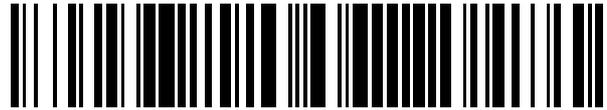


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 462 967**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2010 E 10737817 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2451831**

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

30 Prioridad:

10.07.2009 EP 09165161

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

27.05.2014

73 Titular/es:

**FREIE UNIVERSITÄT BERLIN (100.0%)
Kaiserswerther Str. 16-17
14195 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**SCHMÜLLING, THOMAS;
WERNER, TOMÁS;
BARTRINA Y MANNS, ISABEL y
BRAUN, HELEN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 462 967 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

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

- 5 **[0001]** A fin de abastecer a una población en continuo crecimiento con alimentos y otros productos derivados de las plantas, las personas siempre han estado interesadas en la mejora de la productividad en la agricultura.
- 10 **[0002]** La productividad de una planta puede ser influenciada de diferentes maneras, por ejemplo, mejorando las características de crecimiento de las plantas o retrasando la senescencia foliar. Hay varios mecanismos y vías conocidas involucradas en el crecimiento y desarrollo de las plantas.
- 15 **[0003]** La citoquinina es una hormona vegetal que desempeña un papel regulador positivo y negativo en muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Estimula la formación y la actividad de los meristemas de los brotes, es capaz de establecer tejidos sumideros, retrasa la senescencia foliar, inhibe el crecimiento y la ramificación de la raíz, y desempeña un papel en la germinación de las semillas y en las respuestas al estrés. El análisis de las plantas deficientes de citoquinina ha mostrado que la citoquinina desempeña papeles opuestos en los meristemas de los brotes y en los meristemas de las raíces, y sugiere que la hormona tiene una función esencial en el control cuantitativo del crecimiento orgánico (Mok, D. W. S. & Mok, M. C. (2001) Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Bio. 52, 89 -18). Para la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, se ha mostrado que la señal de citoquinina es percibida por tres miembros de la familia de receptores de citoquinina, que son sensores de histidina quinasa (Inoue, T. et al. (2001) Nature 409, 1060 - 3; Suzuki, T. et al. (2001) Plant Cell Physiol. 42, 107 - 13; Yamada, H. et al. (2001) Plant Cell Physiol. 42, 1017 - 23.). Estos tres receptores de citoquinina, AHK2, AHK3 y CRE1/AHK4, muestran un alto grado de identidad, pero cada uno tiene características distintivas.
- 20 **[0004]** Recientemente, se ha revelado una variante con ganancia de función del receptor de citoquinina AHK3 y se le ha denominado *ore12* (véase el documento WO 2007 / 108931 A1). Se demostró que la expresión *ore12* en la *Arabidopsis thaliana* produce plantas con senescencia foliar retardada, mientras que la apariencia en general de la planta no mostró diferencias significativas en comparación con las plantas de tipo salvaje. Aunque la expresión de *ore12* puede dirigirse a plantas con senescencia foliar retardada y, de ese modo a las plantas con productividad mejorada, la expresión *ore12* no tuvo un efecto significativo en otras características de crecimiento de la planta. Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de mejora de la productividad de la planta.
- 25 **[0005]** Es objeto de la presente invención proporcionar medios y métodos adecuados para producir plantas transgénicas con características de productividad y / o crecimiento mejoradas.
- 30 **[0006]** Este objetivo se alcanza mediante la presente invención tal y como se describe con detalle a continuación.
- 35 **[0007]** La presente invención proporciona nuevas variantes con ganancia de función de los receptores de citoquinina AHK3, denominados *rock3*. El polipéptido *rock3* con la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 2 es una variante constitutivamente activa del receptor de citoquinina AHK3 de la *Arabidopsis thaliana* y puede ser codificada por un ácido nucleico con la secuencia de la SEC ID N° 4.
- 40 **[0008]** Sorprendentemente, se descubrió que la expresión transgénica de un polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2 que se dirige a las plantas transgénicas que exhiben características del crecimiento mejoradas y de la senescencia foliar retardada. El efecto de la expresión transgénica de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2 en una planta con senescencia foliar es más pronunciado de lo que se ha observado en la variante conocida con ganancia de función de AHK3, *ore12*. Aún más sorprendente, es que se descubrió por primera vez que la expresión transgénica de la variante con ganancia de función AHK3 de una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2 tuvo un efecto significativo en el crecimiento de brotes, en el número de silicuas por tallo principal, en el grosor del tallo y / o en el tamaño de la flor de la planta transgénica resultante cuando se compara con la de tipo salvaje, mientras que las plantas que expresan *ore12* carecen de tal efecto. Por lo tanto, la expresión transgénica de una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2 se dirige a las plantas que exhiben una productividad mejorada.
- 45 **[0009]** En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico aislado tal y como se define en las reivindicaciones. El ácido nucleico aislado de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una variante constitutivamente activa del receptor de citoquinina AHK3 con:
- 50 i) una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2 o un ortólogo de la misma; en la que la secuencia de aminoácidos tiene el aminoácido isoleucina (I) en una posición correspondiente a la posición 179 de la SEC ID N° 2.
- 55 **[0010]** Preferiblemente, se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos, la secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2 o un ortólogo de la misma. El término "ortólogo" utilizado en la presente se refiere a una secuencia ácido nucleico o a una secuencia de aminoácidos de una especie, preferiblemente diferente de la *Arabidopsis thaliana*, que muestra una similitud más elevada,
- 60
- 65

preferiblemente una identidad de secuencia más alta, con la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos especificadas de la *Arabidopsis thaliana* ya que ambos genes se originaron a partir de una especie primitiva común. La presente invención proporciona también un polipéptido aislado codificado por un ácido nucleico aislado de la invención, preferiblemente un polipéptido aislado que comprende al menos, la secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2.

[0011] En un segundo aspecto, la invención proporciona un casete de expresión transgénica para la expresión de ácidos nucleicos, en el que el casete de expresión transgénica de la invención comprende un ácido nucleico aislado según la presente invención. El casete de expresión transgénica de la invención puede ser diseñado de tal manera que media la expresión transgénica de la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos, la secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2 en un tejido de la planta bajo el control de al menos un promotor en un organismo huésped, preferiblemente una célula de planta.

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

[0013] En un cuarto aspecto, la presente invención se dirige a un organismo transgénico que comprende un ácido nucleico aislado según la invención, un casete de expresión transgénica de la invención o un vector de la presente invención, en el que el organismo es una planta o un microorganismo.

[0014] La presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende:

- i) una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2 o un ortólogo de la misma; en la que la secuencia de aminoácidos tiene el aminoácido isoleucina (I) en una posición correspondiente a la posición 179 de la SEC ID N° 2.

[0015] En una realización preferente, el polipéptido aislado de la invención comprende y / o consiste en la secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2.

[0016] La presente invención se refiere también a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos, la secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2.

[0017] Un ácido nucleico "aislado" es aquel que está sustancialmente separado de otras moléculas de ácido nucleico presentes en la fuente natural del ácido nucleico (por ejemplo, secuencias que codifican otros polipéptidos). Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está libre de algunas de las secuencias que flanquean de forma natural el ácido nucleico (es decir; secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en su replicación de origen natural. Por ejemplo, un ácido nucleico clonado se considera aislado. En diversas realizaciones, el ácido nucleico aislado de la invención puede contener menos de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, o 0,1 kb de las secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que se deriva el ácido nucleico. Un ácido nucleico se considera también aislado si ha sido alterado por la intervención humana o colocado en un locus o ubicado en una posición que no es su sitio natural, o si ha sido introducido en una célula por ejemplo por agroinfección.

Por otra parte, un ácido nucleico "aislado", como una molécula de ADNc, puede estar libre de algunos materiales celulares con los que se asocia de forma natural, o de medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. Están excluidos específicamente de la definición de "ácido nucleico aislado": los cromosomas producidos de forma natural (como las extensiones cromosómicas), las bibliotecas genómicas, y las preparaciones celulares de ADN genómico completo o ARN celular completo de fuentes de origen natural (incluyendo preparaciones celulares completas que son cortadas mecánicamente o digeridas enzimáticamente). Los ácidos nucleicos y / o polipéptidos de la presente invención pueden proporcionarse en forma aislada, es decir; purificados de su ambiente natural, preferiblemente en forma sustancialmente pura u homogénea o libre o sustancialmente libre de ácidos nucleicos o genes de las especies de origen distintas a la secuencia deseada.

[0018] El ácido nucleico según la presente invención puede incluir ADN, ARN, mezclas y / o sustituyentes funcionales de los mismos, particularmente ADNc, ADN y ARN genómico, y puede ser completo o parcialmente sintético. Los ácidos nucleicos de la invención comprenden secuencias de polinucleótidos monocatenarias o completa o parcialmente bicatenarias. El término "aislado" abarca todas estas posibilidades. Para el propósito de la presente invención, en la que se especifica una secuencia de ADN, por ejemplo con referencia a una SEC ID N° en particular, a menos que el contexto indique lo contrario, abarca el ARN equivalente, cuando tiene lugar la sustitución de U por T. El ácido nucleico de la invención puede ser producido por cualquier medio, incluyendo preparaciones genómicas, preparaciones de ADNc, síntesis *in vitro*, PCR, RT - PCR, y / o transcripción *in vivo* o *in vitro*.

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

- i) una de las SEC ID N° 4 o un complemento inverso de la misma;

- 5 ii) una secuencia funcionalmente equivalente o un complemento inverso de la misma que tiene al menos un 70 % de homología, preferiblemente al menos un 75 % de homología, más preferiblemente al menos un 80 % de homología con la secuencia en la SEC ID N° 4 en un segmento de secuencia codificadora de al menos 300 pares de bases, preferiblemente en un segmento de secuencia codificadora de al menos 500 pares de bases, más preferiblemente en una longitud de secuencia codificadora completa, y que codifica al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2; o
- 10 iii) secuencias funcionalmente equivalentes o un complemento inverso de la misma que se hibridizan en condiciones estándar con la secuencia del ácido nucleico con la SEC ID N° 4 o con secuencias de ácido nucleico complementarias de las mismas y que codifican al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2.

15 **[0020]** La secuencia de ácido nucleico con la SEC ID N° 3 codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, mientras que la secuencia de ácido nucleico con la SEC ID N° 4 codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.

20 **[0021]** Para el propósito de la presente invención, el término “secuencia equivalente funcional” se refiere a cualquier secuencia no idéntica con una de las SEC ID N° 4 o un complemento inverso de la misma, y que codifica al menos la secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2. Los expertos en la disciplina son conscientes de la degeneración del código genético, lo que permite a un número de diferentes secuencias de ácido nucleico codificar la misma secuencia de aminoácidos y no tiene dificultad alguna en determinar si una secuencia de ácido nucleico dada codifica al menos la secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2.

25 **[0022]** Los métodos para la preparación de secuencias equivalentes funcionales o fragmentos de la invención comprenden preferiblemente la introducción de mutaciones en la secuencia descrita por la SEC ID N° 4 o un complemento inverso de la misma. La mutagénesis puede ser aleatoria, en cuyo caso las secuencias mutagenizadas son posteriormente cribadas de sus propiedades por un procedimiento de ensayo y error. Los métodos para la mutagénesis de secuencias de ácidos nucleicos son conocidos por los expertos e incluyen a modo de ejemplo la utilización de oligonucleótidos con una o más mutaciones en comparación con la región a ser mutada (por ejemplo, en una mutagénesis dirigida). Se emplean cebadores con 15 – 75 nucleótidos o más, con preferiblemente 15, 25 o más residuos de nucleótidos localizados a ambos lados de la secuencia que va a ser modificada. Los detalles y el procedimiento para dichos métodos de mutagénesis son familiares para los expertos en la disciplina (Kunkel et al. (1987) *Methods Enzymol* 154: 367 - 382; Tomic et al. (1990) *Nucl Acids Res* 12: 1656; Upender et al. (1995) *Biotechniques* 18(1): 29 - 30; Pat U. S. N° 4.237.224). Puede lograrse también una mutagénesis tratando por ejemplo, los vectores de expresión transgénica que comprenden una de las secuencias de ácido nucleico de la invención con agentes mutagénicos como la hidroxilamina.

40 **[0023]** La utilización de secuencias equivalentes funcionales puede ser particularmente beneficiosa a fin de cumplir con un uso del codón particular de un organismo seleccionado que puede utilizarse para transcribir el ácido nucleico de la invención y de expresar el polipéptido codificado que comprende o consiste en al menos la secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2.

45 **[0024]** El ácido nucleico aislado de la invención puede comprender al menos una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las secuencias equivalentes funcionalmente o un complemento inverso de la misma que tiene al menos un 80 % de homología, preferiblemente al menos un 90 % de homología, más preferiblemente al menos un 95 % de homología con la secuencia de la SEC ID N° 4 en un segmento de secuencia codificadora de al menos 300 pares de bases, preferiblemente en un segmento de secuencia codificadora de al menos 500 pares de bases, más preferiblemente en una longitud de secuencia codificadora completa, y que codifica al menos una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2.

50 **[0025]** La homología o identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos se entiende en el sentido de la identidad de las respectivas secuencias en una longitud de secuencia dada en cada caso, que se calcula comparándose con la ayuda del algoritmo del programa GAP (Wisconsin Package Version 10.0, Universidad de Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA), estableciendo los siguientes parámetros:

60	Peso de espacios:	12
	Peso de longitud:	4
	Media de coincidencia:	2,912
	Media de malapareamiento:	-2,003

65 **[0026]** Por ejemplo, una secuencia que tiene al menos un 70 % de homología o identidad con la secuencia de la SEC ID N° 4 en la base del ácido nucleico se entiende como una secuencia que, en comparación con la SEC ID N° 4 por el algoritmo del programa anterior con el conjunto de parámetros anteriormente establecidos, tiene al menos un 70 % de homología. La identidad u homología entre dos secuencias de aminoácidos se entiende en el sentido de la

identidad de las respectivas secuencias en una longitud de secuencia dada en cada caso, que se calcula comparándose con la ayuda del algoritmo ClusatW_Bioedit (Thompson JD et al. (1994) *Nucleic Acids Res* 22: 4673 - 4680) utilizando las configuraciones predeterminadas en el paquete de software Bioedit (disponible en la página web <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

5 Por ejemplo, una secuencia que tiene al menos un 48 % de homología o identidad con la secuencia de la SEC ID N° 2 en una base de aminoácidos se entiende como una secuencia que, en comparación con la secuencia SEC ID N° 2 por el algoritmo del programa anterior con el conjunto de parámetros anteriormente establecidos, tiene al menos un 48% de identidad.

10 **[0027]** El ácido nucleico aislado de la invención puede comprender al menos una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las secuencias equivalentes funcionalmente o un complemento inverso de la misma que se hibridizan en condiciones estándar con la secuencia de ácido nucleico en la SEC ID N° 4 o con secuencias de ácido nucleico complementarias de las mismas, y que codifican al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2.

15 **[0028]** El término “condiciones estándar de hibridación” se debe tomar en su contexto más amplio y se refiere a ambas condiciones de hibridación severas y / o menos severas. Dichas condiciones de hibridación se describen, *inter alia* en Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T et al., in *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, páginas 9.31 - 9.57 o en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1 - 6.3.6.

20 **[0029]** Por ejemplo, las condiciones durante la(s) etapa(s) de lavado pueden seleccionarse a partir de las condiciones limitadas por aquellas de baja severidad (con 2*SSC a 50 °C) y con una alta severidad (con 0.2*SSC a 50 °C, preferiblemente a 65 °C) (20*SSC: citrato sódico 0,3 M, NaCl 3 M, pH 7,0). Además, la temperatura durante la etapa de lavado puede elevarse a partir de condiciones de baja severidad a temperatura ambiente, 22 °C, a condiciones más severas a 65 °C. Ambos parámetros, la concentración de sal y la temperatura, pueden modificarse simultáneamente, y además es posible que uno de los dos parámetros se mantenga constante y sólo el otro se modifique. También es posible emplear agentes de desnaturalización como, por ejemplo, formamida o SDS durante la hibridación. La hibridación en presencia de un 50 % de formamida se lleva a cabo a 42 °C. Se proporcionan a continuación algunos ejemplos de condiciones para las etapas de hibridación y lavado:

(1) Condiciones de hibridación con, por ejemplo,

- 35 a) 4*SSC a 65 °C, o
 b) 6*SSC, 0,5 % de SDS, 100 mg / ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 65 °C, o
 c) 4*SSC, 50% de formamida, a 42 °C, o
 d) 2* o 4*SSC a 50 °C (condición baja de severidad), o
 40 e) 2* o 4*SSC, 30 – 40 % de formamida a 42 °C (condición baja de severidad), o
 f) 6*SSC a 45 °C, o,
 g) de tampón de fosfato sódico 0,05 M pH 7,0, 2 mM de EDTA, 1% de BSA y 7 % de SDS.

(2) Etapas de lavado con, por ejemplo

- 45 a) 0,1*SSC a 65 °C, o
 b) 0,1*SSC, 0,5 % de SDS a 68 °C, o
 c) 0,1*SSC, 0,5 % de SDS, 50 % de formamida a 42 °C, o
 d) 0,2*SSC, 0,1 % de SDS a 42 °C, o
 50 e) 2*SSC a 65 °C. (condición de baja severidad), o
 f) 40 mM de tampón de fosfato sódico pH 7,0, 1 % de SDS, 2 mM de EDTA.

[0030] El ácido nucleico aislado de la invención puede comprender al menos una secuencia promotora que puede localizarse aguas arriba en la posición 5´ en la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2.

55 **[0031]** Una secuencia promotora es una secuencia de ácido nucleico capaz de facilitar o potenciar la transcripción de un gen particular. La referencia aquí a un “promotor” se debe tomar en su contexto más amplio e incluye las secuencias reguladoras transcripcionales derivadas de un gen genómico eucariota clásico, que incluye la caja TATA requerida para la iniciación de la transcripción precisa, con o sin una secuencia de caja CCAAT y elementos reguladores o de control adicionales (por ejemplo, secuencias de activación aguas arriba, represores, potenciadores y silenciadores) que alteran la expresión génica en respuesta a los estímulos y / o desarrollo externos, o en una forma específica del tejido.

60 **[0032]** El término “promotor” puede incluir además secuencias reguladoras transcripcionales de un gen procarionta clásico, en cuyo caso puede incluir una secuencia de caja - 35 y / o secuencias reguladoras transcripcionales de caja - 10.

5 **[0033]** En el presente contexto, el término “promotor” es utilizado también para describir una molécula sintética o de fusión, o derivada que confiera, active o potencie la expresión de dicha molécula de ácido nucleico en una célula, tejido u órgano. Los promotores pueden contener copias adicionales de uno o más elementos reguladores específicos, para potenciar adicionalmente la expresión y / o para alterar la expresión espacial y / o la expresión temporal de una molécula de ácido nucleico a la que está unida funcionalmente. Dichos elementos reguladores pueden ser colocados en forma adyacente a una secuencia heteróloga del promotor que dirige la expresión de una molécula de ácido nucleico en respuesta a por ejemplo, cobre, glucocorticoides, dexametasona, tetraciclina, giberelina, cAMP, ácido abscísico, auxina, heridas, etileno, jasmonato o ácido salicílico o para conferir la expresión de una molécula de ácido nucleico a células, tejido u órganos específicos como meristemas, hojas, raíces, embriones, flores, semillas o frutos.

15 **[0034]** En el contexto de la presente invención, el promotor es preferiblemente una secuencia promotora expresable en plantas. Los promotores que también funcionan o funcionan únicamente en células no vegetales como las bacterias, células de levadura, células de insecto y células de animales, no se excluyen de la invención. Por “expresable en plantas” se refiere a la secuencia promotora, que incluye cualquier elemento regulador adicional añadido a la misma o contenido en la misma, es al menos capaz de inducir, conferir, activar o potenciar la expresión en una célula, tejido u órgano vegetal, preferiblemente en una célula tejido u órgano de planta monocotiledónea o dicotiledónea. Los términos “operativo en plantas” y “operativo en una planta” cuando se utilizan en la presente, respecto a una secuencia promotora, deberán tomarse como equivalentes a una secuencia promotora expresable en plantas.

25 **[0035]** Los promotores regulables como parte de un sistema de expresión vegetal viral binario también son conocidos por los expertos en la disciplina (Yadav 1999 - WO 99/22003; Yadav 2000 - WO 00/17365). En el presente contexto, una “secuencia promotora regulable” es un promotor capaz de conferir expresión de un gen en una célula particular, tejido, órgano o grupo de células, tejido u órganos de una planta, opcionalmente en condiciones específicas, sin embargo generalmente no confiere expresión en la planta en todas las condiciones. Por consiguiente, una secuencia promotora regulable puede ser una secuencia promotora que confiere expresión de un gen al que está ligado funcionalmente en una posición particular en la planta o alternativamente a través de la planta en un conjunto específico de condiciones, como la inducción de una expresión génica por un compuesto químico u otro inductor. Preferiblemente, el promotor regulador utilizado en la realización de la presente invención confiere expresión en una posición específica en la planta, ya sea constitutivamente o tras la inducción, sin embargo, no en toda la planta en cualquier circunstancia. Incluidos en el alcance de dichos promotores están las secuencias promotoras específicas de células, secuencias promotoras específicas de tejidos, secuencias promotoras específicas de órganos, secuencias promotoras génicas específicas del ciclo celular, secuencias promotoras inducibles y secuencias promotoras constitutivas que han sido modificadas para conferir expresión en una parte particular de la planta en un momento determinado, como la integración de dicho promotor constitutivo en un elemento genético transponible (Ac, Ds, Spm, En, u otro transposón). Del mismo modo, el término “específico de tejido” se tendrá en cuenta para indicar que la expresión está predominantemente en un tejido particular o tipo de tejido, preferiblemente de origen vegetal, aunque no necesariamente exclusivamente en dicho tejido o tipo de tejido. Del mismo modo, el término “específico de órgano” se tendrá en cuenta para indicar que la expresión está predominantemente en un órgano particular, preferiblemente de origen vegetal, aunque no necesariamente exclusivamente en dicho órgano. Del mismo modo, el término “específico del ciclo celular” se tendrá en cuenta para indicar que la expresión es predominantemente cíclica y tiene lugar en una o más, no necesariamente en fases consecutivas del ciclo celular aunque no necesariamente exclusivamente en células cíclicas, preferiblemente de origen vegetal. Los expertos en la disciplina serán conscientes de que un “promotor inducible” es un promotor de la actividad transcripcional que se incrementa o induce en respuesta a un estímulo de desarrollo, químico, ambiental o físico. Del mismo modo, los expertos comprenderán que un “promotor constitutivo” es un promotor transcripcionalmente activo durante la mayor parte, aunque no necesariamente en todas las partes de un organismo, preferiblemente una planta, durante la mayor parte, aunque no necesariamente en todas las fases de su crecimiento y desarrollo. Los expertos en la disciplina serán capaces de seleccionar secuencias promotoras apropiadas para su utilización en la regulación de la expresión apropiada de las variantes de proteína del receptor de citoquinina a partir de fuentes disponibles públicamente sin experimentación indebida.

55 **[0036]** La colocación de una molécula de ácido nucleico en el control regulador de una secuencia promotora, o en una conexión o ligamiento funcional con una secuencia promotora, se refiere a colocar dicha molécula de ácido nucleico de manera que la expresión está en parte controlada por la secuencia promotora. Un promotor está generalmente, aunque no necesariamente, situado aguas arriba, o en el extremo 5' y en 2 Kb del sitio de iniciación de la transcripción de una molécula de ácido nucleico que se regula, aunque los potenciadores y silenciadores que están comprendidos también por el término “promotor” pueden situarse más lejos del sitio de iniciación de la transcripción. Se cree que estos elementos se unen a proteínas capaces de una acción de largo alcance debido a un lazo de la secuencia de intervención. En la construcción de combinaciones promotoras / génicas estructurales heterólogas, se prefiere generalmente situar el promotor a una distancia del sitio de iniciación de la transcripción génica que es aproximadamente la misma que la distancia entre ese promotor y el gen que lo controla en su ajuste natural (es decir, el gen del que se deriva el promotor). Como se conoce ya en la disciplina, pueden ajustarse algunas modificaciones en esta distancia sin pérdida de la función del promotor. Del mismo modo, la posición

preferida de un elemento de la secuencia reguladora con respecto al gen heterólogo que se sitúa bajo su control es definido por la posición del elemento en su ajuste natural (es decir; el gen del que se deriva el promotor). De nuevo, como se conoce en la disciplina, pueden también producirse algunas modificaciones en esta distancia.

5 **[0037]** Según la presente invención, cualquier secuencia promotora puede utilizarse para producir un ácido nucleico aislado de la invención. Preferiblemente, la secuencia promotora se sitúa aguas arriba de la secuencia de ácido nucleico codificada al menos por un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 1. Preferiblemente se utilizan secuencias promotoras que están activas en al menos un tejido o un tipo celular de una planta y / o que están activas en un microorganismo. Para tal finalidad, al menos
10 una secuencia promotora y una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2; están funcionalmente unidas entre sí.

[0038] La presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado de la invención, además comprende al menos una secuencia promotora, en la que al menos una secuencia promotora y una secuencia de ácido nucleico codifica al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2,
15 están funcionalmente unidas entre sí.

[0039] La presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado de la invención, además comprende al menos una secuencia promotora, en la que al menos una secuencia promotora codifica al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2, está localizada en la posición 3' en al menos un promotor y en la que al menos una secuencia promotora y una secuencia de ácido nucleico están funcionalmente unidas entre sí.

[0040] Tal y como se utiliza en la presente, "ligamiento funcional" se refiere, por ejemplo, a la disposición secuencial de al menos un promotor de la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2, y, si es conveniente, de los elementos reguladores como por ejemplo, un terminador, de manera que cada uno de los elementos reguladores son capaces de cumplir con su función esperada en la expresión transgénica de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2. Esto no requiere necesariamente un ligamiento directo en un sentido químico. Las secuencias de control genético, como por ejemplo, las secuencias potenciadoras, pueden asimismo ejercer su función en la secuencia diana en posiciones que están más alejadas, o de hecho a partir de otras moléculas de ADN. Preferiblemente en un ácido nucleico aislado de la invención, la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2 está posicionada aguas abajo de la secuencia que actúa al menos como una secuencia promotora de manera que ambas secuencias se acoplan covalentemente entre sí. Preferiblemente, la distancia entre al menos una secuencia promotora y la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2 es menor a 200 pares de bases, especialmente preferiblemente menor a 100 pares de bases, muy especialmente preferiblemente menor a 50 pares de bases. Al menos una secuencia promotora y el ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2, puede seleccionarse y unirse funcionalmente de manera que permita la expresión transgénica de un polipéptido aislado de la invención, preferiblemente al menos una secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2 en un organismo transgénico.

45 **[0041]** "Expresión" se refiere en este contexto a la transcripción de una secuencia de ácido nucleico que se expresa transgénicamente, aunque también puede incluir la traducción del ARN transcrito de la secuencia de ácido nucleico que se expresa transgénicamente en su correspondiente polipéptido.

[0042] "Transgénico" significa - por ejemplo en referencia a un casete de expresión transgénica, un vector de expresión transgénica, un organismo transgénico o un método para la expresión transgénica de ácidos nucleicos - todos aquellos constructos que son el resultado de métodos transgénicos, o todos los métodos que se utilizan, en los que un ácido nucleico aislado de la invención no se encuentran en su ambiente genético natural o se han modificado por métodos transgénicos, en el que la modificación, a modo de ejemplo, puede ser una sustitución, adición, delección, inversión o inserción de uno o más residuos de nucleótidos. Preferiblemente, al menos una secuencia promotora del ácido nucleico aislado según la invención es heteróloga con respecto a la secuencia de ácido nucleico a la que está funcionalmente ligada y que se expresa transgénicamente. En este contexto, "heteróloga" se refiere a la secuencia de ácido nucleico que no comprende la secuencia codificadora que está de forma natural bajo el control de dicho promotor.

60 **[0043]** "Ambiente genético natural" se refiere al locus cromosómico natural en el organismo de origen o la presencia en una biblioteca genómica. En el caso de una biblioteca genómica, el ambiente genético natural de la secuencia de ácido nucleico se retiene preferiblemente al menos en parte. El ambiente limita la secuencia de ácido nucleico al menos en un lado y tiene una longitud de secuencia de al menos 50 pb, preferiblemente al menos 500 pb, de forma particularmente preferida al menos 1000 pb, muy de la forma más particularmente preferida al menos 5000 pb. Un constructo de expresión producido de forma natural se convierte en un constructo de expresión transgénica cuando esta combinación se modifica por métodos no naturales, sintéticos ("artificiales") como por ejemplo, una
65

mutagénesis *in vitro*. Dichos métodos se han descrito en (Pat U. S. Nº 5.565.350; en el documento WO 00 / 15815; véase anteriormente en la presente).

[0044] "Transgénico" con respecto a una expresión ("expresión transgénica") se refiere preferiblemente a todas aquellas expresiones que han sido realizadas utilizando un casete de expresión transgénica, un vector de expresión transgénica o un organismo transgénico, tal y como se ha definido anteriormente o como se define a continuación.

[0045] Un ligamiento funcional entre al menos una secuencia promotora y una secuencia de ácido nucleico que va a ser expresada puede producirse por medios de recombinación convencional y técnicas de clonación descritas por ejemplo, en Maniatis T et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., en Silhavy T J et al. (1984) *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. y en Ausubel F M et al. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience. Un método adecuado para tal propósito es, por ejemplo, la tecnología de clonación GATEWAY (TM) (Invitrogen Inc.), basada en la recombinación.

[0046] El ácido nucleico aislado según la invención puede comprender secuencias o elementos de control genético adicionales, además de al menos una secuencia promotora según la invención.

[0047] El concepto de las secuencias o elementos de control genético se debe tomar en su contexto más amplio y se refiere a todas aquellas secuencias que tienen un efecto en el origen o en la función del ácido nucleico aislado o en el casete de la expresión transgénica según la invención. Las secuencias de control genético modifican por ejemplo, la transcripción y / o la traducción en organismos procariontes o eucariotas. Preferiblemente, el ácido nucleico aislado o los casetes de expresión transgénica según la invención comprenden al menos una secuencia promotora 5' aguas arriba de una secuencia de ácido nucleico particular que va a ser expresada transgénicamente y una secuencia de terminación 3' aguas abajo como una secuencia de control genético, y, si es conveniente, elementos reguladores usuales, en cada caso ligados funcionalmente con la secuencia de ácido nucleico que va a expresarse transgénicamente.

[0048] Las secuencias de control genético pueden comprender también promotores, elementos promotores o promotores mínimos capaces de modificar las propiedades de control de la expresión. Esto es posible gracias a los medios de las secuencias de control genético, que por ejemplo se realizan en la expresión específica del tejido que tendrá lugar además en dependencia de determinados factores de estrés.

[0049] Las secuencias de control genético comprenden además la región 5' no traducida, intrones, la región 3' no codificada u otras secuencias de genes. Se ha demostrado que las secuencias no traducidas en 5' son capaces de potenciar la expresión transitoria de los genes heterólogos. Por otra parte, pueden promover la especificidad tisular (Rouster J et al. (1998) *Plant J* 15: 435 - 440). Por el contrario, la región no traducida en 5' del gen opaco - 2 suprime la expresión. La delección de la región en cuestión da lugar a un aumento en la actividad génica. (Lohmer S et al. (1993) *Plant Cell* 5: 65 - 73).

[0050] El ácido nucleico aislado puede ventajosamente comprender uno o más de lo que se conoce como secuencias potenciadoras en un ligamiento funcional con el promotor, hace que incremente la expresión transgénica de la posible secuencia de ácido nucleico. Secuencias ventajosas adicionales pueden asimismo insertarse en el extremo 3' de las secuencias de ácido nucleico para expresarse transgénicamente, tales como los elementos o terminadores reguladores. Las secuencias de ácido nucleico pueden expresarse transgénicamente como una o más copias en uno de los casetes de expresión transgénica según la invención.

[0051] Las secuencias de control deben entenderse además en el sentido de aquellas que hacen posible la recombinación homóloga o la inserción en el genoma de un organismo huésped, o que permiten la delección del genoma. En el caso de la recombinación homóloga, uno de los promotores según la invención puede sustituirse por ejemplo, por el promotor natural o un gen particular. Dichas secuencias se han de entender como secuencias de control genético. Los métodos como la tecnología cre / lox permiten la delección específica del tejido, y en algunas circunstancias inducibles, del casete de expresión transgénica del genoma del organismo huésped (Sauer B (1998) *Methods* (Duluth) 14(4): 381 - 92). En la presente, algunas secuencias flanqueadoras pueden añadirse al gen diana (secuencias lox), que más tarde hacen posible la delección por medio de la recombinasa cre.

[0052] Para seleccionar células que han superado con éxito la recombinación homóloga, u otra transformación, es, necesario por regla, introducir además un marcador de selección (véase a continuación). La recombinación homóloga es un hecho relativamente raro en eucariotas superiores, en particular en plantas. Predominan las integraciones aleatorias en el genoma huésped. Es la utilización de un sistema de recombinación específico en la secuencia descrito en la Patente U. S. Nº 6.110.736 una posibilidad de delección de las secuencias integradas al alzar, y por lo tanto para incrementar la concentración de clones celulares con una recombinación homóloga correcta.

[0053] Las señales de poliadenilación adecuadas como secuencias de control comprenden señales de poliadenilación en las plantas y preferiblemente aquellas que corresponden esencialmente a las señales de poliadenilación de ADN - T de *Agrobacterium tumefaciens*. En una realización particularmente preferente, el ácido

nucleico aislado o el casete de expresión transgénica corresponde a una secuencia de terminación que es funcional en plantas. Las secuencias de terminación que son funcionales en plantas se refieren generalmente a aquellas secuencias capaces de producir, en plantas, la terminación de la transcripción de una secuencia de ADN. Ejemplos de secuencias de terminación adecuadas son el terminador OCS (octopina sintasa) y el terminador NOS (nopalina sintasa). Sin embargo, son especialmente preferentes las secuencias de terminación de las plantas. Las secuencias de terminación de las plantas se refieren generalmente a aquellas secuencias que son parte de un gen de una planta natural. Especialmente preferido en este contexto es el terminador del gen inhibidor catepsina D de patata o el terminador del gen VfLE1B3 de la proteína de almacenamiento de la haba. Estos terminadores son al menos equivalentes a los terminadores de ADN – T descritos en el trabajo anterior.

[0054] El ácido nucleico aislado o los casetes de expresión transgénica según la invención y los vectores que los comprenden, pueden comprender además elementos funcionales. El término elemento funcional debe entenderse en su contexto más amplio y se refiere a todos aquellos elementos que tienen un efecto en la generación, multiplicación o función de los casetes de expresión transgénica según la invención o en los vectores de expresión transgénica u en los organismos derivados de ellos. Lo siguiente puede mencionarse a modo de ejemplo, aunque de manera no limitante:

1. Marcadores de selección

[0055] El término “marcador de selección” comprende no solamente los marcadores de selección positiva, que confieren resistencia a un antibiótico, herbicida u otro biocida, sino también marcadores de selección negativa, que confieren sensibilidad a los anteriormente mencionados, y también marcadores que confieren una ventaja de crecimiento para el organismo transformado (por ejemplo mediante expresión de genes clave de biosíntesis de citoquinina; Ebinuma H et al., (2000) Proc Natl Acad Sci USA 94: 2117 – 2121). En el caso de la selección positiva, solo se desarrollan los organismos que expresan el marcador de selección en cuestión, mientras, precisamente estos organismos, mueren en caso de selección negativa. Es preferible el uso de un marcador de selección positiva en la generación de plantas transgénicas. Además, es preferible el uso de marcadores de selección que confieren ventajas de crecimiento. Pueden emplearse ventajosamente marcadores de selección negativa cuando el trabajo actual consiste en eliminar ciertos genes o segmentos del genoma de un organismo (por ejemplo con el objetivo de un proceso de hibridación).

i) Marcadores de selección positiva: el marcador seleccionable introducido con el casete de expresión transgénica confiere resistencia a un biocida, por ejemplo a un herbicida (como fosfotricina, glifosfato o bromoxinil), un inhibidor metabólico (como 2 – desoxiglucosa – 6 – fosfato; WO 98 / 45456) o un antibiótico (como, por ejemplo, tetraciclinas, ampicilina, kanamicina, G 418, neomicina, bleomicina o higromicina) a las células transformadas satisfactoriamente. El marcador de selección permite seleccionar las células transformadas a partir de células no transformadas (McCornick et al., (1986) Plant Cell Reports 5:81 – 84). Son especialmente preferibles los marcadores de selección que confieren resistencia a herbicidas.

ii) Marcadores de selección negativa: los marcadores de selección negativa hacen posible, por ejemplo, la selección exitosa de organismos con secuencias eliminadas que comprenden el gen marcador (Koprek T et al., (1999) The Plant Journal 19 (6): 719 – 726. Cuando se está llevando a cabo una selección negativa, por ejemplo un compuesto que de otra manera no tiene efecto adverso en la planta se convierte en un compuesto desventajoso, por ejemplo debido al marcador de selección negativa introducido en la planta. Los genes que tienen un efecto adverso *per se* también están disponibles.

2) Genes indicadores

[0056] Los genes indicadores codifican fácilmente proteínas cuantificables que, mediante su color o la actividad enzimática, permiten una evaluación de la eficacia de transformación, del sitio o el tiempo de la expresión (véase también Schenbron E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13 (1) : 22 – 44). Los ejemplos que pueden citarse son: “proteína verde fluorescente” (GFP) (Chui W L et al. (1996), Curr Biol 6 : 325 - 330; Leffel S M et al. (1997) Biotechniques 23(5) : 912 - 8; Sheen et al. (1995) Plant J 8(5): 777 - 784; Haseloff et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6): 2122 - 2127; Reichel et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(12): 5888 – 5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep 16:267-271; WO 97/41228). Cloranfenicol transferasa (Fromm et al. (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82:5824-5828), Luciferasa (Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414; Ow et al. (1986) Science 234:856-859); permite la detección mediante bioluminiscencia. La β – Galactosidasa codifica una enzima para que están disponibles numerosos sustratos cromogénicos. La β – Glucuronidasa (GUS) (Jefferson et al., (1987) EMBO J. 6: 3901 – 3907) o el gen uidA, que codifica una enzima para numerosos sustratos cromogénicos. El producto génico del locus R: proteína que regula la producción de pigmentos de antocianina (coloración roja) en tejido de plantas y, por tanto, hace posible el análisis directo de la actividad promotora sin añadir otras sustancias auxiliares o sustratos cromogénicos (Dellaporta et al. (1988) en: *Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts*, 18º Stadler Genetics Symposium, 11: 263 - 282). Tirosinasa (Katz et al. (1983) J Gen Microbiol 129:2703-2714), una enzima que oxida la tirosina en DOPA y dopaquinona, que forman, consecuentemente, melanina, que puede detectarse fácilmente. Aequorina (Prasher et al., (1985) Biochem Biophys Res Commun 126 (3) : 1259 – 1268), puede emplearse en la detección bioluminiscente sensible al calcio.

3) Orígenes de replicación

[0057] Los orígenes de replicación aseguran la multiplicación de los casetes de expresión transgénica o vectores de expresión transgénica según la invención en, por ejemplo, la agrobacteria *E. coli*. Se pueden citar algunos ejemplos como OR1 (origen de replicación de ADN), pBR322 ori o P15A ori (Sambrook et al.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2º Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Algunos ejemplos de orígenes de replicación prácticos en Agrobacterias son pRK2, pRi, PVS1 o pSA.

4) Secuencias límite

[0058] Las “secuencias límite” (como, por ejemplo, el límite derecho o izquierdo del ADN – T) permiten una transferencia mediada por una agrobacteria en células de plantas para la transferencia e integración en el genoma de la planta.

5) Los sitios de clonación múltiple (SCM) permiten y facilitan la inserción de una o más secuencia de ácido nucleico.

[0059] La invención también se refiere a vectores que comprende los ácidos nucleicos aislados anteriormente descritos de la invención o del casete de expresión transgénica de la invención. Los vectores, normalmente, se refiere a estructuras capaces de replicarse y, preferiblemente, específicas de huéspedes, y que permiten la absorción de secuencias de ácido nucleico y la transferencia a otras células. Algunos ejemplos de vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, fagos, virus o agrobacterias. Se describen a continuación los vectores particularmente apropiados para los objetivos de biotecnología en plantas. Los vectores de la presente invención comprenden vectores de expresión transgénicos.

[0060] Otro sujeto de la invención se refiere a organismos transgénicos transformados o transfectados temporal o permanentemente con, al menos, un ácido nucleico aislado de la invención o, al menos, un casete de expresión transgénica según la invención o, al menos, un vector según la invención o un descendiente de dichos organismos transgénicos, en los que el organismo transgénico es una planta o un microorganismo, preferiblemente el organismo transgénico es una planta seleccionada de la familia *Brassicaceae*, más preferiblemente del género *Brassica* o *Arabidopsis*. Además, la presente invención se refiere a células, cultivos celulares, tejidos, partes similares, por ejemplo, en el caso de organismos planta, hojas, raíces y material de propagación similar derivado de dichos organismos, por ejemplo, de semillas de organismos transgénicos de la invención. Cabe señalar que para el objetivo de la presente invención, el término organismo transgénico no solo incluye el organismo en el que se ha introducido temporal o definitivamente el ácido nucleico de la invención, sino también la descendencia de dichos organismos independientemente de la distancia entre generaciones, por ejemplo, descendencia de primera generación, así como descendencia de X generación, siempre que estos organismos todavía comprendan el ácido nucleico de la invención.

[0061] Los organismos, organismos iniciales u organismos huésped se entienden como microorganismo u organismos planta. Los microorganismos preferentes son bacterias, levaduras, algas u hongos.

[0062] Las bacterias preferentes son bacterias del género *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* o *Cyanobacteria*, por ejemplo del género *Synechocystis*.

[0063] Son especialmente preferentes los microorganismos capaces de infectar plantas y, por tanto, transferir el ácido nucleico, el casete de expresión transgénica y / o el vector de la invención. Los microorganismos preferentes son aquellos del género *Agrobacterium* y, en particular, las especies *Agrobacterium tumefaciens*.

[0064] Los organismos huésped o iniciales preferidos como organismos transgénicos son, sobre todo, organismos planta. Los organismos planta se refieren, generalmente, a todos aquellos organismos capaces de realizar fotosíntesis. Se incluyen como organismos planta que abarca la invención todos los géneros y especie de plantas superiores o inferiores del reino planta. Las plantas maduras, semillas, tubérculos, raíces carnosas pivotantes, frutos, brotes y plantones, y también partes, material de propagación y cultivos, por ejemplos, también se incluyen los cultivos celulares derivados de los anteriores. Las plantas maduras se refieren a plantas en cualquier fase de desarrollo después de la fase de plantón. Plantón se refiere a una planta joven inmadura en una fase temprana de desarrollo. Son preferibles las plantas anuales, perennes, monocotiledóneas y dicotiledóneas como organismos huésped para preparar plantas transgénicas. Son preferentes las plantas de la siguiente familia de planta: *Brassicaceae*, en particular las plantas del género *Brassica* y *Arabidopsis*.

[0065] La preparación de un organismo transformado o de una célula transformada requiere la introducción del ADN apropiado en la célula huésped apropiada. Están disponibles múltiples métodos para este proceso, denominado transformación (véase también Keown et al., 1990 *Methods in Enzymology* 185:527 - 537). Por tanto, por ejemplo, puede introducirse el ADN directamente mediante microinyección o bombardeo con micropartículas recubiertas de ADN. La célula puede, también, permeabilizarse químicamente, por ejemplo utilizando polietileno glicol, de manera que el ADN pueda entrar en la célula por difusión. El ADN también puede llevarse a cabo mediante fusión de protoplastos con otras unidades con ADN como minicélulas, células, lisosomas o liposomas. Otro método

apropiado para introducir ADN es la electroporación en la que las células se permeabilizan reversiblemente mediante un impulso eléctrico.

5 [0066] En el caso de las plantas, los métodos descritos para transformar y regenerar plantas a partir de tejidos o células de plantas se utilizan para la transformación temporal o definitiva. Los métodos apropiados son, especialmente, la transformación de protoplastos mediante absorción de ADN inducido por polietileno glicol, el método biolístico utilizando la pistola de genes, el método del “bombardeo de genes”, la electroporación, la incubación de embriones secos en una solución con ADN y la microinyección.

10 [0067] Además de estas técnicas de transformación “directa”, también puede llevarse a cabo una transformación por una infección bacteriana mediante *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. Estas cepas contienen un plásmido (plásmido Ti o Ri), una parte (conocida como ADN – T) se transfiere a la planta tras la infección con *Agrobacterium* y se integra en el genoma de la célula de planta. La transformación mediada por *Agrobacterium* es la más apropiada para las células de plantas dicotiledóneas, en las que las técnicas de transformación directa son aptas para cualquier tipo de célula.

15 [0068] Un casete de expresión transgénica de la invención puede introducirse ventajosamente en las células, preferiblemente en células de plantas, mediante vectores, preferiblemente vectores de la invención.

20 [0069] En una realización ventajosa, el casete de expresión transgénica se introduce mediante vectores plásmidos. Son preferentes estos vectores de expresión transgénica que permiten una integración estable de un casete en el genoma huésped. En este contexto, el genoma huésped se refiere a la información hereditaria completa del huésped y comprende, por ejemplo, no solo el ADN cromosómico del núcleo, sino también el ADN de los plástidos y la mitocondria. Sin embargo, es preferible la inserción en el ADN cromosómico del núcleo.

25 [0070] En el caso de inyección o electroporación de ADN en las células de plantas, no se exigen requisitos particulares del plásmido empleado. Es posible utilizar plásmidos simples como los de las series pUC. Si tienen que regenerarse las plantas completas a partir de células transformadas, es necesario que esté presente en el plásmido un gen marcador de selección adicional.

30 [0071] Se han descritos técnicas de transformación para varios organismos planta monocotiledóneos y dicotiledóneos. Además, para introducir genes extraños en plantas, están disponibles varios posibles vectores plásmidos que contienen normalmente un origen de replicación para la propagación en *E. coli* y un gen marcador para la selección de bacterias transformadas. Algunos ejemplos son pBR322, las series pUC, las series M13 mp, 35 pACYC184, etc.

[0072] El casete de expresión transgénica puede introducirse en el vector mediante un sitio de clivaje de restricción apropiado. El plásmido resultante, en primer lugar, se introduce en *E. coli*. Se seleccionan las células de *E. coli* 40 correctamente transformadas, se cultivan y se obtiene el plásmido recombinante utilizando métodos familiares para los expertos en la disciplina. Pueden emplearse el análisis de restricción y la secuenciación para verificar la fase de clonación.

[0073] Las células transformadas, es decir, aquellas que contienen el ADN introducido integrado en el ADN de la 45 célula huésped pueden seleccionarse a partir de células no transformadas, si un marcador seleccionable forma parte del ADN introducido. Un marcador puede ser, por ejemplo, cualquier gen capaz de conferir una resistencia a antibióticos o herbicidas. Las células transformadas que expresan dicho gen marcador son capaces de sobrevivir en presencia de concentración de un antibiótico o herbicida apropiado, que mata a un tipo salvaje no transformado. Algunos ejemplos son el gen bar que confiere resistencia contra el herbicida fosfinotricina (Rathore K S et al., Plant Mol Biol. Marzo 1993; 21 (5) : 871 – 884), el gen nptII que confiere resistencia contra kanamicina, el gen hpt que confiere resistencia contra higromicina y el gen EPSP que confiere resistencia contra el herbicida glifosato. 50

[0074] Dependiendo del método de introducción de ADN, puede necesitarse otros genes en el plásmido vector. Si se emplea una agrobacteria, el casete de expresión transgénica tiene que integrarse en plásmidos específicos, ya sea en un vector intermediario (vector transportador) o un vector binario. Si, por ejemplo, se utiliza un plásmido Ti o Ri para la transformación, al menos el límite derecho, en la mayoría de los casos, sin embargo, los límites derecho e izquierdo, del plásmido Ti o Ri del ADN – T se conectan como región flanqueadora con el casete de expresión transgénica que se va a introducir. Es preferente el uso de vectores binarios. Los vectores binarios pueden replicarse tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium*. Normalmente contienen un gen marcador de selección y un enlace o polienlace flanqueado por las secuencias límites derecha e izquierda del ADN – T. Pueden transformarse directamente en *Agrobacterium* (Holsters et al., Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181 – 187). El gen marcador de selección permite la selección de una agrobacteria transformada; un ejemplo es el gen nptII, que confiere resistencia contra kanamicina. La *Agrobacterium*, que en este caso actúa como organismo huésped, debería ya contener un plásmido en la región vir. Esta región es necesaria para la transferencia del ADN – T en la célula de planta. Un *Agrobacterium* transformado de esta manera puede emplearse para la transformación de células de planta. 60

65 [0075] El uso de ADN – T para la transformación de células de plantas se ha estudiado y descrito en profundidad

(B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants*, Vol. 1, *Engineering and Utilization*, editado por Kung S D y Wu R, Academic Press (1993), págs. 128 - 143 y en Potrykus (1991) *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* 42: 205 – 225; EP 120516; Hoekema, En: *The Binary Plant Vector System*, Offsetdrukkerij Kanters B. V., Alblasserdam, Chapter V; Fraley et al., *Crit. Rev. Plant. Sci.*, 4: 1 - 46 y An et al. (1985) *EMBO J.* 4: 277 - 287). Se conocen varios vectores binarios y se encuentran parcialmente disponibles comercialmente como, por ejemplo, pBIN19 (Bevan et al. (1984) *Nucl Acids Res* 12:8711f.; Clontech Laboratories, Inc. USA) o los derivados de PSUN (SunGene GmbH & Co. KGaA; WO 02 / 00900).

[0076] El ADN se transfiere a la célula de planta mediante cocultivo de explantes de plantas con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. Comenzando a partir de material de planta infectada (por ejemplo, partes de hojas, raíces o tallo, pero también propoplastos o suspensiones celulares de planta), es posible regenerar plantas completas utilizando un medio apropiado que puede contener, por ejemplo, antibióticos o biocidas para la selección de células transformadas. Las plantas obtenidas pueden analizarse a continuación para la presencia del ADN introducido, en este caso el casete de expresión transgénica de la invención. En cuanto el ADN se ha integrado en el genoma huésped, el genotipo correspondiente es, normalmente, estable y la correspondiente inserción también se encuentra en generaciones siguientes. Normalmente, el casete de expresión transgénica integrado contiene un marcador de selección que confiere a la planta transformada una resistencia contra un biocida (por ejemplo un herbicida), un inhibidor del metabolismo como un 2 – DOG o un antibiótico como Kanamicina, G418, bleomicina, higromicina o fosfotricina, etc. El marcador de selección permite la selección de células transformadas a partir de células no transformadas (McCormick et al., (1986) *Plant Cell Reports* %: 81 – 84). Las plantas obtenidas pueden cultivarse y cruzarse normalmente. Debería cultivarse dos o más generaciones para asegurarse de que la integración genómica es estable y heredable.

[0077] En cuanto una célula de planta transformada se ha preparado, es posible obtener una planta completa utilizando métodos conocidos por los expertos en la disciplina. Con este fin, se utilizan cultivos de callo como punto de inicio, por ejemplo. A partir de estas masas celulares todavía no diferenciadas, es posible inducir la formación de brotes y raíces de maneras conocidas. Los brotes obtenidos pueden plantarse y cultivarse.

[0078] La integración del ADN – T puede determinarse, por ejemplo, en base a la eficacia de la expresión de los ácidos nucleicos que se van a expresar transgénicamente o del marcador de selección, por ejemplo *in vitro* mediante propagación de los meristemos del brote utilizando uno de los métodos de selección anteriormente descritos.

[0079] La invención se refiere, además, a células, cultivos celulares, partes como, por ejemplo, raíces, hojas, etc. en el caso de organismos planta transgénicos, y material de propagación transgénico como semillas, tubérculos, raíces carnosas pivotantes o frutos derivados de los organismos transgénicos anteriormente descritos y / o que comprenden un ácido nucleico aislado de la invención, un casete de expresión transgénica de la invención o un vector de la invención.

[0080] También pueden utilizarse las plantas genéticamente modificadas de la invención, que pueden consumirse por animales y humanos, por ejemplo directamente o tras la preparación conocida *per se*, como productos alimenticios o piensos.

[0081] La invención también se refiere al uso de los organismos transgénicos anteriormente descritos de la invención y a las células, cultivos celulares, partes, como por ejemplo raíces, hojas, etc. en el caso de organismos planta transgénicos, y material de propagación transgénico como semillas, tubérculos, raíces carnosas pivotantes o frutos derivados de los mismos para la producción de piensos o productos alimenticios, productos farmacéuticos o de química fina.

[0082] La invención también se refiere al uso de un ácido nucleico de la invención, un casete de expresión según la invención o un vector de la invención para la fabricación de una planta transgénica.

[0083] La presente también se refiere a un método para la fabricación de una planta transgénica, que comprende los siguientes pasos:

- a) Introducir en una o más células de planta un ácido nucleico aislado de la invención, un casete de expresión de la invención o un vector de la invención para producir células transgénicas; y
- b) Seleccionar las células transgénicas que comprenden dicho ácido nucleico aislado, casete de expresión o vector de la invención integrado de manera estable en el genoma; y
- c) Regenerar plantas intactas a partir de dichas células transgénicas.

[0084] Se detalla a continuación información sobre cómo llevar a cabo estos pasos.

[0085] Además, la presente invención se refiere a un método para mejorar el crecimiento del bulbo de una planta, comprendiendo:

- i) Introducir en una planta un ácido nucleico aislado de la invención; y

ii) Expresar el ácido nucleico introducido de la invención.

[0086] Se describe a continuación la presente invención mediante ejemplos.

Figuras:

5

[0087]

10 FIG. 1 Muestra el crecimiento vegetativo de los mutantes *rock2*, *rock3* y *ore12* en comparación al tipo salvaje: (A.) Foto de plántones 19 DTG (*días tras la germinación*). Las plantas se cultivaron en condiciones de día largo (B.) Comparación de hojas de las plantas mostradas en (A.), sin *ore12*. (C.) Comparación del peso fresco 18 DTG. N= 10; *, • = p < 0,01; **, •• = p < 0,005; ***, ••• = p < 0,0001. * = comparado al TS; • = comparado al *ore12*.

15 FIG. 2 Muestra la senescencia de la hoja 6 de las plantas mutantes *rock* y *ore12* en condiciones de día largo: (A.) Reducción de eficacia fotosintética del fotosistema II de 16 a 37 DTE (*días tras la emergencia*). (B.) Reducción del contenido de clorofila de 16 a 35 DTE. (C.) Comparación de hojas de las plantas mostradas en (A.) y (B.). n = 10; • = p < 0,01; •• = p < 0,005 comparadas a *ore12*.

20 FIG. 3 Muestra los parámetros del brote de las plantas mutantes *rock2*, *rock3* y *ore12* y las líneas transgénicas que expresan *pAHK2: rock 2* o *pAHK3 : rock3*. (A.) La altura de la planta de *rock2* y las plantas mutantes transgénicas *rock2* y *rock3* se incrementa. (B.) los mutantes *rock2* y las líneas transgénica *rock2* y *rock3* forman más silicuas en el tallo central. N = 10, *, • = p < 0,01; ***, ••• = p < 0,0001; * = comparado al TS; • = comparado a *ore12*.

25 FIG. 4 Muestra los parámetros de brote de plantas mutantes *rock2*, *rock3* y *ore12* y de líneas transgénicas que expresan *pAHK2: rock 2* o *pAHK3 : rock3*. (A., B.) Los mutantes *rock2* y *rock3* y las líneas transgénica *rock2* y *rock3* forman (A.) tallos más finos y (B.) flores más grandes. N= 10; ***, ••• = p < 0,0001; * = comparado al TS; • = comparada a *ore12*.

30 FIG. 5 Muestra el rendimiento de las semillas de dos líneas transgénicas independientes de *pAHK3 : rock3* en comparación al tipo salvaje. Las líneas transgénicas tienen un incremento del 47 % de rendimiento de las semillas en comparación a las plantas de tipo salvaje. N = 10. ** = p < 0,005; *** = p < 0,0001 comparado al TS.

Ejemplos:

Materiales y métodos

35

[0088] Se identificaron y aislaron los alelos *rock2* y *rock3* en base a su capacidad para suprimir las consecuencias fenotípicas de la deficiencia de citoquinina causada por la sobreexpresión de un gen *CKX* que codifica una citoquinina oxidasa / deshidrogenasa.

40 **Material de planta y condiciones de crecimiento**

45 [0089] Se utilizó el ecotipo Columbia (Col – 0) de *Arabidopsis thaliana* como tipo salvaje. Las plantas se cultivaron en invernadero en tierra o en condiciones estériles en placas de Petri con medio ATS (Estelle, M. A. y Somerville, C. (1986). *Auxin-resistant mutants of Arabidopsis thaliana with an altered morphology*. Mol. Gen. Genet. 206, 200 – 206). Todas las plantas se cultivaron a 22 °C en condiciones de día largo (16 h de luz / 8 h de oscuridad).

Mutagénesis

50 [0090] Se pusieron en remojo aproximadamente 25.000 semillas 35S : *CKX1* (Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., and Schmölling, T. (2003). *Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity*. Plant Cell 15, 2532 – 2550) durante 16 h en 100 ml de etil metano sulfonato 0,2 % (v / v) a temperatura ambiente. La generación M1 se cultivó como plantas únicas y se analizó la generación M2 para plantas con el fenotipo similar al tipo salvaje.

55

Análisis genético

60 [0091] El mapeo de las poblaciones de *rock2* y *rock3* se generó cruzando las plantas *rock2 35S: CKX1* y *rock3 35S: CKX1* con el ecotipo de tipo salvaje *Landsberg erecta*. Las plantas progenitoras F2 se utilizaron para mapear *rock2* y *rock3*. Para analizar las consecuencias de las mutaciones de *rock2* y *rock3* en el tipo salvaje, se cruzaron los mutantes supresores de *rock2* y *rock3* en el antecedente 35S: *CKX1* con el tipo salvaje Columbia. Las plantas progenitoras F1 de este cruce que todavía mostraban el fenotipo revertido sugerían que los alelos *rock2* y *rock3* eran dominantes. Se analizó la generación F2 para las plantas *rock2* y *rock3* en el antecedente de tipo salvaje (llamados entonces mutantes *rock2* y *rock3*).

65

Establecimiento de líneas transgénicas

5 **[0092]** Para la construcción del trasgén *pAHK2*: *rock2* se amplificó una región promotora 2124 bp de *AHK2* mediante PCR a partir de ADN genómico de *A. thaliana* de Col – 0 y se clonó con tecnología Gateway™ en el vector de entrada pDONR™ P4 – P1R (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Tras la clonación de la secuencia codificadora de *AHK2* con tecnología Gateway™ en el vector de entrada pDONR™ 221 (Invitrogen), el punto de mutación de *rock2* se introdujo mediante PCR basada en la mutagénesis con el kit “QuickChange Site-Directed Mutagenesis” (Stratagene, La Jolla, E.E.U.U) para obtener el alelo *rock2*. Ambos fragmentos se combinaron con Multisite Gateway™ recombinacional clonando en el vector pK7m24GW, 3 (Karimi et al., 2005). Para obtener el constructo

10 *pAHK3*: *rock3* se amplificó una región promotora 2062 bp de *AHK3* mediante PCR a partir de ADN genómico de *A. thaliana* de Col – 0 y el fragmento se insertó en un vector de entrada pDONR™ P4 – P1R (Invitrogen). El ADNc de *AHK3* con el marco de lectura abierto del gen se amplificó mediante PCR a partir de Col – 0 de *A. thaliana* y se clonó en el vector de entrada pDONR™222 (Invitrogen). Para introducir el punto de mutación *rock3* se utilizó el kit “QuickChange Site – Directed Mutagenesis” (Stratagene, La Jolla, E.E.U.U) para conseguir el alelo *rock3*. El promotor *AHK3* y el ADNc *ROCK3* se combinaron con Multisite Gateway™ recombinacional clonando en el vector pK7m24GW, 3 (Karimi, M., De Meyer, B., and Hilson, P. (2005). *Modular*

15 *cloning in plant cells*. Trends Plant Sci. 10, 103 – 105). Ambas estructuras se introdujeron en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* y las plantas Col – 0 de *A. thaliana* se transformaron utilizando el método de inmersión floral (Clough, S.J., and Bent, A.F.

20 (1998). *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16, 735 – 743). Las líneas transgénicas se seleccionaron utilizando kanamicina y se propagaron en la generación T3 o T4.

25 Medidas morfométricas

[0093] Tras 18 días desde la germinación, se tomaron fotografías digitales de las rosetas y se midió el diámetro de las mismas utilizando el programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, E.E.U.U.). Las flores en la fase 14 se fotografiaron y se midió su tamaño utilizando también el programa Scion Image.

30

Parámetros de determinación del peso fresco, de la altura final de la planta y del rendimiento

[0094] Los pesos frescos se midieron pesando las rosetas, los brotes sin rosetas o las partes aéreas al completo de las plantas. La altura final de la planta y el número de silicuas se determinaron tras la floración. Para el análisis el rendimiento de la semilla, las plantas se dispusieron en bolsas de papel tras la floración. Después de conservar las plantas secas durante tres semanas más, se determinó el peso total de la semilla.

35

Parámetros fotosintéticos

[0095] La eficacia máxima de la fotoquímica PSII (proporción Fv / Fm) de la oscuridad adaptada a las plantas se midió con FluorCam (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic). El contenido de clorofila de cada hoja se midió utilizando el Chlorophyll Meter SPAD – 502 (Konika Minolta, Bremen, Alemania), tomando el valor medio de dos medidas de la misma hoja.

45 Resultados

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

[0096] Para comparar las consecuencias de la mutación de *rock3* con la mutación de *ore12*, se introgresó este último en el antecedente de 35S : CKX1 (se identificó el *rock3* en este antecedente). Podría mostrarse que la mutación *ore12* revierte parcialmente las consecuencias fenotípicas de la sobreexpresión de CKX1. Sin embargo, en diferentes puntos de tiempos durante el desarrollo, el grado de reversión es menos severo que la reversión alcanzada con el alelo *rock3*. Esta diferencia es más evidente para el tamaño de la semilla y el diámetro de la roseta. Estos dos parámetros son buenos indicadores del estado cambiado de citoquinina de las plantas CKX1ox.

55

2. Análisis de alelos mutantes en antecedentes de tipo salvaje

[0097] A continuación, se compararon las consecuencias de los tres alelos mutantes (*rock2*, *rock3* y *ore12*) en el antecedente de tipo salvaje (Col – 0) se compararon. En la Fig. 1 se muestra que solo los alelos *rock2* y *rock3* mejoran significativamente el crecimiento vegetativo de las plantas de tipo salvaje, en las que el alelo *ore12* no da como resultado mejora en el crecimiento significativa. Este efecto puede verse poco después de la germinación de las semillas (Fig. 1A) y también resulta evidente a partir de la comparación del tamaño de las hojas en una fase de desarrollo tardía (Fig. 1B). Los efectos de los alelos *rock2* y *rock3* no solo fueron significativamente más fuertes en comparación a las plantas de tipo salvaje, sino también en comparación al alelo *ore12*. Tanto *rock2* como *rock3* causaron un incremento > 75 % del peso fresco 18 días después de la germinación (DTG) en comparación al tipo salvaje. Un análisis del incremento del peso fresco de las rosetas y de la planta completa en el ciclo de vida de las

65

plantas mostró que el incremento de la diferencia del peso fresco es particularmente evidente de 32 a 40 DTG y que el efecto es más fuerte con el alelo *rock2*.

5 **[0098]** Es conocido que el estado mejorado de la citoquinina causado por el alelo *ore12* retrasa la senescencia de la hoja. La senescencia foliar se comparó en plantas de tipo salvaje, en plantas mutantes *ore12* y en los mutantes *rock*. La Fig. 2 muestra claramente un comienzo retrasado de la senescencia foliar en todas las plantas mutantes comparadas al tipo salvaje. La eficacia fotosintética de PS II (Fv / Fm) comenzó a disminuir en la hoja de la roseta 6's de las plantas de tipo salvaje alrededor del día 17 DTE y del día 21 al 23 DTE en las plantas mutantes (Fig. 2A). Entre estas, las plantas *rock2* mostraron el comienzo más temprano de senescencia foliar, seguidas de *ore12* y *rock3*. Esta diferencia de tiempo de senescencia foliar se mantuvo, llegando a un tiempo de vida diez días más largo en las hojas *rock3* en comparación a las hojas de tipo salvaje (Fig. 2A). Este resultado se confirmó midiendo otro parámetro de senescencia, la disminución de clorofila (Fig. 2B), así como la inspección visual de las hojas (Fig. 2C).

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

[0099] En la siguiente fase se analizaron las consecuencias de la expresión transgénica de los alelos *rock* dominantes. Para este fin, se transformaron plantas Col – 0 de *Arabidopsis* con genes que contenían ca. 2 kb de las regiones reguladoras 5' aguas arriba de AHK2 y AHK3, respectivamente, y las secuencias codificadoras *rock2* y *rock3*, respectivamente. Estos genes se denominaron *pAHK2: rock2* y *pAHK3: rock3*, respectivamente, y se marcan como *pAHK2: rock2* y *pAHK3: rock3* en la Fig. 3 a la Fig. 5. Normalmente, se encontró una mejora de los atributos fenotípicos que se alteraron en las plantas mutantes *rock*. Las Figs. 3 y 4 muestran que las plantas transgénicas *pAHK2: rock2* y *pAHK3: rock3* que se han comparado al tipo salvaje o a las plantas *ore12* un incremento significativo en la altura del bulbo (Fig. 3A), un incremento significativo en el número de silicuas del tallo central (Fig. 3B), tallos más finos causados por el aumento en el número de células más largas en la dimensión radial (Fig. 4A) y un incremento significativo del tamaño de las flores (Fig. 4B). Como se demuestra en la Fig. 5, podría mostrarse que las plantas transgénicas *pAHK3: rock3* tienen un rendimiento de las semillas significativamente mayor que las de tipo salvaje.

30 LISTADO SECUENCIAL

[0100]

<110> FU Berlin Institut für Biologie Angewandte Genetik

35 <120> *rock2* y *rock3*, dos nuevas variantes con ganancia de función de los receptores de citoquinina AHK2 y AHK3

<130> P658809EP

40 <160> 6

<170> Patente versión 3.3

<210> 1

<211> 1176

45 <212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 1

50

55

60

65

ES 2 462 967 T3

5 Met Ser Ile Thr Cys Glu Leu Leu Asn Leu Thr Ser Lys Lys Ala Lys
1 5 10 15

10 Lys Ser Ser Ser Ser Asp Lys Lys Trp Leu Lys Lys Pro Leu Phe Phe
20 25 30

15 Leu Ile Leu Cys Gly Ser Leu Val Ile Val Leu Val Met Phe Leu Arg
35 40 45

20 Leu Gly Arg Ser Gln Lys Glu Glu Thr Asp Ser Cys Asn Gly Glu Glu
50 55 60

25 Lys Val Leu Tyr Arg His Gln Asn Val Thr Arg Ser Glu Ile His Asp
65 70 75 80

30 Leu Val Ser Leu Phe Ser Asp Ser Asp Gln Val Thr Ser Phe Glu Cys
85 90 95

35 His Lys Glu Ser Ser Pro Gly Met Trp Thr Asn Tyr Gly Ile Thr Cys
100 105 110

40 Ser Leu Ser Val Arg Ser Asp Lys Gln Glu Thr Arg Gly Leu Pro Trp
115 120 125

45 Asn Leu Gly Leu Gly His Ser Ile Ser Ser Thr Ser Cys Met Cys Gly
130 135 140

50 Asn Leu Glu Pro Ile Leu Gln Gln Pro Glu Asn Leu Glu Glu Glu Asn
145 150 155 160

55 His Glu Glu Gly Leu Glu Gln Gly Leu Ser Ser Tyr Leu Arg Asn Ala
165 170 175

60 Trp Trp Cys Leu Ile Leu Gly Val Leu Val Cys His Lys Ile Tyr Val

65

ES 2 462 967 T3

5
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 462 967 T3

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

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

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

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

ES 2 462 967 T3

5

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

10

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

15

Glu Pro Leu Thr Ile Glu Asp Ala Val Leu Lys Gln Arg Leu Ala Leu
740 745 750

20

Gly Cys Ser Glu Ser Gly Glu Thr Val Ser Gly Phe Pro Ala Val Asn
755 760 765

25

Ala Trp Gly Ser Trp Lys Asn Phe Lys Thr Cys Tyr Ser Thr Glu Ser
770 775 780

30

Gln Asn Ser Asp Gln Ile Lys Leu Leu Val Thr Val Glu Asp Thr Gly
785 790 795 800

35

Val Gly Ile Pro Val Asp Ala Gln Gly Arg Ile Phe Thr Pro Phe Met
805 810 815

40

Gln Ala Asp Ser Ser Thr Ser Arg Thr Tyr Gly Gly Thr Gly Ile Gly
820 825 830

45

Leu Ser Ile Ser Lys Arg Leu Val Glu Leu Met Gln Gly Glu Met Gly
835 840 845

50

Phe Val Ser Glu Pro Gly Ile Gly Ser Thr Phe Ser Phe Thr Gly Val
850 855 860

55

Phe Gly Lys Ala Glu Thr Asn Thr Ser Ile Thr Lys Leu Glu Arg Phe
865 870 875 880

60

Asp Leu Ala Ile Gln Glu Phe Thr Gly Leu Arg Ala Leu Val Ile Asp
885 890 895

65

Asn Arg Asn Ile Arg Ala Glu Val Thr Arg Tyr Glu Leu Arg Arg Leu
900 905 910

Gly Ile Ser Ala Asp Ile Val Ser Ser Leu Arg Met Ala Cys Thr Cys
915 920 925

Cys Ile Ser Lys Leu Glu Asn Leu Ala Met Ile Leu Ile Asp Lys Asp
930 935 940

Ala Trp Asn Lys Glu Glu Phe Ser Val Leu Asp Glu Leu Phe Thr Arg
945 950 955 960

ES 2 462 967 T3

5 Ser Lys Val Thr Phe Thr Arg Val Pro Lys Ile Phe Leu Leu Ala Thr
965 970 975

10 Ser Ala Thr Leu Thr Glu Arg Ser Glu Met Lys Ser Thr Gly Leu Ile
980 985 990

15 Asp Glu Val Val Ile Lys Pro Leu Arg Met Ser Val Leu Ile Cys Cys
995 1000 1005

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

75 Glu Pro Cys
1175

<210> 2
<211> 1036
<212> PRT
65 <213> Arabidopsis thaliana

ES 2 462 967 T3

<400> 2

5

Met Ser Leu Phe His Val Leu Gly Phe Gly Val Lys Ile Gly His Leu
1 5 10 15

10

Phe Trp Met Leu Cys Cys Trp Phe Val Ser Trp Phe Val Asp Asn Gly
20 25 30

15

Ile Glu Asp Lys Ser Gly Leu Leu Val Gly Ser Val Gly Asp Leu Glu
35 40 45

20

Lys Thr Lys Met Thr Thr Leu Lys Lys Lys Asn Lys Met Trp Phe Trp
50 55 60

25

Asn Lys Ile Ser Ser Ser Gly Leu Lys Ile Pro Ser Phe Ser Tyr Gln
65 70 75 80

30

Phe Leu Gly Ser Val Lys Phe Asn Lys Ala Trp Trp Arg Lys Leu Val
85 90 95

35

Val Val Trp Val Val Phe Trp Val Leu Val Ser Ile Trp Thr Phe Trp
100 105 110

Tyr Phe Ser Ser Gln Ala Met Glu Lys Arg Lys Glu Thr Leu Ala Ser
115 120 125

40

Met Cys Asp Glu Arg Ala Arg Met Leu Gln Asp Gln Phe Asn Val Ser
130 135 140

45

Met Asn His Val Gln Ala Met Ser Ile Leu Ile Ser Thr Phe His His
145 150 155 160

Gly Lys Ile Pro Ser Ala Ile Asp Gln Arg Thr Phe Ser Glu Tyr Thr
165 170 175

50

Asp Arg Ile Ser Phe Glu Arg Pro Leu Thr Ser Gly Val Ala Tyr Ala
180 185 190

55

Met Arg Val Leu His Ser Glu Arg Glu Glu Phe Glu Arg Gln Gln Gly
195 200 205

Trp Thr Ile Arg Lys Met Tyr Ser Leu Glu Gln Asn Pro Val His Lys
210 215 220

60

Asp Asp Tyr Asp Leu Glu Ala Leu Glu Pro Ser Pro Val Gln Glu Glu
225 230 235 240

65

Tyr Ala Pro Val Ile Phe Ala Gln Asp Thr Val Ser His Val Val Ser
245 250 255

ES 2 462 967 T3

5

Leu Asp Met Leu Ser Gly Lys Glu Asp Arg Glu Asn Val Leu Arg Ala
 260 265 270

10

Arg Ser Ser Gly Lys Gly Val Leu Thr Ala Pro Phe Pro Leu Ile Lys
 275 280 285

15

Thr Asn Arg Leu Gly Val Ile Leu Thr Phe Ala Val Tyr Lys Arg Asp
 290 295 300

20

Leu Pro Ser Asn Ala Thr Pro Lys Glu Arg Ile Glu Ala Thr Asn Gly
 305 310 315 320

Tyr Leu Gly Gly Val Phe Asp Ile Glu Ser Leu Val Glu Asn Leu Leu
 325 330 335

25

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

30

Thr Asn His Ser Gln Pro Ile Ser Met Tyr Gly Thr Asn Val Ser Ala
 355 360 365

35

Asp Gly Leu Glu Arg Val Ser Pro Leu Ile Phe Gly Asp Pro Leu Arg
 370 375 380

Lys His Glu Met Arg Cys Arg Phe Lys Gln Lys Pro Pro Trp Pro Val
 385 390 395 400

40

Leu Ser Met Val Thr Ser Phe Gly Ile Leu Val Ile Ala Leu Leu Val
 405 410 415

45

Ala His Ile Ile His Ala Thr Val Ser Arg Ile His Lys Val Glu Glu
 420 425 430

50

Asp Cys Asp Lys Met Lys Gln Leu Lys Lys Lys Ala Glu Ala Ala Asp
 435 440 445

Val Ala Lys Ser Gln Phe Leu Ala Thr Val Ser His Glu Ile Arg Thr
 450 455 460

55

Pro Met Asn Gly Val Leu Gly Met Leu His Met Leu Met Asp Thr Glu
 465 470 475 480

60

Leu Asp Val Thr Gln Gln Asp Tyr Val Arg Thr Ala Gln Ala Ser Gly
 485 490 495

65

Lys Ala Leu Val Ser Leu Ile Asn Glu Val Leu Asp Gln Ala Lys Ile
 500 505 510

ES 2 462 967 T3

5

Glu Ser Gly Lys Leu Glu Leu Glu Glu Val Arg Phe Asp Leu Arg Gly
515 520 525

10

Ile Leu Asp Asp Val Leu Ser Leu Phe Ser Ser Lys Ser Gln Gln Lys
530 535 540

15

Gly Val Glu Leu Ala Val Tyr Ile Ser Asp Arg Val Pro Asp Met Leu
545 550 555 560

20

Ile Gly Asp Pro Gly Arg Phe Arg Gln Ile Leu Thr Asn Leu Met Gly
565 570 575

25

Asn Ser Ile Lys Phe Thr Glu Lys Gly His Ile Phe Val Thr Val His
580 585 590

30

Leu Val Asp Glu Leu Phe Glu Ser Ile Asp Gly Glu Thr Ala Ser Ser
595 600 605

35

Pro Glu Ser Thr Leu Ser Gly Leu Pro Val Ala Asp Arg Gln Arg Ser
610 615 620

40

Trp Glu Asn Phe Lys Ala Phe Ser Ser Asn Gly His Arg Ser Phe Glu
625 630 635 640

45

Pro Ser Pro Pro Asp Ile Asn Leu Ile Val Ser Val Glu Asp Thr Gly
645 650 655

50

Val Gly Ile Pro Val Glu Ala Gln Ser Arg Ile Phe Thr Pro Phe Met
660 665 670

55

Gln Val Gly Pro Ser Ile Ser Arg Thr His Gly Gly Thr Gly Ile Gly
675 680 685

60

Leu Ser Ile Ser Lys Cys Leu Val Gly Leu Met Lys Gly Glu Ile Gly
690 695 700

65

Phe Ser Ser Thr Pro Lys Val Gly Ser Thr Phe Thr Phe Thr Ala Val
705 710 715 720

Phe Ser Asn Gly Met Gln Pro Ala Glu Arg Lys Asn Asp Asn Asn Gln
725 730 735

Pro Ile Phe Ser Glu Phe Arg Gly Met Lys Ala Val Val Val Asp His
740 745 750

Arg Pro Ala Arg Ala Lys Val Ser Trp Tyr His Phe Gln Arg Leu Gly
755 760 765

Ile Arg Val Glu Val Val Pro Arg Val Glu Gln Ala Leu His Tyr Leu

ES 2 462 967 T3

5 770 775 780

Lys Ile Gly Thr Thr Thr Val Asn Met Ile Leu Ile Glu Gln Glu Ile
785 790 795 800

10 Trp Asn Arg Glu Ala Asp Asp Phe Ile Lys Lys Leu Gln Lys Asp Pro
 805 810 815

15 Leu Phe Leu Ser Pro Lys Leu Ile Leu Leu Ala Asn Ser Val Glu Ser
 820 825 830

20 Ser Ile Ser Glu Ala Leu Cys Thr Gly Ile Asp Pro Pro Ile Val Ile
 835 840 845

25 Val Lys Pro Leu Arg Ala Ser Met Leu Ala Ala Thr Leu Gln Arg Gly
850 855 860

30 Leu Gly Ile Gly Ile Arg Glu Pro Pro Gln His Lys Gly Pro Pro Ala
865 870 875 880

35 Leu Ile Leu Arg Asn Leu Leu Leu Gly Arg Lys Ile Leu Ile Val Asp
 885 890 895

40 Asp Asn Asn Val Asn Leu Arg Val Ala Ala Gly Ala Leu Lys Lys Tyr
 900 905 910

45 Gly Ala Asp Val Val Cys Ala Glu Ser Gly Ile Lys Ala Ile Ser Leu
915 920 925

50 Leu Lys Pro Pro His Glu Phe Asp Ala Cys Phe Met Asp Ile Gln Met
930 935 940

55 Pro Glu Met Asp Gly Phe Glu Ala Thr Arg Arg Ile Arg Asp Met Glu
945 950 955 960

60 Glu Glu Met Asn Lys Arg Ile Lys Asn Gly Glu Ala Leu Ile Val Glu
 965 970 975

65 Asn Gly Asn Lys Thr Ser Trp His Leu Pro Val Leu Ala Met Thr Ala
 980 985 990

70 Asp Val Ile Gln Ala Thr His Glu Glu Cys Leu Lys Cys Gly Met Asp
 995 1000 1005

75 Gly Tyr Val Ser Lys Pro Phe Glu Ala Glu Gln Leu Tyr Arg Glu
1010 1015 1020

80 Val Ser Arg Phe Phe Asn Ser Pro Ser Asp Thr Glu Ser
1025 1030 1035

ES 2 462 967 T3

<210> 3
<211> 4595

5 <212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

10	atgtctataa cttgtgagct cttgaatctt acttcaaaga aagctaagaa gtcgctgagc	60
	agtgacaaga aatggctaaa gaagcctctc ttcttcctga ttttgtgtgg ctctttggta	120
	attgttttgg ttatgttctt acggttaggt agaagtcaga aggaggagac agattcttgt	180
15	aatggagaag agaaagtgtt gtatagacat caaaatgtca caagaagtga gattcatgat	240
	ttggtctctt tgttctctga ttcagatcag gtaattgcat gaattgactt gtatttgttg	300
20	aaattgagct tttgaatacg caccagattt gccttaaagt gtaacagttt ctctgtattt	360
	gttgtaggta acatcctttg aatgtcataa ggaatcaagc cctggaatgt ggacaaacta	420
	tggtattaca tgttccctga gtgtgcgctt tgataaaca gagactagag ggcttccctg	480
25	gaatcttggc ttaggacatt ctatctcctc aacatcttgt atgtgtggta atcttgaacc	540
	ggtaagataa tattcgattc gacaacatgt gaaggaaatg ctttaagatt tgggtgttag	600
	ctagttctca caaaagttta ttgtgaatgt gtttggttat gagtagattt tacagcaacc	660
30	tgaaaacctt gaggaagaaa accatgaaga agggctggag cagggtttgt catcgtattt	720
	aagaaatgca tgggtggtgc taatccttgg tgtgttagtg tgccataaga tttatgtatc	780
35	tcattctaaa gcacgagggtg agaggaaaga gaaagtacat ctgcaagagg ctttagctcc	840
	aaagaagcag caacaacgtg ctacagactt ttctagaggg gctggaagat ggaggaagaa	900
	tatccttctc cttgggtattt taggaggagt ttcttctct gtttgggtgg tttgggacac	960
40	taatgaggag atcataatga aaaggaggga gactttggca aacatgtgtg acgaacgagc	1020
	acgtgtttta caagatcagt tcaatgttag cttgaacat gttcatgcct tgtctattct	1080
45	tgtatctaca tttcatcatg gtaaaatccc atctgccatt gatcaggtga tgtttttttc	1140
	ttactgctaa atacattttg tgtctcaagt ttatgtttta atcatcaact tctgtttacat	1200
	ttacagagaa catttgaaga atatactgag agaacaaact ttgagaggcc acttactagt	1260
50	ggtgtagcgt atgctttgaa agtoccacac tcagaaagag agaaatttga aaaggagcat	1320
	ggatgggcaa taaagaaaat ggaaactgag gaccagacag ttgtacaaga ttgtgttcct	1380
	gaaaactttg atcccgcacc gattcaagac gaatacgcgc cagttatatt tgctcaagaa	1440
55	actgtttccc atattgtatc ggtcgacatg atgtctggag aagtcagtaa cgtctaaaag	1500
	tttcttgaac tattttgcca aaccaatgtc cttaaaagag aattcaaaag tctaactatt	1560
60	ttgcaggaag accgtgaaaa catcttacgg gcaagggcat caggaaaagg agtgtaaca	1620
	tctccattta agcttcttaa gtcaaatcat cttgggtgtg tgttgacctt tgctgtctat	1680
	gacacgagcc taccgcctga tgctacagaa gaacagcgtg ttgaagcaac tattgggtac	1740

65

ES 2 462 967 T3

5
tacttctact taaaatgatt ctaggactga agaaattgaa cctatgtaac aaagaatgat 1800
ctctggacca gaaaatatta ataagataca cttaaaaaca ggtaccttgg tgcacatata 1860
10
gatatgccat cgctggtgga gaaacttctt caccaacttg ccagcaaaca gacaattgct 1920
gtggatgttt acgacacaac taacacttca ggtctaataa aaatgtatgg ctcaaaaatt 1980
15
gggatataa gtgagcagca tataagtagc cttgattttg gtgatccatc aaggaacat 2040
gagatgcatt gcaggttagt tagctctaac tgttatggta catttttata agatatgttt 2100
cacttctctg tttctgaag tatgaaagtg gcatttttca tttacaggtt taagcataaa 2160
20
cttcccattc cctggacagc gataacaccg tcgatcttag ttctggttat tacttttttt 2220
gttggttata ttttatatga agccatcaac cgaattgoga cagttgaaga ggattgtcag 2280
25
aagatgaggg aactcaaagc tcgtgctgag gccgctgaca ttgcaaagtc acaggtgatc 2340
tttgtgaatc atatagtctc aaaagcttta cttgtttttt cactgaaatg cttcttattt 2400
tgcagttcct agcaactggt tctcatgaga tacggactcc gatgaatgga gttttaggta 2460
30
ctttttctac ttatccttgg tcaaatattgc atgttctctt aaaatcagct gaaacgttta 2520
agcattttgt tacaggaatg ctgaaaatgc tgatggacac cgatcttgat gcgaagcaga 2580
tggactatgc gcaaactgct catggcagtg ggaaggatct tacatcacta ataaatgagg 2640
35
ttcttgatca ggcaaagatt gaatccggaa ggctcgagct tgaaaatgtg ccttttgata 2700
tgcgttttat tcttgataat gtttcatctc tcctctctgg caaggcaaat gaaaaaggaa 2760
40
ttgaggata attataaact gcatgacctt ctactttctt aatgttttca tatggcaaac 2820
aaattccata tgtaatgaaa tgttgacttc ttgttacagt tggccgttta tgtttctagt 2880
caagttcctg atgttgtagt cggtgatccg agtcggttcc ggcagatcat taaaacctg 2940
45
gttggaaact caatcaaagt aatttactcc ttactttctt cagaacaaca ggcttcacga 3000
atcttacta ttacagtact catttgttat ttacttaata acagttcaca caggaaaggg 3060
gacacatatt tatctcagtg caccttgacg atgaggtaaa ggagcctctt actattgaag 3120
50
acgcagtgct aaaacagcga ctagcttttag gatgcagcga gtccggtgag acagttagcg 3180
ggtttcctgc ggtaaatgca tggggaagct ggaagaatth caagacatgt tacagtactg 3240
55
agagtcagaa ttctgatcaa atcaaattgc tagttacagt ggaggacact ggagttggca 3300
tacctgtgga tgcacaaggc cgaatcttca caccttttat gcaagccgac agttccacat 3360
cgcggaacta tgggtggaact ggcataggtt tgagtataag caaacgtttg gttgaaactca 3420
60
tgcaaggaga gatgggggttt gtgagtgagc ccgggatagg cagtactttt tcatttactg 3480
gagttttcgg gaaagcagaa acaaatacgt cgattactaa gctggaacga ttcgatctag 3540
ctattcagga gtttacagga ttgagagcat tagttattga taacagaaac attagagcag 3600
65
aggtcaccag gtacgaactt cggagactgg gaatatctgc agacattggt tcaagtctga 3660

ES 2 462 967 T3

5	gaatggcatg cacttggtgt atcaggtact ttacgtacat tagtgtctgt ctgtctttag	3720
	agattatagt gagttcacta aaagcgtttt attgttctgg aatctttgca gcaaattaga	3780
	aaatthggct atgattctaa tagacaaaga cgcttggac aaggaagaat tttcagtact	3840
10	tgacgagttg tttacccgaa gcaaagtaac ctttacaaga gtcccaaaga tttttctttt	3900
	ggcaacttct gcaactctta ctgagcgcag tgagatgaag tctactggtc tcatcgatga	3960
15	ggtggtgata aagcctcttc ggatgagtgt cttaatatgt tgcttgcaag aaacccttgt	4020
	caatggcaag aagaggcaac cgaacagaca gcgaagaaat cttggacact tgctaagaga	4080
	aaaacagatt ctggttgtgg atgataatct tgtgaacaga cgagttgcag aaggtgcact	4140
20	taagaaatat ggagctattg ttacatgcgt tgagagtggc aaagctgcat tggcaatgct	4200
	taagccgct cataacttcg atgcttgctt catggatctc cagatgctg aaatggatgg	4260
	gtagataact atttttcaat cttatctctt cagcttgctc atttcttggga tgtcgtcctt	4320
25	ggtaacttta taatthtttg cgcagatttg aagcgacaag gagagtccgt gagctggaga	4380
	gggaaatcaa taagaaaata gcttctggag aagtttcagc tgaaatgttc tgtaaattta	4440
30	gtagttggca cgtcccgata ttagcaatga cagcagatgt tattcaggct actcatgaag	4500
	aatgcatgaa atgtggaatg gatggttatg tatcaaaacc gtttgaagag gaagtgctct	4560
	acacagcggg agcaagattc tttgaacctt gtaa	4595
35	<210> 4 <211> 4248 <212> DNA <213> Arabidopsis thaliana	
40	<400> 4	
	atgagtctgt tccatgtgct aggttttggg gtcaagattg ggcatctctt ctggatgcta	60
45	tgctgctggg ttgtttcttg gttcgttgat aatgggatcg aggacaagtc tggctcttta	120
	gttggctctg tcggtgatct tgagaagact aagatgacta cgttgaagaa gaagaacaag	180
50	atgtggttct ggaataagat ctctagcagc ggactcaaga tcccagagttt ctcttatcag	240
	tttcttggct ctgttaaatt caacaaggcg tgggtggagga agcttgtggg ggtttggggt	300
	gtcttctggg tcttggctc tatttggacg ttttggact ttagctcgca agctatggag	360
55	aagaggaaag agacgctagc tagtatgtgt gatgagagag ctcgtatgct gcaggatcag	420
	ttcaacgtha gcatgaatca tgttcaagcc atgtctatct tgatctcaac cttccacat	480
	ggcaagattc cttctgctat cgatcaggta ttctcgattc cgcactctct tgtcttctaa	540
60	tctgtttgga ttgatgctg agatctagtc ttgctttag tagcataagtt gttcctacgg	600
	tgtagtatat gaacggtcct tggatgatgg tagctthttt cattcaactt gctctcgaat	660
65	ttcagttagg atttacaatt ttgctgattg ttgcttacag tctttgtatt tagctaacac	720
	ttggtagctt gattcctatc ttcttgagta ttagtgaaca gtaactaaca ttaagaagct	780

ES 2 462 967 T3

5
 ttgtgtagag aacattctca gagtacactg atagaatttc ctttgagagg cctcttacta 840
 10
 gcgggtagc ttatgctatg aggggtctcc attcagagag ggaagagttc gagaggcaac 900
 aaggttgac tattaggaag atgtattctc ttgaacaaa cccagttcac aaggatgact 960
 atgacctgga agctttgga ccatcccctg tccaagaaga gtacgctcca gtcactcttg 1020
 15
 ctcaggacac tgtttctcac gttgtttctc tcgatatgct gtctgggaaa gtaagcttct 1080
 ttactggttc taattttact gtttttatgt aatttactat catggtctac actcactacc 1140
 gggcgaatcc tgccgacatg gctagttcat atttcaatct cggcttaccg attaagttgt 1200
 20
 tttgatcatt ttatttaaag tttagagcac tgttttaact gatacttatt ctcaactcaat 1260
 tcctcttgat aggaagatcg tgaaaacggt ttgcgggcca ggagttcagg taaaggggtt 1320
 25
 ttgacagctc ctttcccatt gataaagaca aatagacttg gggtagctct gacatttgca 1380
 gtgtacaaga gagatctccc ctccaatgca acgccaaaag agagaattga ggctactaac 1440
 ggggtgtgtag cataggcgtc taaataaata ataacgcata agttttacaa cattatTTTT 1500
 30
 gtcattcat ctcttttgat gccctgaag gtatctoggg ggagtgtttg acattgagtc 1560
 cctggtagaa aacttgcttc aacagctggc tagcaagcaa acgattcttg tcaatgtgta 1620
 cgatatcacc aatcaactctc aaccgattag catgtatggt acaaatgtgt cggctgatgg 1680
 35
 gttggaacgt gttagtccac taatctttgg cgatccattg agaaagcatg agatgcggtg 1740
 caggtaactg cagttggcac atacatatgt ctgtaatttc ttcttgttg caagaatcca 1800
 40
 ggtgctaaca ttttgttgtg agcttcttcc tctttgtaga ttttaagcaga aaccacatg 1860
 gccagtgcta tcaatgggta catcattcgg tatccttggtg attgcgttac ttgttgaca 1920
 tataatccac gcaaccgtta gtcgaataca caaagttgaa gaagattgtg ataaaatgaa 1980
 45
 gcagctcaag aaaaaggctg aagcagcaga tgttgcaaag tcacaggtaa atacatcatc 2040
 ctcaagttgat aaatttccac agcatattaa actttctatg acagagagaa gaggttgtaat 2100
 50
 ctaactTTTT tttatgcagt tccttgccac tgtttcacat gaaatcagaa ctccaatgaa 2160
 tgggtttcta ggtgagtatc gaaatggcca ctatgttgcc tccttctctc acctatgccc 2220
 atgaatattt tctgaagaac aaacttaacc aatattctc atgttgactt tgatctgggg 2280
 55
 tgtaggaatg ttgcatatgc ttatggacac agagttagat gttacgcaac aggattatgt 2340
 taggaccgca caggcaagtg gaaaagcttt agtctcgcta ataaatgagg ttttgacca 2400
 agcaaagatt gaatctgga agcttgaact tgaggagggtg cggtttgatt tgagaggaat 2460
 60
 attagatgat gtctgtcac tcttctctag caagtcccaa caaaaggggg tggaggtaac 2520
 ttactatatg atctgcaaag caagggttgt aactgatagc aagtctttct tactgatttt 2580
 65
 ttgagtgttg ctgatgaacg cagttggcag tatacatatc tgatcgtggt ccagatatgt 2640
 taattgggta tcctgggagg tttcgacaaa tactcacaaa tcttatgggt aattccatta 2700
 aggtaaactt ttttattatg ttttttctg accattcctt gcatccgagt tgatcaacgg 2760

ES 2 462 967 T3

5 agctgatcat ttatatatat tctggcagtt cactgagaaa ggacacatct ttgtaactgt 2820
 tcatttggtg gatgagctat ttgaatctat cgatggagag acagcatcat ctccggaaag 2880
 tacactgagt gggcttccag ttgagaccg gcagaggagc tgggaaaact ttaaagcttt 2940
 10 cagctccaac gggcatcgga gctttgaacc atctccccct gatataaacc taatcgtctc 3000
 agttgaggat actggcgtag ggatccctgt agaagcgcag tcccgtattt ttacgccttt 3060
 15 catgcaagtc ggaccatcca tatccaggac gcatggaggc acaggaattg gacttagcat 3120
 aagcaaagt ctagttggac tgatgaaggg agaaattgga ttctcgagta ctccaaggt 3180
 tgggtccaca ttcacattta ctgctgtatt ttccaatggg atgcaaccag ctgaaagaaa 3240
 20 gaatgacaac aaccagccca tattctcgga attccggggc atgaaagctg tggttggtgga 3300
 ccataggcct gcaagggcaa aagtctcgtg gtaccatttt cagcgtcttg gaattcgagt 3360
 cgaagtagtt ccacgtgttg aacaggctct acattatctg aagattggta ctaccactgt 3420
 25 gaatatgata ctcatagagc aagaaatatg gaatagggaa gcagatgatt tcattaaaaa 3480
 gctacagaaa gaccctcttt tcctttctcc taagttgatt ttgtagcaa actcagtaga 3540
 30 atcgtcaata tcagaggctt tatgcaccgg tatagatcct ccaatagtga tagtgaaacc 3600
 attgagggcg agtatgctag cagcaacttt gcagagggga ttgggtattg gaatcagaga 3660
 accacctcaa cacaagggac ctctgcttt gattctcagg aatcttctcc ttggtagaaa 3720
 35 aattttaatc gtggatgata acaacgtaaa cctcagagtg gcagcgggag ctctgaaaaa 3780
 gtacggagct gatgtggtct gcgctgagag tgggataaag gcaatctcat tgcttaagcc 3840
 40 acctcagag tttgatgctt gcttcatgga cattcagatg ccagaaatgg atgggtatgc 3900
 ctgattggta tactagtttt tttgaaaagt tcgaaatatg taataagaaa attgaaatgt 3960
 ttttctgccc tgtctttctg cagatttgaa gctacaagga gaatacgaga tatggaagag 4020
 45 gagatgaaca agagaataaa gaatggggag gctttgatag tagagaacgg taacaaaaca 4080
 agctggcatc ttccggtatt agcaatgacg gcagatgtga tccaagcaac gcatgaggaa 4140
 tgtctgaagt gtggaatgga tgggtatgta tcaaacat ttgaagcaga gcagctgtac 4200
 50 agggaagttt ctcgcttttt caattcgctc tcagatacag aatcataa 4248

<210> 5

<211> 50

55 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 5

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

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

ES 2 462 967 T3

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

10 Thr Phe
50

<210> 6
<211> 50
<212> PRT
15 <213> Arabidopsis thaliana
<400> 6

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

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

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

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante activa constitutivamente del receptor de citoquinina AHK3 con:
- una secuencia aminoácida con la SEC ID N° 2 o un ortólogo de la misma;
 en la que la secuencia aminoácida tiene el aminoácido isoleucina (I) en una posición correspondiente a la posición 179 de la SEC ID N° 2.
- 10 **2.** Un ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, que comprende, además, al menos una secuencia promotora, en la que, al menos, una secuencia promotora y una secuencia de ácido nucleico codificadora están unidas funcionalmente la una a la otra.
- 15 **3.** Un casete de expresión transgénica para la expresión de ácidos nucleicos que comprenden un ácido nucleico aislado de una de las reivindicaciones 1 a 2.
- 4.** Un vector que comprende un ácido nucleico aislado de una de las reivindicaciones 1 a 2 o un casete de expresión transgénica de la reivindicación 3.
- 20 **5.** Un organismo transgénico transformado o transfectado temporal o definitivamente con un ácido nucleico aislado de las reivindicaciones 1 a 2, un casete de expresión de la reivindicación 3 o un vector de la reivindicación 4 o un descendiente de dicho organismo transgénico, en el que el organismo es una planta o un microorganismo.
- 25 **6.** Un organismo transgénico de la reivindicación 5, en el que el organismo es una planta seleccionada de la familia *Brassicaceae*, preferiblemente del género *Brassica* o *Arabidopsis*.
- 7.** Una célula, un cultivo celular, una parte, órgano, tejido o material de propagación transgénico derivados de una planta o microorganismo que comprende un ácido nucleico aislado de las reivindicaciones 1 a 2, un casete de expresión transgénica de la reivindicación 3 o un vector de la reivindicación 4.
- 30 **8.** La utilización de un ácido nucleico aislado de las reivindicaciones 1 a 2, un casete de expresión transgénica de la reivindicación 3 o un vector de la reivindicación 4 para la fabricación de una planta transgénica.
- 35 **9.** Un método para la fabricación de una planta transgénica que comprende las siguientes etapas:
 a) Introducir en una o más células de planta un ácido nucleico aislado de la reivindicación 1 a 2, un casete de expresión transgénica de la reivindicación 3 o un vector de la reivindicación 4 para producir células transgénicas;
 b) Seleccionar células transgénicas que comprenden dicho ácido nucleico aislado, dicho casete de expresión o dicho vector integrado definitivamente en el genoma; y
 c) Regenerar plantas intactas a partir de dichas células transgénicas o células derivadas de las mismas.
- 40 **10.** Un polipéptido aislado codificado por un ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
- 11.** Un polipéptido aislado que comprende, al menos, la secuencia aminoácida con la SEC ID N° 2.
- 45 **12.** Un método para mejorar el crecimiento del brote de una planta, que comprende:
 i) Introducir en una planta un ácido nucleico aislado de la reivindicación 1 a 2; y
 ii) Expresar el ácido nucleico introducido de la reivindicación 1 a 2.

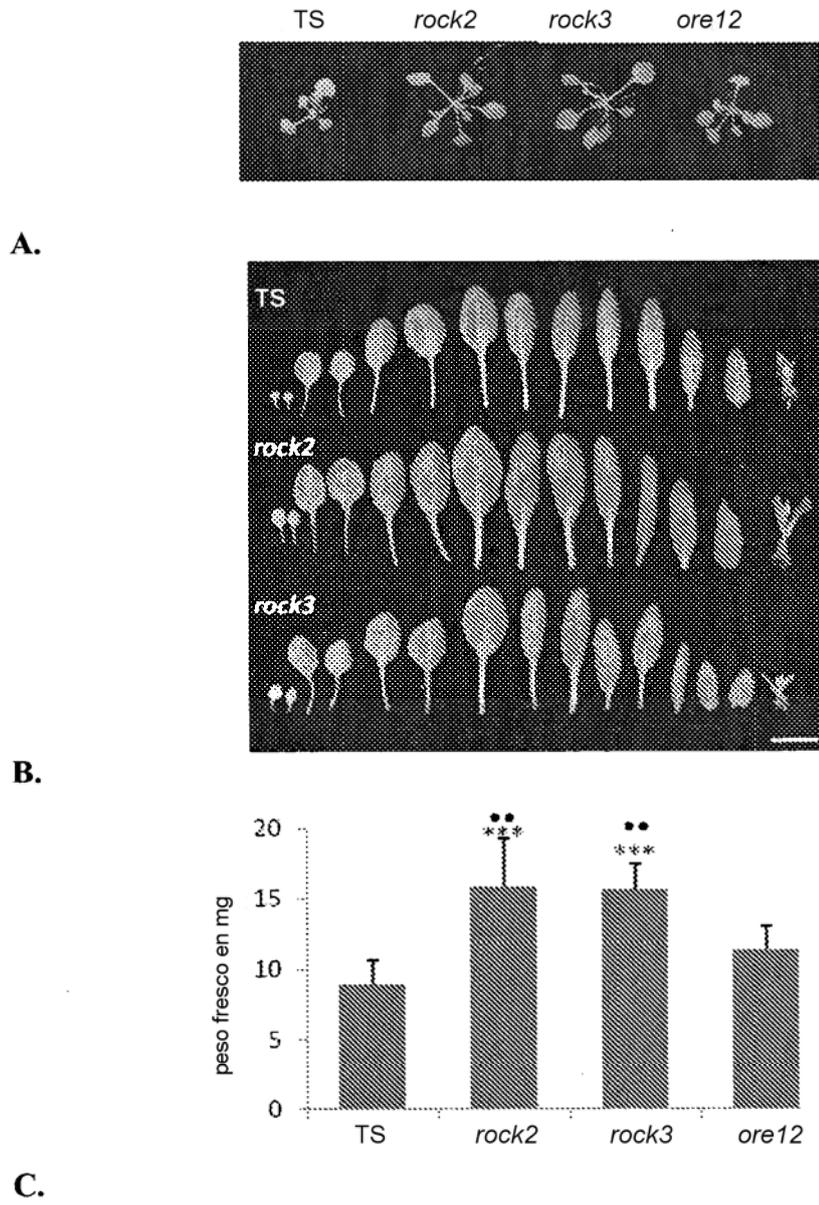


FIG. 1

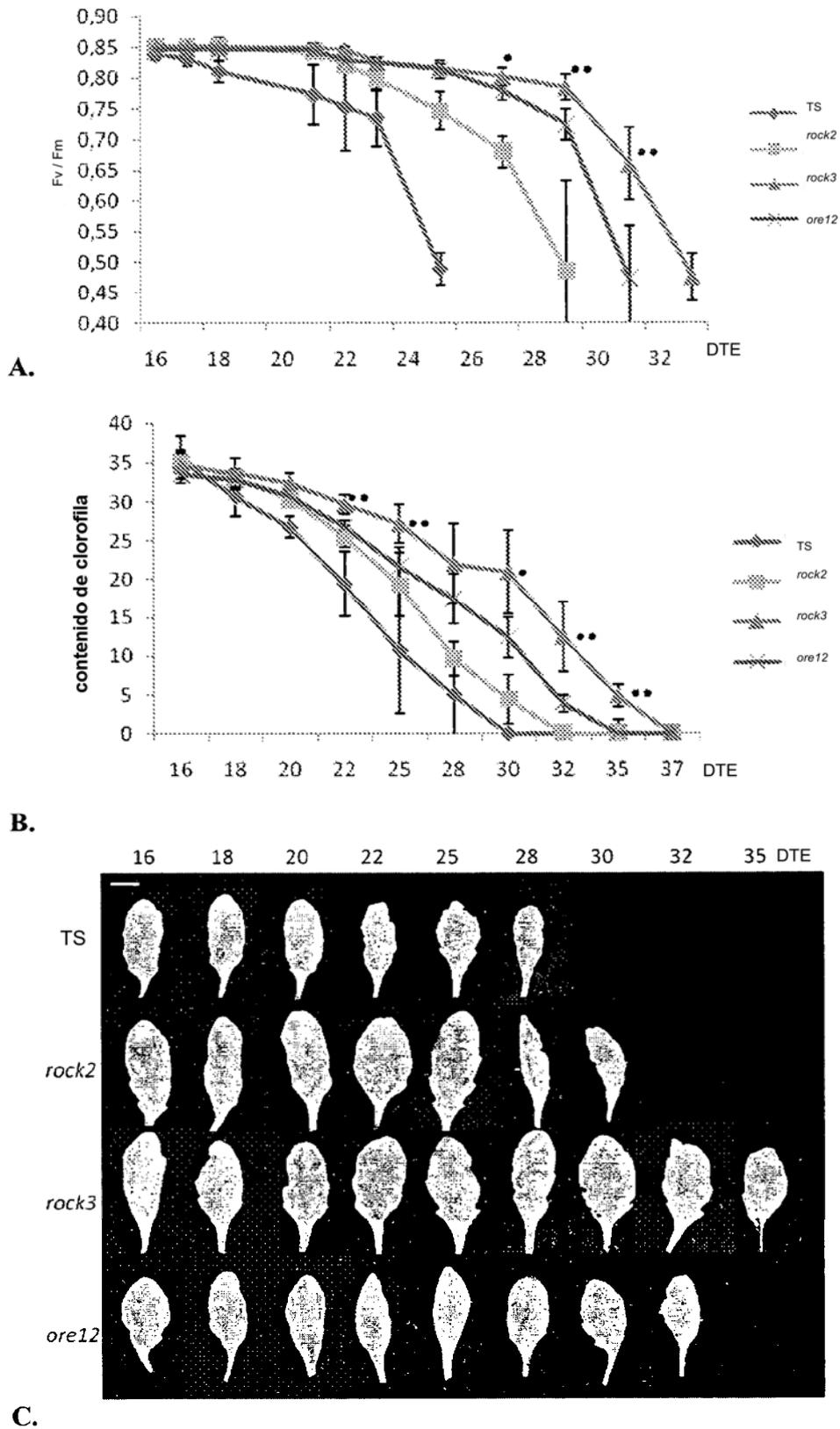


FIG. 2

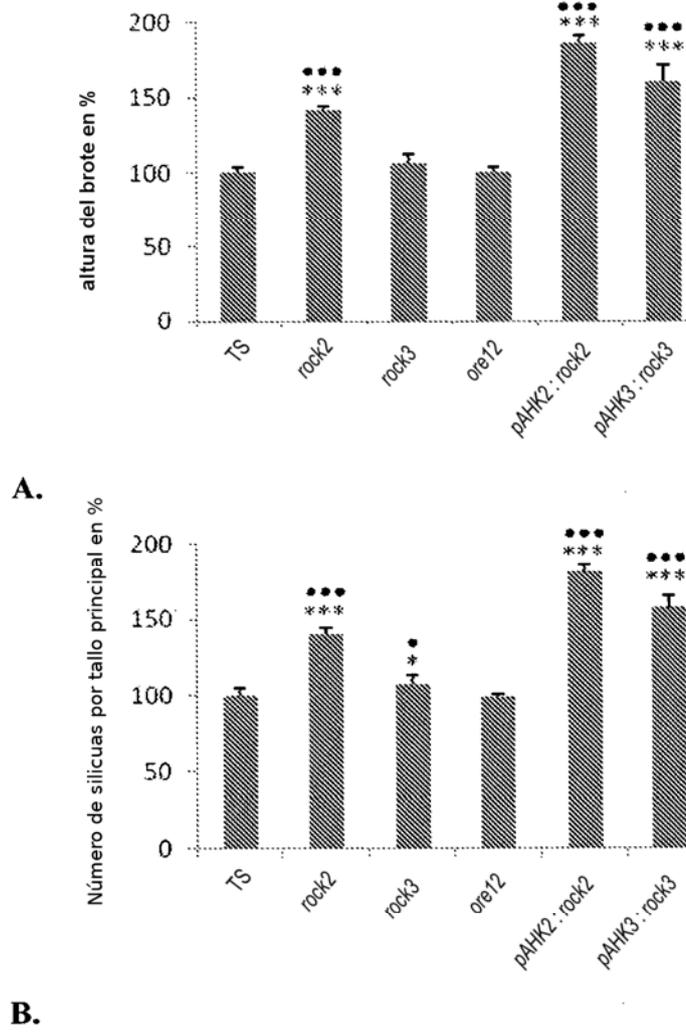
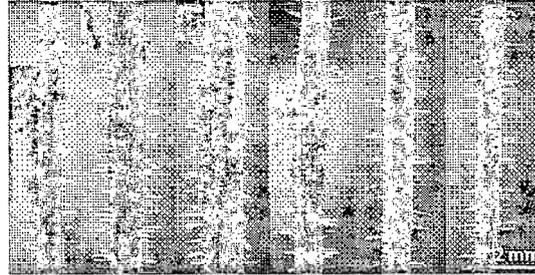
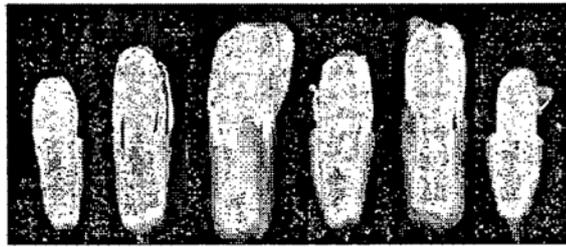


FIG. 3

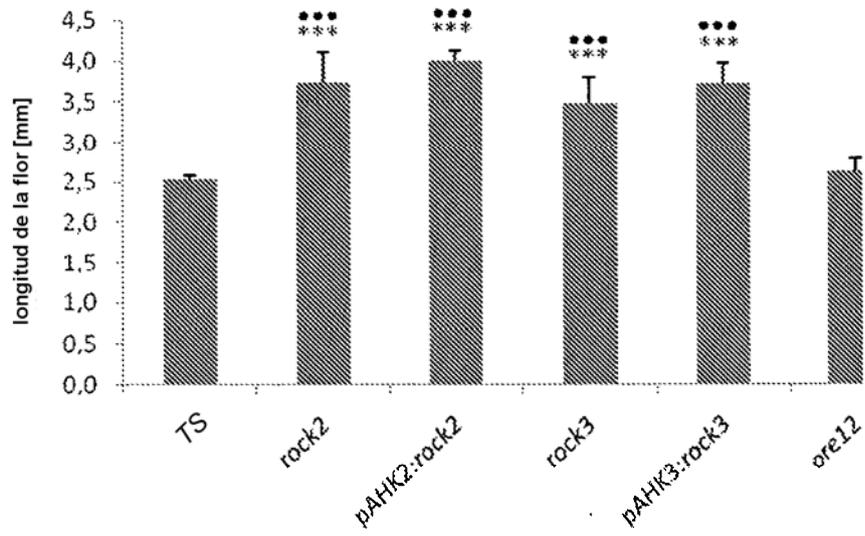


TS *rock2* *pAHK2:rock2* *rock3* *pAHK3:rock3* *ore12*

A.



TS *rock2* *pAHK2:rock2* *rock3* *pAHK3:rock3* *ore12*



B.

FIG. 4

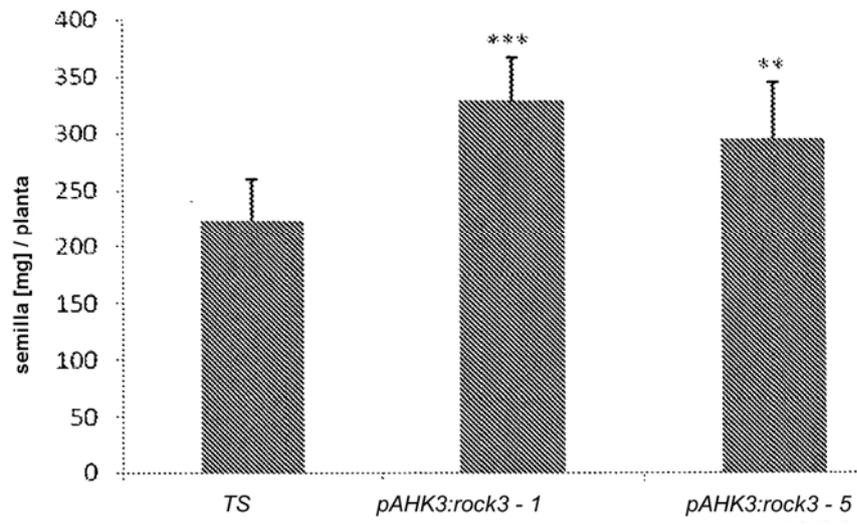


FIG. 5