction of protein function from sequence properties: A discriminate analysis of a database. *Biochim. Biophys. Acta* 787: 221-226 (1984). Versión 2 del Dr. K. Nakai);

PROSEARCH (Detección de patrones de secuencia de proteína PROSITE; Kolakowski y col., 1992, ProSearch: fast searching of protein sequences with regular expression patterns related to protein structure and function. Biotechniques 13, 919-921); BLIMPS (Búsquedas de similitud frente a una base de datos de bloques sin huecos, Wallace y Henikoff, 1992); PATMAT (un programa de búsqueda y extracción para consultas de secuencia, patrón y bloque y bases de datos, CABIOS 8: 249-254. Escrito por Bill Alford).

Se encontraron homólogos del gen de AtACCD en las bases de datos públicas y patentadas. Estos homólogos se evaluaron para determinar el nivel de relación con AtACCD. El programa tblastn de la familia de BLAST de algoritmos se usó para comparar la secuencia proteica de AtACCD frente a las bases de datos de cultivo patentadas traducidas en las seis fases de lectura. Se encontraron secuencias con homología significativa en cada biblioteca de cultivo. El porcentaje de identidad de secuencia en el nivel de aminoácidos de cada secuencia en comparación con AtACCD se muestra en la Columna N° 5 de la Tabla 1 y la Tabla 2.

Los alineamientos de BLAST a nivel de aminoácidos entre AtACCD (SEC ID N°: 2) y ACCDP de cultivos tales como soja, arroz, maíz y trigo se muestran en las Figuras 9-12. Se considera que el ACCDP de soja, arroz, maíz y trigo como se muestra en las Figuras 9-12 es de longitud completa. Las secuencias de longitud completa para las secuencias parciales restantes pueden obtenerse usando secuencias de cebadores basadas en las secuencias de ADNc parciales desveladas usando técnicas de biología molecular convencionales (Véase Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Ejemplo 8

Modificación por ingeniería genética de plantas de soja sobreexpresando el gen de ACCDP

Las semillas de soja se esterilizan en superficie con 70 % de etanol durante 4 minutos a temperatura ambiente con agitación continua, seguido de Clorox 20 % (v/v) complementado con Tween 0,05 % (v/v) durante 20 minutos con agitación continua. Después, las semillas se aclaran 4 veces con agua destilada y se colocan en papel de filtro estéril húmedo en una placa de Petri a temperatura ambiente durante 6 a 39 horas. Los tegumentos se retiran y se separan los cotiledones del eje embrionario. El eje embrionario se examina para asegurar que la región meristémica no esté dañada. Los ejes embrionarios escindidos se recogen en una placa de Petri estéril semiabierta y se secan al aire hasta un contenido de humedad menor del 20 % (peso en fresco) en una placa de Petri sellada hasta su uso posterior.

Se prepara un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* a partir de una única colona en medio sólido LB más agentes de selección apropiados seguido de cultivo de la colonia individual en medio LB líquido hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,8. Después, el cultivo de bacterias se sedimenta a 7000 rpm durante 7 minutos a temperatura ambiente, y se resuspende en medio MS complementado con acetosiringona 100 µM. Los cultivos bacterianos se incuban en este medio pre-inducción durante 2 horas a temperatura ambiente antes de su uso. El eje de embriones de siembra zigóticos de soja a contenido de humedad de aproximadamente el 15 % se empapa durante 2 horas a temperatura ambiente con el cultivo de suspensión de *Agrobacterium* preinducido. Los embriones se retiran del cultivo de empapado y se transfieren a placas de Petri que contienen medio MS sólido complementado con sacarosa al 2 % y se incuban durante 2 días en oscuridad a temperatura ambiente. Como alternativa, los embriones se sitúan sobre papel de filtro estéril húmedo (medio MS líquido) en una placa de Petri y se incuban en las mismas condiciones descritas anteriormente. Después de este periodo, los embriones se transfieren a medio MS sólido o líquido complementado con carbenicilina 500 mg/l o cefotaxima 300 mg/l para destruir las *Agrobacterium*. El medio líquido se usa para humectar el papel de filtro estéril. Los embriones se incuban durante 4 semanas a 25 °C, bajo un fotoperiodo de 12 horas y 150 µmol m⁻²s⁻¹. Una vez que las plántulas producen raíces, estas se transfieren a suelo metromix estéril. El medio de las plantas *in vitro* se retira por lavado antes de transferir las plantas al suelo. Las plantas se mantienen bajo una cobertura de plástico durante 1 semana para favorecer el proceso de aclimatación. Después las plantas se transfieren a una sala de cultivo en la que se incuban a 25 °C, bajo intensidad de luz de 150 µmol m⁻²s⁻¹ y foto período de 12 horas durante aproximadamente 80 días.

Las plantas transgénicas se exploran con respecto a su mejor crecimiento de la raíz y/o tolerancia a la tensión, demostrando que la expresión del transgén confiere aumento del crecimiento de la raíz, tolerancia a la tensión y/o aumento de la eficacia en el uso del agua.

Ejemplo 9

Modificación por ingeniería genética de plantas de colza/canola sobreexpresando el gen de ACCDP

El procedimiento de transformación de plantas descrito en el presente documento es aplicable a *Brassica* y otros cultivos. Se esterilizan en superficie semillas de canola con etanol al 70 % durante 4 minutos a temperatura ambiente con agitación continua, seguido de Clorox 20 % (v/v) complementado con Tween 0,05 % (v/v) durante 20 minutos, a temperatura ambiente con agitación continua. Después, las semillas se aclaran 4 veces con agua destilada y se colocan en papel de filtro estéril húmedo en una placa de Petri a temperatura ambiente durante 18 horas. Después se retiran los tegumentos y las semillas se secan al aire durante una noche en una placa de Petri estéril semiabierta. Durante este periodo, las semillas pierden aproximadamente el 85 % de su contenido de agua.

Las semillas se almacenan después a temperatura ambiente en una placa de Petri sellada hasta su uso posterior. Las construcciones de ADN y empapado de embriones son como se describe en el Ejemplo 10. Se analizan muestras de las plantas transgénicas primarias (TO) por PCR para confirmar la presencia de ADN-T. Estos resultados se confirman por hibridación de Southern en la que el ADN se somete a electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y se transfiere a una membrana de nailon cargada positivamente (Roche Diagnostics). El Kit de Síntesis de Sondas PCR DIG (Roche Diagnostics) se usa para preparar una sonda marcada con digoxigenina por PCR, y se usa como recomienda el fabricante.

Las plantas transgénicas se exploran con respecto a su tolerancia a la tensión y/o crecimiento de la raíz mejorado, que demuestra que la expresión transgénica confiere aumento del crecimiento de la raíz, tolerancia a la tensión y/o aumento en la eficacia del uso del agua.

Ejemplo 10

Modificación por ingeniería genética de plantas de maíz sobreexpresando el gen ACCDP

Se realiza transformación de maíz (*Zea Mays L.*) con el gen de interés con el procedimiento descrito por Ishida y col., 1996, Nature Biotech. 14745-50. Se co-cultivan embriones inmaduros con *Agrobacterium tumefaciens* que portan vectores "súper binarios" y se recuperan plantas transgénicas mediante organogénesis. Este procedimiento proporciona una eficacia de transformación de entre el 2,5 % y el 20 %. Las plantas transgénicas se exploran con respecto a su tolerancia a la tensión y/o crecimiento de raíz mejorado, que demuestra que la expresión transgénica confiere aumento del crecimiento de la raíz, tolerancia a la tensión y/o aumento en la eficacia del uso del agua.

Ejemplo 11

Modificación por ingeniería genética de plantas de arroz sobreexpresando el gen de ACCDP

La transformación de arroz con el gen de interés puede emprenderse por técnicas de transferencia génica directa utilizando protoplastos o bombardeo de partículas. La transformación mediada por protoplastos se ha descrito para tipos Japonica y tipos Indica (Zhang y col., 1988, Plant Cell Rep. 7: 379-384; Shimamoto y col., 1989, Nature 338:274-277; Datta y col., 1990, Biotechnology 8:736-740). Ambos tipos también pueden transformarse rutinariamente usando bombardeo de partículas (Christou y col., 1991, Biotechnology 9: 957-962). Las plantas transgénicas se exploran con respecto a su tolerancia a la tensión y/o crecimiento de la raíz mejorado, que demuestra que la expresión transgénica confiere aumento del crecimiento de la raíz, tolerancia a la tensión y/o aumento en la eficacia del uso del agua.

Ejemplo 12

Identificación de genes homólogos y heterólogos

Pueden usarse secuencias génicas para identificar genes homólogos o heterólogos de bibliotecas de ADNc o genómicas. Los genes homólogos (por ejemplo clones de ADNc de longitud completa) pueden aislarse mediante hibridación de ácidos nucleicos usando por ejemplo bibliotecas de ADNc. Dependiendo de la abundancia del gen de interés, se siembran de 100.000 hasta 1.000.000 de bacteriófagos recombinantes y se transfieren a membranas de nailon. Después de desnaturalización con álcali, el ADN se inmoviliza en la membrana mediante, por ejemplo, reticulación de UV. La hibridación se lleva a cabo en condiciones de alta rigurosidad. En solución acuosa, se realiza hibridación y lavado a una fuerza iónica de NaCl 1 M y una temperatura de 68 °C. Se generan sondas de hibridación mediante, por ejemplo, marcaje de transcripción de muesca radioactivo (³²P) (High Prime, Roche, Mannheim, Alemania). Las señales se detectan mediante autorradiografía.

Los genes parcialmente homólogos o heterólogos que están relacionados pero no son idénticos pueden identificarse de una manera análoga al procedimiento anteriormente descrito usando condiciones de lavado e hibridación de baja rigurosidad. Para hibridación acuosa, la fuerza iónica se mantiene normalmente a NaCl 1 M mientras que la temperatura se reduce progresivamente de 68 a 42 °C.

El aislamiento de las secuencias génicas con homologías (o identidad/similitud de secuencia) solamente en un dominio definido de por ejemplo 10-20 aminoácidos puede llevarse a cabo usando sondas oligonucleotídicas radiomarcadas sintéticas. Los oligonucleótidos radiomarcados se preparan por fosforilación del extremo 5' de dos oligonucleótidos complementarios con polinucleótido quinasa T4. Los oligonucleótidos complementarios se hibridan y ligan para formar concatémicos. Los concatémicos bicatenarios se radiomarcán después mediante, por ejemplo, transcripción de muesca. La hibridación normalmente se realiza a condiciones de baja rigurosidad usando concentraciones de oligonucleótidos altas.

Solución de hibridación de oligonucleótidos:

SSC 6 x
fosfato sódico 0,01 M
EDTA 1 mM (pH 8)

SDS 0,5 %
 ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml
 leche en polvo desgrasada 0,1 %

5 Durante la hibridación, la temperatura se reduce por etapas a 5-10 °C por debajo de la T_m del oligonucleótido estimada, o hasta la temperatura ambiente, seguido de etapas de lavado y autorradiografía. Se realiza lavado con baja rigurosidad, tal como 3 etapas de lavado usando SSC 4 x. Se describen detalles adicionales en Sambrook, J. y col., 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press o Ausubel, F.M. y col., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons.

Ejemplo 13

10 *Identificación de genes homólogos explorando bibliotecas de expresión con anticuerpos*

15 Pueden usarse clones de ADN-c para producir proteína recombinante por ejemplo en *E. coli* (por ejemplo sistema Qiagen QIAexpress pQE). Después las proteínas recombinantes se purifican por afinidad de forma normal mediante cromatografía de afinidad de Ni-NTA (Qiagen). Después se usan proteínas recombinantes para producir anticuerpos específicos por ejemplo usando técnicas convencionales para inmunización de conejos. Los anticuerpos se purifican por afinidad usando una columna de Ni-NTA saturada con el antígeno recombinante como se describe en Gu y col., 1994, BioTechniques 17: 257- 262. El anticuerpo puede usarse para explorar bibliotecas de ADNc de expresión para identificar genes homólogos o heterólogos mediante una exploración inmunológica (Sambrook, J. y col., 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press o Ausubel, F.M. y col., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons).

Ejemplo 14

Mutagénesis in vivo

25 Puede realizarse mutagénesis *in vivo* de microorganismos mediante el pase de ADN plasmídico (o de otro vector) a través de *E. coli* u otros microorganismos (por ejemplo, *Bacillus* spp. o levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*) que estén alterados en sus capacidades para mantener la integridad de su información genética. Las cepas mutantes típicas tienen mutaciones en los genes para el sistema de reparación de ADN (Por ejemplo, mutHLS, mutD, mutT, etc.; para referencia, véase Rupp, W.D., 1996, DNA repair mechanisms, en: Escherichia coli and Salmonella, páginas 2277-2294, ASM: Washington). Dichas cepas se conocen bien por los expertos en la materia. El uso de dichas cepas se ilustra, por ejemplo, en Greener, A. y Callahan, M., 1994, Strategies 7: 32-34. La transferencia de moléculas de ADN mutadas en plantas se realiza preferentemente después de selección y ensayo en microorganismos. Las plantas transgénicas se generan de acuerdo con diversos ejemplos dentro de la ejemplificación del presente documento.

Ejemplo 15

Análisis in vitro de la función de genes de Arabidopsis en organismos transgénicos

35 La determinación de actividades y parámetros cinéticos de las enzimas está bien establecida en la técnica. Los experimentos para determinar la actividad de cualquier enzima alterada dada deben adaptarse a la actividad específica de la enzima natural, lo que está dentro de la capacidad de un experto en la materia. Pueden encontrarse visiones de conjunto acerca de enzimas en general, así como detalles específicos con respecto a estructura, cinética, principios, procedimientos, aplicaciones y ejemplos para la determinación de muchas actividades enzimáticas, por ejemplo, en las siguientes referencias: Dixon, M., y Webb, E.C., 1979, Enzymes. Longmans: London; Fersht, 1985, Enzyme Structure and Mechanism. Freeman: Nueva York; Walsh, 1979, Enzymatic Reaction Mechanisms. Freeman: San Francisco; Price, N.C., Stevens, L., 1982, Fundamentals of Enzymology. Oxford Univ. Press: Oxford; Boyer, P.D., ed., 1983, The Enzymes, 3ª ed. Academic Press: Nueva York; Bisswanger, H., 1994, Enzymkinetik, 2ª ed. VCH: Weinheim (ISBN 3527300325); Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J., Graßl, M., eds., 1983-1986, Methods of Enzymatic Analysis, 3ª ed., vol. I-XII, Verlag Chemie: Weinheim; y Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 1987, vol. A9, Enzymes. VCH: Weinheim, páginas 352-363.

50 La actividad de las proteínas que se unen a ADN puede medirse por varios procedimientos bien establecidos, tales como ensayos de desplazamiento de banda de ADN (también llamados ensayos de retardo de gel). El efecto de dichas proteínas en la expresión de otras moléculas puede medirse usando ensayos de genes indicadores (tales como el descrito en Kolmar, H. y col., 1995, EMBO J. 14: 3895-3904 y referencias citadas en el mismo). Se conocen bien sistemas de ensayo de genes indicadores y están establecidos para aplicaciones en células tanto procariontas como eucariotas, usando enzimas tales como β -galactosidasa, proteína verde fluorescente y varias otras.

55 La determinación de actividad de proteínas de transporte en membrana puede realizarse de acuerdo con técnicas tales como las descritas en Gennis, R.B., 1989, Pores, Channels and Transporters, en Biomembranes, Molecular Structure and Function, páginas 85-137, 199-234 y 270-322, Springer: Heidelberg.

Ejemplo 16*Purificación del producto deseado a partir de organismos transformados*

Puede realizarse recuperación del producto deseado de material vegetal, hongos, algas, ciliados, células de *C. glutamicum* u otras células bacterianas transformadas con las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento, o el sobrenadante de los cultivos anteriormente descritos por diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Si el producto deseado no se secreta de las células, las células pueden recogerse del cultivo por centrifugación a baja velocidad, y las células pueden lisarse por técnicas convencionales, tales como fuerza mecánica o sonicación. Los órganos de las plantas pueden separarse mecánicamente de otros tejidos u órganos. Después de homogeneización, se retiran los residuos celulares por centrifugación, y la fracción de sobrenadante que contiene las proteínas solubles se conserva para purificación adicional del compuesto deseado. Si el producto se secreta de células deseadas, después las células se retiran del cultivo por centrifugación a baja velocidad, y la fracción de sobrenadante se conserva para purificación adicional.

La fracción de sobrenadante de uno de los procedimientos de purificación se somete a cromatografía con una resina adecuada, en la que la molécula deseada se conserva en una resina de cromatografía mientras que muchas de las impurezas en la muestra no, o en la que las impurezas se conservan por la resina mientras que la muestra no. Dichas etapas de cromatografía pueden repetirse como sea necesario, usando la misma o diferentes resinas de cromatografía. Un experto en la materia conocerá bien la selección de resinas de cromatografía apropiadas en su aplicación más eficaz para una molécula particular para purificar. El producto purificado puede concentrarse por filtración o ultrafiltración, y almacenarse a una temperatura a la que la estabilidad del producto se maximiza.

Hay una amplia serie de procedimientos de purificación conocidos en la técnica y el procedimiento de purificación precedente no pretende ser limitante. Dichas técnicas de purificación se describen, por ejemplo, en Bailey, J.E. y Ollis, 1986, D.F. *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill: Nueva York. Adicionalmente, la identidad y pureza de los compuestos aislados pueden evaluarse por técnicas convencionales en este campo. Estas incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), procedimientos espectroscópicos, procedimientos de tinción, cromatografía en capa fina, NIRS, ensayo enzimático o de forma microbiológica. Dichos procedimientos de análisis se revisan en: Patek y col., 1994, *Appl. Environ. Microbiol.* 60:133-140; Malakhova y col., 1996, *Biotekhnologiya* 1: 27-32; y Schmidt y col., 1998, *Bioprocess Engineer.* 19:67-70; *Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 1996, vol. A27, VCH: Weinheim, páginas 89-90, páginas 521-540, páginas 540-547, páginas 559-566, 575-581, y páginas 581-587; Michal, G., 1999, *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley y Sons; Fallon, A. y col., 1987, *Applications of HPLC in Biochemistry en: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 17.

Ejemplo 17*Exploración de tolerancia a la salinidad*Ensayo de salinidad en placa de MS

Las plántulas se transfieren a papel de filtro empapado en MS ½ y se colocan en agar 0,6 % MS ½ complementado con benomilo 2 µg/ml la noche antes de la exploración de tensión. Para la exploración de tensión, el papel de filtro con las plántulas se mueve a pilas de papel de filtro estéril, empapadas en NaCl 50 mM, en una placa de petri. Después de dos horas, el papel de filtro con las plántulas se retira a pilas de papel de filtro estéril, empapado con NaCl 200 mM, en una placa de petri. Después de dos horas, el papel de filtro con las plántulas se mueve a pilas de papel de filtro estéril, empapado en NaCl 600 mM, en una placa de petri. Después de 10 horas, las plántulas se mueven a placas de petri que contienen agar 0,6 % MS ½ complementado con benomilo 2 µg/ml. Las plántulas se puntúan después de 5 días, demostrando que la expresión transgénica confiere tolerancia a la salinidad.

Ensayo en suelo para tolerancia a la salinidad

Las semillas de plantas para ensayar se esterilizan (lejía 100 %, Triton X 0,1 % durante cinco minutos dos veces y aclaradas cinco veces con ddH₂O). Las semillas se siembran en placas con medio no de selección (MS 1/2, phytagar 0,6 %, MES 0,5 g/l, sacarosa 1 %, benamilo 2 µg/ml).

Se permite que las semillas germinen durante aproximadamente diez días. En el estadio de 4-5 hojas, las plantas transgénicas se siembran en macetas de 5,5 cm de diámetros llenas de suelo suelto (Metromix 360, Scotts) humectado con fertilizante 20-20-20 1g/l (Peters Professional, Scotts).

Se permite que las plantas crezcan (22 °C, luz continua) durante aproximadamente siete días, regando según sea necesario. Cuando las plantas están a punto de producir semilla, el agua se retira de la bandeja y se inicia el ensayo. Para comenzar el ensayo, se añaden tres litros de NaCl 100 mM y MS 1/8 a la bandeja bajo las macetas. A la bandeja que contiene las plantas de control se añaden tres litros de MS 1/8. Después de 10 días, se proporciona agua a las plantas tratadas con NaCl y de control. Diez días después, se fotografían las plantas.

Ejemplo 18

Exploración de tolerancia a la sequía

Se transfieren plántulas T1 y T2 a papel de filtro estéril, seco, en una placa de petri y se permite que se des sequen durante dos horas a HR (humedad relativa) del 80 % en una Cabina de Cultivo Sanyo MLR-350H, micromoles^{-1m²} (luz blanca; tubo fluorescente Philips TL 65W/25). La HR se reduce después a 60 % y las plántulas se desecan adicionalmente durante ocho horas. Las plántulas se retiran después y se colocan en placas de agar 0,6 % MS ½ complementadas por benomilo 2 µg/ml y se puntúan después de cinco días.

Las plantas transgénicas se exploran con respecto a su tolerancia a sequía mejorada que demuestra que la expresión transgénica confiere tolerancia a la sequía.

Ejemplo 19

Exploración de tolerancia a la congelación

Las plántulas se mueven a placas de petri que contienen agar 0,6 % MS ½ complementado con sacarosa 2 % y benomilo 2 µg/ml. Después de cuatro días, las plántulas se incuban a +4 °C durante 1 hora y después se cubren con hielo raspado. Las plántulas se colocan después en una Cámara Ambiental Environmental Specialist ES2000 y se incuban durante 3,5 horas comenzando a -1,0 °C reduciendo -1 °C cada hora. Las plántulas se incuban después a -5,0 °C durante 24 horas y después se permite que se descongelen a +5 °C durante 12 horas. El agua se retira por vertido y las plántulas se puntúan después de cinco días.

Las plantas transgénicas se exploran con respecto a su tolerancia a frío mejorada que demuestra que la expresión transgénica confiere tolerancia al frío.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BASF PLant Science GmbH
 Sarria-Millan, Rodrigo
 Garr, Eric R
 Haertel, Jamie
 Allen, Damian
 McKersie, Bryan

<120> AUMENTO DEL RENDIMIENTO EN PLANTAS QUE SOBREEXPRESAN LOS GENES DE ACCDP

<130> PF2063015105

<150> US 60/700.096
 <151> 18-07-2005

<160> 361

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 1246
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
 <221> CDS
 <222> (16)..(1221)

<400> 1

ES 2 437 577 T3

```

ggggtcgacg aagca atg aga gga cga agc ttg aca ctc tca aga gta aag      51
      Met Arg Gly Arg Ser Leu Thr Leu Ser Arg Val Lys
      1          5          10
ctc gag ctt gcg aga aga agc atg tct gca aca tcc gta cct tca atg      99
Leu Glu Leu Ala Arg Arg Ser Met Ser Ala Thr Ser Val Pro Ser Met
      15          20          25
gcg gat ttt ctc acc aaa aaa cct tac tct cct cct tct tgg gct tct      147
Ala Asp Phe Leu Thr Lys Lys Pro Tyr Ser Pro Pro Ser Trp Ala Ser
      30          35          40
cat ctt cgt ccg ctt cct tct cac act ttc tcc ctc gct cac ctt cct      195
His Leu Arg Pro Leu Pro Ser His Thr Phe Ser Leu Ala His Leu Pro
      45          50          55          60
act ccg atc cat cga tgg aat ctt cct ggt ctt cct aat ggc aca gaa      243
Thr Pro Ile His Arg Trp Asn Leu Pro Gly Leu Pro Asn Gly Thr Glu
      65          70          75
ctc tgg atc aag cga gat gat ttc acc gga atg gaa ttg agt gga aac      291
Leu Trp Ile Lys Arg Asp Asp Phe Thr Gly Met Glu Leu Ser Gly Asn
      80          85          90
aaa gta cga aaa ctc gaa ttc tta atg gcg gaa gct gtt gat caa cac      339
Lys Val Arg Lys Leu Glu Phe Leu Met Ala Glu Ala Val Asp Gln His
      95          100          105
gct gat act gta atc act atc ggc ggt att cag agc aat cat tgt cgt      387
Ala Asp Thr Val Ile Thr Ile Gly Gly Ile Gln Ser Asn His Cys Arg
      110          115          120
gct aca gcc act gca tct aac tat ctt aat ctc aat tct cat ctt att      435
Ala Thr Ala Thr Ala Ser Asn Tyr Leu Asn Leu Asn Ser His Leu Ile
      125          130          135          140
ctc cgt act tcc aag ctt ctt gct gat gaa gat cct gga ttg gtt ggg      483
Leu Arg Thr Ser Lys Leu Leu Ala Asp Glu Asp Pro Gly Leu Val Gly
      145          150          155
aat ctc ctt gtc gag cgt ctc gtt gga gct aat gtt cat cta atc tct      531
Asn Leu Leu Val Glu Arg Leu Val Gly Ala Asn Val His Leu Ile Ser
      160          165          170
aaa gaa gag tat tct tcc att ggg agt gag gct ctt act aat gct ctg      579
Lys Glu Glu Tyr Ser Ser Ile Gly Ser Glu Ala Leu Thr Asn Ala Leu

```

```

175          180          185
aaa gag aaa ctg gaa aaa gaa gga aag aaa ccc tat gtt att cca gtc      627
Lys Glu Lys Leu Glu Lys Glu Gly Lys Lys Pro Tyr Val Ile Pro Val
190          195          200
ggt gga tcg aac tct ttg gga act tgg ggt tat ata gaa gca gca agg      675
Gly Gly Ser Asn Ser Leu Gly Thr Trp Gly Tyr Ile Glu Ala Ala Arg
205          210          215          220
gaa att gag gag cag ctg aat tat aga ccc gat gac ctg aaa ttt gat      723
Glu Ile Glu Glu Gln Leu Asn Tyr Arg Pro Asp Asp Leu Lys Phe Asp
225          230          235
gat att gtg gta gca tgt ggc agt ggt ggt aca att gct ggt att tca      771
Asp Ile Val Val Ala Cys Gly Ser Gly Thr Ile Ala Gly Ile Ser
240          245          250
ttg ggg tct tgg ttg gga gct cta aaa gcc aag gtt cat gct ttc tcg      819
Leu Gly Ser Trp Leu Gly Ala Leu Lys Ala Lys Val His Ala Phe Ser
255          260          265
gtt tgc gat gat cct gat tac ttc tat gac ttt gtc caa ggg ctt ctg      867
Val Cys Asp Asp Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp Phe Val Gln Gly Leu Leu
270          275          280
gat gga ctt cac gct ggt gtt aac tct cgt gat atc gtc aac atc cac      915
Asp Gly Leu His Ala Gly Val Asn Ser Arg Asp Ile Val Asn Ile His
285          290          295          300
aat gcc aaa gga aaa gga tat gcc atg aac acg tca gag gag ctt gag      963
Asn Ala Lys Gly Lys Gly Tyr Ala Met Asn Thr Ser Glu Glu Leu Glu
305          310          315
ttt gta aag aaa gta gca agt tca act ggt gtt att ctt gat ccg gtt      1011
Phe Val Lys Lys Val Ala Ser Ser Thr Gly Val Ile Leu Asp Pro Val
320          325          330
tac agt ggg aaa gct gcg tat ggt ttg ata aat gag atc acc aaa gat      1059
Tyr Ser Gly Lys Ala Ala Tyr Gly Leu Ile Asn Glu Ile Thr Lys Asp
335          340          345
ccc aaa tgt tgg gag gga agg aag ata ttg ttc ata cac act ggt ggg      1107
Pro Lys Cys Trp Glu Gly Arg Lys Ile Leu Phe Ile His Thr Gly Gly
350          355          360
ctt ctt ggg ttg tat gat aag gtt gat caa atg gca tct ctg atg ggt      1155
Leu Leu Gly Leu Tyr Asp Lys Val Asp Gln Met Ala Ser Leu Met Gly
365          370          375          380
aat tgg tcc cgg atg gat gtt tca gaa tcc gtt cca aga aaa gat ggt      1203
Asn Trp Ser Arg Met Asp Val Ser Glu Ser Val Pro Arg Lys Asp Gly
385          390          395
gtt ggg aaa atg ttc tag cacaacaaaa tctgttaatt aaccc      1246
Val Gly Lys Met Phe
400

```

<210> 2
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 2

5

```

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

      115      120      125
Ala Ser Asn Tyr Leu Asn Leu Asn Ser His Leu Ile Leu Arg Thr Ser
      130      135      140
Lys Leu Leu Ala Asp Glu Asp Pro Gly Leu Val Gly Asn Leu Leu Val
145      150      155      160
Glu Arg Leu Val Gly Ala Asn Val His Leu Ile Ser Lys Glu Glu Tyr
      165      170      175
Ser Ser Ile Gly Ser Glu Ala Leu Thr Asn Ala Leu Lys Glu Lys Leu
      180      185      190
Glu Lys Glu Gly Lys Lys Pro Tyr Val Ile Pro Val Gly Ser Asn
      195      200      205
Ser Leu Gly Thr Trp Gly Tyr Ile Glu Ala Ala Arg Glu Ile Glu Glu
      210      215      220
Gln Leu Asn Tyr Arg Pro Asp Asp Leu Lys Phe Asp Asp Ile Val Val
225      230      235      240
Ala Cys Gly Ser Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ile Ser Leu Gly Ser Trp
      245      250      255
Leu Gly Ala Leu Lys Ala Lys Val His Ala Phe Ser Val Cys Asp Asp
      260      265      270
Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp Phe Val Gln Gly Leu Leu Asp Gly Leu His
      275      280      285
Ala Gly Val Asn Ser Arg Asp Ile Val Asn Ile His Asn Ala Lys Gly
      290      295      300
Lys Gly Tyr Ala Met Asn Thr Ser Glu Glu Leu Glu Phe Val Lys Lys
305      310      315      320
Val Ala Ser Ser Thr Gly Val Ile Leu Asp Pro Val Tyr Ser Gly Lys
      325      330      335
Ala Ala Tyr Gly Leu Ile Asn Glu Ile Thr Lys Asp Pro Lys Cys Trp
      340      345      350
Glu Gly Arg Lys Ile Leu Phe Ile His Thr Gly Gly Leu Leu Gly Leu
      355      360      365
Tyr Asp Lys Val Asp Gln Met Ala Ser Leu Met Gly Asn Trp Ser Arg
      370      375      380
Met Asp Val Ser Glu Ser Val Pro Arg Lys Asp Gly Val Gly Lys Met
385      390      395      400
Phe

```

<210> 3
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 3

```

Met Ala Asp Phe Leu Thr Lys Lys Pro Tyr Ser Pro Pro Ser Trp Ala
1      5      10      15
Ser His Leu Arg Pro Leu Pro Ser His Thr Phe Ser Leu Ala His Leu
      20      25      30
Pro Thr Pro Ile His Arg Trp Asn Leu Pro Gly Leu Pro Asn Gly Thr
      35      40      45
Glu Leu Trp Ile Lys Arg Asp Asp Phe Thr Gly Met Glu Leu Ser Gly
      50      55      60
Asn Lys Val Arg Lys Leu Glu Phe Leu Met Ala Glu Ala Val Asp Gln
65      70      75      80
His Ala Asp Thr Val Ile Thr Ile Gly Gly Ile Gln Ser Asn His Cys
      85      90      95
Arg Ala Thr Ala Thr Ala Ser Asn Tyr Leu Asn Leu Asn Ser His Leu
      100      105      110
Ile Leu Arg Thr Ser Lys Arg Leu Ala Asp Glu Asp Pro Gly Leu Val
      115      120      125
Gly Asn Leu Leu Val Glu Arg Leu Val Gly Ala Asn Val His Leu Ile
      130      135      140
Ser Lys Glu Glu Tyr Ser Ser Ile Gly Ser Glu Ala Leu Thr Asn Ala
145      150      155      160
Leu Lys Glu Lys Leu Glu Lys Glu Gly Lys Lys Pro Tyr Val Ile Pro
      165      170      175
Val Gly Gly Ser Asn Ser Leu Gly Thr Trp Gly Tyr Ile Glu Ala Ala
      180      185      190
Arg Glu Ile Glu Glu Gln Leu Asn Ser Arg Pro Asp Asp Leu Lys Phe
      195      200      205
Asp Asp Ile Val Val Ala Cys Gly Ser Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ile
      210      215      220
Ser Leu Gly Ser Trp Leu Gly Ala Leu Lys Ala Lys Val His Ala Phe
225      230      235      240
Ser Val Cys Asp Asp Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp Phe Val Gln Gly Leu
      245      250      255
Leu Asp Gly Leu His Ala Gly Val Asn Ser Arg Asp Ile Val Asn Ile
      260      265      270
His Asn Ala Lys Gly Lys Gly Tyr Ala Met Asn Thr
      275      280

```

```

5 <210> 4
   <211> 1083
   <212> ADN
   <213> Escherichia coli

10 <220>
    <221> CDS
    <222> (1) .. (1083)

    <400> 4

15 "000"

    <210> 5
    <211> 360
    <212> PRT
    <213> Escherichia coli

20 <400> 5
    "000"

25 <210> 6
    <211> 893
    <212> ADN

```

<213> *Oryza sativa*

<220>

<221> CDS

5 <222> (79) .. (702)

<400> 6

```

gctgctgccc cgaogcgtg ctcgctgccc cactctctcc ccattcccct ccacgcgcgc 60
gccgcgcgcg ccgcgtgg atg gcc gga gtt tcc gcc gcc tcc gcc gcc ggg 111
                Met Ala Gly Val Ser Ala Ala Ser Ala Ala Gly
                1          5          10
aag atc ggg agc ttc ctc tcc aag agg ccg tac gcg ccg ccg tcc tgg 159
Lys Ile Gly Ser Phe Leu Ser Lys Arg Pro Tyr Ala Pro Pro Ser Trp
                15          20          25
gcc tcg cac ctg tcc ccc gcc ccc tcg cag acc ttc tcg ctc gcc cat 207
Ala Ser His Leu Ser Pro Ala Pro Ser Gln Thr Phe Ser Leu Gly His
                30          35          40
ttc ccg acg ccg atc cac aag tgg aat ctg ccc aat ttg ccg aat ggc 255
Phe Pro Thr Pro Ile His Lys Trp Asn Leu Pro Asn Leu Pro Asn Gly
                45          50          55
acg gag gtg tgg atc aag cga gac gac atc tca ggc atg cag ttg agc 303
Thr Glu Val Trp Ile Lys Arg Asp Asp Ile Ser Gly Met Gln Leu Ser
60          65          70          75
ggg aac aag gtc cgg aag ctc gag ttc ctg atg gca gat gcc gtc gcg 351
Gly Asn Lys Val Arg Lys Leu Glu Phe Leu Met Ala Asp Ala Val Ala

                80          85          90
cag ggc gct gac tgc gtt ata act gta ggt ggc atc cag agc aat cac 399
Gln Gly Ala Asp Cys Val Ile Thr Val Gly Gly Ile Gln Ser Asn His
                95          100          105
tgc cgt gcc acc gca gtg gct gca aag tat ata aat ctt gat tgt tat 447
Cys Arg Ala Thr Ala Val Ala Ala Lys Tyr Ile Asn Leu Asp Cys Tyr
                110          115          120
ctg ata ctg cgc aca tcc aag ctt ctt gtg gat aag gac cct ggt ttg 495
Leu Ile Leu Arg Thr Ser Lys Leu Leu Val Asp Lys Asp Pro Gly Leu
                125          130          135
gtt ggg aat ctc ctt gtt gag aga ttg gtg gga gcg cat att gat ctt 543
Val Gly Asn Leu Leu Val Glu Arg Leu Val Gly Ala His Ile Asp Leu
140          145          150          155
gtt tca aaa gaa gaa tat gga aaa att ggc agt gtg gct tta gcg gac 591
Val Ser Lys Glu Glu Tyr Gly Lys Ile Gly Ser Val Ala Leu Ala Asp
                160          165          170
ttg ctg aaa aag aag ctt ttg gaa gaa ggc cga aaa cca tat gtt att 639
Leu Leu Lys Lys Lys Leu Leu Glu Glu Gly Arg Lys Pro Tyr Val Ile
                175          180          185
cct gtt ggt gga tca aac tct cta gga act tgg tat tgt ttt ctg ttc 687
Pro Val Gly Gly Ser Asn Ser Leu Gly Thr Trp Tyr Cys Phe Leu Phe
                190          195          200
aat cct aac tat tgaaccattt ttgcattttc aatttctttg tgcgtttata 739
Asn Pro Asn Tyr
                205
gcatactttg aatattcctc agggactatt attattcatg gattggtggt tgccatcagt 799
ctatcagaaa agaagagatt agtttgtatt tgaataaaca ttagggcatc actttttttt 859
ggcaaatttc taatggtcaa tatactatgt tgga 893

```

10

<210> 7

<211> 207

<212> PRT

<213> *Oryza sativa*

<400> 7

```

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

```

5

<210> 8
 <211> 1455
 <212> ADN
 <213> *Zea mays*

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (85) .. (1272)

15

<400> 8

cattgggaac ctcgagtcgc gacggcgact ctcccactcc tctgtcgtt ccgccgacac 60

ctgagtcttg togetgccgc cggg atg gcc gga gtc acc gcc acc ggg atg 111
Met Ala Gly Val Thr Ala Thr Gly Met
1 5

gcc gga gtt ccc gcc acc ttc tcc tca gcc acc gct cag atc ggg gcc 159
Ala Gly Val Pro Ala Thr Phe Ser Ser Ala Thr Ala Gln Ile Gly Gly
10 15 20 25

ttc ctc tcg aag aag cct tac gcg ccg ccg ttg tgg gcc acg cac ctc 207
Phe Leu Ser Lys Lys Pro Tyr Ala Pro Pro Leu Trp Ala Thr His Leu
30 35 40

tcc ccc atg cct tgc cat acc ttc tcg ctc ggc cat ttc cca aca ccg 255
Ser Pro Met Pro Cys His Thr Phe Ser Leu Gly His Phe Pro Thr Pro
45 50 55

att cac aag tgg aat ctg ccc aat ttg ccg gaa gga acg gaa gtg tgg 303
Ile His Lys Trp Asn Leu Pro Asn Leu Pro Glu Gly Thr Glu Val Trp
60 65 70

atc aag cga gac gat tta tca ggc atg cag ttg agt gga aac aag gtc 351
Ile Lys Arg Asp Asp Leu Ser Gly Met Gln Leu Ser Gly Asn Lys Val
75 80 85

cgg aag ctg gag ttc ttg atg gca gat gcc gta gca caa ggc gca gac 399
Arg Lys Leu Glu Phe Leu Met Ala Asp Ala Val Ala Gln Gly Ala Asp
90 95 100 105

tgc gtt att act gtt ggg ggt ata cag agt aac cac tgc cgt gcc aca 447
Cys Val Ile Thr Val Gly Gly Ile Gln Ser Asn His Cys Arg Ala Thr
110 115 120

gcc gtg gct gct aag tat ctc aat ctt gat tgc tac ctg ata cta cgt 495
Ala Val Ala Ala Lys Tyr Leu Asn Leu Asp Cys Tyr Leu Ile Leu Arg
125 130 135

acc tcc aag ctt ctt gtg gat aag gac cct ggt ttg gtt ggc aat ctt 543
Thr Ser Lys Leu Leu Val Asp Lys Asp Pro Gly Leu Val Gly Asn Leu
140 145 150

ctt gtc gag aga cta gtt ggg gca cac gtt gat ctt gtg tca aaa gaa 591
Leu Val Glu Arg Leu Val Gly Ala His Val Asp Leu Val Ser Lys Glu
155 160 165

gaa tat gga aaa att ggt agt gtg gct tta gct gac ctg ctg aaa aaa 639
Glu Tyr Gly Lys Ile Gly Ser Val Ala Leu Ala Asp Leu Leu Lys Lys
170 175 180 185

agg ctt ctg gaa gaa ggg agg aag ccg tat gtg att cct gtt ggt gga 687
Arg Leu Leu Glu Glu Gly Arg Lys Pro Tyr Val Ile Pro Val Gly Gly
190 195 200

tca aac tca ttg gga act tgg gga tat att gag gca ata agg gag att 735
Ser Asn Ser Leu Gly Thr Trp Gly Tyr Ile Glu Ala Ile Arg Glu Ile
205 210 215

gag cag caa att cag caa tct tct gat gtt cag ttt gat gat att gtt 783
Glu Gln Gln Ile Gln Gln Ser Ser Asp Val Gln Phe Asp Asp Ile Val
220 225 230

gtt gca tgt ggc agt ggt gga acc att gct ggc ctt gct tta gga tcc 831
Val Ala Cys Gly Ser Gly Gly Thr Ile Ala Gly Leu Ala Leu Gly Ser
235 240 245

aga ttg agc agc tta aat aca aaa gtt cat gca ttc tct gtt tgt gat 879
Arg Leu Ser Ser Leu Asn Thr Lys Val His Ala Phe Ser Val Cys Asp
250 255 260 265

gac cct gaa tac ttc tat gac tat gtc caa ggc ctg att gat gga ctt 927

```

Asp Pro Glu Tyr Phe Tyr Asp Tyr Val Gln Gly Leu Ile Asp Gly Leu
      270      275      280
aat tct ggt ttg gat tca cat gat ata gtt agc atc gaa aat gct aag      975
Asn Ser Gly Leu Asp Ser His Asp Ile Val Ser Ile Glu Asn Ala Lys
      285      290      295
ggg tta ggc tat gcc atg aac aca gct gag gag ctt aag ttt gtc aaa      1023
Gly Leu Gly Tyr Ala Met Asn Thr Ala Glu Glu Leu Lys Phe Val Lys
      300      305      310
gac ata gct gca tca aca ggc att gtc ctt gat cca gtc tac agt ggg      1071
Asp Ile Ala Ala Ser Thr Gly Ile Val Leu Asp Pro Val Tyr Ser Gly
      315      320      325
aag gcg gtt tat ggt ttg cta aaa gac atg gct ggc aat cca gcc aaa      1119
Lys Ala Val Tyr Gly Leu Leu Lys Asp Met Ala Gly Asn Pro Ala Lys
      330      335      340      345
tgg aaa ggt cga aaa gtt ctg ttt atc cac aca ggt ggt ctt ctt ggg      1167
Trp Lys Gly Arg Lys Val Leu Phe Ile His Thr Gly Gly Leu Leu Gly
      350      355      360
ttg tat gat aag gct gac cag ttg tca tct ttg gct ggg agc tgg cgc      1215
Leu Tyr Asp Lys Ala Asp Gln Leu Ser Ser Leu Ala Gly Ser Trp Arg
      365      370      375
aga atg gat ctt gaa gat tct gtt cca cgc aaa gat ggc act ggt aag      1263
Arg Met Asp Leu Glu Asp Ser Val Pro Arg Lys Asp Gly Thr Gly Lys
      380      385      390
atg ttc tgatcagtat ggtccatgtg attccatgat ggctcattct tgcaaacatt      1319
Met Phe
      395
gtatocatta cagagttatt actcttaaatt ttgtgcaaga aaatgcagaa tagatggttc      1379
acattgtata gaacactgat gcaatttaag aataaagcac atctttctgc cctttaaaaa      1439
aaaaaaaaaa caaaaaa      1455

```

<210> 9
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> *Zea mays*
 <400> 9

5

Met	Ala	Gly	Val	Thr	Ala	Thr	Gly	Met	Ala	Gly	Val	Pro	Ala	Thr	Phe
1				5					10					15	
Ser	Ser	Ala	Thr	Ala	Gln	Ile	Gly	Gly	Phe	Leu	Ser	Lys	Lys	Pro	Tyr
			20					25					30		
Ala	Pro	Pro	Leu	Trp	Ala	Thr	His	Leu	Ser	Pro	Met	Pro	Cys	His	Thr
			35				40					45			
Phe	Ser	Leu	Gly	His	Phe	Pro	Thr	Pro	Ile	His	Lys	Trp	Asn	Leu	Pro
	50					55					60				
Asn	Leu	Pro	Glu	Gly	Thr	Glu	Val	Trp	Ile	Lys	Arg	Asp	Asp	Leu	Ser
65					70					75				80	
Gly	Met	Gln	Leu	Ser	Gly	Asn	Lys	Val	Arg	Lys	Leu	Glu	Phe	Leu	Met
				85					90					95	
Ala	Asp	Ala	Val	Ala	Gln	Gly	Ala	Asp	Cys	Val	Ile	Thr	Val	Gly	Gly
			100					105					110		
Ile	Gln	Ser	Asn	His	Cys	Arg	Ala	Thr	Ala	Val	Ala	Ala	Lys	Tyr	Leu
			115					120					125		
Asn	Leu	Asp	Cys	Tyr	Leu	Ile	Leu	Arg	Thr	Ser	Lys	Leu	Leu	Val	Asp
	130					135					140				
Lys	Asp	Pro	Gly	Leu	Val	Gly	Asn	Leu	Leu	Val	Glu	Arg	Leu	Val	Gly
145					150						155				160
Ala	His	Val	Asp	Leu	Val	Ser	Lys	Glu	Glu	Tyr	Gly	Lys	Ile	Gly	Ser
				165					170					175	
Val	Ala	Leu	Ala	Asp	Leu	Leu	Lys	Lys	Arg	Leu	Leu	Glu	Glu	Gly	Arg
			180					185						190	
Lys	Pro	Tyr	Val	Ile	Pro	Val	Gly	Gly	Ser	Asn	Ser	Leu	Gly	Thr	Trp
			195					200						205	
Gly	Tyr	Ile	Glu	Ala	Ile	Arg	Glu	Ile	Glu	Gln	Gln	Ile	Gln	Gln	Ser
	210					215					220				
Ser	Asp	Val	Gln	Phe	Asp	Asp	Ile	Val	Val	Ala	Cys	Gly	Ser	Gly	Gly
225					230					235				240	
Thr	Ile	Ala	Gly	Leu	Ala	Leu	Gly	Ser	Arg	Leu	Ser	Ser	Leu	Asn	Thr
				245					250					255	
Lys	Val	His	Ala	Phe	Ser	Val	Cys	Asp	Asp	Pro	Glu	Tyr	Phe	Tyr	Asp
			260					265					270		
Tyr	Val	Gln	Gly	Leu	Ile	Asp	Gly	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Asp	Ser	His
		275					280						285		
Asp	Ile	Val	Ser	Ile	Glu	Asn	Ala	Lys	Gly	Leu	Gly	Tyr	Ala	Met	Asn
	290					295					300				
Thr	Ala	Glu	Glu	Leu	Lys	Phe	Val	Lys	Asp	Ile	Ala	Ala	Ser	Thr	Gly
305					310					315					320
Ile	Val	Leu	Asp	Pro	Val	Tyr	Ser	Gly	Lys	Ala	Val	Tyr	Gly	Leu	Leu
				325					330					335	
Lys	Asp	Met	Ala	Gly	Asn	Pro	Ala	Lys	Trp	Lys	Gly	Arg	Lys	Val	Leu
			340					345					350		
Phe	Ile	His	Thr	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Leu	Tyr	Asp	Lys	Ala	Asp	Gln
		355						360					365		
Leu	Ser	Ser	Leu	Ala	Gly	Ser	Trp	Arg	Arg	Met	Asp	Leu	Glu	Asp	Ser
	370					375					380				
Val	Pro	Arg	Lys	Asp	Gly	Thr	Gly	Lys	Met	Phe					
385					390					395					

<210> 10
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* W3110

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(987)

10

<223> transl_table=11
 <400> 10
 "000"
 5
 <210> 11
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli* W3110
 10
 <400> 11
 "000"
 15
 <210> 12
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> *Pyrococcus horikoshii* OT3
 20
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (987)
 <223> transl_table=11
 25
 <400> 12
 "000"
 30
 <210> 13
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> *Pyrococcus horikoshii* OT3
 35
 <400> 13
 "000"
 40
 <210> 14
 <211> 876
 <212> ADN
 <213> *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11168
 45
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (876)
 <223> transl_table=11
 50
 <400> 14
 "000"
 55
 <210> 15
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11168
 60
 <400> 15
 "000"
 65
 <210> 16
 <211> 1083
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* 0157:H7 EDL933
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1083)
 <223> transl_table=11

ES 2 437 577 T3

<400> 16
"000"

5 <210> 17
<211> 360
<212> PRT
<213> *Escherichia coli* 0157:H7 EDL933

10 <400> 17
"000"

15 <210> 18
<211> 1002
<212> ADN
<213> *Caulobacter crescentus* CB15

20 <220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1002)
<223> transl_table=11

25 <400> 18
"000"

30 <210> 19
<211> 333
<212> PRT
<213> *Caulobacter crescentus* CB15

35 <400> 19
"000"

40 <210> 20
<211> 987
<212> ADN
<213> *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi cepa CT18

45 <220>
<221> CDS
<222> (1) .. (987)
<223> transl_table=11

50 <400> 20
"000"

55 <210> 21
<211> 328
<212> PRT
<213> *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi cepa CT18

60 <400> 21
"000"

65 <210> 22
<211> 987
<212> ADN
<213> *Salmonella typhimurium* LT2

70 <220>
<221> CDS
<222> (1) .. (987)
<223> transl_table=11

75 <400> 22
"000"

5
 <210> 23
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> *Salmonella typhimurium* LT2
 <400> 23
 "000"

10
 <210> 24
 <211> 948
 <212> ADN
 <213> *Nostoc* sp. PCC 7120

15
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (948)
 <223> transl_table=11

20
 <400> 24
 "000"

25
 <210> 25
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> *Nostoc* sp. PCC 7120

30
 <400> 25
 "000"

35
 <210> 26
 <211> 1065
 <212> ADN
 <213> *Pyrococcus furiosus* DSM 3638

40
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1065)
 <223> trans1_table=11

45
 <400> 26
 "000"

50
 <210> 27
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> *Pyrococcus furiosus* DSM 3638

55
 <400> 27
 "000"

60
 <210> 28
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> *Yersinia pestis* KIM

65
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1020)
 <223> transl_table=11

70
 <400> 28
 "000"

75
 <210> 29
 <211> 339
 <212> PRT

<213> *Yersinia pestis* KIM
 <400> 29
 "000"
 5
 <210> 30
 <211> 1083
 <212> ADN
 <213> *Shigella flexneri* 2a cepa 301
 10
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1083)
 <223> transl_table=11
 15
 <400> 30
 "000"
 <210> 31
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> *Shigella flexneri* 2a cepa 301
 20
 <400> 31
 "000"
 25
 <210> 32
 <211> 894
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas putida* KT2440
 30
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (894)
 <223> transl_table=11
 35
 <400> 32
 "000"
 40
 <210> 33
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas putida* KT2440
 45
 <400> 33
 "000"
 <210> 34
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* CFT073
 50
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (987)
 <223> transl_table=11
 55
 <400> 34
 "000"
 60
 <210> 35
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli* CFT073
 65

<400> 35
 "000"

5 <210> 36
 <211> 999
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas syringae* pv. *tomate cepa* DC3000

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (999)
 <223> transl_table=11

15 <400> 36
 "000"

20 <210> 37
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas syringae* pv. *tomate cepa* DC3000

25 <400> 37
 "000"

30 <210> 38
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces avermitilis* MA-4680

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (981)
 <223> transl_table=11

40 <400> 38
 "000"

45 <210> 39
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> *Streptomyces avermitilis* MA-4680

50 <400> 39
 "000"

55 <210> 40
 <211> 936
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces avermitilis* MA-4680

60 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (936)
 <223> transl_table=11

65 <400> 40
 "000"

70 <210> 41
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> *Streptomyces avermitilis* MA-4680

75 <400> 41
 "000"

5
 <210> 42
 <211> 996
 <212> ADN
 <213> *Bacillus cereus* ATCC 14579

10
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (996)
 <223> transl_ table=11

15
 <400> 42
 "000"

20
 <210> 43
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> *Bacillus cereus* ATCC 14579

25
 <400> 43
 "000"

30
 <210> 44
 <211> 996
 <212> ADN
 <213> *Bacillus anthracis* cepa Ames

35
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (996)
 <223> transl_ table=11

40
 <400> 44
 "000"

45
 <210> 45
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> *Bacillus anthracis* cepa Ames

50
 <400> 45
 "000"

55
 <210> 46
 <211> 1026
 <212> ADN
 <213> *Bordetella bronchiseptica* RB50

60
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1026)
 <223> transl_ table=11

65
 <400> 46
 "000"

70
 <210> 47
 <211> 341
 <212> PRT
 <213> *Bordetella bronchiseptica* RB50

75
 <400> 47
 "000"

80
 <210> 48
 <211> 1224

<212> ADN
 <213> *Oryza sativa* (grupo de cultivar japonica)

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1224)

<400> 48
 "000"

10

<210> 49
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> *Oryza sativa* (grupo de cultivar japonica)

15

<400> 49
 "000"

20

<210> 50
 <211> 996
 <212> ADN
 <213> *Bacillus cereus* ATCC 10987

25

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (996)
 <223> transl_table=11

30

<400> 50
 "000"

35

<210> 51
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> *Bacillus cereus* ATCC 10987

<400> 51
 "000"

40

<210> 52
 <211> 1206
 <212> ADN
 <213> *Magnaporthe grisea* 70-15

45

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1206)

50

<400> 52
 "000"

55

<210> 53
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> *Magnaporthe grisea* 70-15

<400> 53
 "000"

60

<210> 54
 <211> 984
 <212> ADN
 <213> *Gibberella zeae* PH-1

65

<220>
 <221> CDS

<222> (1)..(984)
 <400> 54
 "000"
 5
 <210> 55
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Gibberella zeae* PH-1
 10
 <400> 55
 "000"
 15
 <210> 56
 <211> 1158
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa* (grupo de cultivar japonica)
 20
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1158)
 <400> 56
 "000"
 25
 <210> 57
 <211> 385
 <212> PRT
 <213> *Oryza sativa* (grupo de cultivar japonica)
 30
 <400> 57
 "000"
 35
 <210> 58
 <211> 1011
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus nidulans* FGSC A4
 40
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1011)
 <400> 58
 "000"
 45
 <210> 59
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus nidulans* FGSC A4
 50
 <400> 59
 "000"
 55
 <210> 60
 <211> 1200
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus fumigatus* Af293
 60
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1200)
 <400> 60
 "000"
 65

5
 <210> 61
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus fumigatus* Af293
 <400> 61
 "000"

10
 <210> 62
 <211> 1053
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus fumigatus* Af293

15
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1053)

20
 <400> 62
 "000"

25
 <210> 63
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus fumigatus* Af293

30
 <400> 63
 "000"

35
 <210> 64
 <211> 1248
 <212> ADN
 <213> *Strongylocentrotus purpuratus*

40
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1248)

45
 <400> 64
 "000"

50
 <210> 65
 <211> 415
 <212> PRT
 <213> *Strongylocentrotus purpuratus*

55
 <400> 65
 "000"

60
 <210> 66
 <211> 1137
 <212> ADN
 <213> *Strongylocentrotus purpuratus*

65
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1137)

60
 <400> 66
 "000"

65
 <210> 67
 <211> 378
 <212> PRT
 <213> *Strongylocentrotus purpuratus*

<400> 67
 "000"

 5 <210> 68
 <211> 1155
 <212> ADN
 <213> *Strongylocentrotus purpuratus*

 10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1155)

 15 <400> 68
 "000"

 <210> 69
 <211> 384
 <212> PRT
 <213> *Strongylocentrotus purpuratus*
 20
 <400> 69
 "000"

 25 <210> 70
 <211> 1155
 <212> ADN
 <213> *Strongylocentrotus purpuratus*

 30 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1155)

 35 <400> 70
 "000"

 <210> 71
 <211> 384
 <212> PRT
 <213> *Strongylocentrotus purpuratus*
 40
 <400> 71
 "000"

 45 <210> 72
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Neurospora crassa* N150

 50 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)

 55 <400> 72
 "000"

 <210> 73
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Neurospora crassa* N150
 60
 <400> 73
 "000"

 65 <210> 74
 <211> 999
 <212> ADN

<213> *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* cepa Hildenborough
 <220>
 <221> CDS
 5 <222> (1) .. (999)
 <223> transl_table=11
 <400> 74
 "000"
 10
 <210> 75
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* cepa Hildenborough
 15
 <400> 75
 "000"
 <210> 76
 <211> 996
 <212> ADN
 <213> *Bacillus thuringiensis* serovar *konkukian* cepa 97-27
 20
 <220>
 <221> CDS
 25 <222> (1) .. (996)
 <223> transl_table=11
 <400> 76
 "000"
 30
 <210> 77
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis* serovar *konkukian* cepa 97-27
 35
 <400> 77
 "000"
 <210> 78
 <211> 885
 <212> ADN
 <213> *Acinetobacter* sp. ADP1
 40
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (885)
 <223> transl_table=11
 45
 <400> 78
 "000"
 <210> 79
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> *Acinetobacter* sp. ADP1
 50
 <400> 79
 "000"
 <210> 80
 <211> 1014
 <212> ADN
 <213> *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043
 55
 60
 65

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1014)
 <223> transl_table=11
 5
 <400> 80
 "000"
 <210> 81
 <211> 337
 <212> PRT
 <213> *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043
 10
 <400> 81
 "000"
 <210> 82
 <211> 999
 <212> ADN
 <213> *Desulfotalea psychrophila* LSv54
 15
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (999)
 <223> transl_table=11
 20
 <400> 82
 "000"
 <210> 83
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> *Desulfotalea psychrophila* LSv54
 25
 <400> 83
 "000"
 <210> 84
 <211> 1035
 <212> ADN
 <213> *Desulfotalea psychrophila* LSv54
 30
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1035)
 <223> transl_table=11
 35
 <400> 84
 "000"
 <210> 85
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> *Desulfotalea psychrophila* LSv54
 40
 <400> 85
 "000"
 <210> 86
 <211> 993
 <212> ADN
 <213> *Yersinia pseudotuberculosis* IP 32953
 45
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (993)

<223> transl_table=11
 <400> 86
 "000"
 5
 <210> 87
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Yersinia pseudotuberculosis* IP 32953
 10
 <400> 87
 "000"
 15
 <210> 88
 <211> 996
 <212> ADN
 <213> *Bacillus cereus* E33L
 20
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (996)
 <223> transl_table=11
 25
 <400> 88
 "000"
 30
 <210> 89
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> *Bacillus cereus* E33L
 35
 <400> 89
 "000"
 40
 <210> 90
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> *Burkholderia mallei* ATCC 23344
 45
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1020)
 <223> transl_table=11
 50
 <400> 90
 "000"
 55
 <210> 91
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia mallei* ATCC 23344
 60
 <400> 91
 "000"
 65
 <210> 92
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> *Burkholderia pseudomallei* K96243
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1020)
 <223> transl_table=11
 <400> 92

ES 2 437 577 T3

"000"
<210> 93
<211> 339
5 <212> PRT
<213> *Burkholderia pseudomallei* K96243

<400> 93
"000"
10

<210> 94
<211> 987
<212> ADN
15 <213> *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi A cepa ATCC

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (987)
20 <223> transl_table=11

<400> 94
"000"

<210> 95
25 <211> 328
<212> PRT
<213> *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi A cepa ATCC

<400> 95
30 "000"

<210> 96
<211> 1020
<212> ADN
35 <213> *Silicibacter pomeroyi* DSS-3

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1020)
40 <223> transl_table=11

<400> 96
"000"

45 <210> 97
<211> 339
<212> PRT
<213> *Silicibacter pomeroyi* DSS-3

50 <400> 97
"000"

<210> 98
<211> 1158
55 <212> ADN
<213> *Silicibacter pomeroyi* DSS-3

<220>
<221> CDS
60 <222> (1) .. (1158)
<223> transl_table=11

<400> 98
"000"
65

<210> 99

ES 2 437 577 T3

<211> 385
<212> PRT
<213> *Silicibacter pomeroyi* DSS-3

5 <400> 99
"000"

<210> 100
<211> 987
10 <212> ADN
<213> *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis cepa

<220>
<221> CDS
15 <222> (1) .. (987)
<223> transl_table=11

<400> 100
"000"
20

<210> 101
<211> 328
<212> PRT
<213> *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis cepa
25

<400> 101
"000"

<210> 102
<211> 999
<212> ADN
<213> *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a
30

<220>
<221> CDS
35 <222> (1) .. (999)
<223> transl_table=11

<400> 102
"000"
40

<210> 103
<211> 332
<212> PRT
<213> *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a
45

<400> 103
"000"

<210> 104
<211> 945
<212> ADN
<213> *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a
50

<220>
<221> CDS
55 <222> (1) .. (945)
<223> transl_table=11

<400> 104
"000"
60

<210> 105
<211> 314
<212> PRT
<213> *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a
65

<400> 105
 "000"

5 <210> 106
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11

15 <400> 106
 "000"

20 <210> 107
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a

25 <400> 107
 "000"

30 <210> 108
 <211> 996
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas fluorescens* Pf-5

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (996)
 <223> transl_table=11

40 <400> 108
 "000"

45 <210> 109
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas fluorescens* Pf-5

50 <400> 109
 "000"

55 <210> 110
 <211> 1023
 <212> ADN
 <213> *Psychrobacter arcticus* 273-4

60 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1023)
 <223> transl_table=11

65 <400> 110
 "000"

70 <210> 111
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> *Psychrobacter arcticus* 273-4

75 <400> 111
 "000"

5
 <210> 112
 <211> 960
 <212> ADN
 <213> *Colwellia psychrerythraea* 34H

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (960)
 <223> transl_table=11

10
 <400> 112
 "000"

15
 <210> 113
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> *Colwellia psychrerythraea* 34H

20
 <400> 113
 "000"

25
 <210> 114
 <211> 999
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A

30
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (999)
 <223> transl_table=11

35
 <400> 114
 "000"

40
 <210> 115
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A

45
 <400> 115
 "000"

50
 <210> 116
 <211> 945
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A

55
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (945)
 <223> transl_table=11

60
 <400> 116
 "000"

65
 <210> 117
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A

70
 <400> 117
 "000"

75
 <210> 118
 <211> 1017
 <212> ADN

<213> *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A
 <220>
 <221> CDS
 5 <222> (1) .. (1017) <223> transl_table=11
 <400> 118
 "000"
 10 <210> 119
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A
 15 <400> 119
 "000"
 <210> 120
 <211> 1017
 20 <212> ADN
 <213> *Ralstonia eutropha* JMP134
 <220>
 <221> CDS
 25 <222> (1) .. (1017)
 <223> trans1_table=11
 <400> 120
 "000"
 30 <210> 121
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Ralstonia eutropha* JMP134
 35 <400> 121
 "000"
 <210> 122
 <211> 987
 40 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC 15305
 <220>
 <221> CDS
 45 <222> (1) .. (987)
 <223> trans1_table=11
 <400> 122
 "000"
 50 <210> 123
 <211> 328
 <212> PRT
 55 <213> *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC 15305
 <400> 123
 "000"
 60 <210> 124
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> *Shigella sonnei* Ss046
 65 <220>
 <221> CDS

<222> (1) .. (987)
 <223> transl_table=11

 5 <400> 124
 "000"

 <210> 125
 <211> 328
 <212> PRT
 10 <213> *Shigella sonnei* Ss046

 <400> 125
 "000"

 15 <210> 126
 <211> 924
 <212> ADN
 <213> *Anabaena variabilis* ATCC 29413

 20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (924)
 <223> transl_table=11

 25 <400> 126
 "000"

 <210> 127
 <211> 307
 <212> PRT
 30 <213> *Anabaena variabilis* ATCC 29413

 <400> 127
 "000"

 35 <210> 128
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Burkholderia pseudomallei* 1710b

 40 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11

 45 <400> 128
 "000"

 <210> 129
 <211> 338
 <212> PRT
 50 <213> *Burkholderia pseudomallei* 1710b

 <400> 129
 "000"

 <210> 130
 <211> 909
 <212> ADN
 60 <213> *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (909)
 65 <223> transl_table=11

ES 2 437 577 T3

<400> 130
"000"

5 <210> 131
<211> 302
<212> PRT
<213> *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125

10 <400> 131
"000"

15 <210> 132
<211> 1005
<212> ADN
<213> *Pseudomonas fluorescens* PfO-1

20 <220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1005)
<223> transl_ table=11

25 <400> 132
"000"

30 <210> 133
<211> 334
<212> PRT
<213> *Pseudomonas fluorescens* PfO-1

35 <400> 133
"000"

40 <210> 134
<211> 1080
<212> ADN
<213> *Burkholderia* sp. 383

45 <220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1080)
<223> transl_ table=11

50 <400> 134
"000"

55 <210> 135
<211> 359
<212> PRT
<213> *Burkholderia* sp. 383

60 <400> 135
"000"

65 <210> 136
<211> 1017
<212> ADN
<213> *Burkholderia* sp. 383

70 <220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1017)
<223> transl_ table=11

75 <400> 136
"000"

5
 <210> 137
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia* sp. 383
 <400> 137
 "000"

10
 <210> 138
 <211> 1002
 <212> ADN
 <213> *Desulfovibrio desulfuricans* G20

15
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1002)
 <223> transl_table=11

20
 <400> 138
 "000"

25
 <210> 139
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> *Desulfovibrio desulfuricans* G20

30
 <400> 139
 "000"

35
 <210> 140
 <211> 945
 <212> ADN
 <213> *Thiomicrospira crunogena* XCL-2

40
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (945)
 <223> transl_table=11

45
 <400> 140
 "000"

50
 <210> 141
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> *Thiomicrospira crunogena* XCL-2

55
 <400> 141
 "000"

60
 <210> 142
 <211> 1083
 <212> ADN
 <213> *Shigella dysenteriae* Sd197

65
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1083)
 <223> transl_table=11

70
 <400> 142
 "000"

75
 <210> 143
 <211> 360
 <212> PRT

<213> *Shigella dysenteriae* Sd197
 <400> 143
 "000"
 5
 <210> 144
 <211> 1083
 <212> ADN
 <213> *Shigella boydii* Sb227
 10
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1083)
 <223> transl_table=11
 15
 <400> 144
 "000"
 20
 <210> 145
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> *Shigella boydii* Sb227
 25
 <400> 145
 "000"
 30
 <210> 146
 <211> 942
 <212> ADN
 <213> *Hahella chejuensis* KCTC 2396
 35
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (942)
 <223> transl_table=11
 40
 <400> 146
 "000"
 45
 <210> 147
 <211> 313
 <212> PRT
 <213> *Hahella chejuensis* KCTC 2396
 50
 <400> 147
 "000"
 55
 <210> 148
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Burkholderia thailandensis* E264
 60
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11
 65
 <400> 148
 "000"
 <210> 149
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia thailandensis* E264
 <400> 149

"000"

5 <210> 150
 <211> 993
 <212> ADN
 <213> *Sodalis glossinidius* cepa 'morsitans'

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (993)
 <223> transl_table=11

15 <400> 150
 "000"

20 <210> 151
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Sodalis glossinidius* cepa 'morsitans'

25 <400> 151
 "000"

30 <210> 152
 <211> 1023
 <212> ADN
 <213> *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1023)
 <223> transl_table=11

40 <400> 152
 "000"

45 <210> 153
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C

50 <400> 153
 "000"

55 <210> 154
 <211> 1029
 <212> ADN
 <213> *Jannaschia* sp. CCS1

60 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1029)
 <223> transl_table=11

65 <400> 154
 "000"

<210> 155
 <211> 342
 <212> PRT
 <213> *Jannaschia* sp. CCS1

<400> 155
 "000"

<210> 156

<211> 1011
 <212> ADN
 <213> *Saccharophagus degradans* 2-40
 5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1011)
 <223> transl_table=11
 10 <400> 156
 "000"
 <210> 157
 <211> 336
 15 <212> PRT
 <213> *Saccharophagus degradans* 2-40
 <400> 157
 "000"
 20 <210> 158
 <211> 978
 <212> ADN
 <213> *Saccharophagus degradans* 2-40
 25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (978)
 <223> transl_table=11
 30 <400> 158
 "000"
 <210> 159
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> *Saccharophagus degradans* 2-40
 35 <400> 159
 "000"
 <210> 160
 <211> 987
 <212> ADN
 45 <213> *Escherichia coli* UTI89
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (987)
 50 <223> transl_table=11
 <400> 160
 "000"
 55 <210> 161
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli* UTI89
 60 <400> 161
 "000"
 <210> 162
 <211> 1038
 <212> ADN
 65 <213> *Polaromonas* sp. JS666

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1038)
 <223> transl_table=11
 5
 <400> 162
 "000"
 <210> 163
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> *Polaromonas* sp. JS666
 10
 <400> 163
 "000"
 <210> 164
 <211> 1029
 <212> ADN
 <213> *Polaromonas* sp. JS666
 15
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1029)
 <223> transl_table=11
 20
 <400> 164
 "000"
 <210> 165
 <211> 342
 <212> PRT
 <213> *Polaromonas* sp. JS666
 25
 <400> 165
 "000"
 <210> 166
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Burkholderia xenovorans* LB400
 30
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11
 35
 <400> 166
 "000"
 <210> 167
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia xenovorans* LB400
 40
 <400> 167
 "000"
 <210> 168
 <211> 1023
 <212> ADN
 <213> *Psychrobacter cryohalolentis* K5
 45
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1023)

<223> transl_table=11
 <400> 168
 "000"
 5
 <210> 169
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> *Psychrobacter cryohalolentis* K5
 10
 <400> 169
 "000"
 <210> 170
 <211> 975
 <212> ADN
 <213> *Nostoc punctiforme* PCC 73102
 15
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (975)
 <400> 170
 "000"
 25
 <210> 171
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> *Nostoc punctiforme* PCC 73102
 30
 <400> 171
 "000"
 <210> 172
 <211> 900
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14
 35
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(900)
 <400> 172
 "000"
 45
 <210> 173
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14
 50
 <400> 173
 "000"
 <210> 174
 <211> 996
 <212> ADN
 <213> *Bacillus cereus* G9241
 55
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (996)
 <223> transl_table=11
 <400> 174
 "000"
 65

<210> 175
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> *Bacillus cereus* G9241
 5
 <400> 175
 "000"
 <210> 176
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Rubrivivax gelatinosus* PM1
 10
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <400> 176
 "000"
 20
 <210> 177
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Rubrivivax gelatinosus* PM1
 25
 <400> 177
 "000"
 <210> 178
 <211> 909
 <212> ADN
 <213> *Cytophaga hutchinsonii*
 30
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (909)
 <400> 178
 "000"
 40
 <210> 179
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> *Cytophaga hutchinsonii*
 45
 <400> 179
 "000"
 <210> 180
 <211> 1026
 <212> ADN
 <213> *Brevibacterium linens* BL2
 50
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1026)
 <400> 180
 "000"
 60
 <210> 181
 <211> 341
 <212> PRT
 <213> *Brevibacterium linens* BL2
 65
 <400> 181

"000"

5 <210> 182
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Brevibacterium linens* BL2

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)

15 <400> 182
 "000"

20 <210> 183
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Brevibacterium linens* BL2

25 <400> 183
 "000"

30 <210> 184
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Burkholderia vietnamiensis* G4

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> trans1_table=11

40 <400> 184
 "000"

45 <210> 185
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia vietnamiensis* G4

50 <400> 185
 "000"

55 <210> 186
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Burkholderia cenocepacia* AU 1054

60 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11

65 <400> 186
 "000"

70 <210> 187
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia cenocepacia* AU 1054

75 <400> 187
 "000"

80 <210> 188
 <211> 969

<212> ADN
 <213> *Kineococcus radiotolerans* SRS30216

 5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (969)
 <223> transl_table=11

 10 <400> 188
 "000"

 <210> 189
 <211> 322
 <212> PRT
 15 <213> *Kineococcus radiotolerans* SRS30216

 <400> 189
 "000"

 20 <210> 190
 <211> 969
 <212> ADN
 <213> *Nocardioides* sp. JS614

 25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (969)
 <223> transl_table=11

 30 <400> 190
 "000"

 <210> 191
 <211> 322
 <212> PRT
 35 <213> *Nocardioides* sp. JS614

 <400> 191
 "000"

 40 <210> 192
 <211> 969
 <212> ADN
 <213> *Nocardioides* sp. JS614

 45 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (969)
 <223> transl_table=11

 50 <400> 192
 "000"

 <210> 193
 <211> 322
 <212> PRT
 55 <213> *Nocardioides* sp. JS614

 <400> 193
 "000"

 60 <210> 194
 <211> 999
 <212> ADN
 65 <213> *Syntrophobacter fumaroxidans* MPOB

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (999)
 <223> transl_table=11
 5
 <400> 194
 "000"
 <210> 195
 10
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> *Syntrophobacter fumaroxidans* MPOB
 15
 <400> 195
 "000"
 <210> 196
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Burkholderia ambifaria* AMMD
 20
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11
 25
 <400> 196
 "000"
 30
 <210> 197
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia ambifaria* AMMD
 35
 <400> 197
 "000"
 <210> 198
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> *Shigella boydii* BS512
 40
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (987)
 45
 <400> 198
 "000"
 50
 <210> 199
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> *Shigella boydii* BS512
 55
 <400> 199
 "000"
 <210> 200
 <211> 1029
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* E24377A
 60
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1029)
 65

<400> 200
 "000"

 5 <210> 201
 <211> 342
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli* E24377A

 10 <400> 201
 "000"

 <210> 202
 <211> 987
 <212> ADN
 15 <213> *Escherichia coli* HS

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(987)
 20
 <400> 202
 "000"

 <210> 203
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli* HS
 25

 <400> 203
 "000"
 30
 <210> 204
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* B7A
 35

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(987)
 40
 <400> 204
 "000"

 <210> 205
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli* B7A
 45

 <400> 205
 "000"
 50

 <210> 206
 <211> 957
 <212> ADN
 <213> *Pseudoalteromonas atlantica* T6c
 55

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (957)
 <223> transl_ table=11
 60

 <400> 206
 "000"

 <210> 207
 <211> 318
 65

<212> PRT
 <213> *Pseudoalteromonas atlantica* T6c

 5 <400> 207
 "000"

 <210> 208
 <211> 993
 <212> ADN
 10 <213> *Pseudoalteromonas atlantica* T6c

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (993)
 15 <223> transl_table=11

 <400> 208
 "000"

 20 <210> 209
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Pseudoalteromonas atlantica* T6c

 25 <400> 209
 "000"

 <210> 210
 <211> 999
 <212> ADN
 30 <213> *Pseudoalteromonas atlantica* T6c

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (999)
 35 <223> transl_table=11

 <400> 210
 "000"

 40 <210> 211
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> *Pseudoalteromonas atlantica* T6c

 45 <400> 211
 "000"

 <210> 212
 <211> 1020
 <212> ADN
 50 <213> *Yersinia pseudotuberculosis* IP 31758

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1020)
 55

 <400> 212
 "000"

 60 <210> 213
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> *Yersinia pseudotuberculosis* IP 31758

 65

<400> 213
 "000"

5 <210> 214
 <211> 984
 <212> ADN
 <213> *Alkaliphilus metalliredigenes* QYMF

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (984)
 <223> transl_table=11

15 <400> 214
 "000"

 <210> 215
 <211> 327
 <212> PRT
 20 <213> *Alkaliphilus metalliredigenes* QYMF

 <400> 215
 "000"

25 <210> 216
 <211> 1053
 <212> ADN
 <213> *Rhodopseudomonas palustris* BisA53

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1053)
 <223> transl_table=11

35 <400> 216
 "000"

 <210> 217
 <211> 350
 <212> PRT
 40 <213> *Rhodopseudomonas palustris* BisA53

 <400> 217
 "000"

45 <210> 218
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> *Bradyrhizobium* sp. BTAi1

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1020)
 55 <223> transl_table=11

 <400> 218
 "000"

60 <210> 219
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> *Bradyrhizobium* sp. BTAi1

65 <400> 219
 "000"

5
 <210> 220
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* 101-1

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(987)

10
 <400> 220
 "000"

15
 <210> 221
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli* 101-1

20
 <400> 221
 "000"

25
 <210> 222
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Ralstonia solanacearum* UW551

30
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11

35
 <400> 222
 "000"

40
 <210> 223
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Ralstonia solanacearum* UW551

45
 <400> 223
 "000"

50
 <210> 224
 <211> 1011
 <212> ADN
 <213> *Roseovarius nubinhibens* ISM

55
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1011)
 <223> transl_table=11

60
 <400> 224
 "000"

65
 <210> 225
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> *Roseovarius nubinhibens* ISM

<400> 225
 "000"

<210> 226
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Roseovarius nubinhibens* ISM

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11
 5
 <400> 226
 "000"
 <210> 227
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Roseovarius nubinhibens* ISM
 10
 <400> 227
 "000"
 <210> 228
 <211> 900
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas aeruginosa* C3719
 15
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(900)
 20
 <400> 228
 "000"
 <210> 229
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa* C3719
 25
 <400> 229
 "000"
 <210> 230
 <211> 900
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas aeruginosa* 2192
 30
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(900)
 35
 <400> 230
 "000"
 <210> 231
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa* 2192
 40
 <400> 231
 "000"
 <210> 232
 <211> 957
 <212> ADN
 <213> *Burkholderia cenocepacia* PC184
 45
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(957)
 50
 <400> 232
 "000"
 <210> 233
 <211> 957
 <212> ADN
 <213> *Burkholderia cenocepacia* PC184
 55
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(957)
 60
 <400> 233
 "000"
 <210> 234
 <211> 957
 <212> ADN
 <213> *Burkholderia cenocepacia* PC184
 65

<400> 232
 "000"

5 <210> 233
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia cenocepacia* PC184

10 <400> 233
 "000"

15 <210> 234
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Burkholderia cenocepacia* PC184

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)

<400> 234
 "000"

25 <210> 235
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia cenocepacia* PC184

30 <400> 235
 "000"

35 <210> 236
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Burkholderia dolosa* AU0158

40 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)

<400> 236
 "000"

45 <210> 237
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia dolosa* AU0158

50 <400> 237
 "000"

55 <210> 238
 <211> 1092
 <212> ADN
 <213> *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2

60 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1092)
 <223> transl_ table=11

<400> 238
 "000"

65 <210> 239
 <211> 363

<212> PRT
 <213> *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2

 5 <400> 239
 "000"

 <210> 240
 <211> 1020
 <212> ADN
 10 <213> *Burkholderia mallei* 10229

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1020)
 15
 <400> 240
 "000"

 <210> 241
 <211> 339
 <212> PRT
 20 <213> *Burkholderia mallei* 10229

 <400> 241
 25 "000"

 <210> 242
 <211> 957
 <212> ADN
 30 <213> *Roseovarius* sp. 217

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (957)
 35 <223> transl_table=11

 <400> 242
 "000"
 40
 <210> 243
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> *Roseovarius* sp. 217
 45
 <400> 243
 "000"

 <210> 244
 <211> 1017
 <212> ADN
 50 <213> *Roseovarius* sp. 217

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 55 <223> transl_table=11

 <400> 244
 "000"
 60
 <210> 245
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Roseovarius* sp. 217
 65

<400> 245
 "000"

 5 <210> 246
 <211> 909
 <212> ADN
 <213> *Cellulophaga* sp. MED134

 10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (909)
 <223> transl_table=11

 15 <400> 246
 "000"

 20 <210> 247
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> *Cellulophaga* sp. MED134

 25 <400> 247
 "000"

 30 <210> 248
 <211> 939
 <212> ADN
 <213> *Tenacibaculum* sp. MED152

 35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (939)
 <223> transl_table=11

 40 <400> 248
 "000"

 45 <210> 249
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> *Tenacibaculum* sp. MED152

 50 <400> 249
 "000"

 55 <210> 250
 <211> 948
 <212> ADN
 <213> *Flavobacterium* sp. MED217

 60 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (948)
 <223> transl_table=11

 65 <400> 250
 "000"

 70 <210> 251
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> *Flavobacterium* sp. MED217

 75 <400> 251
 "000"

5
 <210> 252
 <211> 876
 <212> ADN
 <213> *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* 260.94

10
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (876)
 <223> transl_table=11

15
 <400> 252
 "000"

20
 <210> 253
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* 260.94

25
 <400> 253
 "000"

30
 <210> 254
 <211> 900
 <212> ADN
 <213> *Marinomonas* sp. MED121

35
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (900)
 <223> transl_table=11

40
 <400> 254
 "000"

45
 <210> 255
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> *Marinomonas* sp. MED121

50
 <400> 255
 "000"

55
 <210> 256
 <211> 1008
 <212> ADN
 <213> *gamma proteobacterium* KT 71

60
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1008)
 <223> transl_table=11

65
 <400> 256
 "000"

70
 <210> 257
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> *gamma proteobacterium* KT 71

75
 <400> 257
 "000"

80
 <210> 258
 <211> 978
 <212> ADN

<213> gamma proteobacteria KT 71
 <220>
 <221> CDS
 5 <222> (1) .. (978)
 <223> transl_table=11
 <400> 258
 "000"
 10 <210> 259
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> gamma proteobacteria KT 71
 15 <400> 259
 "000"
 <210> 260
 <211> 927
 <212> ADN
 20 <213> *Flavobacteriales bacterium* HTCC2170
 <220>
 <221> CDS
 25 <222> (1) .. (927)
 <223> transl_table=11
 <400> 260
 "000"
 30 <210> 261
 <211> 308
 <212> PRT
 35 <213> *Flavobacteriales bacterium* HTCC2170
 <400> 261
 "000"
 40 <210> 262
 <211> 924
 <212> ADN
 <213> *Alteromonas macleodii* "ecotipo Deep"
 45 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (924)
 <223> transl_table=11
 50 <400> 262
 "000"
 <210> 263
 <211> 307
 <212> PRT
 55 <213> *Alteromonas macleodii* "ecotipo Deep"
 <400> 263
 "000"
 60 <210> 264
 <211> 927
 <212> ADN
 <213> *Polaribacter irgensii* 23-P
 65 <220>

<221> CDS
 <222> (1) .. (927)
 <223> transl_table=11
 5 <400> 264
 "000"
 <210> 265
 <211> 308
 10 <212> PRT
 <213> *Polaribacter irgensii* 23-P
 <400> 265
 "000"
 15 <210> 266
 <211> 906
 <212> ADN
 <213> *Robiginitalea biformata* HTCC2501
 20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (906)
 <223> transl_table=11
 25 <400> 266
 "000"
 <210> 267
 <211> 301
 <212> PRT
 30 <213> *Robiginitalea biformata* HTCC2501
 <400> 267
 "000"
 35 <210> 268
 <211> 1008
 <212> ADN
 40 <213> actinobacteria marina PHSC20C1
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1008)
 <223> transl_table=11
 45 <400> 268
 "000"
 50 <210> 269
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> actinobacteria marina PHSC20C1
 55 <400> 269
 "000"
 <210> 270
 <211> 1005
 <212> ADN
 60 <213> *Desulfotomaculum reducens* MI-1
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1005)
 <223> transl_table=11
 65

<400> 270
 "000"

 5 <210> 271
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> *Desulfotomaculum reducens* MI-1

 10 <400> 271
 "000"

 <210> 272
 <211> 1005
 <212> ADN
 15 <213> *Desulfotomaculum reducens* MI-1

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1005)
 20 <223> transl_ table=11

 <400> 272
 "000"

 25 <210> 273
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> *Desulfotomaculum reducens* MI-1

 30 <400> 273
 "000"

 <210> 274

 35 <211> 924
 <212> ADN
 <213> *Oceanospirillum* sp. MED92

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (924)
 40 <223> transl_ table=11

 <400> 274
 "000"

 45 <210> 275
 <211> 307
 <212> PRT
 50 <213> *Oceanospirillum* sp. MED92

 <400> 275
 "000"

 55 <210> 276
 <211> 996
 <212> ADN
 <213> *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4

 60 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (996)
 <223> transl_ table=11

 65 <400> 276
 "000"

5
 <210> 277
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4
 <400> 277
 "000"

10
 <210> 278
 <211> 996
 <212> ADN
 <213> *Xanthobacter autotrophicus* Py2

15
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (996)
 <223> transl_table=11

20
 <400> 278
 "000"

25
 <210> 279
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> *Xanthobacter autotrophicus* Py2

30
 <400> 279
 "000"

35
 <210> 280
 <211> 996
 <212> ADN
 <213> *Xanthobacter autotrophicus* Py2

40
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (996)
 <223> transl_table=11

45
 <400> 280
 "000"

50
 <210> 281
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> *Xanthobacter autotrophicus* Py2

55
 <400> 281
 "000"

60
 <210> 282
 <211> 966
 <212> ADN
 <213> *Flavobacteria bacterium* BBFL7

65
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (966)
 <223> transl_table=11

70
 <400> 282
 "000"

75
 <210> 283
 <211> 321

<212> PRT
 <213> *Flavobacteria bacterium* BBFL7

 5 <400> 283
 "000"

 <210> 284
 <211> 993
 <212> ADN
 10 <213> gamma proteobacteria marina HTCC2207

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (993)
 15 <223> transl_table=11

 <400> 284
 "000"

 20 <210> 285
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> gamma proteobacteria marina HTCC2207

 25 <400> 285
 "000"

 <210> 286
 <211> 909
 <212> ADN
 30 <213> *Flavobacterium johnsoniae* UW101

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (909)
 35 <223> transl_table=11

 <400> 286
 "000"

 40 <210> 287
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> *Flavobacterium johnsoniae* UW101

 45 <400> 287
 "000"

 <210> 288
 <211> 951
 <212> ADN
 50 <213> *Psychroflexus torquis* ATCC 700755

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (951)
 55 <223> transl_table=11

 <400> 288
 "000"

 60 <210> 289
 <211> 316
 <212> PRT
 65 <213> *Psychroflexus torquis* ATCC 700755

<400> 289
 "000"

5 <210> 290
 <211> 933
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas aeruginosa* PA7

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(933)

15 <400> 290
 "000"

20 <210> 291
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa* PA7

25 <400> 291
 "000"

30 <210> 292
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> *Rhizobium meliloti*

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1020)
 <223> transl_ table=11

40 <400> 292
 "000"

45 <210> 293
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> *Rhizobium meliloti*

50 <400> 293
 "000"

55 <210> 294
 <211> 1056
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus oryzae*

60 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1056)

65 <400> 294
 "000"

<210> 295
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus oryzae*

<400> 295
 "000"

<210> 296
 <211> 1206

<212> ADN
 <213> *Aspergillus oryzae*

 5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1206)

 <400> 296
 "000"
 10
 <210> 297
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus oryzae*
 15
 <400> 297
 "000"

 20 <210> 298
 <211> 1116
 <212> ADN
 <213> *Neurospora crassa*

 25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1116)

 <400> 298
 "000"
 30
 <210> 299
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> *Neurospora crassa*
 35
 <400> 299
 "000"

 40 <210> 300
 <211> 1014
 <212> ADN
 <213> *Rhizobium loti*

 45 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1014)
 <223> transl_table=11

 <400> 300
 "000"
 50
 <210> 301
 <211> 337
 <212> PRT
 <213> *Rhizobium loti*
 55
 <400> 301
 "000"

 60 <210> 302
 <211> 1149
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

 65 <220>
 <221> CDS

<222> (1) .. (1149)

<400> 302

atg tct gca aca tcc gta cct tca atg gcg gat ttt ctc acc aaa aaa	48
Met Ser Ala Thr Ser Val Pro Ser Met Ala Asp Phe Leu Thr Lys Lys	
1 5 10 15	
cct tac tct cct cct tct tgg gct tct cat ctt cgt ccg ctt cct tct	96
Pro Tyr Ser Pro Pro Ser Trp Ala Ser His Leu Arg Pro Leu Pro Ser	
20 25 30	
cac act ttc tcc ctc gct cac ctt cct act ccg atc cat cga tgg aat	144
His Thr Phe Ser Leu Ala His Leu Pro Thr Pro Ile His Arg Trp Asn	
35 40 45	
ctt cct ggt ctt cct aat ggc aca gaa ctc tgg atc aag cga gat gat	192
Leu Pro Gly Leu Pro Asn Gly Thr Glu Leu Trp Ile Lys Arg Asp Asp	
50 55 60	
ttc acc gga atg gaa ttg agt gga aac aaa gta cga aaa ctc gaa ttc	240
Phe Thr Gly Met Glu Leu Ser Gly Asn Lys Val Arg Lys Leu Glu Phe	
65 70 75 80	
tta atg gcg gaa gct gtt gat caa cac gct gat act gta atc act atc	288
Leu Met Ala Glu Ala Val Asp Gln His Ala Asp Thr Val Ile Thr Ile	
85 90 95	
ggc ggt att cag agc aat cat tgt cgt gct aca gcc act gca tct aac	336
Gly Gly Ile Gln Ser Asn His Cys Arg Ala Thr Ala Thr Ala Ser Asn	
100 105 110	
tat ctt aat ctc aat tct cat ctt att ctc cgt act tcc aag ctt ctt	384
Tyr Leu Asn Leu Asn Ser His Leu Ile Leu Arg Thr Ser Lys Leu Leu	
115 120 125	
gct gat gaa gat cct gga ttg gtt ggg aat ctc ctt gtc gag cgt ctc	432
Ala Asp Glu Asp Pro Gly Leu Val Gly Asn Leu Leu Val Glu Arg Leu	
130 135 140	
gtt gga gct aat gtt cat cta atc tct aaa gaa gag tat tct tcc att	480
Val Gly Ala Asn Val His Leu Ile Ser Lys Glu Glu Tyr Ser Ser Ile	
145 150 155 160	
ggg agt gag gct ctt act aat gct ctg aaa gag aaa ctg gaa aaa gaa	528
Gly Ser Glu Ala Leu Thr Asn Ala Leu Lys Glu Lys Leu Glu Lys Glu	
165 170 175	
gga aag aaa ccc tat gtt att cca gtc ggt gga tcg aac tct ttg gga	576
Gly Lys Lys Pro Tyr Val Ile Pro Val Gly Gly Ser Asn Ser Leu Gly	
180 185 190	
act tgg ggt tat ata gaa gca gca agg gaa att gag gag cag ctg aat	624
Thr Trp Gly Tyr Ile Glu Ala Ala Arg Glu Ile Glu Glu Gln Leu Asn	
195 200 205	
tat aga ccc gat gac ctg aaa ttt gat gat att gtg gta gca tgt ggc	672
Tyr Arg Pro Asp Asp Leu Lys Phe Asp Asp Ile Val Val Ala Cys Gly	
210 215 220	
agt ggt ggt aca att gct ggt att tca ttg ggg tct tgg ttg gga gct	720
Ser Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ile Ser Leu Gly Ser Trp Leu Gly Ala	
225 230 235 240	

ES 2 437 577 T3

cta aaa gcc aag gtt cat gct ttc tcg gtt tgc gat gat cct gat tac	768
Leu Lys Ala Lys Val His Ala Phe Ser Val Cys Asp Asp Pro Asp Tyr	
245 250 255	
ttc tat gac ttt gtc caa ggg ctt ctg gat gga ctt cac gct ggt gtt	816
Phe Tyr Asp Phe Val Gln Gly Leu Leu Asp Gly Leu His Ala Gly Val	
260 265 270	
aac tct cgt gat atc gtc aac atc cac aat gcc aaa gga aaa gga tat	864
Asn Ser Arg Asp Ile Val Asn Ile His Asn Ala Lys Gly Lys Gly Tyr	
275 280 285	
gcc atg aac acg tca gag gag ctt gag ttt gta aag aaa gta gca agt	912
Ala Met Asn Thr Ser Glu Glu Leu Glu Phe Val Lys Lys Val Ala Ser	
290 295 300	
tca act ggt gtt att ctt gat ccg gtt tac agt ggg aaa gct gcg tat	960
Ser Thr Gly Val Ile Leu Asp Pro Val Tyr Ser Gly Lys Ala Ala Tyr	
305 310 315 320	
ggt ttg ata aat gag atc acc aaa gat ccc aaa tgt tgg gag gga agg	1008
Gly Leu Ile Asn Glu Ile Thr Lys Asp Pro Lys Cys Trp Glu Gly Arg	
325 330 335	
aag ata ttg ttc ata cac act ggt ggg ctt ctt ggg ttg tat gat aag	1056
Lys Ile Leu Phe Ile His Thr Gly Gly Leu Leu Gly Leu Tyr Asp Lys	
340 345 350	
ggt gat caa atg gca tct ctg atg ggt aat tgg tcc cgg atg gat gtt	1104
Val Asp Gln Met Ala Ser Leu Met Gly Asn Trp Ser Arg Met Asp Val	
355 360 365	
tca gaa tcc gtt cca aga aaa gat ggt gtt ggg aaa atg ttc tag	1149
Ser Glu Ser Val Pro Arg Lys Asp Gly Val Gly Lys Met Phe	
370 375 380	

<210> 303
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 303

5

```

Met Ser Ala Thr Ser Val Pro Ser Met Ala Asp Phe Leu Thr Lys Lys
1      5      10
Pro Tyr Ser Pro Ser Trp Ala Ser His Leu Arg Pro Leu Pro Ser
      20      25      30
His Thr Phe Ser Leu Ala His Leu Pro Thr Pro Ile His Arg Trp Asn
      35      40      45
Leu Pro Gly Leu Pro Asn Gly Thr Glu Leu Trp Ile Lys Arg Asp Asp
      50      55      60
Phe Thr Gly Met Glu Leu Ser Gly Asn Lys Val Arg Lys Leu Glu Phe
      65      70      75      80
Leu Met Ala Glu Ala Val Asp Gln His Ala Asp Thr Val Ile Thr Ile
      85      90      95
Gly Gly Ile Gln Ser Asn His Cys Arg Ala Thr Ala Thr Ala Ser Asn
      100      105      110
Tyr Leu Asn Leu Asn Ser His Leu Ile Leu Arg Thr Ser Lys Leu Leu
      115      120      125
Ala Asp Glu Asp Pro Gly Leu Val Gly Asn Leu Leu Val Glu Arg Leu
      130      135      140
Val Gly Ala Asn Val His Leu Ile Ser Lys Glu Glu Tyr Ser Ser Ile
      145      150      155      160
Gly Ser Glu Ala Leu Thr Asn Ala Leu Lys Glu Lys Leu Glu Lys Glu
      165      170      175
Gly Lys Lys Pro Tyr Val Ile Pro Val Gly Gly Ser Asn Ser Leu Gly
      180      185      190
Thr Trp Gly Tyr Ile Glu Ala Ala Arg Glu Ile Glu Glu Gln Leu Asn
      195      200      205
Tyr Arg Pro Asp Asp Leu Lys Phe Asp Asp Ile Val Val Ala Cys Gly
      210      215      220
Ser Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ile Ser Leu Gly Ser Trp Leu Gly Ala
      225      230      235      240
Leu Lys Ala Lys Val His Ala Phe Ser Val Cys Asp Asp Pro Asp Tyr
      245      250      255
Phe Tyr Asp Phe Val Gln Gly Leu Leu Asp Gly Leu His Ala Gly Val
      260      265      270
Asn Ser Arg Asp Ile Val Asn Ile His Asn Ala Lys Gly Lys Gly Tyr
      275      280      285
Ala Met Asn Thr Ser Glu Glu Leu Glu Phe Val Lys Lys Val Ala Ser
      290      295      300
Ser Thr Gly Val Ile Leu Asp Pro Val Tyr Ser Gly Lys Ala Ala Tyr
      305      310      315      320
Gly Leu Ile Asn Glu Ile Thr Lys Asp Pro Lys Cys Trp Glu Gly Arg
      325      330      335
Lys Ile Leu Phe Ile His Thr Gly Gly Leu Leu Gly Leu Tyr Asp Lys
      340      345      350
Val Asp Gln Met Ala Ser Leu Met Gly Asn Trp Ser Arg Met Asp Val
      355      360      365
Ser Glu Ser Val Pro Arg Lys Asp Gly Val Gly Lys Met Phe
      370      375      380

```

<210> 304
 <211> 1083
 <212> ADN
 <213> *Penicillium citrinum*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1083)

<400> 304

5

10

ES 2 437 577 T3

```

"000"

<210> 305
<211> 360
5 <212> PRT
   <213> Penicillium citrinum

<400> 305
"000"
10
<210> 306
<211> 1245
<212> ADN
15 <213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1245)

20 <400> 306

  atg aga gga cga agc ttg aca ctc tca aga gta aag ctc gag ctt gcg      48
  Met Arg Gly Arg Ser Leu Thr Leu Ser Arg Val Lys Leu Glu Leu Ala
  1                               5                               10                               15
  aga aga agc atg tct gca aca tcc gta cct tca atg gcg gat ttt ctc      96
  Arg Arg Ser Met Ser Ala Thr Ser Val Pro Ser Met Ala Asp Phe Leu
  20                               25                               30
  acc aaa aaa cct tac tct cct cct tct tgg gct tct cat ctt cgt ccg      144
  Thr Lys Lys Pro Tyr Ser Pro Pro Ser Trp Ala Ser His Leu Arg Pro
  35                               40                               45
  ctt cct tct cac act ttc tcc ctc gct cac ctt cct act ccg atc cat      192
  Leu Pro Ser His Thr Phe Ser Leu Ala His Leu Pro Thr Pro Ile His
  50                               55                               60
  cga tgg aat ctt cct ggt ctt cct aat ggc aca gaa ctc tgg atc aag      240
  Arg Trp Asn Leu Pro Gly Leu Pro Asn Gly Thr Glu Leu Trp Ile Lys
  65                               70                               75                               80
  cga gat gat ttc acc gga atg gaa ttg agt gga aac aaa gta cga aaa      288
  Arg Asp Asp Phe Thr Gly Met Glu Leu Ser Gly Asn Lys Val Arg Lys

```


<400> 307

```

Met Arg Gly Arg Ser Leu Thr Leu Ser Arg Val Lys Leu Glu Leu Ala
1      5      10      15
Arg Arg Ser Met Ser Ala Thr Ser Val Pro Ser Met Ala Asp Phe Leu
      20      25      30
Thr Lys Lys Pro Tyr Ser Pro Pro Ser Trp Ala Ser His Leu Arg Pro
      35      40      45
Leu Pro Ser His Thr Phe Ser Leu Ala His Leu Pro Thr Pro Ile His
      50      55      60
Arg Trp Asn Leu Pro Gly Leu Pro Asn Gly Thr Glu Leu Trp Ile Lys
65      70      75      80
Arg Asp Asp Phe Thr Gly Met Glu Leu Ser Gly Asn Lys Val Arg Lys
      85      90      95
Leu Glu Phe Leu Met Ala Glu Ala Val Asp Gln His Ala Asp Thr Val
      100      105      110
Ile Thr Ile Gly Gly Ile Gln Ser Asn His Cys Arg Ala Thr Ala Thr
      115      120      125
Ala Ser Asn Tyr Leu Asn Leu Asn Ser His Leu Ile Leu Arg Thr Ser
      130      135      140
Lys Leu Leu Ala Asp Glu Asp Pro Gly Leu Val Gly Asn Leu Leu Val
145      150      155      160
Glu Arg Leu Val Gly Ala Asn Val His Leu Ile Ser Lys Glu Glu Tyr
      165      170      175
Ser Ser Ile Gly Ser Glu Ala Leu Thr Asn Ala Leu Lys Glu Lys Leu
      180      185      190
Glu Lys Glu Gly Lys Lys Pro Tyr Val Ile Pro Val Gly Gly Ser Asn
      195      200      205
Ser Leu Gly Thr Trp Gly Tyr Ile Glu Ala Ala Arg Glu Ile Glu Glu
210      215      220
Gln Leu Asn Tyr Arg Pro Asp Asp Leu Lys Phe Asp Asp Ile Val Val
225      230      235      240
Ala Cys Gly Ser Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ile Ser Leu Gly Ser Trp
      245      250      255
Leu Gly Ala Leu Lys Ala Lys Leu Thr Asp Gly Ser Val Lys Phe Pro
      260      265      270
Phe Ile Val Gln Val His Ala Phe Ser Val Cys Asp Asp Pro Asp Tyr
      275      280      285
Phe Tyr Asp Phe Val Gln Gly Leu Leu Asp Gly Leu His Ala Gly Val
290      295      300
Asn Ser Arg Asp Ile Val Asn Ile His Asn Ala Lys Gly Lys Gly Tyr
305      310      315      320
Ala Met Asn Thr Ser Glu Glu Leu Glu Phe Val Lys Lys Val Ala Ser
      325      330      335
Ser Thr Gly Val Ile Leu Asp Pro Val Tyr Ser Gly Lys Ala Ala Tyr
      340      345      350
Gly Leu Ile Asn Glu Ile Thr Lys Asp Pro Lys Cys Trp Glu Gly Arg
      355      360      365
Lys Ile Leu Phe Ile His Thr Gly Gly Leu Leu Gly Leu Tyr Asp Lys
      370      375      380
Val Asp Gln Met Ala Ser Leu Met Gly Asn Trp Ser Arg Met Asp Val
385      390      395      400
Ser Glu Ser Val Pro Arg Lys Asp Gly Val Gly Lys Met Phe
      405      410

```

5 <210> 308
 <211> 1014
 <212> ADN
 <213> *Bradyrhizobium japonicum*

10 <220>
 <221> CDS

<222> (1) .. (1014)
 <223> transl_table=11

 5 <400> 308
 "000"

 <210> 309
 <211> 337
 <212> PRT
 10 <213> *Bradyrhizobium japonicum*

 <400> 309
 "000"

 15 <210> 310
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Burkholderia mallei*

 20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11

 25 <400> 310
 "000"

 <210> 311
 <211> 338
 <212> PRT
 30 <213> *Burkholderia mallei*

 <400> 311
 "000"
 35 <210> 312
 <211> 1038
 <212> ADN
 <213> *Cryptococcus neoformans*
 40 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1038)

 45 <400> 312
 "000"

 <210> 313
 <211> 345
 <212> PRT
 50 <213> *Cryptococcus neoformans*

 <400> 313
 "000"
 55 <210> 314
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Enterobacter cloacae*
 60 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11

 65 <400> 314

"000"

5 <210> 315
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Enterobacter cloacae*

10 <400> 315
 "000"

15 <210> 316
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas fluorescens*

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11

25 <400> 316
 "000"

30 <210> 317
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas fluorescens*

35 <400> 317
 "000"

40 <210> 318
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas putida*

45 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11

50 <400> 318
 "000"

55 <210> 319
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas putida*

60 <400> 319
 "000"

65 <210> 320
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas sp*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11

<400> 320
 "000"

<210> 321

<211> 338
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas* sp
 5 <400> 321
 "000"
 <210> 322
 <211> 1017
 10 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas syringae* pv
 <220>
 <221> CDS
 15 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11
 <400> 322
 "000"
 20 <210> 323
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas syringae* pv
 25 <400> 323
 "000"
 <210> 324
 <211> 1017
 30 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas* sp
 <220>
 <221> CDS
 35 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11
 <400> 324
 "000"
 40 <210> 325
 <211> 338
 <212> PRT
 45 <213> *Pseudomonas* sp
 <400> 325
 "000"
 50 <210> 326
 <211> 993
 <212> ADN
 <213> *Pyrococcus abyssi*
 55 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (993)
 <223> transl_table=11
 60 <400> 326
 "000"
 <210> 327
 <211> 330
 65 <212> PRT
 <213> *Pyrococcus abyssi*

<400> 327
 "000"

 5 <210> 328
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Ralstonia solanacearum*

 10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11

 15 <400> 328
 "000"

 20 <210> 329
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Ralstonia solanacearum*

 25 <400> 329
 "000"

 30 <210> 330
 <211> 1014
 <212> ADN
 <213> *Rhizobium loti*

 35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1014)
 <223> transl_table=11

 40 <400> 330
 "000"

 45 <210> 331
 <211> 337
 <212> PRT
 <213> *Rhizobium loti*

 50 <400> 331
 "000"

 55 <210> 332
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> *Rhizobium leguminosarum* bv

 60 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1020)
 <223> transl_table=11

 65 <400> 332
 "000"

 70 <210> 333
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> *Rhizobium leguminosarum* bv

 75 <400> 333
 "000"

5
 <210> 334
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Schizosaccharomyces pombe*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)

10
 <400> 334
 "000"

15
 <210> 335
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Schizosaccharomyces pombe*

20
 <400> 335
 "000"

25
 <210> 336
 <211> 939
 <212> ADN
 <213> *Thermotoga maritima*

30
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (939)
 <223> transl_table=11

35
 <400> 336
 "000"

40
 <210> 337
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> *Thermotoga maritima*

45
 <400> 337
 "000"

50
 <210> 338
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> *Variovorax paradoxus*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1017)
 <223> transl_table=11

55
 <400> 338
 "000"

60
 <210> 339
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Variovorax paradoxus*

65
 <400> 339
 "000"

<210> 340
 <211> 993
 <212> ADN
 <213> *Yersinia pestis*

5
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (993)
 <223> transl_table=11

<400> 340
 "000"

10
 <210> 341
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Yersinia pestis*

15
 <400> 341
 "000"

20
 <210> 342
 <211> 1406
 <212> ADN
 <213> *Glycine max*

25
 <220>
 <221> CDS
 <222> (68) .. (1207)

<400> 342

```

gaattcccgg atcgacgctt tcgttgaatt ctaaaaggaa agaacagctg agctggtcag      60

ataatca atg gca tca tcc ttg ggt ttt gag ttc ctg acg aag aag cct      109
      Met Ala Ser Ser Leu Gly Phe Glu Phe Leu Thr Lys Lys Pro
      1          5          10
tac agt cct cca tcc tgg gca tcc cat ctc cac cct tta cct tcc cac      157
Tyr Ser Pro Pro Ser Trp Ala Ser His Leu His Pro Leu Pro Ser His
      15          20          25          30
ttc ttc tct ctt gcc cat ctt ccc act cca att cac aga tgg aac ctt      205
Phe Phe Ser Leu Ala His Leu Pro Thr Pro Ile His Arg Trp Asn Leu
      35          40          45
ccc aat ctg ccc acc aat acc gag ctg tgg atc aag cga gac gac ctt      253
Pro Asn Leu Pro Thr Asn Thr Glu Leu Trp Ile Lys Arg Asp Asp Leu
      50          55          60
tcc gga atg cag ctg agt ggt aac aaa gtg agg aaa ttg gag ttc ctg      301
Ser Gly Met Gln Leu Ser Gly Asn Lys Val Arg Lys Leu Glu Phe Leu
      65          70          75
atg gcc gat gcc att gcg caa ggc gcc gac tct atc atc aca atc gga      349
Met Ala Asp Ala Ile Ala Gln Gly Ala Asp Ser Ile Ile Thr Ile Gly
      80          85          90
ggc att cag agc aac cac tgt cgc gcc acc gcc gtt gcc gcc aag tat      397
Gly Ile Gln Ser Asn His Cys Arg Ala Thr Ala Val Ala Ala Lys Tyr
      95          100          105          110
tta aac ctt gac tgt ttt ctc atc ctc cgc act tct gac ctc ctc gtc      445
Leu Asn Leu Asp Cys Phe Leu Ile Leu Arg Thr Ser Asp Leu Leu Val
      115          120          125
gat caa gat cca gga ctt act ggc aat ctt ctc gtc gaa cgt atg gtt      493
Asp Gln Asp Pro Gly Leu Thr Gly Asn Leu Leu Val Glu Arg Met Val
      130          135          140
gga gct cac gtt cac ctc atc tcc aaa caa gaa tat gcc aaa att ggc      541
Gly Ala His Val His Leu Ile Ser Lys Gln Glu Tyr Ala Lys Ile Gly
      145          150          155
agc gtg aca ctc acc aat gtc cta aaa gaa aaa ttg atc aag gaa ggg      589
Ser Val Thr Leu Thr Asn Val Leu Lys Glu Lys Leu Ile Lys Glu Gly
    
```

ES 2 437 577 T3

```

160          165          170
agg agg cca tat gtt ata ccc gtt ggc gga tca aac tct ttg gga aca      637
Arg Arg Pro Tyr Val Ile Pro Val Gly Gly Ser Asn Ser Leu Gly Thr
175          180          185          190
tgg ggt tat ata gaa gca gta cgg gaa att gag cag cag att cag aag      685
Trp Gly Tyr Ile Glu Ala Val Arg Glu Ile Glu Gln Gln Ile Gln Lys
195          200          205
ggg aca ggc aat gtc aag ttt gat gat att gtt gtt gct tgt ggc agt      733
Gly Thr Gly Asn Val Lys Phe Asp Asp Ile Val Val Ala Cys Gly Ser
210          215          220
ggt ggc aca att gct ggt ctg tca cta gga tcg tca ttg agt gca ttg      781
Gly Gly Thr Ile Ala Gly Leu Ser Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Leu
225          230          235
aaa gca agg gta cat gca ttc tct gtt tgt gat gac cca gat tac ttc      829
Lys Ala Arg Val His Ala Phe Ser Val Cys Asp Asp Pro Asp Tyr Phe
240          245          250
cac aac ttt gct caa ggc ttg ctt gat gga ctc aag gct ggc gtt agc      877
His Asn Phe Ala Gln Gly Leu Leu Asp Gly Leu Lys Ala Gly Val Ser
255          260          265          270
tca aga gat att gtc cac att caa aac gcc aag ggt ctt ggc tat gca      925
Ser Arg Asp Ile Val His Ile Gln Asn Ala Lys Gly Leu Gly Tyr Ala
275          280          285
atg aat aca tcg gag gag ctt aat ttt gta aaa gaa gtt gct gcc act      973
Met Asn Thr Ser Glu Glu Leu Asn Phe Val Lys Glu Val Ala Ala Thr
290          295          300
act ggt gtt gtt ctt gac cca gta tac agt ggt aag gct gct tat gca      1021
Thr Gly Val Val Leu Asp Pro Val Tyr Ser Gly Lys Ala Ala Tyr Ala
305          310          315
atg ctg aaa gat atg tct gaa aat cca aag aag tgg gaa agg aga aag      1069
Met Leu Lys Asp Met Ser Glu Asn Pro Lys Lys Trp Glu Arg Arg Lys
320          325          330
atc ctc ttc ata cat acg ggt ggc ctc cta gga ttg tat gac aag gtc      1117
Ile Leu Phe Ile His Thr Gly Gly Leu Leu Gly Leu Tyr Asp Lys Val
335          340          345          350
gat cag ttg gct tct ttt gtt ggg aat tgg caa cga atg gat gtc aat      1165
Asp Gln Leu Ala Ser Phe Val Gly Asn Trp Gln Arg Met Asp Val Asn
355          360          365
gaa tct gtt cct agg cag gat ggt att gga aag atg ttc tag agaagaaaa      1217
Glu Ser Val Pro Arg Gln Asp Gly Ile Gly Lys Met Phe
370          375          379
tgaaaaaaccc tgacgttgcc agcatctata tttgtacta tcttgctcta aataaatTTT      1277

atacttatat ttaatagcca tatgctcaca ctgaatcctg cctgaagtta ccataagata      1337

gtaaagttcc aaaaacttaa gtgacaaaata aatcaagttt tatttatttt taaaaaaaa      1397

aaaaaaaaa      1406

```

<210> 343
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> *Glycine max*

 <400> 343

5

Met	Ala	Ser	Ser	Leu	Gly	Phe	Glu	Phe	Leu	Thr	Lys	Lys	Pro	Tyr	Ser
1				5					10					15	
Pro	Pro	Ser	Trp	Ala	Ser	His	Leu	His	Pro	Leu	Pro	Ser	His	Phe	Phe
			20					25					30		
Ser	Leu	Ala	His	Leu	Pro	Thr	Pro	Ile	His	Arg	Trp	Asn	Leu	Pro	Asn
		35				40						45			
Leu	Pro	Thr	Asn	Thr	Glu	Leu	Trp	Ile	Lys	Arg	Asp	Asp	Leu	Ser	Gly
	50				55						60				
Met	Gln	Leu	Ser	Gly	Asn	Lys	Val	Arg	Lys	Leu	Glu	Phe	Leu	Met	Ala
65					70					75					80
Asp	Ala	Ile	Ala	Gln	Gly	Ala	Asp	Ser	Ile	Ile	Thr	Ile	Gly	Gly	Ile
					85				90					95	
Gln	Ser	Asn	His	Cys	Arg	Ala	Thr	Ala	Val	Ala	Ala	Lys	Tyr	Leu	Asn
			100					105					110		
Leu	Asp	Cys	Phe	Leu	Ile	Leu	Arg	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Val	Asp	Gln
		115					120					125			
Asp	Pro	Gly	Leu	Thr	Gly	Asn	Leu	Leu	Val	Glu	Arg	Met	Val	Gly	Ala
	130					135					140				
His	Val	His	Leu	Ile	Ser	Lys	Gln	Glu	Tyr	Ala	Lys	Ile	Gly	Ser	Val
145					150					155					160
Thr	Leu	Thr	Asn	Val	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	Ile	Lys	Glu	Gly	Arg	Arg
				165					170						175
Pro	Tyr	Val	Ile	Pro	Val	Gly	Gly	Ser	Asn	Ser	Leu	Gly	Thr	Trp	Gly
			180					185					190		
Tyr	Ile	Glu	Ala	Val	Arg	Glu	Ile	Glu	Gln	Gln	Ile	Gln	Lys	Gly	Thr
		195					200					205			
Gly	Asn	Val	Lys	Phe	Asp	Asp	Ile	Val	Val	Ala	Cys	Gly	Ser	Gly	Gly
	210					215					220				
Thr	Ile	Ala	Gly	Leu	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Leu	Lys	Ala
225					230					235					240
Arg	Val	His	Ala	Phe	Ser	Val	Cys	Asp	Asp	Pro	Asp	Tyr	Phe	His	Asn
				245					250						255
Phe	Ala	Gln	Gly	Leu	Leu	Asp	Gly	Leu	Lys	Ala	Gly	Val	Ser	Ser	Arg
			260					265					270		
Asp	Ile	Val	His	Ile	Gln	Asn	Ala	Lys	Gly	Leu	Gly	Tyr	Ala	Met	Asn
		275					280					285			
Thr	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Phe	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Thr	Thr	Gly
	290					295					300				
Val	Val	Leu	Asp	Pro	Val	Tyr	Ser	Gly	Lys	Ala	Ala	Tyr	Ala	Met	Leu
305					310					315					320
Lys	Asp	Met	Ser	Glu	Asn	Pro	Lys	Lys	Trp	Glu	Arg	Arg	Lys	Ile	Leu
				325					330						335
Phe	Ile	His	Thr	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Leu	Tyr	Asp	Lys	Val	Asp	Gln
			340					345					350		
Leu	Ala	Ser	Phe	Val	Gly	Asn	Trp	Gln	Arg	Met	Asp	Val	Asn	Glu	Ser
		355					360					365			
Val	Pro	Arg	Gln	Asp	Gly	Ile	Gly	Lys	Met	Phe					
	370					375									

<210> 344
 <211> 1315
 <212> ADN
 <213> *Brassica napus*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (14) .. (1138)

10

<400> 344

ES 2 437 577 T3

tgcagcaaca ccc atg gcg gat ttt ctc acg aaa agt cct tac tct cct	49
Met Ala Asp Phe Leu Thr Lys Ser Pro Tyr Ser Pro	
1 5 10	
cct tcg tgg gct tct cat ctt cgt ccg ctt cct tcc cac acc ttc tcc	97
Pro Ser Trp Ala Ser His Leu Arg Pro Leu Pro Ser His Thr Phe Ser	
15 20 25	
ctc gct cac cgt cct act ccg atc cat cga tgg aac ctc ccc ggt ctc	145
Leu Ala His Arg Pro Thr Pro Ile His Arg Trp Asn Leu Pro Gly Leu	
30 35 40	
ccc aac ggc acc gaa ctc tgg atc aag cga gat gac ttc acg ggg atg	193
Pro Asn Gly Thr Glu Leu Trp Ile Lys Arg Asp Asp Phe Thr Gly Met	
45 50 55 60	
gaa ttg agc ggg aac aaa gtc cgg aaa ctc gag ttc cta atg gcc gac	241
Glu Leu Ser Gly Asn Lys Val Arg Lys Leu Glu Phe Leu Met Ala Asp	
65 70 75	
gcc gtg gag cag caa gcc gac acc gtc atc acc atc ggc ggt atc cag	289
Ala Val Glu Gln Gln Ala Asp Thr Val Ile Thr Ile Gly Gly Ile Gln	

	80		85		90		
agc aac cac tgc cgc gcc acc acc gtc gct tct aac tac ctc aat ctg							337
Ser Asn His Cys Arg Ala Thr Thr Val Ala Ser Asn Tyr Leu Asn Leu							
	95		100		105		
gac act cat ctt atc ctc cgc acc tcc aag ctt ctt gcg gat gga gat							385
Asp Thr His Leu Ile Leu Arg Thr Ser Lys Leu Leu Ala Asp Gly Asp							
	110		115		120		
cct ggg ttg gtt ggg aat ctc ctt gtt gag cgc ctc gtt gga gct aac							433
Pro Gly Leu Val Gly Asn Leu Leu Val Glu Arg Leu Val Gly Ala Asn							
	125		130		135		140
gtt cat ctc atc tcc aag gaa gag tat tcc tcc att ggg agt gag gct							481
Val His Leu Ile Ser Lys Glu Glu Tyr Ser Ser Ile Gly Ser Glu Ala							
	145		150		155		
ctc act agt gcc ttg aaa gag aag ctg gag aaa gaa ggg aaa aag cct							529
Leu Thr Ser Ala Leu Lys Glu Lys Leu Glu Lys Glu Gly Lys Lys Pro							
	160		165		170		
tat gtt att ccc gtt ggt gga tcc aac tct ctg gga act tgg ggt tat							577
Tyr Val Ile Pro Val Gly Gly Ser Asn Ser Leu Gly Thr Trp Gly Tyr							
	175		180		185		
att gaa gca gca agg gaa att gag gag cag ctt aaa tgt aga act gat							625
Ile Glu Ala Ala Arg Glu Ile Glu Glu Gln Leu Lys Cys Arg Thr Asp							
	190		195		200		
agc ctc aag ttt gat gat att gtg gtt gca tgt ggc agt ggt ggt aca							673
Ser Leu Lys Phe Asp Asp Ile Val Val Ala Cys Gly Ser Gly Gly Thr							
	205		210		215		220
att gct ggt att tca ttg gga tct tgg ttg gga gct ctt aaa gcc aag							721
Ile Ala Gly Ile Ser Leu Gly Ser Trp Leu Gly Ala Leu Lys Ala Lys							
	225		230		235		
gtc cat gct ttc tcg gta tgc gat gat cct gat tac ttt tac gac ttt							769
Val His Ala Phe Ser Val Cys Asp Asp Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp Phe							
	240		245		250		
gtc caa ggc ctt ctg gat gga ctt caa gct ggt gtt aac tct cgc gat							817
Val Gln Gly Leu Leu Asp Gly Leu Gln Ala Gly Val Asn Ser Arg Asp							
	255		260		265		
att gtt agc atc cac aat gcc aag gga aaa gga tat gca atg aac act							865
Ile Val Ser Ile His Asn Ala Lys Gly Lys Gly Tyr Ala Met Asn Thr							
	270		275		280		
tca gag gag ctt aag ttt tta aag gac ata gct agt gca aca agt gtg							913
Ser Glu Glu Leu Lys Phe Leu Lys Asp Ile Ala Ser Ala Thr Ser Val							
	285		290		295		300
att ctt gat cct gtt tac agt ggg aaa gct gcg tac ggt ttg ata aat							961
Ile Leu Asp Pro Val Tyr Ser Gly Lys Ala Ala Tyr Gly Leu Ile Asn							
	305		310		315		
gag atg acc aag gat ccc aaa agt tgg gag ggg aag aag ata ttg ttc							1009
Glu Met Thr Lys Asp Pro Lys Ser Trp Glu Gly Lys Lys Ile Leu Phe							
	320		325		330		
ata cac act ggt ggg ctt ctt ggg ttg tat gat aaa gtt gat caa atg							1057
Ile His Thr Gly Gly Leu Leu Gly Leu Tyr Asp Lys Val Asp Gln Met							
	335		340		345		
gct tct ctg atg gga aac tgg agc cgt atg gat gtt caa gaa tcc gtc							1105
Ala Ser Leu Met Gly Asn Trp Ser Arg Met Asp Val Gln Glu Ser Val							
	350		355		360		
cca aga aaa gag ggt gtt ggg aaa atg ttc tag cagaacaaaa acctgattct							1158
Pro Arg Lys Glu Gly Val Gly Lys Met Phe							
	365		370		374		
gtaataatcc tgtgaagata agacaggttg aacacttggt tgtgcatttg gtctgataaa							1218
aacgcatcca ttcattgat ttctattctg tgtattatgt ttaatagcta tcgatgatta							1278
ataaaatggt gggtcactc tcaaaaaaaaa aaaaaaa							1315

<210> 345
 <211> 374
 <212> PRT

<213> *Brassica napus*

<400> 345

Met Ala Asp Phe Leu Thr Lys Ser Pro Tyr Ser Pro Pro Ser Trp Ala
 1 5 10 15
 Ser His Leu Arg Pro Leu Pro Ser His Thr Phe Ser Leu Ala His Arg
 20 25 30
 Pro Thr Pro Ile His Arg Trp Asn Leu Pro Gly Leu Pro Asn Gly Thr
 35 40 45
 Glu Leu Trp Ile Lys Arg Asp Phe Thr Gly Met Glu Leu Ser Gly
 50 55 60
 Asn Lys Val Arg Lys Leu Glu Phe Leu Met Ala Asp Ala Val Glu Gln
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Thr Val Ile Thr Ile Gly Gly Ile Gln Ser Asn His Cys
 85 90 95
 Arg Ala Thr Thr Val Ala Ser Asn Tyr Leu Asn Leu Asp Thr His Leu
 100 105 110
 Ile Leu Arg Thr Ser Lys Leu Leu Ala Asp Gly Asp Pro Gly Leu Val
 115 120 125
 Gly Asn Leu Leu Val Glu Arg Leu Val Gly Ala Asn Val His Leu Ile
 130 135 140
 Ser Lys Glu Glu Tyr Ser Ser Ile Gly Ser Glu Ala Leu Thr Ser Ala
 145 150 155 160
 Leu Lys Glu Lys Leu Glu Lys Glu Gly Lys Lys Pro Tyr Val Ile Pro
 165 170 175
 Val Gly Gly Ser Asn Ser Leu Gly Thr Trp Gly Tyr Ile Glu Ala Ala
 180 185 190
 Arg Glu Ile Glu Glu Gln Leu Lys Cys Arg Thr Asp Ser Leu Lys Phe
 195 200 205
 Asp Asp Ile Val Val Ala Cys Gly Ser Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ile
 210 215 220
 Ser Leu Gly Ser Trp Leu Gly Ala Leu Lys Ala Lys Val His Ala Phe
 225 230 235 240
 Ser Val Cys Asp Asp Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp Phe Val Gln Gly Leu
 245 250 255
 Leu Asp Gly Leu Gln Ala Gly Val Asn Ser Arg Asp Ile Val Ser Ile
 260 265 270
 His Asn Ala Lys Gly Lys Gly Tyr Ala Met Asn Thr Ser Glu Glu Leu
 275 280 285
 Lys Phe Leu Lys Asp Ile Ala Ser Ala Thr Ser Val Ile Leu Asp Pro
 290 295 300
 Val Tyr Ser Gly Lys Ala Ala Tyr Gly Leu Ile Asn Glu Met Thr Lys
 305 310 315 320
 Asp Pro Lys Ser Trp Glu Gly Lys Lys Ile Leu Phe Ile His Thr Gly
 325 330 335
 Gly Leu Leu Gly Leu Tyr Asp Lys Val Asp Gln Met Ala Ser Leu Met
 340 345 350
 Gly Asn Trp Ser Arg Met Asp Val Gln Glu Ser Val Pro Arg Lys Glu
 355 360 365
 Gly Val Gly Lys Met Phe
 370

5

<210> 346
 <211> 1389
 <212> ADN
 <213> *Zea mays*

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (42) .. (1229)

15

<400> 346

ES 2 437 577 T3

```
gtcgcttccg ccgacacctg agtattgtcg ctgcgcggg g atg gcc gga gtc acc 56
                                     Met Ala Gly Val Thr
                                     1           5
gcc acc ggg atg gcc gga gtt ccc gcc acc ttc tcc tca gcc acc gct 104
```

Ala	Thr	Gly	Met	Ala	Gly	Val	Pro	Ala	Thr	Phe	Ser	Ser	Ala	Thr	Ala		
				10					15					20			
cag	atc	ggg	ggc	ttc	ctc	tcg	aag	aag	cct	tac	gcg	ccg	ccg	ttg	tgg		152
Gln	Ile	Gly	Gly	Phe	Leu	Ser	Lys	Lys	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Leu	Trp		
			25					30					35				
gcc	acg	cac	ctc	tcc	ccc	atg	cct	tgc	cat	acc	ttc	tcg	ctc	ggc	cat		200
Ala	Thr	His	Leu	Ser	Pro	Met	Pro	Cys	His	Thr	Phe	Ser	Leu	Gly	His		
		40				45						50					
ttc	cca	aca	ccg	att	cac	aag	tgg	aat	ctg	ccc	aat	ttg	ccg	gaa	gga		248
Phe	Pro	Thr	Pro	Ile	His	Lys	Trp	Asn	Leu	Pro	Asn	Leu	Pro	Glu	Gly		
		55				60					65						
acg	gaa	gtg	tgg	atc	aag	cga	gac	gat	tta	tca	ggc	atg	cag	ttg	agt		296
Thr	Glu	Val	Trp	Ile	Lys	Arg	Asp	Asp	Leu	Ser	Gly	Met	Gln	Leu	Ser		
70					75					80					85		
gga	aac	aag	gtc	cgg	aag	ctg	gag	ttc	ttg	atg	gca	gat	gcc	gta	gca		344
Gly	Asn	Lys	Val	Arg	Lys	Leu	Glu	Phe	Leu	Met	Ala	Asp	Ala	Val	Ala		
				90					95					100			
caa	ggc	gca	gac	tgc	ggt	att	act	ggt	ggg	ggt	ata	cag	agt	aac	cac		392
Gln	Gly	Ala	Asp	Cys	Val	Ile	Thr	Val	Gly	Gly	Ile	Gln	Ser	Asn	His		
			105					110						115			
tgc	cgt	gcc	aca	gcc	gtg	gct	gct	aag	tat	ctc	aat	ctt	gat	tgc	tac		440
Cys	Arg	Ala	Thr	Ala	Val	Ala	Ala	Lys	Tyr	Leu	Asn	Leu	Asp	Cys	Tyr		
		120				125						130					
ctg	ata	cta	cgt	acc	tcc	aag	ctt	ctt	gtg	gat	aag	gac	cct	ggt	ttg		488
Leu	Ile	Leu	Arg	Thr	Ser	Lys	Leu	Leu	Val	Asp	Lys	Asp	Pro	Gly	Leu		
		135				140					145						
ggt	ggc	aat	ctt	ctt	gtc	gag	aga	cta	ggt	ggg	gca	cac	ggt	gat	ctt		536
Val	Gly	Asn	Leu	Leu	Val	Glu	Arg	Leu	Val	Gly	Ala	His	Val	Asp	Leu		
150					155					160					165		
gtg	tca	aaa	gaa	gaa	tat	gga	aaa	att	ggt	agt	gtg	gct	tta	gct	gac		584
Val	Ser	Lys	Glu	Glu	Tyr	Gly	Lys	Ile	Gly	Ser	Val	Ala	Leu	Ala	Asp		
				170					175					180			
ctg	ctg	aaa	aaa	agg	ctt	ctg	gaa	gaa	ggg	agg	aag	ccg	tat	gtg	att		632
Leu	Leu	Lys	Lys	Arg	Leu	Leu	Glu	Glu	Gly	Arg	Lys	Pro	Tyr	Val	Ile		
			185					190					195				
cct	ggt	ggt	gga	tca	aac	tca	ttg	gga	act	tgg	gga	tat	att	gag	gca		680
Pro	Val	Gly	Gly	Ser	Asn	Ser	Leu	Gly	Thr	Trp	Gly	Tyr	Ile	Glu	Ala		
		200					205					210					
ata	agg	gag	att	gag	cag	caa	att	cag	caa	tct	gct	gat	ggt	cag	ttt		728
Ile	Arg	Glu	Ile	Glu	Gln	Gln	Ile	Gln	Gln	Ser	Ala	Asp	Val	Gln	Phe		
		215				220						225					
gat	gat	att	ggt	ggt	gca	tgt	ggc	agt	ggt	gga	acc	atc	gct	ggc	ctt		776
Asp	Asp	Ile	Val	Val	Ala	Cys	Gly	Ser	Gly	Gly	Thr	Ile	Ala	Gly	Leu		
230					235					240					245		
gct	tta	gga	tcc	aga	ttg	agc	agc	tta	aat	aca	aaa	ggt	cat	gca	ttc		824
Ala	Leu	Gly	Ser	Arg	Leu	Ser	Ser	Leu	Asn	Thr	Lys	Val	His	Ala	Phe		
				250						255				260			
tct	ggt	tgt	gat	gac	cct	gaa	tac	ttc	tat	gac	tat	atc	caa	ggc	ctg		872
Ser	Val	Cys	Asp	Asp	Pro	Glu	Tyr	Phe	Tyr	Asp	Tyr	Ile	Gln	Gly	Leu		
			265					270					275				
att	gat	gga	ctt	aat	tct	ggt	ttg	gat	tca	cat	gat	ata	ggt	agc	atc		920
Ile	Asp	Gly	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Asp	Ser	His	Asp	Ile	Val	Ser	Ile		
		280				285						290					
gaa	aat	gct	aag	ggg	tta	ggc	tat	gcc	atg	aaa	aca	gct	gag	gag	ctt		968
Glu	Asn	Ala	Lys	Gly	Leu	Gly	Tyr	Ala	Met	Lys	Thr	Ala	Glu	Glu	Leu		
		295				300					305						
aag	ttt	gtc	aaa	gac	ata	gct	gca	tca	aca	ggc	att	atc	ctt	gat	cca		1016
Lys	Phe	Val	Lys	Asp	Ile	Ala	Ala	Ser	Thr	Gly	Ile	Ile	Leu	Asp	Pro		
310					315					320					325		
gtc	tac	agt	ggg	aag	gog	ggt	tat	ggt	ttg	ota	aaa	gac	atg	gct	ggc		1064
Val	Tyr	Ser	Gly	Lys	Ala	Val	Tyr	Gly	Leu	Leu	Lys	Asp	Met	Ala	Gly		
				330					335					340			
aat	cca	gcc	aaa	tgg	aaa	ggt	cga	aaa	ggt	ctg	ttt	atc	cac	aca	ggt		1112
Asn	Pro	Ala	Lys	Trp	Lys	Gly	Arg	Lys	Val	Leu	Phe	Ile	His	Thr	Gly		
			345					350						355			

ES 2 437 577 T3

```

ggt ctt ctt ggg ttg tat gat aag gct gac cag tta tca tct ttg gct      1160
Gly Leu Leu Gly Leu Tyr Asp Lys Ala Asp Gln Leu Ser Ser Leu Ala
      360                      365                      370
ggg agc tgg cgc aga atg gat ctt gaa gat tct gtt cca cgc caa gat      1208
Gly Ser Trp Arg Arg Met Asp Leu Glu Asp Ser Val Pro Arg Gln Asp
      375                      380                      385
ggc act ggt aag atg ttc tga tcagtatggt tcatgtgatt ccatgatggc      1259
Gly Thr Gly Lys Met Phe
      390                      395
tcattcctgc aaacattgta tccattacag agttgttact cttatatttg tgcaagaaaa      1319

tgcagaatag atggttcaca ttgtatagag cactgatgca atttaagaat aaagcacatc      1379

ttttttgcca                                                                1389

```

<210> 347
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> *Zea mays*

<400> 347

5

Met Ala Gly Val Thr Ala Thr Gly Met Ala Gly Val Pro Ala Thr Phe
1 5 10 15
Ser Ser Ala Thr Ala Gln Ile Gly Gly Phe Leu Ser Lys Lys Pro Tyr
20 25 30
Ala Pro Pro Leu Trp Ala Thr His Leu Ser Pro Met Pro Cys His Thr
35 40 45
Phe Ser Leu Gly His Phe Pro Thr Pro Ile His Lys Trp Asn Leu Pro
50 55 60
Asn Leu Pro Glu Gly Thr Glu Val Trp Ile Lys Arg Asp Asp Leu Ser
65 70 75 80
Gly Met Gln Leu Ser Gly Asn Lys Val Arg Lys Leu Glu Phe Leu Met
85 90 95
Ala Asp Ala Val Ala Gln Gly Ala Asp Cys Val Ile Thr Val Gly Gly
100 105 110
Ile Gln Ser Asn His Cys Arg Ala Thr Ala Val Ala Ala Lys Tyr Leu
115 120 125
Asn Leu Asp Cys Tyr Leu Ile Leu Arg Thr Ser Lys Leu Leu Val Asp
130 135 140
Lys Asp Pro Gly Leu Val Gly Asn Leu Leu Val Glu Arg Leu Val Gly
145 150 155 160
Ala His Val Asp Leu Val Ser Lys Glu Glu Tyr Gly Lys Ile Gly Ser
165 170 175
Val Ala Leu Ala Asp Leu Leu Lys Lys Arg Leu Leu Glu Glu Gly Arg
180 185 190
Lys Pro Tyr Val Ile Pro Val Gly Gly Ser Asn Ser Leu Gly Thr Trp
195 200 205
Gly Tyr Ile Glu Ala Ile Arg Glu Ile Glu Gln Gln Ile Gln Gln Ser
210 215 220
Ala Asp Val Gln Phe Asp Asp Ile Val Val Ala Cys Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240
Thr Ile Ala Gly Leu Ala Leu Gly Ser Arg Leu Ser Ser Leu Asn Thr
245 250 255
Lys Val His Ala Phe Ser Val Cys Asp Asp Pro Glu Tyr Phe Tyr Asp
260 265 270
Tyr Ile Gln Gly Leu Ile Asp Gly Leu Asn Ser Gly Leu Asp Ser His
275 280 285
Asp Ile Val Ser Ile Glu Asn Ala Lys Gly Leu Gly Tyr Ala Met Lys
290 295 300
Thr Ala Glu Glu Leu Lys Phe Val Lys Asp Ile Ala Ala Ser Thr Gly
305 310 315 320
Ile Ile Leu Asp Pro Val Tyr Ser Gly Lys Ala Val Tyr Gly Leu Leu
325 330 335
Lys Asp Met Ala Gly Asn Pro Ala Lys Trp Lys Gly Arg Lys Val Leu
340 345 350

Phe Ile His Thr Gly Gly Leu Leu Gly Leu Tyr Asp Lys Ala Asp Gln
355 360 365
Leu Ser Ser Leu Ala Gly Ser Trp Arg Arg Met Asp Leu Glu Asp Ser
370 375 380
Val Pro Arg Gln Asp Gly Thr Gly Lys Met Phe
385 390 395

<210> 348
<211> 1429
<212> ADN
<213> *Zea mays*

5

<220>
<221> CDS
<222> (284)..(1228)

10

<400> 348

gtogcttccg cggacacctg agtcttgtcg ctgccgccgg gatggccgga gtcaccgcca	60
ccgggatggc cggagttccc gccaccttct cctcaaccac cgctcagatc gggggcttcc	120
tctogaagaa gccttacgcg ccgcccgttg gggccacgca cctctcccc atgccttggc	180
ataccttctc gctcggccat ttcccaacac cgattcacia gtggaatctg cccaatttgc	240
cggaaggaac ggaagtgtgg atcaagcgag acgattatca ggc atg cag ttg agt	295
	Met Gln Leu Ser
	1
gga aac aag gtc cgg aag ctg gag ttc ttg atg gca gat gcc gta gca	343
Gly Asn Lys Val Arg Lys Leu Glu Phe Leu Met Ala Asp Ala Val Ala	
5 10 15 20	
caa ggc gca gac tgc gtt att act gtt ggg ggt ata cag agt aac cac	391
Gln Gly Ala Asp Cys Val Ile Thr Val Gly Gly Ile Gln Ser Asn His	
25 30 35	
tgc cgt gcc aca gcc gtg gct gct aag tat ctc aat ctt gat tgc tac	439
Cys Arg Ala Thr Ala Val Ala Ala Lys Tyr Leu Asn Leu Asp Cys Tyr	
40 45 50	
ctg ata cta cgt acc tcc aag ctt ctt gtg gat aag gac cct ggt ttg	487
Leu Ile Leu Arg Thr Ser Lys Leu Val Asp Lys Asp Pro Gly Leu	
55 60 65	
ggt ggc aat ctt ctt gtc gag aga cta gtt ggg gca cac gtt gat ctt	535
Val Gly Asn Leu Leu Val Glu Arg Leu Val Gly Ala His Val Asp Leu	
70 75 80	
gtg tca aaa gaa gaa tat gga aaa att ggt agt gtg gct tta gct gac	583
Val Ser Lys Glu Glu Tyr Gly Lys Ile Gly Ser Val Ala Leu Ala Asp	
85 90 95 100	
ctg ctg aaa aaa agg ctt ctg gaa gaa ggg agg aag ccg tat gtg att	631
Leu Leu Lys Lys Arg Leu Leu Glu Glu Gly Arg Lys Pro Tyr Val Ile	
105 110 115	
cct gtt ggt gga tca aac tca ttg gga act tgg gga tat att gag gca	679
Pro Val Gly Gly Ser Asn Ser Leu Gly Thr Trp Gly Tyr Ile Glu Ala	
120 125 130	
ata agg gag att gag cag caa att cag caa tct gct gat gtt cag ttt	727
Ile Arg Glu Ile Glu Gln Gln Ile Gln Gln Ser Ala Asp Val Gln Phe	
135 140 145	
gat gat att gtt gtt gca tgt ggc agt ggt gga acc atc gct ggc ctt	775
Asp Asp Ile Val Val Ala Cys Gly Ser Gly Gly Thr Ile Ala Gly Leu	
150 155 160	
gct tta gga tcc aga ttg agc agc tta aat aca aaa gtt cat gca ttc	823
Ala Leu Gly Ser Arg Leu Ser Ser Leu Asn Thr Lys Val His Ala Phe	
165 170 175 180	
tct gtt tgt gat gac cct gaa tac ttc tat gac tat gtc caa ggc ctg	871
Ser Val Cys Asp Asp Pro Glu Tyr Phe Tyr Asp Tyr Val Gln Gly Leu	
185 190 195	
att gat gga ctt aat tct ggt ttg gat tca cat gat ata gtt agc atc	919


```

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

Ile Leu Asp Pro Val Tyr Ser Gly Lys Ala Val Tyr Gly Leu Leu Lys
      245      250      255
Asp Met Ala Gly Asn Pro Ala Lys Trp Lys Gly Arg Lys Val Leu Phe
      260      265      270
Ile His Thr Gly Gly Leu Leu Gly Leu Tyr Asp Lys Ala Asp Gln Leu
      275      280      285
Ser Ser Leu Ala Gly Ser Trp Arg Arg Met Asp Leu Glu Asp Ser Val
      290      295      300
Pro Arg Gln Asp Gly Thr Gly Lys Met Phe
      305      310

```

<210> 350
 <211> 1383
 <212> ADN
 <213> *Zea mays*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (42) .. (1226)

10

<400> 350

```

gtcgccttccg ccgacacctg agtcttgtcg ctgccgccgg g atg gcc gga gtc acc      56
                                     Met Ala Gly Val Thr
                                     1      5
gcc acc ggg atg gcc gga gtt ccc gcc acc ttc tcc tca gcc acc gct      104
Ala Thr Gly Met Ala Gly Val Pro Ala Thr Phe Ser Ser Ala Thr Ala
                                     10      15      20
cag atc ggg ggc ttc ctc tcg aag aag cct tac gcg ccg ccg ttg tgg      152
Gln Ile Gly Gly Phe Leu Ser Lys Lys Pro Tyr Ala Pro Pro Leu Trp
                                     25      30      35
gcc acg cac ctc tcc ccc atg cct tgc cat acc ttc tcg ctc ggc cat      200
Ala Thr His Leu Ser Pro Met Pro Cys His Thr Phe Ser Leu Gly His
                                     40      45      50
ttc cca aca ccg att cac aag tgg aat ctg ccc aat ttg ccg gaa gga      248
Phe Pro Thr Pro Ile His Lys Trp Asn Leu Pro Asn Leu Pro Glu Gly
                                     55      60      65
acg gaa gtg tgg atc aag cga gac gat tta tca ggc atg cag ttg agt      296
Thr Glu Val Trp Ile Lys Arg Asp Asp Leu Ser Gly Met Gln Leu Ser
70      75      80      85
gga aac aag gtc cgg aag ctg gag ttc ttg atg gca gat gcc gta gca      344
Gly Asn Lys Val Arg Lys Leu Glu Phe Leu Met Ala Asp Ala Val Ala
                                     90      95      100
caa ggc gca gac tgc gtt att act gtt ggg ggt ata cag agt aac cac      392
Gln Gly Ala Asp Cys Val Ile Thr Val Gly Gly Ile Gln Ser Asn His
                                     105      110      115
tgc cgt gcc aca gcc gtg gct gct aag tat ctc aat ctt gat tgc tac      440
Cys Arg Ala Thr Ala Val Ala Ala Lys Tyr Leu Asn Leu Asp Cys Tyr
120      125      130
ctg ata cta cgt acc tcc aag ctt ctt gtg gat aag gac cct ggt ttg      488
Leu Ile Leu Arg Thr Ser Lys Leu Leu Val Asp Lys Asp Pro Gly Leu
135      140      145
gtt ggc aat ctt ctt gtc gag aga cta gtt ggg gca cac gtt gat ctt      536
Val Gly Asn Leu Leu Val Glu Arg Leu Val Gly Ala His Val Asp Leu
150      155      160      165
gtg tca aaa gaa gaa tat gga aaa att ggc agt gtg gct tta gct gac      584
Val Ser Lys Glu Glu Tyr Gly Lys Ile Gly Ser Val Ala Leu Ala Asp
170      175      180
ctg ctg aaa aaa agg ctt ctg gaa gaa ggg agg aag ccg tat gtg att      632
Leu Leu Lys Lys Arg Leu Leu Glu Glu Gly Arg Lys Pro Tyr Val Ile
185      190      195
cct gtt ggt gga tca aac tca ttg gga act tgg gga tat att gag gca      680
Pro Val Gly Gly Ser Asn Ser Leu Gly Thr Trp Gly Tyr Ile Glu Ala
200      205      210
ata agg gag att gag cag caa att cag caa tct gct gat gtt cag ttt      728
Ile Arg Glu Ile Glu Gln Gln Ile Gln Gln Ser Ala Asp Val Gln Phe

```

215	220	225	
gat gat att gtt gtt gca tgt ggc agt ggt gga acc atc gct ggc ctt			776
Asp Asp Ile Val Val Ala Cys Gly Ser Gly Gly Thr Ile Ala Gly Leu			
230	235	240	245
gct tta gga tcc aga ttg agc agc tta aat aca aaa gtt cat gca ttc			824
Ala Leu Gly Ser Arg Leu Ser Ser Leu Asn Thr Lys Val His Ala Phe			
	250	255	260
tct gtt tgt gat gac cct gaa tac ttc tat gac tat gtc caa ggc ctg			872
Ser Val Cys Asp Asp Pro Glu Tyr Phe Tyr Asp Tyr Val Gln Gly Leu			
	265	270	275
att gat gga ctt aat tct ggt ttg gat tca cat gat ata gtt agc atc			920
Ile Asp Gly Leu Asn Ser Gly Leu Asp Ser His Asp Ile Val Ser Ile			
	280	285	290
gaa aat gct aag ggg tta ggc tat gcc atg aac aca gct gag gag ctt			968
Glu Asn Ala Lys Gly Leu Gly Tyr Ala Met Asn Thr Ala Glu Glu Leu			
	295	300	305
aag ttt gtc aaa gac ata gct gca tca aca ggc att gtc ctt gat cca			1016
Lys Phe Val Lys Asp Ile Ala Ala Ser Thr Gly Ile Val Leu Asp Pro			
	310	315	320
gtc tac agt ggg aag gcg gtt tat gga ttg cta aaa gac atg gct ggc			1064
Val Tyr Ser Gly Lys Ala Val Tyr Gly Leu Leu Lys Asp Met Ala Gly			
	330	335	340
aat cca gcc aaa tgg aaa ggt cga aaa gtt ctg ttt atc cac aca ggt			1112
Asn Pro Ala Lys Trp Lys Gly Arg Lys Val Leu Phe Ile His Thr Gly			
	345	350	355
ggt ctt ctt ggg ttg tat gat aag gct gac cag ttg tca tct ttg gct			1160
Gly Leu Leu Gly Leu Tyr Asp Lys Ala Asp Gln Leu Ser Ser Leu Ala			
	360	365	370
ggg agc tgg cgc aga atg gat ctt gaa gat tot gtt cca cgc aaa gat			1208
Gly Ser Trp Arg Arg Met Asp Leu Glu Asp Ser Val Pro Arg Lys Asp			
	375	380	385
ggc act ggt aag atg ttc tgatcagtat ggtccatgtg attccatgat			1256
Gly Thr Gly Lys Met Phe			
	390	395	
ggctcattct tgcaaacatt gtatccatta cagagttggt actcttatat ttgtgcaaga			1316
aatgcagaa tagatggttc acattgtata gaacactgat gcaatttaag aataaagcac			1376
tctttct			1383

<210> 351
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> *Zea mays*

 <400> 351

5

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

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

<210> 352
<211> 1402
<212> ADN
<213> *Oryza sativa*

5

<220>
<221> CDS
<222> (38)..(1192)

10

<400> 352

ES 2 437 577 T3

```

cattcccctc cacgccgccg ccgccgccgc cgcgtgg atg gcc gga gtt tcc gcc      55
                               Met Ala Gly Val Ser Ala
                               1           5
gcc tcc gcc gcc ggg aag atc ggg agc ttc ctc tcc aag agg ccg tac      103
Ala Ser Ala Ala Gly Lys Ile Gly Ser Phe Leu Ser Lys Arg Pro Tyr
                               10           15           20
gcg ccg ccg tcc tgg gcc tcg cac ctg tcc ccc gcc ccc tcg cag acc      151
Ala Pro Pro Ser Trp Ala Ser His Leu Ser Pro Ala Pro Ser Gln Thr
                               25           30           35
ttc tcg ctc ggc cat ttc ccg acg ccg atc cac aag tgg aat ctg ccc      199
Phe Ser Leu Gly His Phe Pro Thr Pro Ile His Lys Trp Asn Leu Pro
                               40           45           50
aat ttg ccg aat ggc acg gag gtg tgg atc aag cga gac gac atc tca      247
Asn Leu Pro Asn Gly Thr Glu Val Trp Ile Lys Arg Asp Asp Ile Ser
55           60           65           70
ggc atg cag ttg agc ggg aac aag gtc cgg aag ctc gag ttc ctg atg      295
Gly Met Gln Leu Ser Gly Asn Lys Val Arg Lys Leu Glu Phe Leu Met
                               75           80           85
gca gat gcc gtc gcg cag ggc gct gac tgc gtt ata act gta ggt ggc      343
Ala Asp Ala Val Ala Gln Gly Ala Asp Cys Val Ile Thr Val Gly Gly
                               90           95           100
atc cag agc aat cac tgc cgt gcc acc gca gtg gct gca aag tat ata      391

```


<213> *Oryza sativa*

<400> 353

```

Met Ala Gly Val Ser Ala Ala Ser Ala Ala Gly Lys Ile Gly Ser Phe
 1      5      10
Leu Ser Lys Arg Pro Tyr Ala Pro Pro Ser Trp Ala Ser His Leu Ser
      20      25      30
Pro Ala Pro Ser Gln Thr Phe Ser Leu Gly His Phe Pro Thr Pro Ile
      35      40      45
His Lys Trp Asn Leu Pro Asn Leu Pro Asn Gly Thr Glu Val Trp Ile
      50      55      60
Lys Arg Asp Asp Ile Ser Gly Met Gln Leu Ser Gly Asn Lys Val Arg
      65      70      75      80
Lys Leu Glu Phe Leu Met Ala Asp Ala Val Ala Gln Gly Ala Asp Cys
      85      90      95
Val Ile Thr Val Gly Gly Ile Gln Ser Asn His Cys Arg Ala Thr Ala
      100      105      110
Val Ala Ala Lys Tyr Ile Asn Leu Asp Cys Tyr Leu Ile Leu Arg Thr
      115      120      125
Ser Lys Leu Leu Val Asp Lys Asp Pro Gly Leu Val Gly Asn Leu Leu
      130      135      140
Val Glu Arg Leu Val Gly Ala His Ile Asp Leu Val Ser Lys Glu Glu
      145      150      155      160
Tyr Gly Lys Ile Gly Ser Val Ala Leu Ala Asp Leu Leu Lys Lys Lys
      165      170      175
Leu Leu Glu Glu Gly Arg Lys Pro Tyr Val Ile Pro Val Gly Gly Ser
      180      185      190
Asn Ser Leu Gly Thr Trp Gly Tyr Ile Glu Ala Ile Arg Glu Ile Glu
      195      200      205
His Gln Ile Gln Ile Ser Gly Asp Val Gln Phe Asp Asp Ile Val Val
      210      215      220
Ala Cys Gly Ser Gly Gly Thr Ile Ala Gly Leu Ala Leu Gly Ser Lys
      225      230      235      240
Leu Ser Ser Leu Lys Ala Lys Val His Ala Phe Ser Val Cys Asp Asp
      245      250      255
Pro Gly Tyr Phe His Ser Tyr Val Gln Asp Leu Ile Asp Gly Leu His
      260      265      270
Ser Asp Leu Arg Ser His Asp Leu Val Asn Ile Glu Asn Ala Lys Gly
      275      280      285
Leu Gly Tyr Ala Met Asn Thr Ala Glu Glu Leu Lys Phe Val Lys Asp
      290      295      300
Ile Ala Thr Ala Thr Gly Ile Val Leu Asp Pro Val Tyr Ser Gly Lys
      305      310      315      320
Ala Ala Tyr Gly Met Leu Lys Asp Met Gly Ala Asn Pro Ala Lys Trp
      325      330      335
Glu Gly Arg Lys Ile Leu Phe Val His Thr Gly Gly Leu Leu Gly Leu
      340      345      350
Tyr Asp Lys Val Asp Glu Leu Ser Ser Leu Ser Gly Ser Trp Arg Arg
      355      360      365
Met Asp Leu Glu Glu Ser Val Pro Arg Lys Asp Gly Thr Gly Lys Met
      370      375      380
Phe
      385

```

5

<210> 354
 <211> 1406
 <212> ADN
 <213> *Glycine max*

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (68) .. (1204)

ES 2 437 577 T3

<400> 354

gaattcccgg atcgacgctt tcgttgaatt ctaaaaggaa agaacagctg agctggtcag 60

aaaatca	atg	gca	tca	tcc	ttg	ggt	ttt	gag	ttc	ctg	acg	aag	aag	cct	109	
	Met	Ala	Ser	Ser	Leu	Gly	Phe	Glu	Phe	Leu	Thr	Lys	Lys	Pro		
	1				5					10						
tac	agt	cct	cca	tcc	tgg	gca	tcc	cat	ctc	cac	cct	tta	cct	tcc	cac	157
Tyr	Ser	Pro	Pro	Ser	Trp	Ala	Ser	His	Leu	His	Pro	Leu	Pro	Ser	His	
15					20					25					30	
ttc	ttc	tct	ctt	gcc	cat	ctt	ccc	act	cca	att	cac	aga	tgg	aac	ctt	205
Phe	Phe	Ser	Leu	Ala	His	Leu	Pro	Thr	Pro	Ile	His	Arg	Trp	Asn	Leu	
				35					40					45		
ccc	aat	ctg	ccc	acc	aat	acc	gag	ctg	tgg	atc	aag	cga	gac	gac	ctt	253
Pro	Asn	Leu	Pro	Thr	Asn	Thr	Glu	Leu	Trp	Ile	Lys	Arg	Asp	Asp	Leu	
			50						55					60		
tcc	gga	atg	cag	ctg	agt	ggt	aac	aaa	gtg	agg	aaa	ttg	gag	ttc	ctg	301
Ser	Gly	Met	Gln	Leu	Ser	Gly	Asn	Lys	Val	Arg	Lys	Leu	Glu	Phe	Leu	
	65					70						75				
atg	gcc	gat	gcc	att	gcg	caa	ggc	gcc	gac	tct	atc	atc	aca	atc	gga	349
Met	Ala	Asp	Ala	Ile	Ala	Gln	Gly	Ala	Asp	Ser	Ile	Ile	Thr	Ile	Gly	
	80					85						90				
ggc	att	cag	agc	aac	cac	tgt	cgc	gcc	acc	gcc	ggt	gcc	gcc	aag	tat	397
Gly	Ile	Gln	Ser	Asn	His	Cys	Arg	Ala	Thr	Ala	Val	Ala	Ala	Lys	Tyr	
95				100						105					110	
tta	aac	ctt	gac	tgt	ttt	ctc	atc	ctc	cgc	act	tct	gac	ctc	ctc	gtc	445
Leu	Asn	Leu	Asp	Cys	Phe	Leu	Ile	Leu	Arg	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Val	
				115					120					125		
gat	caa	gat	cca	gga	ctt	act	ggc	aat	ctt	ctc	gtc	gaa	cgt	atg	gtt	493
Asp	Gln	Asp	Pro	Gly	Leu	Thr	Gly	Asn	Leu	Leu	Val	Glu	Arg	Met	Val	
			130					135					140			
gga	gct	cac	gtt	cac	ctc	atc	tcc	aaa	caa	gaa	tat	gcc	aaa	att	ggc	541
Gly	Ala	His	Val	His	Leu	Ile	Ser	Lys	Gln	Glu	Tyr	Ala	Lys	Ile	Gly	
	145						150					155				
agc	gtg	aca	ctc	acc	aat	gtc	cta	aaa	gaa	aaa	ttg	atc	aag	gaa	ggg	589
Ser	Val	Thr	Leu	Thr	Asn	Val	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	Ile	Lys	Glu	Gly	
	160					165					170					
agg	agg	cca	tat	gtt	ata	ccc	ggt	ggc	gga	tca	aac	tct	ttg	gga	aca	637
Arg	Arg	Pro	Tyr	Val	Ile	Pro	Val	Gly	Gly	Ser	Asn	Ser	Leu	Gly	Thr	
175					180					185					190	
tgg	ggt	tat	ata	gaa	gca	gta	cgg	gaa	att	gag	cag	cag	att	cag	aag	685
Trp	Gly	Tyr	Ile	Glu	Ala	Val	Arg	Glu	Ile	Glu	Gln	Gln	Ile	Gln	Lys	
				195				200						205		
ggg	aca	ggc	aat	gtc	aag	ttt	gat	gat	att	ggt	ggt	gct	tgt	ggc	agt	733
Gly	Thr	Gly	Asn	Val	Lys	Phe	Asp	Asp	Ile	Val	Val	Ala	Cys	Gly	Ser	
			210					215					220			
ggt	ggc	aca	att	gct	ggt	ctg	tca	cta	gga	tcg	tca	ttg	agt	gca	ttg	781
Gly	Gly	Thr	Ile	Ala	Gly	Leu	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Leu	
		225					230					235				
aaa	gca	agg	gta	cat	gca	ttc	tct	ggt	tgt	gat	gac	cca	gat	tac	ttc	829
Lys	Ala	Arg	Val	His	Ala	Phe	Ser	Val	Cys	Asp	Asp	Pro	Asp	Tyr	Phe	
	240					245					250					
cac	aac	ttt	gct	caa	ggc	ttg	ctt	gat	gga	ctc	aag	gct	ggc	ggt	agc	877
His	Asn	Phe	Ala	Gln	Gly	Leu	Leu	Asp	Gly	Leu	Lys	Ala	Gly	Val	Ser	
255				260						265					270	
tca	aga	gat	att	gtc	cac	att	caa	aac	gcc	aag	ggt	ctt	ggc	tat	gca	925
Ser	Arg	Asp	Ile	Val	His	Ile	Gln	Asn	Ala	Lys	Gly	Leu	Gly	Tyr	Ala	
				275					280					285		
atg	aat	aca	tcg	gag	gag	ctt	aat	ttt	gta	aaa	gaa	ggt	gct	gcc	act	973
Met	Asn	Thr	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Phe	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Thr	
			290					295					300			
act	ggt	ggt	ggt	ctt	gac	cca	gta	tac	agt	ggt	aag	gct	gct	tat	gca	1021
Thr	Gly	Val	Val	Leu	Asp	Pro	Val	Tyr	Ser	Gly	Lys	Ala	Ala	Tyr	Ala	
			305				310						315			
atg	ctg	aaa	gat	atg	tct	gaa	aat	cca	aag	aag	tgg	gaa	agg	aga	aag	1069
Met	Leu	Lys	Asp	Met	Ser	Glu	Asn	Pro	Lys	Lys	Trp	Glu	Arg	Arg	Lys	
	320					325						330				
atc	ctc	ttc	ata	cat	acg	ggt	ggc	ctc	cta	gga	ttg	tat	gac	aag	gtc	1117
Ile	Leu	Phe	Ile	His	Thr	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Leu	Tyr	Asp	Lys	Val	

ES 2 437 577 T3

335		340		345		350										
gat	cag	ttg	gct	tct	ttt	ggt	ggg	aat	tgg	caa	cga	atg	gat	gtc	aat	1165
Asp	Gln	Leu	Ala	Ser	Phe	Val	Gly	Asn	Trp	Gln	Arg	Met	Asp	Val	Asn	
				355					360					365		
gaa	tot	ggt	cct	agg	cag	gat	ggt	att	gga	aag	atg	ttc	tagagaagga			1214
Glu	Ser	Val	Pro	Arg	Gln	Asp	Gly	Ile	Gly	Lys	Met	Phe				
			370						375							
aaatgaaaaa	acctgacggt	gccagcatct	atattttgta	ctatcttgct	ctaaataaat											1274
tttatactta	tatttaaatag	ccatatgctc	acactgaatc	ctgctgaag	ttaccataag											1334
atagtaaagt	tccaaaaact	taagtgacaa	ataaatcaag	ttttatttat	ttttaaaaaa											1394
aaaaaaaaaa	aa															1406

<210> 355
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> *Glycine max*

 <400> 355

5

Met Ala Ser Ser Leu Gly Phe Glu Phe Leu Thr Lys Lys Pro Tyr Ser
 1 5 10 15
 Pro Pro Ser Trp Ala Ser His Leu His Pro Leu Pro Ser His Phe Phe
 20 25 30
 Ser Leu Ala His Leu Pro Thr Pro Ile His Arg Trp Asn Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Pro Thr Asn Thr Glu Leu Trp Ile Lys Arg Asp Asp Leu Ser Gly
 50 55 60
 Met Gln Leu Ser Gly Asn Lys Val Arg Lys Leu Glu Phe Leu Met Ala
 65 70 75 80
 Asp Ala Ile Ala Gln Gly Ala Asp Ser Ile Ile Thr Ile Gly Gly Ile
 85 90 95
 Gln Ser Asn His Cys Arg Ala Thr Ala Val Ala Ala Lys Tyr Leu Asn
 100 105 110
 Leu Asp Cys Phe Leu Ile Leu Arg Thr Ser Asp Leu Leu Val Asp Gln
 115 120 125
 Asp Pro Gly Leu Thr Gly Asn Leu Leu Val Glu Arg Met Val Gly Ala
 130 135 140
 His Val His Leu Ile Ser Lys Gln Glu Tyr Ala Lys Ile Gly Ser Val
 145 150 155 160
 Thr Leu Thr Asn Val Leu Lys Glu Lys Leu Ile Lys Glu Gly Arg Arg
 165 170 175
 Pro Tyr Val Ile Pro Val Gly Gly Ser Asn Ser Leu Gly Thr Trp Gly
 180 185 190
 Tyr Ile Glu Ala Val Arg Glu Ile Glu Gln Gln Ile Gln Lys Gly Thr
 195 200 205
 Gly Asn Val Lys Phe Asp Asp Ile Val Val Ala Cys Gly Ser Gly Gly
 210 215 220
 Thr Ile Ala Gly Leu Ser Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Leu Lys Ala
 225 230 235 240
 Arg Val His Ala Phe Ser Val Cys Asp Asp Pro Asp Tyr Phe His Asn
 245 250 255
 Phe Ala Gln Gly Leu Leu Asp Gly Leu Lys Ala Gly Val Ser Ser Arg
 260 265 270
 Asp Ile Val His Ile Gln Asn Ala Lys Gly Leu Gly Tyr Ala Met Asn
 275 280 285
 Thr Ser Glu Glu Leu Asn Phe Val Lys Glu Val Ala Ala Thr Thr Gly
 290 295 300
 Val Val Leu Asp Pro Val Tyr Ser Gly Lys Ala Ala Tyr Ala Met Leu
 305 310 315 320
 Lys Asp Met Ser Glu Asn Pro Lys Lys Trp Glu Arg Arg Lys Ile Leu
 325 330 335
 Phe Ile His Thr Gly Gly Leu Leu Gly Leu Tyr Asp Lys Val Asp Gln
 340 345 350

 Leu Ala Ser Phe Val Gly Asn Trp Gln Arg Met Asp Val Asn Glu Ser
 355 360 365
 Val Pro Arg Gln Asp Gly Ile Gly Lys Met Phe
 370 375

<210> 356
 <211> 1463
 <212> ADN
 <213> *Triticum aestivum*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (21) .. (1280)

10

<400> 356

```

cccacgcgctc cgaatccccc atg ctc ctg aga ccg gcc ctc ccc gtc gcc gtc      53
                Met Leu Leu Arg Pro Ala Leu Pro Val Ala Val
                1           5           10
agt tcc act ctc cca ctc ttc tcc cat ctc gcc gcc gtc cgc cgt cgg      101
Ser Ser Thr Leu Pro Leu Phe Ser His Leu Ala Ala Val Arg Arg Arg
                15           20           25
tgc tca atc gcc gcc acg ggc atg gca gga gtc tcc gcc gcc tct ccc      149
Cys Ser Ile Ala Ala Thr Gly Met Ala Gly Val Ser Ala Ala Ser Pro
                30           35           40
gcc gca gca cag atc ggc agc ttc ctc tcc aag aag ccc tac gcg ccg      197
Ala Ala Ala Gln Ile Gly Ser Phe Leu Ser Lys Lys Pro Tyr Ala Pro
                45           50           55
cog tcc tgg gcc tgg cac ctc gcc ctc gcc cca tcc cac act ttc tcc      245
Pro Ser Trp Ala Ser His Leu Ala Leu Ala Pro Ser His Thr Phe Ser
                60           65           70           75
ctc gcc cac ttc ccg acc ccg att cac aaa tgg aat ctg cca aat ctg      293
Leu Gly His Phe Pro Thr Pro Ile His Lys Trp Asn Leu Pro Asn Leu
                80           85           90
ccg gag ggc act gaa gta tgg atc aag ccg gac gat ctg tgg ggt atg      341
Pro Glu Gly Thr Glu Val Trp Ile Lys Arg Asp Asp Leu Ser Gly Met
                95           100           105
cag ctg agc ggg aac aag gtc ccg aag ctc gag ttt ctg ttg tca gat      389
Gln Leu Ser Gly Asn Lys Val Arg Lys Leu Glu Phe Leu Leu Ser Asp
                110           115           120
gcc gtc gcg cag ggt gcg gac tgc gtt atc act gtc ggt ggt atc cag      437
Ala Val Ala Gln Gly Ala Asp Cys Val Ile Thr Val Gly Gly Ile Gln
                125           130           135
agc aac cac tgc cgt gcg acg gcg gtg gct gcc aag tat ctc aat ctt      485
Ser Asn His Cys Arg Ala Thr Ala Val Ala Ala Lys Tyr Leu Asn Leu
                140           145           150           155
gac tgt tat ttg ata ctg cgt act tcc aag ctt ctt gtg gat cag gac      533
Asp Cys Tyr Leu Ile Leu Arg Thr Ser Lys Leu Leu Val Asp Gln Asp
                160           165           170
cct ggt ttg gtt ggc aat ctc ctt gtt gag aga ctg ttg gga gcg cac      581
Pro Gly Leu Val Gly Asn Leu Leu Val Glu Arg Leu Leu Gly Ala His
                175           180           185
att gat ctc gtc tca aaa gaa gag tat ggg aaa att gcc agt gtg gct      629
Ile Asp Leu Val Ser Lys Glu Glu Tyr Gly Lys Ile Gly Ser Val Ala
                190           195           200
tta gcg gac ttg ctt aaa aag agg ctt ttg gag gaa gga ccg aag cca      677
Leu Ala Asp Leu Leu Lys Lys Arg Leu Leu Glu Glu Gly Arg Lys Pro
                205           210           215
tat gtg att cct gtt ggt gga tcc aat tca ctt gga act tgg gga tat      725
Tyr Val Ile Pro Val Gly Ser Asn Ser Leu Gly Thr Trp Gly Tyr
                220           225           230           235
att gaa gca gta aga gag ctt gag cag caa att cag tta tct gcc gat      773
Ile Glu Ala Val Arg Glu Leu Glu Gln Gln Ile Gln Leu Ser Gly Asp
                240           245           250
gtt cag ttt gat gac att gtt gtt gcc tgt gcc agt ggt gga acc att      821
Val Gln Phe Asp Asp Ile Val Val Ala Cys Gly Ser Gly Gly Thr Ile

```


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

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

<210> 358
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Desconocido

 <220>

ES 2 437 577 T3

<223> Cebador directo de AtACCD

5 <400> 358
ggggtcgacg aagcaatgag aggacgaagc t 31

<210> 359
<211> 32
<212> ADN
<213> Desconocido

10 <220>
<223> Cebador inverso de AtACCD

15 <400> 359
gggtaatta acagatttg ttgtgctaga ac 32

<210> 360
<211> 20
<212> ADN
<213> Desconocido

20 <220>
<223> Cebador directo de terminador NOS

25 <400> 360
tccccgatcg ttcaacatt 20

<210> 361
<211> 25
<212> ADN
<213> Desconocido

30 <220>
<223> Cebador inverso de terminador NOS

35 <400> 361
ccatctcata aataacgtca tgcac 25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aumentar el crecimiento de la raíz en condiciones normales o de tensión y/o aumentar la tolerancia a la tensión para una tensión ambiental y/o aumentar el rendimiento de una planta de cultivo transgénica en comparación con la planta de cultivo natural no transformada, en el que el procedimiento comprende aumentar la expresión de un Polipéptido de tipo 1-Aminociclopropano-1-carboxilato Desaminasa (ACCDP) mediante transformación de la planta de cultivo con, y sobreexpresión de, un ácido nucleico que codifica el ACCDP, en el que el ACCDP se codifica por un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:
- un polinucleótido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID N°: 1;
 - un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID N°: 2;
 - un polinucleótido que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con el polinucleótido de a);
 - un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con el polipéptido de b); y
 - un polinucleótido cuya secuencia puede derivar de una secuencia polipeptídica codificada por cualquier molécula de ácido nucleico de a) a d) anterior, debido a la degeneración del código genético;
- en el que la tensión ambiental se selecciona de una o más del grupo que consiste en salinidad, sequía o temperatura, o combinaciones de las mismas.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la planta se transforma con un vector que comprende un ácido nucleico aislado, en el que el ácido nucleico comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:
- un polinucleótido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID N°: 1;
 - un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID N°: 2;
 - un polinucleótido que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con el polinucleótido de a);
 - un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido de b); y
 - un polinucleótido cuya secuencia puede derivar de una secuencia polipeptídica codificada por cualquier molécula de ácido nucleico de a) a d) anterior, debido a la degeneración del código genético.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el ácido nucleico está unido operativamente a un promotor y en el que el promotor tiene preferencia de tejido, está regulado por el desarrollo, es inducible por tensión, o una combinación de los mismos.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el promotor con preferencia de tejido tiene preferencia de raíz.
5. Una planta de cultivo transgénica transformada con, que comprende y que sobreexpresa un ácido nucleico, en la que el ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un Polipéptido de tipo 1-Aminociclopropano-1-carboxilato Desaminasa (ACCDP) seleccionado del grupo que consiste en:
- un polinucleótido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID N°: 1;
 - un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID N°: 2;
 - un polinucleótido que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con el polinucleótido de a);
 - un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido de b); y
 - un polinucleótido cuya secuencia puede derivar de una secuencia polipeptídica codificada por cualquier molécula de ácido nucleico de a) a d) anterior, debido a la degeneración del código genético;
- y en la que el polinucleótido codifica un ACCDP vegetal, y en la que la expresión del polinucleótido en la planta da como resultado
- aumento de la tolerancia a la tensión para una tensión ambiental en comparación con la planta de cultivo natural no transformada, en el que la tensión ambiental se selecciona de una o más del grupo que consiste en salinidad, sequía o temperatura, o combinaciones de las mismas; o
 - aumento del crecimiento de la raíz en condiciones normales o de tensión en comparación con la planta de cultivo natural no transformada, o
 - aumento del rendimiento en condiciones normales o de tensión en comparación con la planta de cultivo natural no transformada,
- en el que la planta se selecciona del grupo que consiste en maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, sorgo, mijo, caña de azúcar, soja, cacahuete, algodón, colza, canola, *Manihot*, pimiento, girasol, *Tagetes*, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especies de *Vicia*, guisante, alfalfa, café, cacao, té, especies de *Salix*, palma aceitera, coco, hierba perenne y una planta de cultivo de forraje.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la planta es una monocotiledónea o dicotiledónea.

- 5 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la planta se selecciona del grupo que consiste en maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, sorgo, mijo, caña de azúcar, soja, cacahuate, algodón, colza, canola, *Manihot*, pimiento, girasol, *Tagetes*, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especies de *Vicia*, guisante, alfalfa, café, cacao, té, especies de *Salix*, palma aceitera, coco, hierba perenne y una planta de cultivo de forraje.
8. Una semilla de planta de cultivo producida por la planta de cultivo transgénica de la reivindicación 5, en la que la semilla comprende el ácido nucleico aislado.
9. La semilla de la reivindicación 8, en la que la semilla es de stirpe pura para
- 10 a. aumento de la tolerancia a la tensión para una tensión ambiental en comparación con la variedad natural no transformada de la semilla, en el que la tensión ambiental se selecciona de una o más del grupo que consiste en salinidad, sequía o temperatura, o combinaciones de las mismas; o
- b. un aumento del crecimiento de la raíz en condiciones normales o de tensión en comparación con una variedad natural no transformada de la semilla,
- 15 c. aumento del rendimiento en condiciones normales o de tensión en comparación con la planta de cultivo natural no transformada.
10. Uso de un ácido nucleico que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:
- a. un polinucleótido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID N°: 1;
- b. un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID N°: 2;
- 20 c. un polinucleótido que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con el polinucleótido de a);
- d. un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con el polipéptido de b); y
- e. un polinucleótido cuya secuencia puede derivar de una secuencia polipeptídica codificada por cualquier molécula de ácido nucleico de a) a d) anterior, debido a la degeneración del código genético;
- 25 para aumentar en plantas de cultivo el crecimiento de la raíz y/o el rendimiento en condiciones normales o de tensión y/o la tolerancia a la tensión ambiental en comparación con una variedad natural no transformada de la planta, en la que la tensión ambiental se selecciona de una o más del grupo que consiste en salinidad, sequía o temperatura, o combinaciones de las mismas.

Figura 1

GGGGTCGACGAAGCAATGAGAGGACGAAGCTTGACACTCTCAAGAGTAAAGCTCGAGCTTGCGAGAAG
AAGCATGTCTGCAACATCCGTACCTTCAATGGCGGATTTTCTCACCAAAAAACCTTACTCTCCTCCTT
CTTGGGCTTCTCATCTTCGTCGCTTCTCTTCTCACACTTTCTCCCTCGCTCACCTTCTACTCCGATC
CATCGATGGAATCTTCTGGTCTTCTAATGGCACAGAACTCTGGATCAAGCGAGATGATTTACCCGG
AATGGAATTGAGTGGAACAAGTACGAAAACCTCGAATTTCTAATGGCGGAAGCTGTTGATCAACACC
CTGATACTGTAATCACTATCGGGCGGTATTCAGAGCAATCATTTGTCGTGCTACAGCCACTGCATCTAAC
TATCTTAATCTCAATCTCATCTTATTCTCCGTACTTCCAAGCTTCTTGCTGATGAAGATCCTGGATT
GGTTGGGAATCTCCTTGTGAGCGTCTCGTTGGAGCTAATGTTTCATCTAATCTCTAAAGAAGAGTATT
CTTCCAATTGGGAGTGAGGCTCTTACTAATGCTCTGAAAGAGAACTGGAAAAAGAAGGAAAGAAACCC
TATGTTATTCAGTCGGTGGATCGAACTCTTGGGAACCTGGGGTTATATAGAAGCAGCAAGGGAAAT
TGAGGAGCAGCTGAATATAGACCCGATGACCTGAAATTTGATGATATTGTGGTAGCATGTGGCAGTG
GTGGTACAATTGCTGGTATTTCAATGGGGTCTTGGTTGGGAGCTCTAAAAGCCAAGGTTTCATGCTTTC
TCGGTTTGCATGATCCTGATTACTTCTATGACTTTGTCCAAGGGCTTCTGGATGGACTTCACGCTGG
TGTTAACTCTCGTGATATCGTCAACATCCACAATGCCAAAGGAAAAGGATATGCCATGAACACGTCAG
AGGAGCTTGAGTTTGTAAAGAAAGTAGCAAGTTCAACTGGTGTATTTCTTGATCCGGTTTACAGTGGG
AAAGCTGCGTATGGTTTGATAAATGAGATCACCAAGATCCCAAATGTTGGGAGGGAAGGAAGATATT
GTTTCATACACACTGGTGGGCTTCTTGGGTGTATGATAAGGTTGATCAAATGGCATCTCTGATGGGTA
ATTGGTCCCGGATGGATGTTTTCAGAATCCGTTCCAAGAAAAGATGGTGTGGGAAAATGTTCTAGCAC
AACAAAATCTGTTAATTAACCC

Figura 2

MRGRSLTLSRVKLELARRSMSATSVPSMADFLTKKPYSPPSWASHLRPLPSHTFSLAHLPTPIHRWNL
PGLPNGTELWIKRDDFTGMELSGNKVRKLEFLMAEAVDQHADTVITIGGIQSNHCRATATASNYLNLN
SHLILRTSKLLADEDPLVGNLLVERLVGANVHLISKEEYSSIGSEALTNALKEKLEKEGKKPYVIPV
GGSNSLGTWGYIEAAREIEEQLNYRPDDLKFDIVVACSGSGTIAGISLGSWLGALKAKVHAFSVCDD
PDYFYDFVQGLLDGLHAGVNSRDIVNIHNAKKGYAMNTSEELEFVKKVASSTGVILDPVYSGKAAYG
LINEITKDPKCWEGRKILFIHTGGLLGLYDKVDQMASLMGNWSRMDVSESVPRKDGVGKMF

Figura 3

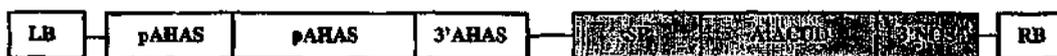


Figura 4

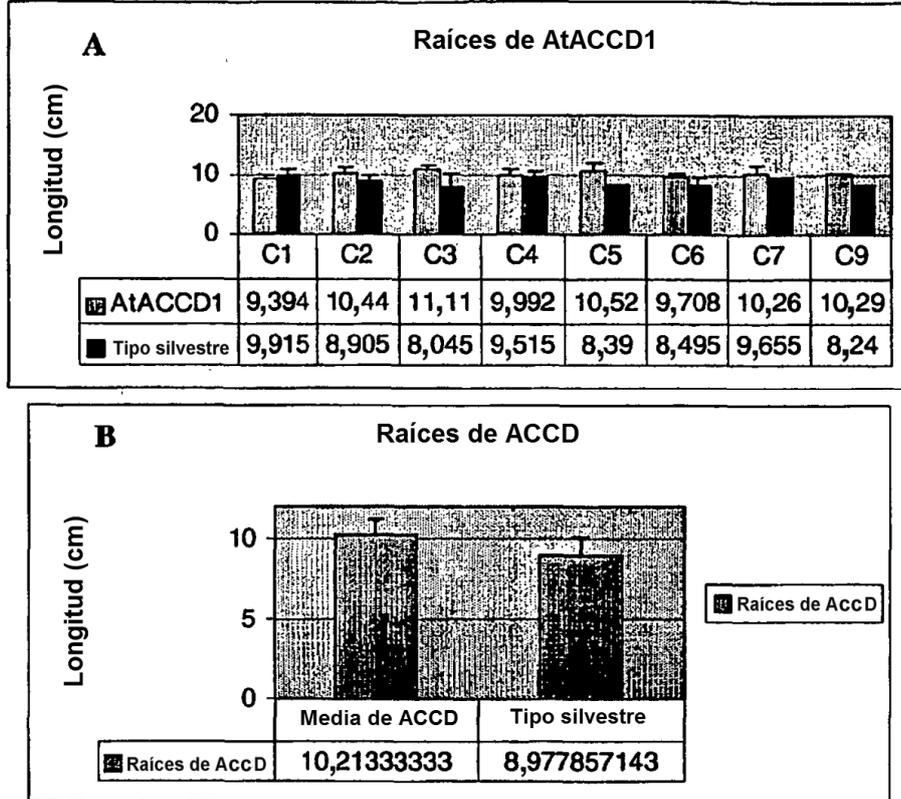


Figura 5

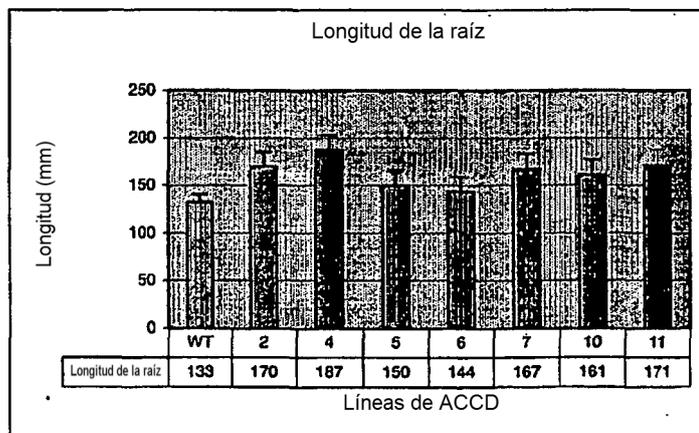


Figura 6

Gen	Longitud de la Raíz (mm)	Error	Diferencias del Control
ID	MEDIA LS	típico	P
WT	132,8	8,0	-
1.1 AtACCD	164,3	6,0	0,0055

Figura 7

Gen	Peso Seco del Brote (g)	Error	Diferencias del Control
ID	MEDIA LS	típico	P
WT	0,0123	0,0013	-
AtACCD	0,0135	0,0010	0,8197

Figura 8

Gen de Consulta	Aciertos de Tblasn (Nombre de los genes y SEC ID)	Porcentaje de identidad	Longitud (aa)
AtACCD (SEC ID N°: 2, 401 aa)	GmACCD-1 (SEC ID N°: 355)	74	388
	OsACCD (SEC ID N°: 353)	69	381
	ZmACCD-1 (SEC ID N°: 351)	69	380
	TaACCD (SEC ID N°: 357)	67	401

Figura 9

>Contig1481_48982441Dec03 1406pb 11m +
 48982441.f_115_1|Soja|Lib:AC040|cluID:7088|varID:1077
 3|RTA56564033F.1.15.1
 Longitud = 1406

Puntuación = 591 bits (1523), Expectativa = e-168
 Identidades= 288/388 (74 %), Positivos = 332/388 (85 %).
 Fase = +2

Consulta: 14 ELARRSMSATSVPSMADFLTKKPYSPPSWASHLRPLPSHTFSLAHLPTPIHRWNLPGLPN 73
 EL R+SM+++ +FLTKKPYSPPSWASHL PLPSH FSLAHLPTPIHRWNLP LP
 Sujeto: 50 ELVRKSMASLGG---FEFLTKKPYSPPSWASHLHPLPSHFFSLAHLPTPIHRWNLPNLPT 220

Consulta: 74 GTELWIKRDDFTGMELSGNKVRKLEFLMAEAVDQHADTVITIGGIQSNHCRATATASNYL 133
 TELWIKRDD +GM+LSGNKVRKLEFLMA+A+ Q AD++ITIGGIQSNHCRATA A+ YL
 Sujeto: 221 NTELWIKRDDLSGMQLSGNKVRKLEFLMADAIAQGADSIITIGGIQSNHCRATAVAAYL 400

Consulta: 134 NLNSHLILRTSKLLADEDPLVGNLLVERLVGANVHLISKEEYSSIGSEALTNAXXXXXX 193
 NL+ LILRTS LL D+DPGL GNLLVER+VGA+VHLISK+EY+ IGS LTN
 Sujeto: 401 NLDCFLILRTSDLLVDQDPGLTGNLLVERMVGAVHLISKQEYAKIGSVTLTNVLKEKLI 580

Consulta: 194 XXXXXPYVIPVGGNSLGTWGYIEAAREIEEQLNYPDDLKFDDIVVACGSGGTIAGISL 253
 PYVIPVGGNSLGTWGYIEA REIE+Q+ ++KFDDIVVACGSGGTIAG+SL
 Sujeto: 581 KEGRRPYVIPVGGNSLGTWGYIEAVREIEQQIQKGTGNVKFDDIVVACGSGGTIAGLSL 760

Consulta: 254 GSWLGALKAKVHAFSVCDDPDYFYDFVQGLLDGLHAGVNSRDIVNIHNAKGGYAMNTSE 313
 GS L ALKA+VHAFSVCDDPDYF++F QGLLDGL AGV+SRDIV+I NAKG GYAMNTSE
 Sujeto: 761 GSSLALKARVHAFSVCDDPDYFHNFAQGLLDGLKAGVSSRDIVHIQNAKGLGYAMNTSE 940

Consulta: 314 ELEFVKKVASSTGVILDPVYSGKAAYGLINEITKDPKCWEGRKILFIHTGGLLGLYDKVD 373
 EL FVK+VA++TGV+LDPVYSGKAAY ++ +++++PK WE RKILFIHTGGLLGLYDKVD
 Sujeto: 941 ELNFBVKEVAATTGVVLDPVYSGKAAYAMLKDMSENPKKWERRKILFIHTGGLLGLYDKVD
 1120

Consulta: 374 QMASLMGNWSRMDVSESVPRKDGVGKMF 401
 Q+AS +GNW RMDV+ESVPR+DG+GKMF
 Sujeto: 1121QLASFVGNWQRMDVNESVPRQDGIGKMF 1204

Figura 10

>ContigI9555_30859453Dec03 1402pb 8m +
 30859453.f_f17_1|Arroz|Lib:AC003|cluID:706|varID:779|RT
 A56560012F.f.17.1
 Longitud = 1402

Puntuación = 560 bits (1442), Expectativa = e-159
 Identidades= 266/381 (69 %), Positivos = 318/381 (83 %)
 Fase = +2

Consulta: 21 SATSVPSMADFLTKKPYSPPSWASHLRPLPSHTFSLAHLPTPIHRWNLPLPGLPNGTELWIK 80
 +A++ + FL+K+PY+PPSWASHL P PS TFSL H PTPIH+WNL P LPNGTE+WIK
 Sujeto: 53 AASAAGKIGSFSLKRPYAPPSWASHLSPAPSQTFSLGHFPTPIHKWNLPLPGLPNGTEVWIK 232

Consulta: 81 RDDFTGMELSGNKVRKLEFLMAEAVDQHADTVITIGGIQSNHCRATATASNYLNLNSHLI 140
 RDD +GM+LSGNKVRKLEFLMA+AV Q AD VIT+GGIQSNHCRATA A+ Y+NL+ +LI
 Sujeto: 233 RDDISGMQLSGNKVRKLEFLMADAVAQGADCVITVGGIQSNHCRATAVAAKYINLDCYLI 412

Consulta: 141 LRYSKLLADEDPGLVGNLLVERLVGANVHLISKEEYSSIGSEALTNAXXXXXXXXXXXXXPY 200
 LRYSKLL D+DPGLVGNLLVERLVGA++ L+SKEEY IGS AL + PY
 Sujeto: 413 LRYSKLLVDKDPGLVGNLLVERLVGAHIDLVSKEEYKIGSVALADLLKKKLEEGRPY 592

Consulta: 201 VIPVGGNSLGTWGYIEAAREIEEQLNYPDDLKFDIVVACGSGGTIAGISLGSWL GAL 260
 VIPVGGNSLGTWGYIEA REIE Q+ D++FDDIVVACGSGGTIAG++LGS L +L
 Sujeto: 593 VIPVGGNSLGTWGYIEAIREIEHQIQI-SGDVQFDDIVVACGSGGTIAGLALGSKLSSL 769

Consulta: 261 KAKVHAFSVCDDPDYFYDFVQGLLDGLHAGVNSRDIVNIHNAKKGAMNTSEELFVKK 320
 KAKVHAFSVCDDP YF+ +VQ L+DGLH+ + S D+VNI NAKG GYAMNT+EEL+FVK
 Sujeto: 770 KAKVHAFSVCDDPGYFHSYVQDLIDGLHSDLRSHDLVNIENAKGLGYAMNTAEELKFVKD 949

Consulta: 321 VASSTGVILDPVYSGKAAAYGLINEITKDPKCWEGRKILFIHTGGLLGLYDKVDQMASLGM 380
 +A++TG++LDPVYSGKAAAYG++ ++ +P WEGRKILF+HTGGLLGLYDKVD+++SL G
 Sujeto: 950 IATATGIVLDPVYSGKAAAYGMLKDMGANPAKWEGRKILFVHTGGLLGLYDKVDELSSLSG
 1129

Consulta: 381 NWSRMDVSESVPRKDGVGKMF 401
 +W RMD+ ESVPRKDG GKMF
 Sujeto: 1130SWRRMDLEESVPRKDGKMF 1192

Figura 11

>Contigl4714_57817161Dec03 1383pb 4m +
 57817161.f_h20_1 |Maíz|Lib:AC080|cluID:57802|varID:6856
 1|RTA56568132F.h.20.1
 Longitud =1383

Puntuación = 560 bits (1442), Expectativa = e-159
 Identidades= 265/380 (69 %), Positivos = 319/380 (83 %)
 Fase = +3

Consulta:22 ATSVPSMADFLTKKPYSPPSWASHLRPLPSHTFSLAHLPTPIHRWNLPGLPNGTELWIKR 81
 +++ + FL+KKPY+PP WA+HL P+P HTFSL H PTPIH+WNLP LP GTE+WIKR
 Sujeto: 90 SSATAQIGGFSLKPKYAPPLWATHLSPMPCHTFSLGHFPTPIHKWNLPNLEPTEVWIKR 269

Consulta: 82 DDFTGMELSGNKVRKLEFLMAEAVDQHADTVITIGGIQSNHCRATATASNYLNLNSHLIL 141
 DD +GM+LSGNKVRKLEFLMA+AV Q AD VIT+GGIQSNHCRATA A+ YLNL+ +LIL
 Sujeto: 270 DDLSGMQLSGNKVRKLEFLMADAVAQGADCVITVGGIQSNHCRATAVAARYLNLDCYLIL 449

Consulta: 142 RTSKLLADEDPGLVGNLLVERLVGANVHLISKEEYSSIGSEALTNAXXXXXXXXXXXPYV 201
 RTSKLL D+DPGLVGNLLVERLVGA+V L+SKEEY IGS AL + PYV
 Sujeto: 450 RTSKLLVDKDPGLVGNLLVERLVGAHVLDVLSKEEYGKIGSVALADLLKRRLLLEGRKPYV 629

Consulta: 202 IPVGGNSLGTWGYIEAAREIEEQNLNRPDDLKFDIVVACGSGGTIAGISLGSWLGALK 261
 IPVGGNSLGTWGYIEA REIE+Q+ + D++FDDIVVACGSGGTIAG++LGS L +L
 Sujeto: 630 IPVGGNSLGTWGYIEAIREIEQQIQ-QSADVQFDDIVVACGSGGTIAGLALGSRLSSLN 806

Consulta: 262 AKVHAFSVCDDPDYFYDFVQGLLDGLHAGVNSRDIVNIHNAKGGYAMNTSEEFVKKV 321
 KVHAFSVCDDP+YFYD+VQGL+DGL++G++S DIV+I .NAKG GYAMNT+EEL+FVK +
 Sujeto: 807 TKVHAFSVCDDPEYFYDYVQGLIDGLNSGLDSDIVSIEHNAKGLGYAMNTAEELKFVKDI 986

Consulta: 322 ASSTGVILDPVYSGKAAVGLINEITKPKCWEGRKILFIHTGGLLGLYDKVDQMASLMGN. 381
 A+STG++LDPVYSGKA YGL+ ++ +P W+GRK+LFIHTGGLLGLYDK DQ++SL G+
 Sujeto: 987 AASTGIVLDPVYSGKAVYGLLKDMAGNPAKWGRKRVLFHTGGLLGLYDKADQLSSLAGS
 1166

Consulta: 382 WSRMDVSESVPKDGVGKMF 401
 W RMD+ +SVPRKD G KMF
 Sujeto: 1167WRRMDLEDSVPRKDGKMF 1226

Figura 12

>Contig15977_54201209Dec03 1463pb 5m +
 54201209.f_kc01_1|Trigo|Lib:AC062|cluID:9364|varID:69571
 |RTA56566095F.k.01.1
 Longitud = 1463

Puntuación = 558 bits (1439), Expectativa = e-159
 Identidades= 269/401 (67 %), Positivos = 324/401 (80 %), Huecos = 5/401 (1 %)
 Fase = +3

Consulta: 6 LTL SRVKLELARRSMSATSVPSMA-----DFLTKKPYSPPSWASHLRPLPSHTFSLAHL P 60
 L R + +A M+ S S A FL+KKPY+PPSWASHL PSHTFSL H P
 Sujeto: 81 LAAVRRRCSIAATGMAGVSAASPAQAIGSFLSKKPYAPPSWASHLALAPSHTFSLGHFP 260

Consulta: 61 TPIHRWNLPGLPNGTELWIKRDDFTGMELSGNKVRKLEFLMAEAVDQHADTVITIGGIQS 120
 TPIH+WNLP LP GTE+WIKRDD +GM+LSGNKVRKLEFL+++AV Q AD VIT+GGIQS
 Sujeto: 261 TPIHKWNLPNLPEGTEVWIKRDDLSGMQLSGNKVRKLEFLSDAVAQGADCVITVGGIQS 440

Consulta: 121 NHCRATATASNYLNLNSHLILRTSKLLADEDPGLVGNLLVERLVGANVHLISKEEYSSIG 180
 NHCRATA A+ YLNL+ +LILRTSKLL D+DPGLVGNLLVERL+GA++ L+SKEEY IG
 Sujeto: 441 NHCRATAVAAYLNLDCYLILRTSKLLVDQDPGLVGNLLVERLLGAHIDLVSKEEYKIG 620

Consulta: 181 SEALTNAXXXXXXXXXXXPYVIPVGGNSLGTWGYIEAAREIEEQLNYPDDLKFDIVV 240
 S AL + PYVIPVGGNSLGTWGYIEA RE+E+Q+ D++FDDIVV
 Sujeto: 621 SVALADLLKRLLEGRKPYVIPVGGNSLGTWGYIEAVRELEQQIQL-SGDVQFDDIVV 797

Consulta: 241 ACGSGGTIAGISLGSWLGALKAKVHAFSVCDDPDYFYDFVQGLLDGLHAGVNSRDIVNIH 300
 ACGSGGTIAG++LGS L +L AKVHAFSVCDDP+YFYD+VQGL+DGL +G++S DIV+I
 Sujeto: 798 ACGSGGTIAGLALGSKLSSLTAKVHAFSVCDDPEYFYDYVQGLIDGLQSGLDSDHIVSIQ 977

Consulta: 301 NAKGKYAMNTSEELFVKKVASSTGVILDPVYSGKAAYGLINEITKDPKCWEGRKILFI 360
 NAKG GYAMNT+EEL+FVK +A++TG++LDPVYSGK AY ++ ++ +P W+GRK+LF+
 Sujeto: 978 NAKGLGYAMNTAEELKFVKDIATATGIVLDPVYSGKAYAMLKDMADNPSKWKGRKVLV 1157

Consulta: 361 HTGGLLGLYDKVDQMASLMGNWSRMDVSESVPRKDGVGKMF 401
 HTGGLLGLYDKVDQM+SL G+W RMD+ ESVPRKDG GKMF
 Sujeto: 1158HTGGLLGLYDKVDQMSSLAGSWRRMDLEESVPRKDG TGKMF 1280