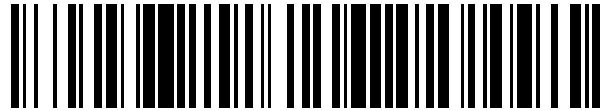


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 315**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 14/425 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2007 E 07703625 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 1979484**

54 Título: **Uso de polinucleótidos de estomatina (STM1) para alcanzar una resistencia a patógenos en plantas**

30 Prioridad:

12.01.2006 EP 06100304

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

02.06.2014

73 Titular/es:

**BASF PLANT SCIENCE GMBH (100.0%)
67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:

**FRANK, MARKUS;
SCHWEIZER, PATRICK y
DOUCHKOV, DIMITAR**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 464 315 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

Uso de polinucleótidos de estomatina (STM1) para alcanzar una resistencia a patógenos en plantas

La invención se refiere a un procedimiento de generar o aumentar una resistencia a patógenos en plantas reduciendo la expresión de al menos un polipéptido de estomatina o un equivalente funcional del mismo. La invención se refiere a nuevas secuencias de ácido nucleico que codifican un polinucleótido de estomatina de *Hordeum vulgare* (HvSTM1) y describe secuencias homólogas (STM1) de la misma y a su uso en procedimientos para obtener una Resistencia a patógenos en plantas y a construcciones de ácido nucleico, casetes de expresión y vectores que comprenden estas secuencias y que son adecuadas para mediar en una resistencia fúngica en plantas. La invención se refiere además a organismos transgénicos, en particular plantas, que se transforman con estos casetes de expresión o vectores, y a cultivos, partes o material de propagación transgénica derivado de las mismas.

Sólo existen algunos enfoques que confieren una resistencia a los patógenos, principalmente hongos patógenos, a las plantas. Esta deficiencia puede atribuirse en parte a la complejidad de los sistemas biológicos en cuestión. Otro dato que se sitúa en el camino de obtener resistencias a patógenos es que poco se sabe sobre las interacciones entre el patógeno y la planta. El gran número de diferentes agentes patógenos, los mecanismos de infección desarrollados por estos organismos y los mecanismos de defensa desarrollados por los filos planta, familias y especies interactúan entre sí de muchas maneras diferentes

Los hongos patógenos han desarrollado básicamente dos estrategias de infección. Algunos hongos entran en el tejido del huésped a través de los estomas (por ejemplo, la roya, la especie *Septoria*, especie *Fusarium*) y penetran en el tejido del mesófilo, mientras que otros penetran a través de la cutícula en las células epidérmicas debajo (por ejemplo, especies *Blumeria*).

Las infecciones causadas por los patógenos fúngicos conducen a la activación de mecanismos de defensa de la planta en las plantas infectadas. Por lo tanto, ha sido posible demostrar que las reacciones de defensa contra los hongos que atraviesan la epidermis con frecuencia se inician con la formación de una resistencia a la penetración (formación de papilas, el fortalecimiento de la pared celular con callosa como componente principal) por debajo de la hifa penetración fúngica (Elliott et al. *Mol Plant Microbe Interact.* 15: 106 9 - 77; 2002).

En algunos casos, sin embargo, los mecanismos de defensa de la planta sólo confieren un mecanismo de protección insuficiente contra el ataque por patógenos.

La formación de una resistencia a la penetración de patógenos cuyo mecanismo infección comprende una penetración de las células de la epidermis o de las células del mesófilo es de gran importancia tanto para plantas monocotiledóneas como para plantas dicotiledóneas. En contraste con la resistencia descrita mediada por mlo, es probable que pueda hacer posible el desarrollo de una resistencia de amplio espectro contra hongos biotróficos obligatorios, hemibiotróficos y necrotrofos.

Por consiguiente, la presente invención se basa en el objeto de proporcionar un procedimiento para generar una resistencia de las plantas la penetración de patógenos.

El objeto se consigue mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Por consiguiente, la invención se refiere a un procedimiento para aumentar la resistencia a los patógenos que penetran en una planta monocotiledónea o dicotiledónea, o una parte de una planta, por ejemplo, en un órgano, tejido, una célula o una parte de una célula vegetal, por ejemplo en un orgánulo, que comprende la disminución o la reducción de la actividad de una proteína estomatina de acuerdo con la SEC ID N ° 2 (STM1) en la planta, o una parte de la planta, por ejemplo, en un órgano, tejido, una célula o una parte de una célula, por ejemplo en un compartimiento celular, por ejemplo, en un orgánulo, en comparación con una planta de control o una parte de una planta de control, por ejemplo, su órgano, tejido, célula o parte de una célula, por ejemplo en un compartimiento de la celda, por ejemplo en un orgánulo.

Preferentemente, se obtiene una resistencia inespecífica de raza en el procedimiento de acuerdo con la invención. Así, por ejemplo, una resistencia de amplio espectro contra hongos o plantas biotróficos y / o hemibiotróficos y / o necrotrofos obligatorios, en particular contra patógenos que penetran en el mesófilo, se puede obtener mediante el procedimiento de acuerdo con la invención.

Sorprendentemente, se ha observado que el silenciamiento de genes a través de dsRNAi de un gen que codifica la proteína estomatina resultados HvSTM1 en un aumento en la resistencia de las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas a patógenos fúngicos. Por lo tanto, esta función de control negativo en caso de ataque de hongos patógenos se ha demostrado para la proteína estomatina HvSTM1 de la cebada (*Hordeum vulgare*) (HvSTM1), el trigo (*Triticum aestivum*) y el berro (*Arabidopsis thaliana*).

Se ha encontrado dentro del alcance de un análisis TIGS (= transitoria inducida silenciamiento génico) en la cebada por el procedimiento de Schweizer et al. (2001)002E (2001) que un silenciamiento mediado por dsRNAi del gen la

HvSTM gen HvSTM aumenta considerablemente la resistencia a la *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (sinónimo: *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *hordei*). Este efecto también se ha obtenido en especies dicotiledóneas, tales como, por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* mediante la inducción de de silenciamiento génico postranscripción (PTGS). Esto pone de relieve la importancia universal de la función de pérdida de los genes de HvSTM1-homólogos para el desarrollo de una resistencia a los patógenos de amplio espectro de la planta.

La estomatina es una proteína integral de membrana que se identificó en primer lugar en las células de la sangre. En ciertas enfermedades hereditarias, en la que esta proteína está ausente, a se produce anemia hemolítica. En esta estomatocitosis, las células de la sangre sufren una difusión pasiva pronunciada de cationes cargados individualmente, lo que resulta en la hiperhidratación como resultado de una concentración alta de sodio y una concentración baja de potasio. El nombre estomatina deriva de la estructura como una boca de estos eritrocitos (griego estoma = boca). La estomatina actúa como un regulador negativo de la permeabilidad de membrana para cationes cargados individualmente. La estomatina tiene un dominio único de membrana, mientras que el resto de la proteína sobresale en el citoplasma. Los mecanismos moleculares a través de los cuales la estomatina ejerce su función no están claros. Se supone que el dominio citoplásmico de la proteína actúa estéricamente como una especie de tapón que cierra los canales de iones y tal vez interactúa con el citoesqueleto (Stewart GW, Argent AC, BCJ Dash (1993) *Biochem.Biophys.Acta* 1225, 15-25; Stewart GW et al. (1992) *Blood* 79, 1593-1601).

Una primera potencial estomatina vegetal se clonó en el maíz (Nadimpalli R et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 29579-29586). Sin embargo, no se publicaron datos funcionales de este gen, Zm-STM1. Un posible papel en la defensa frente a patógenos se ha asumido para otros genes que se clonaron en este trabajo, ya que las transcripciones de estos genes estaban reguladas por aumento en la lesión Mimic-Mutante Les9. Si bien este contexto no se ha demostrado para Zm-STM1, los autores especulan sobre un papel como posible regulador positivo de la defensa frente a patógenos, por ejemplo, como promotores de la reacción de hipersensibilidad (HR). En la misma línea que esta argumentación, otros dos grupos de estudio han encontrado que los genes de las proteínas de *Arabidopsis* en el fondo de dos mutantes con un aumento de la resistencia están regulados por aumento y, por lo tanto, dicha estomatina podría actuar como proteína PR (Petersen M et al. (2000) *Cell* 103, 1111-1120; Brodersen P et al. (2002) *Genes & Dev.* 16, 490-502).

El hallazgo de que una reducción en la expresión de estomatina conduce a un aumento significativo en la resistencia a patógenos en las plantas era tanto más sorprendente.

En una realización adicional, la invención se refiere, por tanto, a un procedimiento de generación de una planta con una mayor resistencia a patógenos de plantas, preferentemente con una resistencia de amplio espectro, en particular, a patógenos fúngicos, por ejemplo de las clases de Ascomycetos, Basidiomicetos, Quitridiomicetos u Oomicetos, por ejemplo de los mohos de la familia Erysiphaceae, género *Blumeria*, al interferir con la estructura de la pared celular, en particular mediante la reducción de la permeabilidad de la membrana, por ejemplo, para los cationes con una sola carga, en particular, mediante la modificación de la concentración de iones en la célula, preferentemente aumentando la concentración de los cationes con una sola, tales como, por ejemplo, sodio, por ejemplo por mutación de un canal iónico o de una proteína que interacciona con, o regula, un canal iónico.

En una forma de realización, la invención se refiere, por tanto, a un procedimiento de generación de una planta con una mayor resistencia a patógenos de plantas, preferentemente con una resistencia de amplio espectro, en particular a hongos patógenos, por ejemplo, de las clases de Ascomycetos, Basidiomicetos, quitridiomicetos u oomicetos, por ejemplo de los mohos de la familia Erysiphaceae, género *Blumeria*, mediante la reducción de la expresión o por mutación de una proteína STM1 estomatina

En una realización adicional, la actividad de un polipéptido similar a la subtilisina se reduce, por ejemplo, se bloquea o elimina, en el procedimiento de acuerdo con la invención.

En una realización adicional, en el procedimiento de acuerdo con la invención, la actividad de un polipéptido se reduce o elimina, que está codificada por un polinucleótido que comprende al menos una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

(a) molécula de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido que comprende la secuencia como se muestra en la SEC ID N° 2;

(b) molécula de ácido nucleico que comprende al menos un polinucleótido de la secuencia como se muestra en la SEC ID N° 1;

(c) molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido cuya secuencia tiene una identidad de al menos un 50% con las secuencias SEC ID N° 2;

(d) molécula de ácido nucleico de acuerdo con (a) a (c) que codifica un fragmento o un epítipo de las secuencias como se muestra en la SEC ID N° 2;

(e) molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que es reconocido por un anticuerpo monoclonal dirigido contra un polipéptido que está codificado por las moléculas de ácido nucleico como se muestra en (a) a (c);

(f) molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula de ácido nucleico como se muestra en (a) a (c); y

5 (g) molécula de ácido nucleico que se puede aislar a partir de una biblioteca de ADN utilizando una molécula de ácido nucleico como se muestra en (a) a (c) o sus fragmentos parciales de al menos 15 nt, preferentemente 20 nt, 30 nt, 50 nt, 100 nt, 200 nt o 500 nt, como sonda en condiciones de hibridación rigurosas;

o comprende una secuencia complementaria de la misma reducida, por ejemplo se eliminada.

En el procedimiento de acuerdo con la invención, es, en particular, la resistencia a los patógenos que penetran en las células del mesófilo, que, preferentemente, está aumentada.

10 En una forma de realización, la resistencia se obtiene mediante la disminución de la reducción o bloqueo de la expresión de un polipéptido, preferentemente de un polipéptido que está codificado por la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente, a partir de cebada, como se muestra en el presente documento en la SEQ ID N ° 2 o a partir de

Arroz:

15 LOCUS XP_480193 377 aa linear PLN 09-NOV-2004 DEFINICIÓN proteína putativa de la banda 7 [*Oryza sativa* (grupo variedad japónica)].

ACCESO XP_480193

VERSIÓN XP_48019 3,1 GI:50941331

DBSOURCE REFSEQ: acceso XM_48019 3,1,

Maíz:

20 LOCUS AAF68388 394 aa linear PLN 11-SEP-2002 DEFINICIÓN proteína de tipo estomatina [*Zea mays*].

ACCESO AAF68388

VERSIÓN AAF6838 8,1 GI:7716464

DBSOURCE acceso AF23637 2,1

o:

25 LOCUS CAB81408 515 aa linear PLN 16-APR-2005

DEFINICIÓN proteína putativa [*Arabidopsis thaliana*].

ACCESO CAB81408

VERSIÓN CAB8140 8,1 GI:7269612

DBSOURCE embi locus ATCHRIV67, acceso AL16157 1,2

30 LOCUS NP_567778 411 aa linear PLN 04-NOV-2005
DEFINICIÓN proteína desconocida [*Arabidopsis thaliana*].

ACCESO N NP_567778

VERSIÓN NP_56777 8,1 GI:18417021

DBSOURCE REFSEQ: acceso NM_11889 4,2

35 LOCUS NP_200221 401 aa linear PLN 04-NOV-2005
DEFINICIÓN proteína desconocida [*Arabidopsis thaliana*].

ACCESO NP_200221

VERSIÓN NP_20022 1,1 GI:15239547

DBSOURCE REFSEQ: acceso NM_12479 0,2

40 LOCUS AAM63205 401 aa linear PLN 14-APR-2003
DEFINICIÓN proteína de tipo estomatina [*Arabidopsis thaliana*].

ACCESO AAM63205

VERSIÓN AAM6320 5,1 GI:21554125

DBSOURCE acceso AY08599 5,1

45 Por otro lado, también es posible reducir, disminuir o bloquear la actividad endógena de uno de estos polipéptidos mediante procedimientos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo mediante la mutación de una región de

codificación genómica para el centro activo, para los sitios de unión, para las señales de localización, para los dominios, las agrupaciones y similares, tales como, por ejemplo, de las regiones de codificación para la hélice superenrollada, HEAT, FBOX, LRR, IBIB, C2, WD40, beach, caja U o dominios UND. La actividad puede reducirse de acuerdo con la invención mediante mutaciones que afectan a la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de la proteína.

Las mutaciones se pueden insertar, por ejemplo, mediante una mutagénesis EMS. Los dominios pueden identificarse mediante programas de ordenador adecuados, tales como, por ejemplo, SMART o InterPro, por ejemplo como se describe en Andersen P., The Journal of Biol. Chemistry, 279, 38, pp. 40053-40061, 2004 o Y. Mudgil, Plant Physiology, 134, 59-66, 2004, y la literatura citada. Los mutantes adecuados pueden identificarse después mediante, por ejemplo, cultivo.

En una forma de realización, la disminución de la cantidad de polipéptido, actividad o función de una proteína STM1 estomatina en una planta se combina con el aumento de la cantidad de polipéptido, actividad o función de otros factores de resistencia, preferentemente de una proteína Bax inhibidor 1 (BI-1), preferentemente de la proteína Bax inhibidor 1 de *Hordeum vulgare* (Nº de acceso en GenBank AJ290421), desde *Nicotiana tabacum* (GenBank Acc.- AF390556), arroz (Nº de acceso en GenBank AB025926), Arabidopsis (Nº de acceso en GenBank AB025927) o el tabaco y colza (Nº de acceso en GenBank AF390555, Bolduc N et al. (2003) Planta 216:377-386) o de ROR2 (por ejemplo de cebada (Nº de acceso en GenBank AY246906), SnAP34 (por ejemplo a partir de cebada (Nº de acceso en GenBank AY247208) y / o de la proteína de unión lumenal BIP por ejemplo de arroz (Nº de acceso en GenBank AF006825). Un aumento puede conseguirse por ejemplo por mutagénesis o la sobreexpresión de un transgén, entre otras cosas.

En una forma de realización, la reducción de la cantidad de polipéptido, actividad o función de una proteína STM1 estomatina en una planta se combina con la disminución de la cantidad de proteína, actividad o función de otros factores de resistencia, preferentemente de las proteínas RacB (por ejemplo de cebada (de acceso en GenBank AJ344223), CSL1 (por ejemplo de Arabidopsis (de acceso en GenBank NM116593), HvNaOX (por ejemplo a partir de cebada (de acceso en GenBank AJ251717), MLO (por ejemplo a partir de cebada (de acceso en GenBank Z83834), ARM1 (proteína de repetición de armadillo, solicitud número 05.110.468.5).

La actividad o función de MLO, BI-1 y / o NAOX se pueden reducir o inhibir de manera análoga a lo que se ha descrito para el MLO en los documentos WO 98/04586, WO 00/01722, WO 99/47552 y las publicaciones mencionadas más adelante en el presente documento, cuyo contenido se incorpora en el presente documento expresamente por referencia, en particular, con el fin de describir la actividad y la inhibición de MLO. La descripción de las publicaciones anteriormente mencionadas describe los procesos, procedimientos y formas de realización especialmente preferidas para disminuir o inhibir la actividad o función de MLO; los ejemplos indican específicamente cómo se puede realizar.

La reducción de la actividad o función, en su caso de la expresión de BI-1, se describe en detalle en el documento WO 2003020939, que se incorpora en el presente documento expresamente en la presente descripción. La descripción de la publicación mencionada anteriormente describe procesos y procedimientos para disminuir o inhibir la actividad o función de BI-1; los ejemplos indican específicamente cómo se puede realizar esto. La reducción o inhibición de la actividad o función de BI-1 se lleva a cabo especialmente preferentemente de acuerdo con las formas de realización especialmente preferidas del documento IRI WO 2003020939 y los ejemplos y en los organismos mostrados como especialmente preferidos, en particular en una planta, por ejemplo, constitutivamente, o una parte de la misma, por ejemplo en un tejido, pero especialmente ventajosa al menos en la epidermis o en una parte considerable de la células epidérmicas. La reducción de la actividad o función, en su caso de la expresión, de BI-1 se describe ampliamente en el documento WO 2003020939. El experto en la materia encuentra en el documento WO 2003020939 las secuencias que codifican proteínas de BI-1 y también puede identificar BI-1 con el procedimiento proporcionado en el documento WO 2003020939.

La reducción de la actividad o función, si procede, de la expresión, de NAOX se describe ampliamente en el documento PCT/EP/03/07589, que se incorpora en el presente documento expresamente en la presente descripción. La descripción de la publicación mencionada anteriormente describe procesos y procedimientos para disminuir o inhibir la actividad o función de NAOX, y los ejemplos indican específicamente cómo se puede realizar. La reducción o inhibición de la actividad o función de NAOX se lleva a cabo especialmente preferentemente de acuerdo con las formas de realización especialmente preferidas en el documento PCT/EP/03/07589 y los ejemplos y en los organismos mostrados como especialmente preferidos, en particular en una planta, por ejemplo, constitutivamente, o una parte del mismo, por ejemplo en un tejido, pero especialmente ventajosa al menos en la epidermis o en una parte considerable de la células epidérmicas. El experto en la materia encuentra en el documento PCT/EP/03/07589 las secuencias que codifican las proteínas NAOX y también puede identificar NAOX con el procedimiento proporcionado en el documento PCT/EP/03/07589.

Los términos "disminuir", "reducir" o "reprimir" o sus sustantivos se utilizan como sinónimos en el texto actual.

Se entiende que "disminución", "reducción" o "represión" o sus verbos significan, de conformidad con la invención, que la actividad en la planta es menor que en una planta de control o es menor en una parte de una planta que en el

- 5 misma parte de la planta de una planta de control, por ejemplo, en un órgano, un orgánulo, un tejido o una célula. En una forma de realización, la actividad del polipéptido antes mencionado anteriormente es 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o más inferior a la del control. En una forma de realización, no hay expresión del polipéptido antes mencionado anteriormente. Como consecuencia, estos términos también comprenden la inhibición completa o el bloqueo de una actividad, por ejemplo mediante la inactivación de un gen.
- "Reducción", "para reducir", "disminución" o " para disminuir", "represión" o "para reprimir" comprenden la inhibición o el bloqueo parcial o esencialmente completo de la funcionalidad de una proteína, sobre la base de una variedad de mecanismos biológicos-celulares.
- 10 La disminución en el propósito de la invención comprende también una reducción cuantitativa de una proteína a una ausencia esencialmente completa de la proteína (es decir, falta de detectabilidad de la actividad o la función o la falta de detectabilidad inmunológica de la proteína). En el presente documento, la expresión de una determinada proteína o la actividad o función en una célula o un organismo se reduce preferentemente en más del 50%, especialmente preferible en más de un 80%, muy especialmente preferible en más de un 90%.
- 15 Por ejemplo, la expresión de una molécula de ácido nucleico para una proteína STM1 estomatina, por ejemplo, en combinación con un aumento específico de tejido en la actividad de un inhibidor de la proteína Bax-1 puede tener lugar en el tejido mesófilo. La reducción de la estomatina STM1 cantidad de proteínas en una planta transgénica que por ejemplo sobreexpresa BI-1 en el tejido mesófilo ofrece la posibilidad de generar una resistencia a los hongos completa y amplia en la planta.
- 20 El aumento en la cantidad de polipéptido, actividad o función de una proteína inhibidora Bax 1 de *Hordeum vulgare* (Nº de acceso en GenBank AJ290421), de *Nicotiana tabacum* (Nº de acceso en GenBank AF390556), arroz (AF390556), AB025926), *Arabidopsis* (AF390556), AB025927) o el tabaco y colza (AF390556), Bolduc N et al. (2003) Planta 216:377-386) o de ROR2 (por ejemplo a partir de cebada (Nº de acceso en GenBank AY246906), SnAP34 (por ejemplo a partir de cebada (Nº de acceso en GenBank: AY247208) y / o de la proteína de unión luminal BIP por ejemplo a partir de arroz (Nº de acceso en GenBank AF006825) se efectúa en combinación con la reducción en la
- 25 cantidad de proteína o la actividad o función de las proteínas RacB (por ejemplo de cebada (Nº de acceso en GenBank AJ344223), CSL1 (por ejemplo a partir de *Arabidopsis* (Nº de acceso en GenBank NM116593), HvNaOX (por ejemplo a partir de cebada (Nº de acceso en GenBank AJ251717), y / o MLO (por ejemplo a partir de cebada (Nº de acceso en GenBank Z83834). Como consecuencia de ello, al menos uno de los genes anteriormente mencionados que son adecuados para la sobreexpresión o aumento de la actividad se activa o se sobreexpresa y /
- 30 o se reduce al menos uno de los genes anteriormente mencionados, que es adecuado para la reducción.
- Un aumento en la expresión se puede obtener como se describe en el presente documento. Un aumento en la expresión o función se entiende que significa en el presente documento tanto la activación o mejora de la expresión o función de la proteína endógena, incluyendo una expresión *de novo* y un aumento o mejora mediante la expresión de una proteína o factor transgénico.
- 35 A los efectos de la invención, "organismo" significa "organismos no humanos", siempre y cuando el término se refiere a un organismo multicelular viable.
- A los efectos de la invención, "plantas" significa todas las plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas. Se prefieren las plantas que se podrían entrar en la clase del Liliatae (plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas). El término incluye las plantas maduras, semillas, brotes y plántulas, y partes, material de propagación, órganos de plantas,
- 40 tejidos, protoplastos, callos y otros cultivos, por ejemplo cultivos de células derivadas de lo anterior, y todos los otros tipos de asociaciones de las células vegetales que dan unidades funcionales o estructurales. Las plantas maduras se refieren a las plantas en cualquier etapa de desarrollo más allá de la etapa de plántula. Plántula significa una planta joven, inmadura en una etapa temprana de desarrollo.
- "Planta" también comprende plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas anuales y perennes e incluye a modo de ejemplo, pero no como limitación, las de los géneros *Bromus*, *Espárrago*, *Pennisetum*, *Lolium*, *Oryza*, *Zea*, *Avena*, *Hordeum*, *Secale*, *Triticum*, *sorgo* y *Saccharum*.
- 45 En una forma de realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención se aplica a las plantas monocotiledóneas, por ejemplo, de la familia Poaceae, especialmente preferentemente a los géneros *Oryza*, *Zea*, *Avena*, *Hordeum*, *Secale*, *Triticum*, *sorgo* y *Saccharum*, muy especialmente preferentemente a agrícolamente plantas importantes tales como, por ejemplo, *Hordeum vulgare* (cebada), *Triticum aestivum* (trigo), *Triticum aestivum* subsp. *spelta* (escandia), *Triticale*, *Avena sativa* (avena), *Secale cereale* (centeno), *Sorghum bicolor* (sorgo), *Zea mays* (maíz), *Saccharum officinarum* (caña de azúcar) u *Oryza sativa* (arroz). Por lo tanto, en una realización preferida, la expresión o actividad de la proteína STM1 estomatina o polinucleótido está reducida en una de estas plantas.
- 50 "Tejido epidérmico" o epidermis significa las capas de tejidos externos de las plantas. Puede ser de una sola capa o en múltiples capas; y hay expresión génica "enriquecida" en la epidermis, tales como, por ejemplo, *Cer3*, que puede actuar como marcador; Hannoufa, A. (1996) *Plant J.* 10 (3), 459-467.

Por "epidermis", el experto quiere decir preferentemente el tejido dérmico predominante de las partes aéreas de la planta principal, como de los brotes, las hojas, flores, frutos y semillas. Las células epidérmicas excretan una capa repelente de agua, la cutícula, hacia el exterior. Las raíces son rodeadas por la rizodermis, que se asemeja a la epidermis de muchas maneras, pero también difiere sustancialmente de la misma. La epidermis desarrolla a partir de la capa más externa de la meristema apical. El origen de los rizodermis, en contraste, está menos claro. Desde el punto de vista filogenético, se puede asignar ya sea a la calyptra o a la corteza primaria, dependiendo de la especie. Un gran número de funciones se puede atribuir a la epidermis: protege a la planta contra la deshidratación y regula la tasa de transpiración. Protege a la planta a partir de una amplia gama de factores externos físicos y químicos y contra los animales de alimentación y ataque por parásitos. Está implicado en el intercambio de gas, en la secreción de ciertos metabolitos y en la absorción de agua. Contiene receptores para estímulos luminosos y mecánicos. Por lo tanto, actúa como transformador de señal entre el medio ambiente y la planta. De acuerdo con las diferentes funciones, la epidermis comprende un número de células diferenciadas de manera diferente. Otros aspectos son especies que tienen variantes específicas y diferentes organizaciones de las epidermis de las partes individuales de una planta. En esencia, se compone de tres categorías de células: las células epidérmicas "reales", las células de los estomas y de los tricomas (griego: tricoma, pelo), que son anejos epidérmicos con diferentes formas, estructuras y funciones.

La "real", es decir, las células de la epidermis menos especializados, representan la mayor parte de la mayor parte de las células del tejido epidérmico. En vista superior, aparecen con forma poligonal (con forma de losa o placa) o alargada. Las paredes entre ellos son a menudo onduladas o sinuosas. No se sabe lo que induce esta forma durante el desarrollo; hipótesis existentes sólo ofrecen explicaciones insatisfactorias de ello. Las células epidérmicas alargadas se pueden encontrar en los órganos o partes de órganos que ellos mismos son alargados, por lo tanto, por ejemplo, en los tallos, peciolo, venas de la hoja y en las hojas de la mayoría de las monocotiledóneas. La superficie superior y la superficie inferior de las láminas pueden estar cubiertas en la epidermis con diferentes estructuras, siendo posible que la forma de las células, el espesor de pared y la distribución y número de células especializadas (estomas y / o tricomas) por unidad de área varíen. Un alto grado de variación también se encuentra dentro de las familias individuales, por ejemplo en Crassulaceae. En la mayoría de los casos, la epidermis se compone de una sola capa, aunque se han encontrado epidermis de almacenamiento de agua de varias capas entre las especies de una pluralidad de familias (Moraceae: la mayoría de las especies de Ficus; Piperaceae: Peperonia, Begoniaceae, Malvaceae y similares). Las células epidérmicas secretan una cutícula hacia el exterior, que abarca todas las superficies epidérmicas como una película sin interrupción. Puede ser lisa o estructurada con bultos, varillas, pliegues y surcos. Sin embargo, el plegamiento de la cutícula, que se puede observar durante la visualización de la superficie, no siempre se debe a la formación de varillas de cuticulares. De hecho, hay casos en los que el plegamiento cuticular es simplemente la expresión de las protuberancias subyacentes de la pared celular. Anejos epidérmicos de varias formas, estructuras y funciones se conocen como tricomas y, en el presente contexto, igualmente entran dentro del término "epidermis". Se presentan en forma de pelos protectores, pelos de soporte y pelos glandulares en forma de escamas, diferentes papilas y, en el caso de las raíces, como pelos absorbentes. Están formados exclusivamente por células epidérmicas. Con frecuencia, un tricoma está formado por sólo una de tales células, sin embargo, de vez en cuando, más de una célula está implicada en su formación.

El término "epidermis" comprende asimismo papilas. Las papilas son protuberancias de la superficie epidérmica. En el ejemplo de libro de texto de la misma es la papila en superficies de flores del pensamiento (*Viola tricolor*) y las superficies de las hojas de muchas especies de los bosques tropicales húmedos. Imparten una consistencia aterciopelada a la superficie. Algunas células epidérmicas pueden formar reservas de agua. Un ejemplo típico es el de las vesículas de agua en la superficie de muchas especies *Mesembryanthemum* y otras plantas suculentas. En algunas plantas, por ejemplo en el caso de campanilla (*Campanula persicifolia*), las paredes externas de la epidermis están espesadas como una lente.

La biomasa principal de todos los tejidos es el parénquima. Los tejidos parenquimáticos incluyen el mesófilo, que en las hojas, se pueden diferenciar en parénquima empalizada y parénquima esponjoso. De acuerdo con ello, el experto entiende, por mesófilo, un tejido parenquimático. Las células parenquimáticas están siempre vivas, en la mayoría de los casos isodiamétrica, raramente alargadas. La médula de los brotes, los tejidos de almacenamiento de los frutos, las semillas, las raíces y otros órganos subterráneos también se consideran como parénquimas, como es el mesófilo. "El tejido mesófilo" significa el tejido foliar entre las capas de la epidermis, y se compone de tejido empalizado, tejido esponjoso y los haces vasculares de la hoja.

En las hojas de la mayoría de los helechos y fanerógamas, especialmente en el caso de las dicotiledóneas y muchas monocotiledóneas, el mesófilo se subdivide en parénquimas empalizadas y parénquimas esponjosos. Una hoja "típica" es la organización dorsiventral. En la mayoría de los casos, el parénquima empalizado está en la superficie superior de la hoja inmediatamente debajo de la epidermis. El parénquima esponjoso llena el espacio subyacente. Se intercalan por un sistema intercelular voluminoso cuyo espacio de gas está en contacto directo con el espacio externo a través de los estomas. El parénquima empalizado está formado por células cilíndricas alargadas. En algunas especies, las células son irregulares, a veces se bifurcan (en forma de Y: parénquima empalizada de brazo). Tales variantes se encuentran en helechos, coníferas y algunas angiospermas (por ejemplo, en algunas especies *Ranunculaceae* y *Caprifoliaceae* [ejemplo: elder]). Además de la forma de organización más amplia atomizada, lo que se acaba de describir, se han encontrado las siguientes variantes:

parénquima en empalizada en la superficie inferior de la hoja. Especialmente visible en hojas escamosas. (Por ejemplo arbor vitae (Thuja), y en las hojas de ajo silvestre (*Allium ursinum*).

parénquima en empalizada en ambas superficies de las hojas (superficie superior y superficie inferior). Se encuentra con frecuencia en las plantas de hábitats secos (Xerófitas). Ejemplo: lechuguilla (*Lactuca serriola*);

- 5 parénquima en empalizada en forma de anillo cerrado: en hojas de forma cilíndrica organizadas y en las agujas de las coníferas.

La variabilidad de las células del parénquima esponjoso y la organización del propio parénquima esponjoso, son aún más variadas que la del parénquima en empalizada. Con mayor frecuencia se denomina aerénquima ya que comprende una multiplicidad de espacios intercelulares interconectados.

- 10 El mesófilo puede comprender lo que se conoce como el tejido de asimilación, pero los términos del mesófilo y tejido asimilación no se van a utilizar como sinónimos. Hay hojas sin cloroplastos cuya organización difiere sólo en un grado menor de las hojas verdes comparables. Como consecuencia, comprenden mesófilo, pero la asimilación no tiene lugar; por el contrario, la asimilación también se lleva a cabo, por ejemplo, las secciones del brote. Otras ayudas para la caracterización de la epidermis y el mesófilo la pueden encontrar el experto en la materia, por ejemplo, en GUTTENBERG, H.: *Lehrbuch der Allgemeinen Botanik* [Textbook of general botany]. Berlin: Akademie-Verlag 1955 (5th Ed.), HABERLANDT, G.: *Physiologische Pflanzenanatomie* [Physiological plant anatomy]. Leipzig: W. Engelmann 1924 (6th Ed.); TROLL, W.: *Morphologie der Pflanzen* [Plant morphology]. Volume 1: *Vegetationsorgane* [Vegetation organs]. Berlin: Gebr. Borntraeger, 1937; TROLL, W.: *Praktische Einführung in die Pflanzenmorphologie* [Practical introduction to plant morphology]. Jena: VEB G. Thieme Verlag 1954/1957; TROLL, W., HÖHN, K.: *Allgemeine Botanik* [General botany]. Stuttgart: F. Enke Verlag, 1973 (4ª Ed.)

Como consecuencia, la epidermis o las células epidérmicas se pueden caracterizar en términos histológicos o bioquímicos, incluyendo términos moleculares- bioquímicos. En una forma de realización, la epidermis se caracteriza en términos bioquímicos. En una forma de realización, la epidermis se pueden caracterizar por la actividad de uno o más de los siguientes promotores:

- 25 WIR5 (=GstA1), acc. X56012, Dudler & Schweizer, sin publicar.
 GLP4, acc. AJ310534; Wei, Y.; (1998) *Plant Molecular Biology* 36, 10 1 - 112.
 GLP2a, acc. AJ237942, Schweizer, P., (1999). *Plant J* 20, 54 1 - 552.
 Prx7, acc. AJ003141, Kristensen BK, 2001. *Molecular Plant Pathology*, 2(6), 31 1 - 317
 GerA, acc. AF250933 ; Wu S, 2000. *Plant Phys Biochem* 38, 68 5 - 698
- 30 OsROC1, acc. AP004656
 RTBV, acc. AAV62708, AAV62707 ; Klöti, A, 1999, *PMB* 40, 24 9 - 266
 Cer3; Hannoufa, A. (1996), *Plant J.* 10 (3), 45 9 - 467.

En otra forma de realización, la epidermis se caracteriza en que sólo algunos de los promotores son activos, por ejemplo 2, 3, 5 o 7 o más, pero por lo menos uno de los promotores antes mencionados está activo. En una forma de realización, la epidermis se caracteriza en que todos los promotores anteriormente mencionados están activos en el tejido o la célula.

- 40 En una forma de realización, la expresión o actividad de la proteína STM1 estomatina o polinucleótido en la epidermis se reduce por la expresión de una molécula inhibidora bajo el control de un promotor específico de la epidermis, en particular bajo el control de uno de los promotores anteriormente mencionados. Ejemplos de moléculas inhibidoras se enumeran a continuación, por ejemplo, ARNi, ARN antisentido, microARN, cosupresión, anticuerpos y otros procedimientos que son conocidos para el experto. La expresión específica de la epidermis de una molécula inhibidora en la epidermis es particularmente ventajoso para aumentar la resistencia de una planta al mildiu.

- 45 Como consecuencia, el mesófilo o las células del mesófilo se pueden caracterizar en términos bioquímicos, incluyendo los términos de biología molecular, o histológicos. En una forma de realización, el mesófilo se caracteriza en términos bioquímicos. En una forma de realización, el mesófilo puede caracterizarse por la actividad de uno o más de los siguientes promotores:

- PPCZm1 (=PEPC); Kausch, A.P., (2001) *Plant Mol. Biol.* 45, 1 - 15
 OsrbcS, Kyojuka et al *PlaNt Phys*: 1993 102: Kyojuka J, 1993. *Plant Phys* 102, 99 1 - 1000
- 50 OsPPDK, acc. AC099041.

TaGF- 2,8, acc. M63223; Schweizer,P., (1999). Plant J 20, 54 1 - 552.

TaFBPase, acc. X53957;

TaWIS1, acc. AF467542; US 200220115849

HvBIS1, acc. AF467539; US 200220115849

5 ZmMIS1, acc. AF467514; US 200220115849

HvPR1a, acc. X74939 ; Bryngelsson et al. Molecular Plant-Microbe Interactions (1994)

HvPR1b, acc. X74940; Bryngelsson et al. Molecular Plant-Microbe Interactions (1994)

HvB1,3gluc; acc. AF479647

HvPrx8, acc. AJ276227; Kristensen et al MPP 2001 (see above)

10 HvPAL, acc. X97313 ; Wei,Y.; (1998) Plant Molecular Biology 36, 10 1 - 112.

En otra forma de realización, el mesófilo se caracteriza en que sólo algunos de los promotores están activos, por ejemplo 2, 3, 5 o 7 o más, pero por lo menos uno de los promotores antes mencionados está activo. En una forma de realización, el mesófilo se caracteriza en que todos los promotores antes mencionados están activos en el tejido o la célula.

15 En una forma de realización, todos los promotores mencionados anteriormente están activos en la epidermis de una planta que se utiliza o se genera de acuerdo con la invención o de una planta de acuerdo con la invención en la epidermis y en el mesófilo. En una forma de realización, sólo algunos de los promotores mencionados anteriormente están activos , por ejemplo 2, 5, 7 o más, pero por lo menos uno de los promotores enumerados anteriormente está activo en cada caso.

20 En una forma de realización, la expresión o actividad de la proteína STM1 estomatina o polinucleótido en el mesófilo se reduce por la expresión de una molécula inhibidora bajo el control de un promotor específico del mesófilo, en particular bajo el control de uno de los promotores mencionados anteriormente. Ejemplos de moléculas inhibidoras se enumeran a continuación, por ejemplo, ARNi, ARN antisentido, microARN, cosupresión, anticuerpos y otros procedimientos que son conocidos para el experto. La expresión específica de la epidermis de una molécula inhibidora en el mesófilo es particularmente ventajosa para aumentar la resistencia de una planta a Septoria y / o mohos.

25 En una forma de realización, la expresión o actividad de la proteína STM1 estomatina o polinucleótido en el mesófilo y en la epidermis se reduce por la expresión de moléculas inhibidoras bajo el control de promotores específicos de la epidermis y/o el mesófilo, en particular bajo el control de los promotores mencionados anteriormente. Ejemplos de moléculas inhibidoras se mencionan a continuación, por ejemplo ARNi, ARN antisentido, anticuerpos y otros.

30 "Ácidos nucleicos" significa biopolímeros de nucleótidos que están unidos entre sí mediante enlaces fosfodiéster (polinucleótidos, ácidos polinucleicos). Dependiendo del tipo de azúcar en los nucleótidos (ribosa o desoxirribosa), se distinguen las dos clases de los ácidos ribonucleicos (ARN) y los ácidos desoxirribonucleico (ADN).

35 El término "cultivo" significa todas las partes de las plantas obtenidas por cultivo agrícola de plantas y recogidos en el proceso de recolección.

40 "Resistencia" significa la prevención, el represor, la reducción o el debilitamiento de los síntomas de la enfermedad de una planta como resultado de la infección por un patógeno. Los síntomas pueden ser múltiples, pero preferentemente comprenden aquellos que directa o indirectamente conducen a afectar negativamente a la calidad de la planta, a la cantidad de la producción, a la idoneidad para el uso como alimento o producto alimenticio, o de lo que hacen siembra, cultivo , la cosecha o el procesamiento de la cosecha más difícil.

En una realización preferida, los siguientes síntomas de la enfermedad se debilitan, reducen o previenen: formación de pústulas y hiyemenia sobre las superficies de los tejidos afectados, la maceración de los tejidos, la difusión de necrosis del tejido, acumulación de micotoxinas, por ejemplo de Fusarium graminearum o F. culmorum.

45 "Conferir", "existente", "generador" o "aumentar" significa una resistencia a patógenos que los mecanismos de defensa de una determinada planta o en una parte de una planta, por ejemplo, en un órgano, un tejido, una célula o un órgano, tener un aumento de la resistencia a uno o más patógenos como el resultado de utilizar el procedimiento de acuerdo con la invención en comparación con un control adecuado, por ejemplo el de tipo salvaje de la planta ("planta de control", "planta de partida"), a la que el procedimiento de acuerdo con la invención no se ha aplicado, en condiciones de otro modo idénticas (tales como, por ejemplo, las condiciones climáticas, las condiciones de cultivo, tipo de patógeno y similares). Preferentemente, al menos la epidermis y / o el tejido mesófilo en una planta, o los órganos que tienen una epidermis y / o tejido mesófilo, tienen una mayor resistencia a los

patógenos. Por ejemplo, se aumenta la resistencia en las hojas. En una forma de realización, se incrementa la resistencia en el lema, la palea y / o la glumela (primordio de la antera).

En una forma de realización, la actividad de la proteína de acuerdo con la invención, estomatina STM1, por lo tanto, se reduce en los órganos y tejidos antes mencionados.

5 En este contexto, el aumento de la resistencia preferentemente se manifiesta en una manifestación reducida de los síntomas de la enfermedad, donde los síntomas de la enfermedad, además de los efectos adversos mencionados anteriormente, también comprende, por ejemplo, la eficiencia de penetración de un patógeno en la planta o la célula vegetal, o la eficiencia de proliferación en o sobre la misma. En este contexto, los síntomas de la enfermedad se reducen preferentemente en al menos 10% o al menos 20%, especialmente preferentemente en al menos 40% o 10 60%, muy especialmente preferentemente en al menos 70% o 80%, más preferentemente en al menos 90 % o 95%. Para los fines de la invención, "patógeno" significa organismos cuyas interacciones con una planta conducen a los síntomas de la enfermedad descritos anteriormente; en particular, patógenos significan organismos del Reino de los hongos. Preferentemente, se entiende un patógeno que penetra en las células de la epidermis o del mesófilo, especialmente preferentemente patógenos que penetran en las plantas a través de los estomas y posteriormente 15 penetran en las células del mesófilo. Los organismos que se mencionan preferentemente en este contexto son los de la filos Ascomycota y Basidiomycota. Se prefieren especialmente en este contexto las familias Blumeriaceae, Pucciniaceae, Mycosphaerellaceae e Hypocreaceae.

Especialmente preferidos son los organismos de estas familias que pertenecen a los géneros Blumeria, Puccinia, Fusarium o Mycosphaerella.

20 Muy especialmente preferidos son las especies Blumeria graminis, Puccinia triticina, Puccinia striiformis, Mycosphaerella graminicola, Stagonospora nodorum, Fusarium graminearum, Fusarium culmorum, Fusarium avenaceum, Fusarium poae y Microdochium nivale.

Sin embargo, es de suponer que la reducción en la expresión de Hvestomatina STM1, su actividad o función también provoca una resistencia a otros patógenos. Los cambios en la estructura de la pared celular pueden 25 constituir un mecanismo básico de la resistencia a patógenos, como se muestra, por ejemplo, en Jacobs AK et al. (2003) Plant Cell, 15 (11) :2503-13.

Especialmente preferidos son los Ascomycota, tales como, por ejemplo, Fusarium oxysporum (marchitamiento por fusarium en tomate), Septoria nodorum y Septoria tritici (mancha de la glumela del trigo), Basidiomicetos, tales como, por ejemplo, Puccinia graminis (roya del tallo de trigo, cebada, centeno, avena), Puccinia recondita (roya de la 30 hoja del trigo), Puccinia dispersa (roya de la hoja en el centeno), Puccinia hordei (roya de la hoja de la cebada), Puccinia coronata (roya de la hoja de avena).

En una realización, el procedimiento de acuerdo con la invención conduce a una resistencia en

- cebada al patógeno:
- Puccinia graminis f.sp. hordei (roya del tallo de la cebada),
- 35 • en el trigo a los agentes patógenos:
Fusarium graminearum, Fusarium avenaceum, Fusarium culmorum, Puccinia graminis f.sp. tritici, Puccinia recondita f.sp. tritici, Puccinia striiformis, Septoria nodorum, Septoria tritici, Septoria avenae o Puccinia graminis f.sp. tritici (roya del tallo del trigo),
- en maíz a los agentes patógenos:
40 Fusarium moniliforme var. subglutinans, sorghi Puccinia o Puccinia polysora
- en el sorgo a los agentes patógenos:
Purpurea Puccinia, Fusarium monilifonne, Fusarium graminearum o Fusarium oxysporum,
- en la soja a los patógenos
Phakopsora pachyrhizi y Phakopsora meibromae.

45 En una realización preferida, la invención se refiere a un polipéptido STM1 estomatina que tiene la actividad se muestra en los ejemplos.

En una realización, una proteína STM1 estomatina se entiende que significa una proteína con una homología con una de las secuencias de aminoácidos mostradas en laSEC ID N° 2,

"Cantidad de polipéptido" significa, por ejemplo el número de moléculas, o moles, de estomatina moléculas de

5 polipéptido STM1 en un organismo, un tejido, una célula o un compartimiento celular. "Reducir" la cantidad de polipéptido significa la reducción molar en el número de polipéptidos STM1 estomatina de los que se muestran en la SEC ID N° 2, en un organismo, un tejido, una célula o un compartimiento celular - por ejemplo mediante uno de los procedimientos descritos a continuación, en comparación con un control adecuado, por ejemplo la de tipo salvaje (planta de control) del mismo género y especie a la que no se ha aplicado este procedimiento, en condiciones de otro modo idénticas (tales como, por ejemplo, condiciones de cultivo, edad de las plantas y similares). La reducción en este contexto equivale a por lo menos 5%, preferentemente al menos 10% o al menos 20%, especialmente preferentemente al menos 40% o 60%, muy especialmente preferentemente al menos 70% o 80%, más preferentemente al menos 90% o 99%.

10 La presente invención se refiere además a la generación de una resistencia a los patógenos mediante la reducción de la función o actividad de polipéptido como TOMATIN que comprende las secuencias mostradas en la SEC ID N° 2, o de un homólogo de la misma y / o un polipéptido que tiene una homología de al menos 90% con la anterior, y / o de un equivalente funcional de los polipéptidos anteriormente mencionados.

15 La homología entre dos secuencias de ácidos nucleicos se entiende que significan la identidad de la secuencia de ácido nucleico en cada caso sobre toda la longitud de la secuencia, en una realización preferida sobre toda la longitud de secuencia expresada, preferentemente ADNc, aún más preferentemente sobre la secuencia de codificación, preferentemente CDS, que se calcula por comparación con ayuda del algoritmo de programa GAP (Wisconsin Package Versión 10.0, Universidad de Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, EE.UU.; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res.. 25:3389 ff), estableciendo de los siguientes parámetros:

Peso del hueco: 50	Peso de la longitud: 3
Apareamiento promedio: 10	Error de apareamiento promedio: 0

20 Por ejemplo, una secuencia que tiene una homología de al menos un 90% con la secuencia de la SEC ID N° 1 a nivel de ácido nucleico se entiende que significa una secuencia que, en comparación con la secuencia de la SEC ID N° 1 por el algoritmo de programa anterior con el parámetro anterior fijado, tiene una homología de al menos un 90%.

25 "Identidad entre dos proteínas" se entiende que significa la identidad de los aminoácidos sobre una región de la proteína específica, preferentemente toda la longitud de la proteína, en particular, la identidad que se calcula por comparación con la ayuda de software, por ejemplo el software Lasergene a partir de ADN Star Inc., Madison, Wisconsin (EE.UU.), utilizando los procedimientos de Clustal (Higgins et al., 1989), Comput.Appl.Biosci., 5 (2), 151). Las homologías también se pueden calcular con la ayuda del software Lasergene de ADN Star Inc., Madison, Wisconsin (EE.UU.), utilizando el procedimiento de CLUSTAL (Higgins et al., 1989), Comput.Appl.Biosci., 5 (2), 151).

30 Para las alineaciones mostradas en el presente documento (por ejemplo, como en la figura 4), los parámetros predeterminados de la página [http:// # # # / clustalw /](http://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/unix/clustalw/) Última actualización: 10/17/2005 11:27:35 se usaron con los siguientes programas de FTP DIRECTORIO:

ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/unix/clustalw/:

35 ParClustal 0,1.tar.gz [Nov 28 2001] 823975 .
 ParClustal 0,2.tar.gz [Jun 27 2002] 2652452
 README [Jun 13 2003] 673
 clustalw 1,8.UNIX.tar.gz [Jul 4 1999] 4725425
 clustalw 1,8.mp.tar.gz [May 2 2000] 174859

40 clustalw 1,81.UNIX.tar.gz [Jun 7 2000] 555655
 clustalw 1,82.UNIX.tar.gz [Feb 6 2001] 606683
 clustalw 1,82.mac-osx.tar.gz [Oct 15 2002] 669021
 clustalw 1,83.UNIX.tar.gz [Jan 30 2003] 166863

45 La homología entre dos polipéptidos se entiende preferentemente en el sentido de la identidad de la secuencia de aminoácidos sobre toda la longitud de la secuencia indicada que se calcula por comparación con ayuda del algoritmo de programa GAP (Wisconsin Package Versión 10.0, Universidad de Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, EE.UU.), con los siguientes parámetros:

Peso del hueco: 8

Peso de la longitud: 2

Apareamiento promedio: Error de apareamiento
2,912 promedio:- 2,003

Por ejemplo, una secuencia que tiene una homología de al menos un 90% a nivel de polipéptido con la secuencia de la SEC ID N° 2 se entiende que significa una secuencia que, por comparación con la secuencia de la SEC ID N° 2 por el algoritmo de programa anterior tiene una homología de al menos un 90%.

5 En una forma de realización preferida de la presente invención, la actividad de la proteína estomatina STM1, función o cantidad de polipéptido se reduce en la planta o en una parte de la planta, por ejemplo, en un órgano de planta, tejido de planta, una célula vegetal o de una parte de un célula de la planta, por ejemplo, un orgánulo específico de la planta.

10 Preferentemente, la actividad de los polipéptidos anteriormente mencionados se reduce en las células epidérmicas y / o del mesófilo de una planta como se detalla más arriba.

La actividad de la STM1 estomatina de acuerdo con la SEQ ID No. 2 se reduce en la lema, la palea y / o la glumela.

15 "Epítipo" se entiende que significa las regiones de un antígeno que determinan la especificidad de los anticuerpos (el determinante antigénico). De acuerdo con ello, un epítipo es la porción de un antígeno que realmente entra en contacto con el anticuerpo. Tales determinantes antigénicos son aquellas regiones de un antígeno con las que los receptores de células T reaccionan y, como consecuencia, producen anticuerpos que se unen específicamente el determinante antigénico / epítipo de un antígeno. En consecuencia, los antígenos, o sus epítipos, son capaces de inducir la respuesta inmune de un organismo con la consecuencia de la formación de anticuerpos específicos, que están dirigidos contra el epítipo. Los epítipos consisten por ejemplo de secuencias lineales de aminoácidos en la estructura primaria de las proteínas, o de estructuras de proteínas secundarias o terciarias complejas. Un hapteno se entiende en el sentido de un epítipo que se disocia del contexto del entorno del antígeno. Aunque los haptenos tienen por definición un anticuerpo dirigido contra ellos, los haptenos no son, en ciertas circunstancias, capaces de inducir una respuesta inmune en un organismo, por ejemplo después de una inyección. Para este fin, los haptenos se acoplan con moléculas portadoras. Un ejemplo que se puede mencionar es dinitrofenol (DNP), que, después del acoplamiento a BSA (seroalbúmina bovina) se ha utilizado para la generación de anticuerpos dirigidos contra DNP.
20
25 (Bohn, A., König, W. 1982).

Los haptenos son, por tanto, las sustancias (frecuentemente pequeñas moléculas) que, aunque ellas mismas no activan la respuesta inmune, de hecho desencadenarán una respuesta cuando se acopla a un portador molecular grande.

Los anticuerpos generados de este modo también incluyen los que se puede unir al hapteno como tal.

30 Los anticuerpos pueden usarse para identificar y aislar polipéptidos divulgados de acuerdo con la invención a partir de organismos, preferentemente plantas, especialmente plantas monocotiledóneas de preferencia. Los anticuerpos pueden ser monoclonales, policlonales o sintéticos o bien consistir en fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fv o fragmentos scFv, que se forman por la degradación proteolítica. Los fragmentos Fv de "cadena única" (scFv) son fragmentos de cadena sencilla que, unidos a través de una secuencia de enlazador flexible sólo comprenden las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos. Tales fragmentos scFv también se pueden producir como derivados de anticuerpos recombinantes. Una presentación de tales fragmentos de anticuerpos en la superficie de fagos filamentosos hace posible la selección directa, a partir de bibliotecas de fagos combinatorios, de moléculas de scFv que se unen con alta afinidad.

40 Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener de acuerdo con el procedimiento descrito por Köhler y Milstein (Nature 256 (1975), 495).

La equivalencia funcional se puede determinar por ejemplo mediante la comparación de los fenotipos de los organismos de prueba después de la expresión de los polipéptidos en cuestión, en las condiciones más idénticas posibles, o después de la reducción de la expresión o actividad de los polipéptidos a comparar, en los organismos fuente en cuestión.

45 "Propiedades esencialmente idénticas" de un equivalente funcional significa sobre todo que imparte un fenotipo resistente a patógenos o impartir o aumentar la resistencia a patógenos a al menos un patógeno al reducir la cantidad de polipéptido, actividad o función de dicha proteína funcional estomatina STM1 equivalente en una planta, órgano, tejido, parte o células, en particular en las células de la epidermis o del mesófilo de la misma, medido preferentemente por la eficiencia de penetración de un patógeno, como se muestra en los ejemplos.

50 "Condiciones análogas" significa que todas las condiciones básicas tales como, por ejemplo, de cultivo o las condiciones de crecimiento, condiciones de ensayo (tales como tampones, temperatura, sustratos, la concentración

de patógenos y similares) entre los experimentos para comparar se mantuvieron idénticas y que los parámetros sólo difieren en la secuencia de los polipéptidos STM1 estomatina que deben compararse, por su organismo de origen y, en su caso, por el patógeno. polipéptidos de plantas preferidas descritas en el presente documento. Las secuencias de otras plantas, cuyas las secuencias son homólogas a las secuencias divulgadas de la estomatina STM1, se pueden encontrar fácilmente por ejemplo, mediante la búsqueda de base de datos o mediante el cribado de bibliotecas de genes usando los estomatina STM1 secuencias de proteínas como secuencia de búsqueda o de la sonda.

Los equivalentes funcionales son también moléculas de ácido nucleico que derivan de las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención como se muestra en SEC ID N° 1, por sustitución, inserción o delección y que tienen al menos 90%, especialmente preferentemente al menos 95%, muy especialmente preferentemente al menos 98% de homología con uno de los polinucleótidos de acuerdo con la invención como se muestra en las SEC ID N° 3, 5, 7, 9, 11 o 13 y el código para polipéptidos con propiedades esencialmente idénticos a los polipéptidos como se muestra en las SEC ID N° 15, 16 o 17.

Ejemplos de los equivalentes funcionales de las proteínas STM1 estomatina como se muestra en las SEC ID N° 15, o 17 se dan a conocer que han de reducirse en el procedimiento de acuerdo con la invención se pueden encontrar por comparaciones de homología de bases de datos, a partir de organismos cuya secuencia genómica se conoce.

La selección de bibliotecas de ADNc o bibliotecas genómicas de otros organismos se da a conocer preferentemente de las especies de plantas mencionadas más adelante, que son adecuadas como huéspedes de transformación, usando la secuencia de ácido nucleico descrita en las SEC ID N° o, 3, 5, 7, 9, 11 o 13 o partes de la misma como sonda es también un procedimiento conocido para el experto en la materia para identificar homólogos en otras especies. En este contexto, las sondas derivadas de la secuencia de ácido nucleico como se muestra en las SEC ID N° 1 o, 3, 5 o 1 tienen una longitud de al menos 20 pb, preferentemente al menos 50 pb, especialmente preferentemente al menos 100 pb, muy especialmente preferentemente al menos 200 pb, más preferentemente al menos 400 pb. La sonda también puede tener una longitud de una o más kilobases, por ejemplo, 1 kb, 1,5 kb o 3 kb. Una cadena de ADN que es complementaria a las secuencias descritas en SEC ID N° o, o un fragmento de la misma cadena con una longitud de entre 20 pb y varias kilobases se pueden emplear también para el cribado de las bibliotecas.

En una realización preferida adicional de la presente invención, un aumento en la resistencia en el procedimiento de acuerdo con la invención se consigue por

- (a) la reducción de la expresión de al menos una proteína STM1 estomatina;
- (b) la reducción de la estabilidad de al menos una proteína STM1 estomatina o de las moléculas de ARNm que corresponden a esta proteína STM1 estomatina;
- (c) la reducción de la actividad de al menos una proteína STM1 estomatina;
- (d) la reducción de la transcripción de al menos un gen que codifica la proteína STM1 estomatina mediante la expresión de un factor de transcripción endógeno o artificial; o
- (e) añadiendo, a la comida o al medio, un factor exógeno que reduzca la actividad de la proteína estomatina STM1.

"Expresión génica" y "expresión" se han de entender como sinónimos y significan la media de la realización de la información que se almacena en una molécula de ácido nucleico. La reducción de la expresión de un gen, por tanto, comprende la reducción de la cantidad de polipéptido de la proteína codificada, por ejemplo, del polipéptido STM1 estomatina o de la función de la proteína STM1 estomatina. La reducción de la expresión génica de un gen de la proteína STM1 estomatina se puede realizar de muchas maneras diferentes, por ejemplo por uno de los procedimientos enumerados a continuación.

"Reducción", "que reducir" o "reducir" en el contexto de una proteína STM1 estomatina o estomatina función de la proteína STM1 debe interpretarse en el sentido amplio y comprende la inhibición o bloqueo parcial o esencialmente completa o bloqueo de la funcionalidad de un estomatina STM1 polipéptido en una planta o una parte, tejido, órgano, células o semillas derivadas de las mismas, sobre la base de diferentes mecanismos de células biológicas.

La reducción en el sentido de la invención comprende también una reducción cuantitativa de un polipéptido STM1 estomatina hacia abajo a una ausencia esencialmente completa del polipéptido STM1 estomatina (es decir, falta de detectabilidad de estomatina función de la proteína STM1 o falta de detectabilidad inmunológica de la proteína STM1 estomática). En el presente documento, la expresión de un cierto polipéptido STM1 estomatina o la función de la proteína estomatina STM1 en una célula o un organismo se reduce preferentemente en más de un 50%, especialmente preferible en más de un 80%, muy especialmente preferible en más de un 90%, en comparación con un control adecuado, es decir, a la wildtype del mismo tipo, por ejemplo, del mismo género, especie, variedad, cultivar y similares ("plantas de control"), a la cual no se ha aplicado este procedimiento, en condiciones por lo demás idénticas (tales como, por ejemplo, las condiciones de cultivo, la edad de las plantas y similares).

De acuerdo con la invención, se describen varias estrategias para la reducción de la expresión de una proteína STM1 estomatina o una función de la proteína STM1 estomatina. El experto en la materia reconoce que una serie de otros procedimientos está disponible para influir en la expresión de un polipéptido STM1 estomatina o de la función de la proteína estomatina STM1 de la manera deseada.

- 5 Una reducción en la proteína STM1 estomatina de acuerdo a SEQ ID NO 2 función o estomatina cantidad polipéptido STM1 se logra preferentemente mediante una expresión reducida de un gen de la proteína estomatina STM1 endógena.

Los procedimientos preferidos individuales se describen brevemente a continuación:

10 **a) La introducción de un estomatina bicatenario secuencia de ácido nucleico STM1 proteína ARN (stomatin proteína STM1 dsRNA):**

El procedimiento de la regulación de genes por medio de ARN de doble cadena ("interferencia de ARN de doble cadena"; dsRNAi) ha sido descrito muchas veces para los organismos animales y vegetales (por ejemplo, Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Supresión génica eficiente también se puede demostrar en el caso de la expresión transitoria, o después de la transformación transitoria, por ejemplo como el resultado de una transformación biolística (Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24: 895-903). dsRNAi procesos se basan en el fenómeno de que la introducción simultáneamente la cadena complementaria y counterstrand de un transcrito de gen suprime la expresión del gen correspondiente en una manera altamente eficiente. El fenotipo causado es muy similar a la de un mutante knock-out correspondiente (Waterhouse PM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 95:13959-64).

El procedimiento de dsRNAi ha demostrado ser particularmente eficaz y ventajosa cuando la reducción de la estomatina STM1 expresión de la proteína (WO 99/32619).

Con respecto a las moléculas de ARN de doble cadena, secuencia de la proteína STM1 estomatina ácido nucleico significa preferentemente una de las secuencias como se muestra en la SEC ID N °: 1, 3, 5, 7, 9, 11 o 13, o que codifica una secuencia de consenso como se muestra en SEC ID N°. 15, 16 o 17, o secuencias que son esencialmente idénticos a los que tienen al menos 90% o más de identidad de estos, por ejemplo, aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % o más de identidad de estos, o fragmentos de los mismos con una longitud de al menos 17 pares de bases. "Esencialmente idéntico" significa en el presente documento que la secuencia de dsRNA también puede tener inserciones, deleciones y mutaciones puntuales individuales en comparación con la secuencia diana STM1 proteína estomatina mientras que todavía lograr una reducción eficiente en la expresión. La homología como se define anteriormente es al menos 90%, o aproximadamente el 100%, entre el "sentido" hebra de un dsARN inhibidora y una subsección de una secuencia de proteína STM1 estomatina ácido nucleico (o entre la hebra "antisentido" y la cadena complementaria de una proteína estomatina STM1 secuencia de ácido nucleico). La longitud de la subsección es de aproximadamente 17 bases o más, por ejemplo aproximadamente 25 bases, o aproximadamente 50 bases, aproximadamente 100 bases, aproximadamente 200 bases o aproximadamente 300 bases. Alternativamente, una "esencialmente idéntico" ARNs también se puede definir como una secuencia de ácido nucleico que es capaz de hibridarse en condiciones rigurosas con una parte de un gen de la proteína estomatina STM1 transcripción.

El "antisentido" cadena de ARN, también, puede tener inserciones, deleciones y mutaciones puntuales individuales en comparación con el complemento de la "sentido" cadena de ARN. La homología es de al menos el 90%, o aproximadamente 95%, o aproximadamente el 100%, entre el "antisentido" cadena de ARN y el complemento de la "sentido" cadena de ARN.

"Subsección de la" sentido "transcrito de ARN" de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido STM1 estomatina o un equivalente funcional del mismo significa fragmentos de un ARN o ARNm transcrito por una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido STM1 estomatina o un equivalente funcional de la misma, preferentemente por un gen de la proteína STM1 estomatina. En este contexto, los fragmentos tienen preferentemente una longitud de secuencia de aproximadamente 20 bases o más, por ejemplo aproximadamente 50 bases, o aproximadamente 100 bases, o aproximadamente 200 bases, o aproximadamente 500 bases. También están comprendidas es el ARN transcrito completa o ARNm.

El dsRNA puede constar de una o más hebras de ribonucleótidos polimerizados. Las modificaciones tanto de la cadena principal de azúcar-fosfato y de los nucleósidos también pueden estar presentes. Por ejemplo, los enlaces fosfodiéster del ARN natural, pueden ser modificados de tal manera que comprenden al menos un heteroátomo de nitrógeno o de azufre. Las bases pueden ser modificados de tal manera que la actividad de, por ejemplo, adenosina desaminasa está restringido. Tales y otras modificaciones se describen a continuación en los procedimientos de estabilización de ARN antisentido.

Para lograr el mismo propósito, que es, por supuesto, también posible introducir, en la célula o el organismo, una pluralidad de moléculas de dsRNA individuales, cada uno de los cuales comprende uno de los segmentos de la secuencia de ribonucleótidos definidos anteriormente.

El ARNds se puede preparar enzimáticamente o total o parcialmente por síntesis química.

Si las dos hebras de la dsRNA se van a combinar en una célula o planta, esto se puede lograr de varias maneras:

a) transformación de la célula o planta con un vector que comprende ambos casetes de expresión,

5 b) co-transformación de la célula o planta con dos vectores, donde uno comprende las casetes de expresión con el "sentido" hebra mientras que el otro comprende los casetes de expresión con la cadena "antisentido", y / o

c) la hibridación de dos plantas que han sido transformadas con en cada caso un vector, donde uno comprende los casetes de expresión con el "sentido" hebra, mientras que el otro comprende los casetes de expresión con la cadena "antisentido".

10 La formación del dúplex de ARN puede iniciarse ya sea externa o internamente de la célula. Como se describe en WO 99/53050, El ARNbc puede también comprender una estructura de horquilla, mediante la vinculación de "sentido" y el capítulo "antisentido" por medio de un "enlazador" (por ejemplo un intrón). Se prefieren las estructuras de dsRNA autocomplementary ya que sólo requieren la expresión de un constructo y siempre comprenden las cadenas complementarias en una relación equimolar.

15 Los casetes de expresión que codifican la "antisentido" o "sentido" hebra de un dsRNA o para la cadena autocomplementary del dsRNA se insertan preferentemente en un vector y de manera estable (por ejemplo, utilizando marcadores de selección) insertado en el genoma de una planta utilizando los procedimientos se describe a continuación con el fin de asegurar la expresión permanente del dsRNA.

20 El ARNbc puede introducirse usando una cantidad que haga posible al menos una copia por célula. Cantidades más altas (por ejemplo, al menos 5, 10, 100, 500 o 1.000 copias por célula) puede hacer que, en su caso, una reducción más eficiente.

25 Con el fin de lograr una reducción eficiente en la estomatina STM1 expresión de la proteína, 100% de identidad de secuencia entre dsRNA y un estomatina STM1 gen de la proteína transcripción o la transcripción génica de un gen funcionalmente equivalente no se requiere necesariamente. Por consiguiente, existe la ventaja de que el procedimiento tolera desviaciones de secuencia, ya que pueden existir como el resultado de mutaciones genéticas, polimorfismos o divergencias evolutivas. El gran número de residuos de aminoácidos altamente conservados entre diferentes estomatina STM1 secuencias de proteínas de diferentes plantas, como se muestra en las figuras con referencia a las secuencias de consenso, permite la conclusión de que este polipéptido es altamente conservadas dentro de las plantas, de manera que la expresión de un dsARN derivado de uno de los estomatina STM1 secuencias de proteínas descritas como se muestra en la SEC ID N °: o también debe tener un efecto ventajoso en otras especies de plantas.

30 Como resultado de la gran cantidad de residuos conservados y de la homología entre los polipéptidos STM1 estomatina individuales y sus equivalentes Funcional, también puede ser posible suprimir la expresión de polipéptidos adicionales STM1 estomatina homóloga y / o sus equivalentes funcionales del mismo organismo, o bien la expresión de polipéptidos STM1 estomatina en otras especies, relacionadas, utilizando una única secuencia de ARN de doble cadena que se ha generado a partir de una secuencia específica estomatina proteína STM1 de un organismo. Para este propósito, el ARNbc comprende preferentemente las regiones de secuencia de estomatina STM1 transcripciones de genes de proteínas que corresponden a regiones conservadas. Dichas regiones conservadas pueden derivarse fácilmente a partir de alineamientos de secuencias, por ejemplo como se muestra en las figuras. Se prefiere para derivar secuencias de ARN de doble cadena a partir de las regiones conservadas de la secuencia de consenso que se muestran en las figuras.

35 Un dsRNA puede ser sintetizada químicamente o enzimáticamente. Para este fin, es posible utilizar ARN polimerasas celulares o polimerasas de bacteriófagos de ARN (tales como, por ejemplo, T3, T7 o SP6 ARN polimerasa). Los procedimientos adecuados para la *in vitro* expresión de ARN se describen (WO 97/32016; US 5,593,874; US 5,698,425, US 5,712,135, US 5,789,214, US 5,804,693). Un dsRNA que ha sido sintetizado químicamente o enzimáticamente *in vitro* puede ser purificado a partir de la mezcla de reacción totalmente o en parte, por ejemplo, por extracción, precipitación, electroforesis, cromatografía o combinaciones de estos procedimientos, antes de que se introduce en una célula, tejido u organismo. El ARNbc puede introducirse en la célula directamente o bien aplicado extracelularmente (por ejemplo en el espacio intersticial).

40 Sin embargo, se prefiere para transformar la planta de manera estable con un constructo de expresión que se da cuenta de la expresión del ARN de doble cadena. Los procedimientos adecuados se describen en lo que sigue.

b) Introducción de una secuencia de ácido nucleico antisentido proteína STM1 estomatina

45 Procedimientos de la supresión de un cierto polipéptido mediante la prevención de la acumulación de su ARNm por medio de la tecnología "antisentido" se han descrito muchas veces, incluyendo en las plantas (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 85: 8.805 a 8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268 (2) :427-430). La molécula de ácido nucleico antisentido se hibrida con, o se une a, el ARNm celular y / o ADN genómico que codifica

el polipéptido diana calosa sintasa que ser suprimida. La transcripción y / o traducción del polipéptido diana se suprimen de esta manera. La hibridación puede llevarse a cabo de una manera tradicional a través de la formación de un dúplex estable o, en el caso de ADN genómico, mediante la unión de la molécula de ácido nucleico antisentido para el dúplex de ADN genómico como el resultado de la interacción específica en el gran surco de la hélice de ADN. Una molécula de ácido nucleico antisentido adecuado para la reducción de un polipéptido STM1 estomatina puede derivarse usando la secuencia de ácido nucleico que codifica este polipéptido, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención como se muestra en la SEC ID N °. Oror una molécula de ácido nucleico que codifica un equivalente funcional de la misma después de Watson y las reglas de apareamiento de bases de Crick. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementario a todo el ARNm transcrito de dicho polipéptido, estar limitado a la región de codificación o de lo contrario sólo consistir en un oligonucleótido que es complementaria a parte de la secuencia codificante o no codificante del ARNm. Así, por ejemplo, el oligonucleótido puede ser complementario a la región que comprende el inicio de la traducción de dicho polipéptido. Moléculas de ácido nucleico antisentido puede tener una longitud de, por ejemplo, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos, pero también pueden ser más largos y comprenden 100, 200, 500, 1000, 2000 o 5000 nucleótidos. Moléculas de ácido nucleico antisentido se pueden expresar de manera recombinante o sintetizarse química o enzimáticamente, usando procedimientos conocidos por el experto en la materia. En el caso de la síntesis química, se pueden utilizar nucleótidos naturales o modificados. Los nucleótidos modificados pueden impartir un aumento de la estabilidad bioquímica de la molécula de ácido nucleico antisentido y conducir a un aumento de la estabilidad física del dúplex formado de secuencia de ácido nucleico antisentido y sentido secuencia diana. Ejemplos que se pueden usar son derivados de fosforo-tioato y nucleótidos de acridina-sustituido tal como 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5 - (carboxyhydroxymethyl) uracilo, 5 - carboxymethylaminomethyl-2-tiouridina, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihidouracilo, β -D-galactosylqueosine, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilamino-metiluracilo, 5-methoxyaminomethyl-2-tiouracilo, β -D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-metil-N6-isopenteniladenina, uracilo -5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracilo-5-oxiacético, 5-uracilo-oxiacético, 5-metil-2-tiouracilo, 3 - (3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo y 2,6-diaminopurina.

En una forma de realización preferida adicional, la expresión de un polipéptido STM1 estomatina puede ser inhibida por moléculas de ácidos nucleicos que son complementarios a una región conservada (por ejemplo, una región que se ha conservado como se describió anteriormente) o a una región reguladora de una proteína STM1 estomatina gen (por ejemplo, un estomatina STM1 promotor de la proteína y / o potenciador) y que forman estructuras de triple hélice con la doble hélice de ADN en la misma, de modo que la transcripción del gen de la proteína estomatina STM1 se reduce. Los procedimientos adecuados se han descrito (Helene C (1991) *Anticancer Drug Res.* 6 (6): 569-84; Helene C et al. (1992) *Ann NY Acad Sci* 660:27-36; Maher LJ (1992) *Los bioensayos* 14 (12): 807-815).

En una realización adicional, la molécula de ácido nucleico antisentido puede ser un ácido nucleico α -anomérico. Tales moléculas de ácido nucleico- α anomérica forman híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en el que - a diferencia de los ácidos- β nucleico convencionales - las dos cadenas corren en paralelo entre sí (Gautier C et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido puede comprender también, además, 2'-O-metilribonucleótidos (Inoue et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) o análogos de ARN-ADN quimérico (Inoue et al. (1987) *FEBS Lett* 215:327-330).

c) Introducción de un ribozima que específicamente, por ejemplo catalíticamente, escinde las moléculas de ácidos ribonucleicos que codifican la proteína STM1 estomatina.

Moléculas de ARN catalíticas o ribozimas se pueden adaptar a cualquier ARN objetivo y escinden el esqueleto de fosfodiéster en posiciones específicas, por lo que el ARN diana se desactiva funcionalmente (Tanner NK (1999) *FEMS Microbiol Rev* 23 (3) :257-275). Como resultado, la ribozima no se modifica en sí, pero es capaz de escindir otras moléculas de ARN destino de manera análoga, con lo que obtiene las características de una enzima.

De esta manera, es posible utilizar ribozimas (por ejemplo, ribozimas de cabeza de martillo; Haselhoff y Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591) Con el fin de escindir el mRNA de una enzima a ser suprimida, por ejemplo calosa sintasas, y para prevenir la traducción. Procedimientos de expresión de ribozimas para reducir ciertos polipéptidos se describen en (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). Una expresión de ribozima también se ha descrito en las células vegetales (Steinecke P et al. (1992) *EMBO J.* 11 (4) :1525-1530; De Feyter R et al. (1996) *Mol Gen Genet.* 250 (3) :329-338). Las ribozimas pueden ser identificados a partir de una biblioteca de diversas ribozimas a través de un proceso de selección (Bartel y Szostak D JW (1993) *Science* 261:1411-1418). Preferentemente, las regiones de unión de la ribozima se hibridan con las regiones conservadas de la proteína STM1 estomatina como se describió anteriormente.

d) Introducción de una secuencia de ácido nucleico antisentido proteína STM1 estomatina en combinación con una ribozima.

La estrategia antisentido se describe anteriormente, ventajosamente, puede ser acoplado con un procedimiento de ribozima. La incorporación de secuencias de ribozima en ARN "antisentido" imparte esta enzima-como, ARN de

escisión característico precisamente a estos ARN antisentido y aumenta así su eficiencia en la inactivación del ARN diana. La preparación y uso de ribozimas "antisentido" moléculas de ARN adecuado se describe, por ejemplo, en Haselhoff et al. (1988) Nature 334: 585-591.

5 La tecnología de ribozima puede aumentar la eficiencia de una estrategia antisentido. Secuencias diana adecuados y ribozimas se pueden determinar, por ejemplo, como se describe en "Steinecke P, ribozimas, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), p.449-460", Mediante el cálculo de la estructura secundaria de ARN de ribozima y ARN diana y por su interacción (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol.18 (2) :353-361; Lloyd AM y Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet.242 (6) :653-657). Por ejemplo, es posible construir derivados de la Tetrahymena L-19 IVS ARN que los derivados tienen regiones complementarias con el ARNm de la proteína STM1
10 estomatina a ser suprimida (véase también US 4,987,071 y US 5,116,742).

e) Introducción de una secuencia de ácido nucleico estomatina STM1 sentido proteína para inducir una cosupresión

15 La expresión de una secuencia de ácido nucleico de proteína STM1 estomatina en orientación de sentido puede conducir a una co-supresión de la correspondiente homóloga, el gen endógeno. La expresión de RNA de sentido con homología a un gen endógeno puede reducir o anular la expresión de la antigua, similar a lo que se ha descrito para los enfoques antisentido (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol Biol 31 (5) :957-973; Goering et al. (1991) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). En el presente documento, la construcción introducida puede
20 representar el gen homólogo a ser reducida ya sea totalmente o sólo en parte. No se requiere la posibilidad de la traducción. La aplicación de esta tecnología a las plantas se describe por ejemplo en Napoli et al. (1990) The Plant Cell 2: 279-289y en US 5,034,323.

25 La cosupresión se realiza preferentemente usando una secuencia que es esencialmente idéntica a al menos parte de la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína STM1 estomatina o un equivalente funcional de la misma, por ejemplo, de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, por ejemplo de la nucleico secuencia de ácido como se muestra en SEC ID N° 13 o, o de la secuencia de ácido nucleico que codifica un equivalente funcional de la misma.

f) Introducción de secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína STM1 estomatina dominante negativo.

30 La actividad de una proteína STM1 estomatina puede probablemente también ser realizado mediante la expresión de una variante dominante negativa de esta proteína STM1 estomatina. Procedimientos de reducción de la función o actividad de un polipéptido por medio de la coexpresión de su forma dominante-negativo son conocidos por el experto en la materia (Lagna G y Hemmati-Brivanlou A (1998) Current Topics in Developmental Biology 36:75-98; Perlmutter RM und Alberola-Ila J (1996) Current Opinion in Immunology 8 (2): 285-90; Sheppard D (1994) American Journal of Respiratory Celular y Biología Molecular.11 (1) :1-6; Herskowitz I (1987) Nature 329 (6136): 219-22).

35 Un estomatina STM1 variante de la proteína negativa dominante puede llevarse a cabo por ejemplo mediante la alteración de residuos de aminoácidos que son parte de la STM1 estomatina y, como resultado de su mutación, el polipéptido pierde su función. Los residuos de aminoácidos que son preferentemente para ser mutado son los que se conservan en las proteínas STM1 estomatina de diferentes organismos. Tales regiones conservadas se pueden determinar por ejemplo por medio de la comparación asistida por ordenador ("alineación"). Estas mutaciones para la
40 obtención de un estomatina STM1 variante de la proteína dominante negativo se llevan a cabo preferentemente a nivel de la secuencia de ácido nucleico que codifica proteínas STM1 estomatina. Una mutación adecuada se puede realizar por ejemplo por mediada por PCR *in vitro* mutagénesis usando los cebadores de oligonucleótidos apropiados, por medio de la cual se introduce la mutación deseada. Procedimientos que son conocidos para el experto se utilizan para este propósito. Por ejemplo, la "LA PCR in vitro Mutagenesis Kit" (Takara Shuzo, Kyoto) se
45 puede utilizar para este propósito.

g) Introducción de estomatina STM1 genes de proteínas, ARN o factores de unión al polipéptido.

Una reducción de un estomatina STM1 proteína de la expresión de genes también es posible el uso de factores de unión al ADN específicas, por ejemplo, utilizando factores de tipo factor de transcripción de dedo de cinc. Estos factores se unen a la secuencia genómica del gen diana endógeno, preferentemente en las regiones reguladoras, y
50 llevar a cabo una represión del gen endógeno. El uso de un procedimiento de este tipo hace posible la reducción de la expresión de un gen de la proteína estomatina STM1 endógena sin que sea necesario para manipular de forma recombinante la secuencia de este último. Los procedimientos adecuados para la preparación de los factores adecuados se describen (Dreier B et al. (2001) J. Biol. Chem. 276 (31) :29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol. 303 (4) :489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 97 (4): 1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J. Biol. Chem. 275 (42) :32617-32627; Segal DJ y Barbas CF tercero.(2000) Curr Opin Chem Biol. 4 (1) :34-39; Kang JS y Kim JS (2000) J Biol Chem. 275 (12) :8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 95 (25) :14628-14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 94 (8): 3.616-3.620; Klug A (1999) J Mol Biol. 293 (2) :215-218; Tsai SY et al. (Deliv 1998) Adv Drogas Rev 30 (1-3) :23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci EE.UU.

97 (8) :3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) *Int J Biochem Cell Biol.* 29 (12) :1371-1387; Zhang L et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275 (43) :33850-33860).

La selección de estos factores se puede lograr usando una porción adecuada de un gen de la proteína STM1 estomatina. Este segmento se encuentra preferentemente en la región de la región promotora. Sin embargo, para el propósito de la supresión de un gen, que también puede ser situado en la región de los exones o intrones de codificación. Los segmentos correspondientes pueden obtenerse por el experto en la materia por medio de la búsqueda de base de datos de la biblioteca de genes o, a partir de un ADNc de la proteína estomatina STM1 cuyo gen no está presente en la biblioteca de genes, mediante el cribado de una biblioteca genómica para clones genómicos correspondiente. Los procedimientos requeridos para este propósito son conocidos por el experto en la materia.

Además, es posible introducir, en una célula, factores que a su vez inhiben la STM1 polipéptido diana proteína estomatina. Los factores de unión al polipéptido puede ser, por ejemplo, los aptámeros (Famulok M y Mayer G (1999) *Curr Top Microbiol Immunol* 243:123-36) o anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. La preparación de estos factores se describe y se conoce por el especialista. Por ejemplo, un anticuerpo scFv citoplasmático se ha empleado para la modulación de la actividad de la proteína del fitocromo A en plantas de tabaco modificadas de manera recombinante (Owen M et al. (1992) *Biotechnología (NY)* 10 (7) :790-794; Franken E et al. (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8 (4) :411-416; Whitelam (1996) *Tendencia Plant Sci.* 1:286-272).

La expresión de genes también se puede suprimirse por, compuestos sintéticos de bajo peso molecular a medida, por ejemplo del tipo de poliamida (Dervan PB y Bürlí RW (1999) *Current Opinion in Chemical Biology* 3:688-693; Gottesfeld JM et al. (2000) *Gene Expr* 9 (1-2) :77-91). Estos oligómeros se componen de las unidades de 3 - (dimetilamino) propilamina, N-metil-3-hidroxipirrol, N-metilimidazol y N-metilpirrol y se pueden adaptar a cada segmento de ADN de doble cadena de tal manera que se unen en el mayor grupo de una manera específica de secuencia y bloquear la expresión de las secuencias de genes en la misma. Los procedimientos adecuados se describen (véanse, en particular, Bremer RE et al. (2001) *Bioorg Med Chem.* 9 (8) :2093-103; Ansari AZ et al. (2001) *Chem. Biol.* 8 (6) :583-92; Gottesfeld JM et al. (2001) *J Mol Biol.* 309 (3) :615-29; Wurtz NR et al. (2001) *Org Lett* 3 (8) :1201-3; Wang CC et al. (2001) *Bioorg Med Chem.* 9 (3) :653-7; Urbach AR y Dervan PB (2001) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 98 (8) :4343-8; Chiang SY et al. (2000) *J Biol Chem.* 275 (32) :24246-54).

h) Introducción de las moléculas de ácidos nucleicos virales y construcciones de expresión que dan lugar a la degradación de la proteína estomatina STM1 ARN.

El estomatina STM1 expresión de la proteína también se puede realizar de manera eficiente por la inducción de la estomatina STM1 proteína degradación específica de ARN por la planta con la ayuda de un sistema de expresión viral (Amplikon) (Angell, SM et al. (1999) *Plant J.* 20 (3) :357-362). Estos sistemas - también se hace referencia como "VIGS" (inducida por virus de silenciamiento génico) - introducen, por medio de vectores virales, secuencias de ácido nucleico con homología con las transcripciones que ser suprimida en la planta. La transcripción se canceló luego, probablemente mediada por mecanismos de defensa de las plantas contra los virus. Se describen técnicas y procedimientos adecuados (Ratcliff F et al. (2001) *Plant J* 25 (2) :237-45; Fagard M y Vaucheret H (2000) *Plant Mol Biol* 43 (2-3) :285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 95 (22) :13079-84; Celular Ruiz MT (1998) *Plant* 10 (6) :937-46).

Los procedimientos de la dsRNAi, de co-supresión por medio de ARN sentido y de "VIGS" ("silenciamiento génico inducido por virus") también se les conoce como "post-transcripcional silenciamiento génico" (PTGS). Procedimientos de PTGS son particularmente ventajosas debido a que las demandas de la homología entre el gen endógeno que ser suprimida y el sentido expresado de forma recombinante o secuencia de ácido nucleico de dsRNA son menos estrictas que, por ejemplo, en un enfoque antisentido tradicional. Se mencionan criterios de homología adecuados en la descripción del procedimiento de dsRNAi y en general se pueden aplicar a procedimientos de PTGS o enfoques dominantes negativos. Como el resultado de la alto grado de homología entre las proteínas STM1 estomatina de maíz, trigo, arroz y cebada, se puede concluir que este polipéptido está altamente conservada en las plantas. Por lo tanto, es probable que sea también posible, el uso de las moléculas de proteína STM1 estomatina de ácido nucleico tal como se muestran en el presente documento, en particular, por medio de las moléculas de ácido nucleico que se derivan de las secuencias de consenso, o bien por ejemplo a partir de las moléculas de ácido nucleico de *Arabidopsis*, la cebada, el maíz o el arroz, también de manera eficiente para suprimir la expresión de polipéptidos STM1 estomatina homólogas en otras especies, sin el aislamiento y la elucidación de la estructura de los estomatina STM1 homólogos de proteínas que se encuentran en estas especies es obligatoria. Esto simplifica sustancialmente la mano de obra requerida.

i) Introducción de una construcción de ácido nucleico adecuada para la inducción de una recombinación homóloga en genes que codifican proteínas STM1 estomatina, por ejemplo para la generación de mutantes knockout.

Para generar un organismo homológamente recombinante con estomatina reducida función de la proteína STM1, uno utiliza, por ejemplo, una construcción de ácido nucleico que comprende al menos parte de un gen endógeno estomatina proteína STM1 que está modificado por una delección, adición o sustitución de al menos un nucleótido,

por ejemplo, en las regiones conservadas, de tal manera que la funcionalidad se reduce o totalmente anulada.

Por ejemplo, la estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria puede ser interrumpido, por ejemplo de tal manera que la capacidad de unión, o la capacidad de regulación, de la proteína de dominio citoplásmico o la integración de la proteína en la membrana ya no existe ni se perturbado, en particular reducida. Tal interrupción se puede lograr, por ejemplo, por la mutación de uno o más residuos que se indican en la secuencia de consenso como está conservada o altamente conservada.

La modificación también puede referirse a los elementos reguladores (por ejemplo el promotor) del gen, de manera que la secuencia de codificación permanece inalterada, pero que la expresión (transcripción y / o traducción) no tiene lugar y se reduce.

En el caso de la recombinación homóloga convencional, la región modificada está flanqueada en sus extremos 5' y 3' terminal por otras secuencias de ácido nucleico que deben ser de longitud suficiente para hacer posible la recombinación. Como regla general, la longitud se encuentra en el intervalo de varios cientos o más bases hasta varias kilobases (Thomas KR y Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 95 (8): 4368-4373). Para llevar a cabo la recombinación homóloga, el organismo huésped - por ejemplo una planta - es transformada con el constructo de recombinación utilizando los procedimientos descritos en lo que sigue, y los clones que han sufrido recombinación con éxito se seleccionan utilizando por ejemplo una resistencia a antibióticos o herbicidas.

j) La introducción de mutaciones en genes de la proteína endógena estomatina STM1 para generar una pérdida de la función (por ejemplo, generación de codones de terminación, los cambios de marco de lectura y similares)

Además los procedimientos adecuados para la reducción de la función de la proteína STM1 estomatina son la introducción de mutaciones sin sentido en estomatina endógena STM1 genes de la proteína, por ejemplo por medio de la generación de mutantes knockout con la ayuda de, por ejemplo, mutagénesis de ADN-T (Koncz et al. (1992) Plant Mol Biol 20 (5) :963-976), ENU (N-etil-N-nitrosourea) - mutagénesis o recombinación homóloga (Hohn B y Puchta (1999) H Proc Natl Acad Sci EE.UU. 96:8321-8323.) O mutagénesis ccsme (Birchler JA, Schwartz D. Biochem Genet. 1979 diciembre, 17 (11-12) :1173-80; Hoffmann GR. Mutat Res. 1980 Jan; 75 (1) :63-129). Las mutaciones puntuales también pueden ser generados por medio de oligonucleótidos híbridos ADN-ARN, que también se conocen como "quimeroplastia" (Zhu et al. (2000) Nat. Biotechnol 18 (5) :555-558, Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res. 27 (5): 1323-1330; Kmiec (1999) La terapia génica American Scientist 87 (3) :240-247).

La célula-o reducción específica de tejido en la actividad de un STM1 estomatina se pueden efectuar por ejemplo mediante la expresión de un constructo adecuado, que, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico antes mencionado, por ejemplo el ARN antisentido, ARN de doble cadena, ARNi, ribozimas, con un promotor específico de tejido adecuado, por ejemplo un promotor como se describe en el presente documento como específico para epidermis o mesófilo.

Para los fines de la presente invención, "mutaciones" significa la modificación de la secuencia de ácido nucleico de una variante del gen en un plásmido o en el genoma de un organismo. Las mutaciones pueden surgir, por ejemplo, como resultado de errores en la replicación, o pueden ser causados por mutágenos. Mientras que la tasa de mutación espontánea en el genoma de la célula de los organismos es muy bajo, el experto está familiarizado con una multiplicidad de factores biológicos, químicos o mutágenos físicos.

Las mutaciones comprenden sustituciones, adiciones, deleciones de uno o más residuos de ácido nucleico. Las sustituciones se entienden el intercambio de bases de ácidos nucleicos individuales; se distingue entre las transiciones (de sustitución de una base de purina para una base de purina, o de una base de pirimidina para una base de pirimidina) y transversiones (de sustitución de una base de pirimidina para una base de purina (o viceversa)).

Las adiciones o inserciones se entienden en el sentido de la incorporación de residuos de ácido nucleico adicionales en el ADN, siendo posible para dar como resultado cambios de marco de lectura. En el caso de tales cambios lectura-marco, se distingue entre "in-frame" inserciones / adiciones e inserciones "fuera de cuadro". En el caso de los "en-marco" inserciones / adiciones, el marco de lectura se conserva, y un polipéptido que está ampliada por el número de los aminoácidos codificados por los ácidos nucleicos insertados resultados. En el caso de inserciones / adiciones "fuera de cuadro", el marco de lectura original se ha perdido, y la formación de un polipéptido completo y funcional ya no es posible.

Las supresiones describen la pérdida de uno o más pares de bases, que también conducen a la lectura o los cambios de marco "en marco", "fuera del marco" y las consecuencias que ello conlleva en cuanto a la formación de una proteína intacta.

Los agentes mutagénicos (mutágenos) que pueden utilizarse para generar mutaciones aleatorias o específicas del lugar, así como los procedimientos y técnicas que se pueden aplicar, son conocidos por el especialista. Tales procedimientos y mutágenos se describen por ejemplo en AM van Harten [(1998), "cría Mutación: teoría y

aplicaciones prácticas", Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido], E Friedberg, G Walker, W Siede [(1995), "Reparación de ADN y mutagénesis", Blackwell Publishing], O K. Sankaranarayanan, JM gentiles, LR Ferguson [(2000) "Los protocolos de mutagénesis", Elsevier Health Sciences].

5 Procedimientos y procesos de biología molecular habituales, tales como el kit de mutagénesis in vitro, LA PCR in vitro Mutagénesis Kit (Takara Shuzo, Kyoto), o mutagénesis de PCR usando cebadores adecuados se pueden emplear para la introducción de mutaciones específicas del sitio.

Como ya se ha mencionado anteriormente, existe una multiplicidad de mutágenos químicos, físicos y biológicos.

10 Mutágenos químicos se pueden distinguir por su mecanismo de acción. Por lo tanto, no son análogos de base (por ejemplo, 5-bromouracilo, 2-aminopurina), agentes de mono-y alquilantes bifuncionales (por ejemplo agentes monofuncionales tales como ethylmethylsulfonate, sulfato de dimetilo, o agentes bifuncionales tales como dicloroetilo sulfito, mitomicina, nitrosoguanidina-dialkylnitrosamine, derivados de N-nitrosoguanidina) o sustancias intercalantes (por ejemplo acridina, bromuro de etidio).

15 Mutágenos físicos son, por ejemplo, la radiación ionizante. La radiación ionizante es radiación de ondas electromagnéticas o de partículas capaces de moléculas ionizantes, es decir, de la eliminación de electrones de este último. Los iones restantes son altamente reactivos en la mayoría de los casos, de modo que, si se generan en el tejido vivo, son capaces de causar un gran daño, por ejemplo, para el ADN, y (a baja intensidad) mutaciones induciendo de ese modo. La radiación ionizante es, por ejemplo, la radiación gamma (energía foto de aproximadamente un megaelectron voltios MeV), rayos X (energía foto de una pluralidad de o muchos voltios kiloelectron keV) o de lo contrario la luz ultravioleta (luz UV, la energía de fotones de arriba 3.1 eV). Luz UV provoca la formación de dímeros entre las bases; con dímeros de timidina, que dan lugar a mutaciones, siendo la más frecuente en el presente documento.

25 La generación tradicional de mutantes mediante el tratamiento de las semillas con agentes mutagénicos tales como, por ejemplo, ethylmethylsulfonate (EMS) (Birchler JA, Schwartz D. Biochem Genet. 1979 diciembre, 17 (11-12) :1173-80; Hoffmann GR. Mutat Res. 1980 Jan; 75 (1) :63-129) O la radiación ionizante se han unido a la utilización de mutágenos biológicos, por ejemplo, los transposones (por ejemplo Tn5, Tn903, Tn916, Tn1000, Balcells et al., 1991, Mayo BP et al. (2003) Proc Natl Acad Sci EE.UU.. 30 de septiembre, 100 (20) :11541-6.) O procedimientos de biología molecular tales como la mutagénesis por medio de inserción de T-ADN (Feldman, KA Plant J. 1:71-82. 1991, Koncz et al. (1992) Plant Mol Biol 20 (5) :963-976).

30 Se prefiere el uso de mutágenos químicos o biológicos para la generación de variantes de genes mutados. En el caso de los agentes químicos, la generación de mutantes mediante la aplicación de mutagénesis con EMS (ethylmethylsulfonate) se menciona por preferencia particular. En el caso de la generación de mutantes usando mutagénesis biológica, la mutagénesis de ADN-T o mutagénesis de transposón se puede mencionar por preferencia.

Por lo tanto, también es posible emplear los polipéptidos para el procedimiento de acuerdo con la invención, que se obtienen como resultado de una mutación de un polipéptido de acuerdo con la invención.

35 Todas las sustancias y compuestos que aportan directamente o indirectamente una reducción en la cantidad de polipéptido, la cantidad de ARN, la actividad del gen o la actividad del polipéptido de una proteína STM1 estomatina se resumirán a continuación en el presente documento bajo el término "compuestos proteicos anti-estomatina STM1" compuestos proteicos anti-estomatina STM1". El término "compuesto proteico anti-estomatina STM1" incluye explícitamente las secuencias de ácidos nucleicos, péptidos, proteínas u otros factores que se emplean en los procedimientos descritos anteriormente.

En una forma de realización preferida adicional de la presente invención, un aumento de la resistencia a los patógenos de las familias Blumeriaceae, Pucciniaceae, Mycosphaerellaceae e Hypocreaceae en una planta monocotiledónea o dicotiledónea o un órgano, tejido o una célula de la misma, se obtiene mediante:

- 45 a) la introducción, en una célula vegetal, de un casete de expresión recombinante que comprende un "compuesto proteico anti-estomatina STM1" en unión operativa con un promotor que está activo en las plantas;
- b) regeneración de la planta a partir de la célula vegetal; y
- 50 c) la expresión de dicho "compuesto proteico anti-estomatina STM1" en una cantidad suficiente y durante un período suficientemente largo como para generar, o para aumentar, una resistencia a patógenos en dicha planta.

Por ejemplo, con respecto a una secuencia de ácido nucleico, un casete de expresión o un vector que comprende dicha secuencia de ácido nucleico o un organismo transformado con dicha secuencia de ácido nucleico, casete de expresión o vector, "transgénico" significa todas las construcciones u organismos que son el resultado de procedimientos recombinante y en los que:

- a) la secuencia de ácido nucleico de la proteína STM1 estomatina, o
- b) una secuencia de control genético que está unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico de la proteína STM1 estomatina, por ejemplo un promotor, o
- c) (a) y (b)

5 no están en su ambiente genético natural o se han modificado por procedimientos recombinantes, siendo posible que la modificación sea por ejemplo una sustitución, adición, delección o inserción de uno o más residuos de nucleótidos. Ambiente genético natural significa el locus cromosómico natural en el organismo original, o bien 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 preferentemente, al menos en parte. El ambiente flanquea la secuencia de ácido nucleico al menos en un lado y tiene una longitud de secuencia de al menos 50 pb, preferentemente al menos 500 pb, especialmente preferentemente al menos 1000 pb, muy especialmente preferentemente al menos 5000 pb. Un casete de expresión de origen natural, por ejemplo la combinación de origen natural del promotor de la proteína estomatina STM1 con el gen de la proteína estomatina STM1 correspondiente, se convierte en un casete de expresión transgénico cuando el último se modifica mediante procedimientos sintéticos no naturales ("artificiales"), tales como, por ejemplo, tratamiento con un mutágeno. Los procedimientos adecuados se describen (documentos US 5,565,350; WO 00/15815).

Para los fines de la invención, "introducción" comprende todos aquellos procedimientos que son adecuados para la introducción de un "compuesto proteico anti-estomatina STM1" directa o indirectamente en una planta o en una célula, compartimiento, tejido, órgano o semillas de la misma, o para la generación de un compuesto de este tipo en el mismo. Comprende procedimientos directos e indirectos. La introducción puede dar lugar a una presencia transitoria de un "compuesto proteico anti-estomatina STM1" (por ejemplo de un ARN de doble cadena), o bien a una presencia estable.

Como resultado de la diferente naturaleza de los enfoques descritos anteriormente, el "compuesto proteico anti-estomatina STM1" puede ejercer su función directamente (por ejemplo, por inserción en un gen de la proteína estomatina STM1 endógeno). Sin embargo, la función también puede ejercerse indirectamente después de la transcripción en un ARN (por ejemplo, en el caso de los enfoques antisentido) o después de la transcripción y la traducción en una proteína (por ejemplo, en el caso de los factores de unión). Los "compuestos anti-callosa sintasa" que actúan tanto directa como indirectamente están comprendidos de acuerdo con la invención.

"Introducción" comprende, por ejemplo, procedimientos tales como transfección, transducción o transformación.

30 Por lo tanto, "compuesto anti-estomatina STM1" también comprende, por ejemplo construcciones de expresión recombinantes que producen una expresión (es decir, la transcripción y, en su caso, la traducción) de, por ejemplo, un ARNs de la proteína estomatina STM1 o ARN "antisentido" de la proteína estomatina STM1 estomatina, preferentemente, en una planta o en una parte, tejido, órgano o semilla de la misma.

35 En dichas construcciones/casetes de expresión, una molécula de ácido nucleico cuya expresión (transcripción y, en su caso, la traducción) genera un "compuesto proteico anti-estomatina STM1" está preferentemente en unión operativa con al menos un elemento de control genético (por ejemplo un promotor) que asegura una expresión en plantas. Si la construcción de expresión se va a introducir directamente en la planta y el "compuesto proteico anti-estomatina STM1" (por ejemplo el ARNs de la la proteína STM1 estomatina se va a generar en él *in planta*, se prefieren los elementos de control genético específicos de la planta (por ejemplo, promotores). Sin embargo, el "compuesto proteico anti-estomatina STM1" también pueden generarse en otros organismos o *in vitro* y luego introducirse en la planta. En el presente documento, se prefieren todos los elementos de control genético procariontas o eucariotas (por ejemplo, promotores) que permiten la expresión en la planta respectiva que se ha elegido para la generación.

45 Se entiende que una unión "operable" significa, por ejemplo, la disposición secuencial de un promotor con la secuencia de ácido nucleico a expresar (por ejemplo, un "compuesto proteico anti-estomatina STM1") y, si es apropiado, otros elementos reguladores, tales como, por ejemplo, un terminador de tal manera que cada uno de los elementos reguladores es capaz de cumplir su función en la expresión transgénica de la secuencia de ácido nucleico, dependiendo de la disposición de las secuencias de ácido nucleico con respecto al ARN sentido o antisentido. Una vinculación directa en el sentido químico no necesariamente se requiere para este propósito. Las secuencias de control genético tales como, por ejemplo, secuencias potenciadoras, pueden también ejercer su función en la secuencia diana a partir de posiciones que se eliminan después o, de otro modo, de las otras moléculas de ADN. Las disposiciones preferidas son aquellas en las que la secuencia del ácido nucleico que se va a expresar de forma recombinante se posiciona detrás de la secuencia que actúa como promotor, de modo que las dos secuencias están unidas covalentemente entre sí. En este contexto, la distancia entre la secuencia promotora y la secuencia de ácido nucleico que se ha expresado de forma recombinante es, preferentemente, inferior a 200 pares de bases, especialmente preferentemente inferior a 100 pares de bases, muy especialmente preferentemente inferior a 50 pares de bases.

La preparación de un enlace funcional y la preparación de un casete de expresión se puede lograr por medio de

técnicas de recombinación y clonación habituales como se describen, por ejemplo, en Maniatis T, Fritsch EF y Sambrook J (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), En Silhavy TJ, Berman ML y Enquist LW (1984) *Los experimentos con genes fusiones*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), En Ausubel FM et al. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience y en Gelvin et al. (1990) en: *Plant Molecular Biology Manual*. Sin embargo, también es posible posicionar otras secuencias que, por ejemplo, actúan como un engarce con sitios de escisión de enzimas de restricción específicas o como un péptido señal entre las dos secuencias. Además, la inserción de secuencias puede conducir a la expresión de proteínas de fusión. Preferentemente, el casete de expresión que consiste en un enlace de promotor y la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar puede estar presente en forma integrada en el vector y se puede insertar en un genoma de la planta mediante, por ejemplo, transformación.

Sin embargo, un casete de expresión también se entiende en el sentido de las construcciones en las que un promotor se coloca detrás de un gen de la proteína estomatina STM1 endógeno, por ejemplo por medio de una recombinación homóloga, y donde la expresión de ARN antisentido de una proteína STM1 estomatina produce la reducción de acuerdo con la invención de una proteína STM1 estomatina. De forma análoga, un "compuesto proteico anti-estomatina STM1" (por ejemplo una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARNs de la proteína estomatina STM1 o un ARN antisentido de la proteína estomatina STM1) se puede colocar detrás de un promotor endógeno de tal manera que se produzca el mismo efecto. Ambos enfoques dan como resultado casetes de expresión para los fines de la invención.

Promotores específicos de la planta significa, en principio, cualquier promotor que es capaz de controlar la expresión de los genes, en particular de genes extraños, en plantas o partes de plantas, células de plantas, tejidos vegetales, cultivos de plantas. En el presente documento, la expresión puede ser, por ejemplo constitucional, inducible o dependiente del desarrollo.

Se prefieren los siguientes:

a) Promotores constitutivos

Los vectores preferidos son aquellos que hacen posible una expresión constitutiva en plantas (Benfey et al. (1989) *EMBO J.* 8:2195-2202). Promotor "constitutivo" significa los promotores que aseguran la expresión en numerosos, preferentemente todos, tejidos durante un periodo relativamente largo de desarrollo de la planta, de preferencia en todo momento durante el desarrollo de la planta. En particular, se utiliza preferentemente un promotor vegetal o un promotor derivado de un virus de plantas. El promotor del transcrito de 35S del virus del mosaico de la coliflor CaMV (Franck et al. (1980) *Cell* 21:285-294; Odell et al. (1985) *Nature* 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) *Virology* 140:281-288; Gardner et al. (1986) *Plant Mol Biol* 6:221- 228) o el 19S del CaMV (documentos US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) *EMBO J.* 8:2195-2202) es particularmente preferido. Un promotor constitutivo adecuado es el promotor de la subunidad pequeña de rubisco (SSU) (documento US 4,962,028), el promotor de la nopalina sintasa de *Agrobacterium*, el doble promotor TR, el promotor de la OCS (octopina sintasa) de *Agrobacterium*, el promotor de ubiquitina (Holtorf S et al. (1995) *Plant Mol Biol* 29:637-649), el 1 promotor de la ubiquitina (Christensen et al. (1992) *Plant Mol Biol* 18:675-689; Bruce et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 86:9692-9696), el promotor Smas, el promotor de la alcohol-cinnamilo deshidrogenasa (documento US 5,683,439), los promotores de las subunidades de la ATPasa o el promotor de una proteína rica en prolina del trigo (documento WO 91/13991) y otros promotores de genes cuya expresión constitutiva en plantas la conocen los expertos en la técnica. Especialmente preferido como promotor constitutivo es el promotor del gen de la nitrilasa 1 (nit1) *A. thaliana* (Nº de acceso en GenBank Y07648.2, Nucleotide 2456-4340, Hillebrand et al. (1996) *Gene* 170:197-200).

b) Promotores específicos de tejido

Una realización emplea promotores con especificidades por las anteras, ovarios, flores, hojas, tallos, raíces y semillas.

Promotores específicos de semillas tales como, por ejemplo, el promotor de la faseolina (documento US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) *Plant Cell* 1 (9) :839-53), del gen de la albúmina 2S (Joseffson LG et al. (1987) *J Biol. Chem.* 262:12196-12201), de la legumina (Shirsat A et al. (1989) *Mol Gen Genet* 215 (2): 326-331), de la (proteína de semilla desconocida USP; Bäumlein H y col. (1991) *Mol Gen Genet* 225 (3): 459-67), del gen de la napina (documento US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) *L Planta* 199:515-519), la proteína de unión de sacarosa (documento WO 00/26388) o el promotor B4 de legumina (LeB4; Bäumlein H y col. (1991) *Mol Gen Genet* 225: 121-128; Bäumlein et al. (1992) *Plant Journal* 2 (2) :233-9; Fiedler U et al. (1995) *Biotechnology (NY)* 13 (10): 1090f), el promotor de la oleosina de *Arabidopsis* (documento WO 98/45461), el promotor de Bce4 de *Brassica* (documento WO 91/13980). Promotores específicos de la semilla más adecuados son los de los genes que codifican la glutenina de alto peso molecular (G-APM), gliadina, enzima de ramificación, ADP glucosa pirofosfatasa (AGPasa) o almidón sintasa. Promotores más preferidos son los que permiten la expresión específica de la semilla en monocotiledóneas, tales como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz, etc. Es posible y ventajoso emplear el promotor del gen *lpt2* o *lpt1* (documentos WO 95/15389, WO 95/23230) o los promotores descritos en el documento WO 99/16890 (promotores del gen de la hordeína, del gen de la glutelina, del gen de la orizina, del gen de la prolamina, del gen de la gliadina, del gen de la zeína, del gen de la kasirina o del gen de la secalina).

Promotores específicos de tubérculos, de raíz de almacenamiento de raíz, por ejemplo, el promotor de la patatina de clase I (B33) o el promotor del inhibidor de la catepsina D de patata.

5 Promotores de la hoja-específicos, por ejemplo, por ejemplo el promotor de la FBPasa citosólica de la patata (WO 97/05900), El promotor SSU (subunidad pequeña) de la rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa) o el promotor ST-LSI de la patata (Stockhaus et al. (1989) EMBO J. 8:2445-2451). Promotores específicos de la epidermis, por ejemplo el promotor del gen OXLP ("proteína similar a la oxalato oxidasa", Wei et al. (1998) Plant Mol. Biol. 36:101-112).

Ejemplos de otros promotores específicos de tejido son:

Promotores específicos de flores

10 por ejemplo el promotor de la sintasa de fitoeno (documento WO 92/16635) O el promotor del gen P-rr (documento WO 98/22593).

Promotores específicos de anteras

por ejemplo, el promotor 5126 (documentos US 5,689,049, US 5,689,051), el promotor glob-I y el promotor de zeína Y.

15 o los promotores específicos de la epidermis o del mesófilo antes mencionados que se prefieren especialmente.

20 En una forma de realización, la actividad de STM1, en particular de HvSTM1, en particular de la STM1 como se describe en el presente documento, se reduce, bloquea o previene en la epidermis, en particular para aumentar la resistencia al moho, por ejemplo por medio de silenciamiento génico, por ejemplo por medio de un RNAi, antisentido, cosupresión o enfoque de microARN como puede llevar a cabo el experto en la materia sobre la base de los procedimientos y secuencias divulgados en el presente documento.

25 En una forma de realización, la actividad de STM1, en particular de HvSTM1, en particular de STM1 como se describe en el presente documento, se reduce, bloquea o previene en el mesófilo, en particular, para aumentar la resistencia a Septoria y a las royas, por ejemplo por medio de silenciamiento génico, por ejemplo por medio de un RNAi, antisentido, cosupresión o enfoque de microARN como puede llevar a cabo el experto en la materia sobre la base de los procedimientos y secuencias divulgados en el presente documento.

c) Promotores químicamente inducibles

30 Los casetes de expresión también pueden comprender un promotor químicamente inducible (artículo de revisión: Gatz et al. (1997) Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108) A través del cual la expresión del gen exógeno en la planta puede ser controlado en un punto particular en el tiempo. Los promotores de este tipo, tales como, por ejemplo, el promotor (PRP1 Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), Un promotor inducible por ácido salicílico- (WO 95/19443), Un promotor inducible-bencenosulfonamida (EP 0 388 186), Un promotor inducible por tetraciclina (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), Un promotor inducible por ácido abscísico-(EP 0 335 528) Y una mezcla de etanol-o-ciclohexanona promotor inducible (WO 93/21334) Del mismo modo se puede utilizar. Así, por ejemplo, la expresión de una molécula que reduce o inhibe la función de la proteína STM1 estomatina, tales como, por ejemplo, el ARN de doble cadena, ribozimas, moléculas de ácido nucleico antisentido y similares que se han enumerado anteriormente pueden inducirse en los puntos adecuados en tiempo.

d) Promotores inducibles por estrés o patógenos

40 Muy especialmente ventajoso es el uso de promotores inducibles para la expresión de las construcciones de RNAi empleadas para reducir la cantidad de polipéptido calosa sintasa, actividad o función, que, por ejemplo, cuando se utilizan promotores inducibles por patógenos, hace posible una expresión sólo cuando sea necesario, es decir, en el caso del ataque de patógenos).

En una realización, el procedimiento de acuerdo con la invención, por lo tanto, utiliza promotores que son activos en plantas que son promotores inducibles por patógenos.

45 Los promotores inducibles por patógenos comprenden los promotores de los genes que se inducen como resultado de ataque de patógenos, tales como, por ejemplo, los genes de las proteínas PR, las proteínas SAR, la beta-1,3-glucanasa, quitinasa, etc (por ejemplo, Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol. 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genética 2:93-98; Chen y col. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang y Sing (1994) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (Cell 1989) Planta 1:961-968) (1989).

También están comprendidos los promotores inducibles por daños, tales como la del gen pinII (Ryan (1990) Ann Rev 28:425-449 Phytopath; Duan et al. (1996) Nat. Biotech 14:494-498), de los genes wun1 y wun2 (US 5,428,148), de

los genes win1 y win2 (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), del gen de la sistemina (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), del gen WIP1 (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), del gen MPI (Corderok et al. (1994) Plant J 6 (2) :141-150) y similares.

5 Una fuente de nuevos promotores inducibles por patógenos es la familia de genes PR. Se ha demostrado que una serie de elementos en estos promotores es ventajosa. Por lo tanto, la región-364 a -288 en el promotor de la PR-2 media en la especificidad por salicilato (Buchel et al. (1996) Plant Mol Biol. 30, 493-504). La secuencia 5'-TCATCTTCTT-3 'se repite en el promotor de la β -1,3-glucanasa de cebada y en más de otros 30 genes inducidos por el estrés. En el tabaco, esta región se une a una proteína nuclear cuya abundancia se incrementa en un salicilato. Los PR-1 promotores de tabaco y Arabidopsis (EP-A 0 332 104, WO 98/03536) También son adecuados como promotores inducibles por patógenos. Preferida, ya que sobre todo inducida específicamente por patógenos, son la "PR-ácida5" - (APR5) promotores de la cebada (Schweizer et al. (1997) Plant Physiol 114:79-88) Y el trigo (Rebmann et al. (1991) Plant Mol Biol 16:329-331). proteínas APR5 acumulan dentro de aproximadamente 4 a 6 horas después del ataque de patógenos y sólo muestran muy poca expresión de fondo (WO 99/66057). Un enfoque para la obtención de un aumento de la especificidad inducida por patógenos es la generación de promotores sintéticos a partir de combinaciones de elementos de patógenos sensibles conocidos (Rushton et al. (Celular 2002) Planta 14, 749-762; WO 00/01830; WO 99/66057). Otros promotores inducibles por patógenos de diferentes especies son conocidos por los expertos en la materia (documentos EP-A 1 165 794; EP-A 1 062 356; EP-A 1 041148; EP-A 1 032 684).

20 Otros promotores inducibles por patógenos comprenden el promotor la Flachs Fis1 (WO 96/34949), el promotor Vst1 (Schubert et al. (1997) Plant Mol Biol 34:417-426) y el promotor de la sesquiterpeno ciclasa EAS4 del tabaco (documento US 6,100,451).

25 Otros promotores preferidos son aquellos que son inducidos por el estrés biótico o abiótico, tales como, por ejemplo, el promotor inducible por patógenos del gen PRP1 (o *gst1* promotor), por ejemplo de la patata (WO 96/28561; Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), el promotor Hsp70 o hsp80 inducible por calor del tomate (US 5,187,267), el promotor de alfa-amilasa inducible por el enfriamiento de la patata (WO 96/12814), el promotor de PPK inducible por la luz o el promotor pinIII inducible por daños (EP-A 0 375 091).

e) Promotores específicos de tejido mesófilo

30 En una realización, el procedimiento de acuerdo con la invención emplea promotores específicos del tejido mesófilo, tales como, por ejemplo, el promotor del gen 9f-3.8 de la germina de trigo (Nº de acceso en GenBank:M63224) o el promotor de la cebada (GeraWO 02/057412). Dichos promotores son particularmente ventajosos ya que son tanto específicos de tejido mesófilo como inducibles por patógenos. También es adecuado el promotor específico del tejido mesófilo de Arabidopsis CAB-2 (Nº de acceso en GenBank:X15222), y el promotor PPCZm1 de Zea mays (Nº de acceso en GenBank:X63869) u homólogos de los mismos. Específico de tejido mesófilo significa que la transcripción de un gen está limitada a el menor número posible de tejidos vegetales que comprenden el tejido mesófilo como el resultado de la interacción específica de elementos cis presentes en la secuencia del promotor y los factores de transcripción que se unen a estos elementos; preferentemente, significa una transcripción que está limitada al tejido mesófilo.

En cuanto a otros promotores que se expresan esencialmente en el mesófilo o en la epidermis, vea la enumeración inserta más arriba.

40 f) Promotores dependientes del desarrollo

Ejemplos de otros promotores adecuados son promotores específicos de la maduración de los frutos, tales como, por ejemplo, el promotor específico de la maduración del fruto de tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Los promotores dependientes del desarrollo incluyen algunos de los promotores específicos de tejido, porque el desarrollo de los tejidos individuales se lleva a cabo de forma natural de una forma dependiente de desarrollo.

45 Los promotores constitutivos y específicos de hojas y / o de tallos, inducibles por patógenos, específicos de raíces, específicos de tejido mesófilo son particularmente preferidos, siendo los más preferidos los promotores constitutivos, específicos de tejido mesófilo, inducibles por patógeno y específicos de la raíz.

50 Una posibilidad adicional es para otros promotores que hacen posible la expresión en otros tejidos de las plantas o en otros organismos, tales como, por ejemplo, bacterias *E. coli* que se unen operativamente a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Todos los promotores descritos anteriormente son en principio adecuados como promotores de la planta.

Otros promotores que son adecuados para la expresión en plantas se describen (Rogers et al. (1987) Meth Enzymol en 153:253-277; Schardi et al. (1987) Gene 61:1-11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 86:8402-8406).

55 Las secuencias de ácidos nucleicos presentes en los casetes de expresión o vectores de la invención pueden unirse operativamente a otras secuencias de control genético, además de un promotor. Las secuencias de control genético término tiene un significado amplio y significa que todas las secuencias que tienen una influencia en la venida a la

existencia o el funcionamiento de la caja de expresión de la invención. Por ejemplo, las secuencias de control genético modifican la transcripción y la traducción en los organismos procariontes o eucariotas. Los casetes de expresión de la invención comprenden preferentemente un promotor con una especificidad antes mencionada 5'-aguas arriba de la secuencia de ácido nucleico particular que ha de ser expresado transgénicamente, y una secuencia de terminación de secuencia adicional como control genético 3'-cadena abajo, y en su caso más convencional elementos reguladores, en cada caso unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que se expresa transgénicamente.

Las secuencias de control genéticas también comprenden, además, promotores, elementos promotores o promotores mínimos capaces de modificar las propiedades de expresión-control. Por tanto, es posible, por ejemplo a través de secuencias de control genético para la expresión específica de tejido que tenga lugar depende, además, en determinados factores de estrés. Los elementos correspondientes se describen, por ejemplo para la agresión por agua, ácido abscísico (Lam E y Chua NH, J Biol. Chem. 1991; 266 (26): 17.131 -17.135) Y el estrés por calor (Schoffl F et al., Molecular y Genética General 217 (2-3) :246-53, 1989).

Es posible, en principio, para todos los promotores naturales con sus secuencias reguladoras como las mencionadas anteriormente su uso en el procedimiento de la invención. Es posible, además, también para los promotores sintéticos que se utilizan ventajosamente.

Secuencias de control genético comprenden además también las regiones 5 'no traducidas, o intrones no codificantes región 3' de los genes, tales como, por ejemplo, el intrón actina-1, o los intrones de Adh1-S 1, 2 y 6 (en general: El Manual de maíz, Capítulo 116, Freeling y Walbot, Eds., Springer, Nueva York (1994)). Se ha demostrado que éstas pueden desempeñar una función significativa en la regulación de la expresión génica. Así, se ha mostrado que las secuencias 5 'no traducidas son capaces de aumentar la expresión transitoria de genes heterólogos. Un ejemplo de un potenciador de la traducción que se puede mencionar es la secuencia líder 5 'del virus del mosaico del tabaco (Gallie y otros. (1987) Nucl Acids Res. 15:8693-8711) y similares. Además pueden promover la especificidad tisular (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

El casete de expresión puede comprender ventajosamente uno o más llamados secuencias potenciadoras en unión operativa con el promotor, que hacen que el aumento de expresión transgénica de la secuencia de ácido nucleico posible: secuencias ventajosas adicionales, tales como elementos reguladores o terminadores adicionales también se puede insertar en el 3 'final de las secuencias de ácido nucleico a ser expresadas de forma recombinante. Las secuencias de ácido nucleico a ser expresadas de manera recombinante pueden estar presentes en una o más copias en la construcción génica.

Las señales de poliadenilación adecuadas como secuencias de control son señales de poliadenilación de plantas, preferentemente las que corresponden esencialmente a las señales de poliadenilación de T-ADN a partir *Agrobacterium tumefaciens*, en particular, a gen 3 del T-DNA (octopina sintasa) de los pTiACHS plásmido Ti (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3:835 ff) O equivalentes funcionales de los mismos. Ejemplos de secuencias de terminación particularmente adecuadas son el terminador OCS (octopina sintasa) y el terminador NOS (nopalina sintasa).

Las secuencias de control, además, significan aquellos que hacen que la recombinación homóloga o inserción en el genoma de un organismo anfitrión posible o permitir la eliminación del genoma. En la recombinación homóloga, por ejemplo, el promotor natural de un gen particular puede ser sustituido específicamente por un promotor con especificidad para la epidermis embrionarios y / o la flor.

Un casete de expresión y / o los vectores derivados de ella pueden comprender elementos funcionales adicionales. El elemento funcional término tiene un significado amplio y significa todos los elementos que tienen una influencia en la producción, la replicación o función de los casetes de expresión, los vectores o los organismos transgénicos de la invención. Como ejemplos no limitantes que se pueden mencionar son los siguientes:

- a) Los marcadores de selección que confieren una resistencia a un inhibidor de metabolismo tal como 2-desoxiglucosa 6-fosfato (WO 98/45456), antibióticos o biocidas, preferentemente herbicidas, por ejemplo, kanamicina, G 418, bleomicina, higromicina o fosfotricina y similares. Marcadores de selección especialmente preferidos son aquellos que confieren una resistencia a los herbicidas. Secuencias de ADN que codifican acetiltransferasas fosfotricina (PAT), que inactivan los inhibidores de la glutamina sintasa (bar y del gen PAT), la sintasa de 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (genes de la EPSP sintasa) que confieren resistencia a Glyphosat® (N-(fosfonometil) glicina) , el gen *gox*, que codifica la enzima degradante Glyphosat® (glifosato oxidorreductasa), el gen *deh* (que codifica una deshalogenasa que inactiva dalapon), sulfonilurea y imidazolinona-inactivación de acetolactato sintasa y genes que codifican BxN nitrilasa-bromoxinil degradantes enzimas, el gen *aasa*, que confiere una resistencia a la apectinomycin antibiótico, la estreptomycin fosfotransferasa gen (SPT), que hace posible una resistencia a la estreptomycin, el gen de la neomicina fosfotransferasa (NPTII), que confiere una resistencia a la kanamicina o geneticidin, la higromicina fosfotransferasa (HPT) gen, que media una resistencia a la higromicina, el gen de la acetolactato sintasa (ALS), que media la resistencia a herbicidas de sulfonilurea (por ejemplo mutado ALS variantes con, por ejemplo, el S4 y / o mutación Hra).

b) Los genes indicadores que codifican las proteínas fácilmente cuantificables y garantizar a través de un color intrínseco o actividad enzimática una evaluación de la eficacia de la transformación o de la ubicación o el momento de la expresión. Muy particularmente se prefieren en este contexto, a las proteínas reportero (Schertborn E, Groskreutz D. *Mol Biotechnol.*1999; 13 (1) :29-44). Tal como la proteína de fluorescencia verde (GFP) (Sheen et al. (1995) *Plant Journal* 8 (5) :777-784;Haselhoff et al. (1997) *Proc Natl Acad.Sci. EE.UU.* 94 (6) :2122-2127; Reichel et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 93 (12) :5888-5893; Tian et al. (1997) *Plant Cell Rep* 16:267-271; WO 97/41228; Chui WL et al. (1996) *Curr Biol.* 6:325-330; Leffel SM et al. (1997) *Biotechniques.*23 (5) :912-8), La chloramphenicoltransferase, una luciferasa (Ow et al. (1986) *Science* 234:856-859; Millar et al. (1992) *Plant Mol Biol* 10:324-414 Rep), El gen de acuorina (Prasher et al. (1985) *Biochem Biophys Res Commun* 126 (3) :1259-1268). La β -galactosidasa, gen de locus R (código para una proteína que regula la producción de pigmentos de antocianina (coloración roja) en tejidos de la planta y por lo tanto hace posible el análisis directo de la actividad del promotor sin la adición de adyuvantes adicionales o sustratos cromogénicos ; . Dellaporta y otros, en: *Estructura y función del cromosoma: Impacto de los Nuevos Conceptos*, 18a Stadler *Genética Simposio*, 11:263-282, (1988), Con β -glucuronidasa siendo muy especialmente preferida (Jefferson et al., *EMBO J.* 1987, 6, 3901 a 3907).

c) Los orígenes de replicación que aseguran la replicación de los casetes de expresión o vectores de la invención en, por ejemplo, *E. coli*. Los ejemplos que se pueden mencionar son ORI (origen de la replicación del ADN), el ori pBR322 o el ori P15A (Sambrook et al. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

d) Elementos que son necesarios para la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*, tales como, por ejemplo, el borde derecho o izquierdo frontera del T-ADN o la región vir.

Para seleccionar las células transformadas con éxito, en general se requiere adicionalmente para introducir un marcador seleccionable que confiere a las células transformadas con éxito una resistencia a un biocida (por ejemplo un herbicida), un inhibidor de metabolismo tal como 2-desoxiglucosa 6-fosfato (WO 98/45456) O un antibiótico. El marcador de selección permite la selección de las células transformadas de las células no transformadas (McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84).

La introducción de un casete de expresión de acuerdo con la invención en un organismo o en células, tejidos, órganos, partes o semillas del mismo (preferentemente en plantas o células vegetales, tejidos, órganos, partes o semillas) ventajosamente se puede lograr usando vectores en los que el casetes de expresión están presentes. El casete de expresión puede introducirse en el vector (por ejemplo, un plásmido) a través de un sitio de escisión por restricción adecuada. El plásmido resultante se introdujo por primera vez en *E. coli*. Transformado correctamente *E. coli* se seleccionan, se cultivan, y se obtuvo el plásmido recombinante usando procedimientos conocidos para el experto. El análisis de restricción y secuenciación se pueden utilizar para la verificación de la etapa de clonación.

Los ejemplos de vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, fagos, virus o más agrobacterias. En una realización ventajosa, la introducción de la casete de expresión se lleva a cabo por medio de vectores plásmidos. Los vectores preferidos son aquellos que hacen posible una integración estable del casete de expresión en el genoma del huésped.

La generación de un organismo transformado (o una célula transformada) requiere la introducción de moléculas de ADN adecuadas, y por lo tanto de las moléculas de ARN o proteínas formadas como resultado de su expresión génica, en la célula huésped en cuestión.

Una multiplicidad de procedimientos (Keown et al. (1990) *Methods in Enzymology* 185:527-537) Está disponible para este procedimiento, que se conoce como transformación (o transducción o transfección). Por lo tanto, el ADN o ARN se pueden introducir, por ejemplo, directamente por medio de microinyección o por bombardeo con micropartículas recubiertas de ADN. Además, es posible para permeabilizar la célula químicamente, por ejemplo con glicol de polietileno, de modo que el ADN puede entrar en la célula por difusión. Alternativamente, el ADN puede introducirse mediante fusión de protoplastos con otras unidades de ADN-que comprende tales como minicélulas, células, lisosomas o liposomas. Otro procedimiento adecuado para introducir ADN es electroporación, en donde las células se permeabilizaron de forma reversible por medio de un impulso eléctrico. Los procedimientos adecuados se describen (por ejemplo en Bilang et al. (1991) *Gene* 100:247-250; Scheid et al. (1991) *Mol Gen Genet* 228:104-112; Guerche et al. (1987) *Vegetal Ciencias* 52:111-116; Neuhause et al. (1987) *Appl Genet* 75:30-36 Theor; Klein et al. (1987) *Naturaleza* 327:70-73; Howell et al. (1980), *Science* 208:1265; Horsch et al. (1985) *Science* 227:1229-1231; DeBlock et al. (1989) *Fisiología Vegetal* 91:694-701; Procedimientos de Biología Molecular de Plantas (Weissbach y Weissbach, eds.) Academic Press Inc.(1988); y Procedimientos en Biología Molecular de Plantas (Schuler y Zielinski, eds.) Academic Press Inc.(1989)).

En las plantas, se utilizan los procedimientos descritos para la transformación y regeneración de plantas a partir de tejidos vegetales o células vegetales para la transformación transitoria o estable. Los procedimientos adecuados son principalmente la transformación de protoplastos por medio de polietileno-glicol-inducida por la captación de ADN, el procedimiento biolístico con el cañón de genes, el llamado procedimiento de bombardeo de partículas, electroporación, la incubación de embriones secos en solución de ADN-que comprende, y microinyección .

Además de estas técnicas de transformación "directos", una transformación también se puede llevar a cabo por infección bacteriana por medio de *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. Los procedimientos se describen por ejemplo en Horsch RB y col. (1985) *Science* 225: 1229f).

5 Si se utilizan agrobacterias, el casete de expresión es para ser integrado en plásmidos específicos, ya sea en una lanzadera o vector intermedio o en un vector binario. Si un plásmido Ti o Ri se utiliza para la transformación, al menos el borde derecho, pero en la mayoría de los casos, el derecho y el borde izquierdo, de Ti o Ri T-ADN plásmido está vinculado como región flanqueante con el casete de expresión para ser introducido.

10 Se prefiere el uso de vectores binarios. Los vectores binarios son capaces de replicar tanto en *E. coli* en *Agrobacterium*. Como una regla, que comprenden un gen marcador de selección y un enlazador o polienlazador flanqueado por la derecha, y dejaron secuencia borde de T-ADN. Se pueden transformar directamente en *Agrobacterium* (Fundas et al. (1978) *Mol Gen Genet* 163:181-187). El gen marcador de selección permite una selección de agrobacterias transformadas y es, por ejemplo, el gen nptII, que confiere una resistencia a la kanamicina. El *Agrobacterium* que actúa como organismo huésped en este caso ya debe comprender un plásmido con la región vir. Esto es necesario para la transferencia del ADN-T a la célula vegetal. Un *Agrobacterium* así transformada puede utilizarse para la transformación de células vegetales. El uso de ADN T para la transformación de células vegetales se ha estudiado y descrito extensamente (EP 120 516; Hoekema, en: *El sistema Vector Planta Binaria*, Offsetdrukkerij Kanters BV, Alblasterdam, Capítulo V; An et al. (1985) *EMBO J.* 4:277-287). Varios vectores binarios son conocidos y en algunos casos disponibles comercialmente, tales como, por ejemplo, pBI101.2 o pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. EE.UU.).

20 En el caso de la inyección o electroporación de ADN o ARN en células de plantas, el plásmido utilizado no deberán cumplir cualquier requisito particular. Plásmidos simples, tales como los de la serie de pUC se pueden utilizar. Si plantas intactas son para ser regenerada a partir de las células transformadas, es necesario que un gen marcador seleccionable adicional que se encuentra en el plásmido.

25 Las células transformadas de manera estable, es decir, aquellos que comprenden el ADN introducido integrado en el ADN de la célula huésped, se pueden seleccionar a partir de células no transformadas cuando un marcador seleccionable es un componente del ADN introducido. Por ejemplo, cualquier gen que es capaz de conferir una resistencia a los antibióticos o herbicidas (tales como kanamicina, G 418, bleomicina, higromicina o fosfotricina y similares) puede actuar como marcador (ver anteriormente). Las células transformadas que expresan dicho gen marcador son capaces de sobrevivir en presencia de concentraciones de un antibiótico o herbicida adecuado que matan a un tipo salvaje no transformadas. Ejemplos se han mencionado anteriormente y comprenden preferentemente el gen bar, que confiere resistencia al herbicida fosfotricina (Rathore KS et al. (1993) *Plant Mol Biol* 21 (5) :871-884), El gen nptII, que confiere resistencia a la kanamicina, el gen hpt, que confiere resistencia a la higromicina, o el gen de la EPSP, que confiere resistencia al herbicida glifosato. El marcador de selección permite la selección de las células transformadas de las células no transformadas (McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84). Las plantas obtenidas pueden ser criados y se hibridaron de la manera habitual. Dos o más generaciones deben ser cultivadas con el fin de asegurar que la integración genómica es estable y hereditaria.

40 Los procedimientos antes mencionados se describen por ejemplo en Jenes B et al. (1993) *Técnicas para la transferencia de genes*, en: *Plantas transgénicas*, vol.1, Engineering and Utilization, editado por SD Kung y R Wu, Academic Press, p.128-143 y en Potrykus (1991) *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* 42:205-225). El constructo para ser expresado se clona preferentemente en un vector que es adecuado para transformar *Agrobacterium tumefaciens*, por ejemplo pBin19 (Bevan et al. (1984) *Nucl acids, Res* 12:8711 f).

45 Tan pronto como una célula de planta transformada que se ha generado, una planta intacta se puede conseguir utilizando procedimientos conocidos para el experto. En el presente documento, el material de partida es, por ejemplo, el callo culturas. El desarrollo de brote y raíz puede ser inducida en la manera conocida a partir de estos grupos de células aún no diferenciadas. Las plántulas obtenidas pueden ir encapsulados dentro y criados.

El experto en la materia también está familiarizado con los procedimientos de regeneración de partes de plantas y plantas intactas a partir de células de plantas. Por ejemplo, los procedimientos descritos por Fennell et al. (1992) *Plant Rep.* 11: 567-570; Stoeger et al (1995) *Plant Cell Rep.* 14:273-278; Jahne et al. (1994) *Appl Genet* 89:525-533 Theorse utilizan para este propósito.

50 El procedimiento de acuerdo con la invención se puede combinar ventajosamente con otros procedimientos que dan lugar a una resistencia a patógenos (por ejemplo, a los insectos, hongos, bacterias, nematodos y similares), resistencia a la tensión o Otra mejora de las características de la planta. Se mencionan ejemplos entre otros, en Dunwell JM, transgénico se acerca a la mejora de los cultivos, *J Exp. Bot.* 2000; 51 Spec No; páginas 487-96.

55 En una realización preferida, la reducción de la función de una proteína STM1 estomatina en una planta se lleva a cabo en combinación con un aumento en la actividad de una proteína Bax inhibidor 1. Este can.be efectúa por ejemplo mediante la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Bax inhibidor 1, por ejemplo en el tejido mesófilo y / o tejido de la raíz.

En el procedimiento de acuerdo con la invención, el inhibidor de Bax proteínas a partir de 1 *Hordeum vulgare*

Nicotiana tabacumson especialmente preferidos.

5 Otro objeto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas STM1 estomatina a partir de cebada, como se muestra por los polinucleótidos SEC. ID N °: 1, y a las secuencias de ácido nucleico que son complementarias de las mismas, y para las secuencias derivadas como resultado de la degeneración (degeneración) del código genético.

Otro objeto de la invención se refiere a la proteína STM1 estomatina a partir de cebada, como se muestra en la SEC. ID N °: 2.

10 Otro objeto de la invención se refiere a moléculas de ARN de doble cadena de ácido nucleico (dsRNA molécula) que, cuando se introduce en una planta (o en una célula, tejido, órgano o semilla de la misma), provocan la reducción de una proteína STM1 estomatina, donde el cadena sentido de dicho dsRNA molécula tiene al menos 90%, muy especialmente, preferentemente 100%, de homología con una molécula de ácido nucleico como se muestra en SEQ ID NO: 1 o a un fragmento de al menos 17 pares de bases, preferentemente al menos 18, 19, 20 , 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 pares de bases, especialmente preferentemente al menos 40, 50, 60, 70, 80 o 90 pares de bases, muy especialmente preferentemente al menos 100, 200, 300 o 400 pares de bases, más preferentemente al menos 500, 600, 700, 800, 900, al menos 1.000 pares de bases, y que tiene al menos 90%, muy especialmente preferentemente 100%, de homología con una molécula de ácido nucleico como se muestra en la SEC ID No: 1.

20 La estructura de doble cadena puede formarse a partir de una única, hebra autocomplementary o a partir de dos cadenas complementarias. En una realización especialmente preferida, el sentido y la secuencia antisentido están unidos por una secuencia de unión (linker) y pueden formar por ejemplo una estructura de horquilla. La secuencia de unión puede ser muy especialmente preferentemente un intrón, que se empalma a cabo después de que el dsRNA se ha sintetizado.

La secuencia de ácido nucleico que codifica un dsRNA puede contener otros elementos, tales como, por ejemplo, señales de terminación de transcripción o señales de poliadenilación.

25 En la expresión transgénica casetes de la secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas STM1 estomatina de la cebada, el trigo y el maíz está vinculado con al menos un elemento de control genético como se define anteriormente, de tal manera que la expresión (transcripción y, en su caso, la traducción) puede llevarse a cabo en un organismo deseado, preferentemente plantas monocotiledóneas. Elementos de control genético que son adecuados para este propósito se han descrito anteriormente. Los casetes de expresión transgénicos también pueden comprender otros elementos funcionales como se define anteriormente.

30 Se prefieren en este contexto son las plantas pertenecientes a la familia Poaceae, especialmente preferidos son plantas seleccionadas entre los géneros de plantas Hordeum, Avena, Secale, Triticum, sorgo, Zea, Saccharum y Oryza, muy especialmente preferentemente de plantas seleccionadas de la especie Hordeum vulgare (cebada), Triticum aestivum (trigo), Triticum aestivum subsp. spelta (deletreado), triticale, avena sativa (avena), Secale cereale (centeno), Sorghum bicolor (sorgo), Zea mays (maíz), Saccharum officinarum (caña de azúcar) y Oryza sativa (arroz).

La Figura 2 muestra una secuencia así llamado alineamiento de diferentes secuencias de STM1 estomatina con estomatina STM1 a partir de cebada. Los colores utilizados en la secuencia de alineación significan lo siguiente:

rojo contra amarillo	todas las posiciones idénticas (por lo tanto, también idéntica a la de consenso)
azul oscuro contra la luz azul:	esta posición en esta secuencia es idéntica a la de consenso
negro contra el verde:	esta posición en esta secuencia muestra gran similitud con el consenso (véase más adelante)
verde contra el blanco:	esta posición en esta secuencia muestra débil similitud con el consenso (véase más adelante)
negro contra blanco:	en esta posición en esta secuencia difiere de la de consenso

40 Fuerte y débil similitud se asignan de acuerdo con la tabla que sigue (el consenso de residuos):

Residuo	Fuerte*	Débil
A	GS	CTV

Residuo	Fuerte*	Débil
B		
C		AS
D	E	GHKNQRS
E	D	HKNQRS
F	WY	HILM
G	A	DNS
H	Y	DEFKNQR
I	LMV	F
K	R	DEHNQST
L	IMV	F
M	ILV	F
N	Q	DEGHKRST
P		ST
Q	N	DEHKRS
R	K	DEHNQ
S	AT	CDEGKNPQ
T	S	AKNPV
V	ILM	AT
W	FY	
Y	FHW	
Z		

La secuencia de consenso derivada de la misma que se puede suponer que será decisivo para la función fisiológica de las diferentes STM1s estomatina lee:

XPXNXGXXIVPEXKAXVXERFGKXXXTLXXGXHXLXPXVDRIAYVHSLKEEXIPIXXXXAITKD
NVXIIXIXXXXYVKIXDPXXASYGVXXPIXAVXQLAQTMRSELGKITLDKTFEERDXLNXXIVX
XINXAAXWGLXCXXYEIRDIXPPXGXXXAMEMQAXAERKKRAQILESEXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXAXXXXNRAXGXAAILAXXXATAXGXXXXSXXXXXXXXGXXXAAXLXXAEOYXXAFX
XXAXXXXXXLLPXXXXXPXXXXAQXX

5

donde X puede ser uno o más de cualquiera de los aminoácidos, siendo X preferentemente cualquier 1 a 3 aminoácidos, siendo X cualquier más preferentemente un aminoácido (SEC ID N °: 15) Los aminoácidos subrayados fueron identificados como está conservado en secuencias de toda comparación.

La secuencia de consenso es, preferentemente,:

PPXNWGIRIVPERKAFVIERFGKYXTTLPSGIHFLXPFVDRIAYVHSLKEEAAIPIPNQTAITKD
NVSIHIDGVLVYKIVDPKLASYGVENPIYAVXOLAOTTMRSELGKITLDKTFEERDTLNEKIVE
AINVAAKDWGLQCLRYEIRDIMPPXGVRXAMEMOAEAEERKKRAQILESEGERQXHINXADGKKS
SVILXSEAAMMDQVNRAQGEAEAILARAQATAKGLXLVSQSLKEXGXEAASLRVAEQYIXAFG
NIAKEGTTMLLPSXAXNPASMTAQAL

5 aminoácidos, siendo X cualquier más preferentemente un aminoácido (SEC ID N °: 16)

La secuencia de consenso se lee::

PPSNWGIRIVPERKAFVIERFGKYXTTLPSGIHFLIPFVDRIAYVHSLKEEAAIPIPNQTAITKD
NVSIHIDGVLVYKIVDPKLASYGVENPIYAVIQLAOTTMRSELGKITLDKTFEERDTLNEKIVE
AINVAAKDWGLQCLRYEIRDIMPPXGVRXAMEMOAEAEERKKRAQILESEGERQAHINXADGKKS
SVILXSEAAMMDQVNRAQGEAEAILARAQATAKGLXLVSQSLKEXGXEAASLRVAEQYIXAFG
NIAKEGTTMLLPSXAXNPASMTAQAL

10 en la que X puede ser cualquier uno o más aminoácidos, siendo X preferentemente cualquier 1 a 3 aminoácidos, siendo X cualquier más preferentemente un aminoácido y donde se componen los siguientes bases alternativas:

La posición 3 también podría mostrar V, T o A. La posición 36 también podrían mostrar V o M. la posición 96 también podrían mostrar L, V o M. Posición 182 también podrían mostrar S (SEC ID n °: 17)

15 Se divulgan secuencias de ácidos nucleicos que codifican la secuencia consenso mostrada anteriormente con la SEC ID N ° 15, preferentemente SEC ID N ° 16, más preferentemente SEQ ID N ° 17, y para su uso en los procedimientos de acuerdo con la invención para la generación de plantas transgénicas con un aumento de la resistencia a los patógenos mediante la reducción del contenido y / o la actividad de al menos una STM1 estomatina. En este contexto, la secuencia de consenso que se muestra es preferentemente característica de la estomatina STM1 a partir de cebada y preferentemente también de la estomatina STM1 de otras plantas. SEC ID N °: 13 o,

20 c) un casete de expresión transgénico que comprende una de las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, o un vector de acuerdo con la invención, y células, cultivos celulares, tejidos, partes - tales como, por ejemplo, en el caso de plantas, hojas organismos , raíces y similares - material o propagación derivado de dichos organismos,

25 donde en una forma de realización las moléculas de ácido nucleico no consisten en las moléculas de ácido nucleico que se muestran en la SEC ID N° 13 o y en una realización no consisten en las moléculas de polipéptido mostrado en SEC ID N° 15, 16 o 17 y

Se divulga que la planta usada de acuerdo con la invención no es de Arabidopsis thaliana.

30 Organismos huésped o de partida que se prefieren como "organismos transgénicos" son principalmente plantas de acuerdo con la definición anterior.El organismo transgénico es una planta madura, semillas, brotes y plántulas, y las piezas, los materiales de multiplicación y los cultivos derivados de la misma, por ejemplo, las culturas de células. "Las plantas maduras" refiere a las plantas en cualquier etapa de desarrollo deseado más allá de la plántula. "Plántula": planta inmadura joven en una etapa temprana de desarrollo. Las plantas que son especialmente preferidas como organismos huésped son plantas a las que se puede aplicar el procedimiento de acuerdo con la invención de la obtención de una resistencia a patógenos de conformidad con los criterios mencionados anteriormente. En una forma de realización, la planta es una planta monocotiledónea tal como, por ejemplo, trigo, 35 avena, sorgo y mijo, cebada, centeno, maíz, arroz, trigo sarraceno, sorgo, triticale, espelta o caña de azúcar, en particular seleccionada de las especies Hordeum vulgare (cebada), Triticum aestivum (trigo), Triticum aestivum subsp.spelta (deletreado), triticale, avena sativa (avena), Secale cereale (centeno), Sorghum bicolor (sorgo), Zea mays (maíz), Saccharum officinarum (azúcar caña) y Oryza sativa (arroz).

40 La generación de los organismos transgénicos se puede lograr con los procedimientos descritos anteriormente para la transformación o transfección de organismos.

Secuencias

1. SEC ID N°1 y 2: HvSTM1, derivada de ADNc

2. SEC ID N° 3 y 4:

LOCUS XP_480193 377 aa linear PLN 09-NOV-2004
 DEFINICIÓN proteína putativa de la banda 7 [Oryza sativa (grupo de la variedad japonica)].
 ACCESO XP_480193
 VERSIÓN XP_48019 3,1 GI:50941331
 DBSOURCE REFSEQ: acceso XM_480193,1.
 PALABRAS CLAVE
 FUENTE Oryza sativa (grupo de la variedad japonica)

3. SEC ID N° 5 y 6:

LOCUS XP_480193 377 aa linear PLN 09-NOV-2004
 DEFINITION proteína putativa de la banda 7 [Oryza sativa (grupo de la variedad japonica)].
 ACCESO XP_480193
 VERSIÓN XP_48019 3,1 GI:50941331
 DBSOURCE REFSEQ: acceso XM_48019 3,1
 PALABRAS CLAVE
 FUENTE Oryza sativa (grupo de la variedad japonica)

4. SEC ID N° 7 y en 8

LOCUS CAB81408 515 aa linear PLN 16-APR-2005
 DEFINICIÓN proteína putativa [Arabidopsis thaliana].
 ACCESO CAB81408
 VERSIÓN CAB8140 8,1 GI:7269612
 DBSOURCE embi locus ATCHRIV67, acceso AL16157 1,2
 PALABRAS CLAVE
 FUENTE Arabidopsis thaliana berro)

5. SEC ID N°9 y 10:

LOCUS NP_567778 411 aa linear PLN 04-NOV-2005
 DEFINICIÓN proteína desconocida [Arabidopsis thaliana].
 ACCESO NP_567778
 VERSIÓN NP_56777 8,1 GI:18417021
 DBSOURCE REFSEQ: acceso NM_11889 4,2
 PALABRAS CLAVE
 FUENTE Arabidopsis thaliana (berro)

6. SEC ID N°11 y 12:

LOCUS NP_200221 401 aa linear PLN 04-NOV-2005
 DEFINICIÓN proteína desconocida [Arabidopsis thaliana].
 ACCESO NP_200221
 VERSIÓN NP_20022 1,1 GI:15239547
 DBSOURCE REFSEQ: acceso NM_12479 0,2
 PALABRAS CLAVE
 FUENTE Arabidopsis thaliana (berro)

7. SEC ID N° 13 y 14:

LOCUS AAM63205 401 aa linear PLN 14-APR-2003
 DEFINICIÓN proteína de tipo estomatina [Arabidopsis thaliana].
 ACCESO AAM63205
 VERSIÓN AAM6320 5,1 GI:21554125
 DBSOURCE acceso AY08599 5,1
 PALABRAS CLAVE
 FUENTE Arabidopsis thaliana (berro)

8. SEC ID N° 15, 16, 17: Secuencias consenso derivadas de una alineación de secuencia de los polipéptidos de la SEC ID N° 1 a 14.

9. SEC ID N° 18 y 19: cebador para PCR

Las figuras muestran:

Figura 1:

5 Aumento de la resistencia al mocho de la cebada por RNAi de proteínas STM1 estomatina. Segmentos de hoja de cebada se bombardaron con una construcción de ARNi contra STM1, los segmentos de hoja se inocularon con hongos de la cebada del aislado *Bgh-A6* y la frecuencia de los haustorios fúngicos en las células epidérmicas transformadas se determinó en relación con el control de vectores ("formación relativa de HAU"). Un ARNi contra STM1 redujo el número de células epidérmicas penetrantes en más de un 50%. SNAP34 actúa como el control.

Figura 2:

10 Alineación de la secuencia de las secuencias de la proteína estomatina STM1 con polipéptidos de la cebada, el arroz, el maíz y *Arabidopsis thaliana*.

Ejemplos

Procedimientos generales:

15 La síntesis química de oligonucleótidos puede tener lugar, por ejemplo, de una manera conocida por el procedimiento de la fosfoamidita (Voet, Voet, 2^a edición, Wiley Press, Nueva York, página 896-897). Las etapas de clonación realizadas para los fines de la presente invención, tales como, por ejemplo, escisión de restricción, electroforesis en gel de agarosa, purificación de fragmentos de ADN, transferencia de ácidos nucleicos a membranas de nitrocelulosa y de nylon, enlace de fragmentos de ADN, transformación de células de *E. coli*, cultivo de bacterias, replicación de fagos y análisis de la secuencia de ADN recombinante se llevan a cabo como se describe en Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6. La secuenciación de moléculas de ADN recombinante se lleva a cabo usando un secuenciador de ADN de fluorescencia por láser de la empresa MWG-Licor por el método de Sanger (Sanger y col. (1977) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 74:5463-5467).

Ejemplo 1: Plantas, agentes patógenos e inoculación

25 La variedad de cebada Golden Promise es de Patrick Schweizer, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben. La variedad Pallas y la línea retrocruzada BCIngrid-*mlo5* fue suministrada por Lisa Munk, Departamento de Fitopatología, Universidad Real de Veterinaria y Agricultura, Copenhague, Dinamarca. Su preparación se describe (Kolster P et al. (1986) Crop Sci. 26: 903-907).

30 A menos que se describa lo contrario, la semilla que ha sido pregerminada durante 12 a 36 horas en la oscuridad sobre papel de filtro húmedo se coloca en lotes de 5 granos a lo largo del borde de una maceta cuadrada (8 x 8 cm) en tipo de suelo P Fruhstorfer, se cubren con tierra y se riegan regularmente con agua del grifo. Todas las plantas se cultivan en armarios con ambiente controlado o cámaras a una temperatura de 16 a 18 ° C durante 5 a 8 días, a una humedad atmosférica relativa de 50 a 60% y en un período lumínico de 16/8-horas con 3000 y 5000 lux , respectivamente (50 y 60 $\mu\text{mols}^{-1}\text{M}^{-2}$ densidad de flujo de fotones, respectivamente) y se emplea en los experimentos en la etapa de plántula. En el caso de experimentos en los que se tratan las hojas primarias, este último están completamente desarrollados.

35 Antes de someter a las plantas a los experimentos de transfección transitoria, se cultivan en cámaras o campanas de ambiente controlado a la temperatura diurna de 24°C, a una temperatura nocturna de 20°C, con una humedad atmosférica relativa de 50 a 60% y con un fotoperiodo de 16/8horas con 30.000 lux.

40 Mildiu pulverulento de la cebada *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em Marchal der Rasse A6 (Wiberg A (1974) Hereditas 77: 89 - 148) (BghA6) se usa para inocular plantas de cebada. El mildiu lo proporcionó el Institut für Biometrie, JLU Gießen, El inóculo se mantiene en cámaras de ambiente controlado en condiciones idénticas a las que se han descrito anteriormente para las plantas transfiriendo los conidios de material vegetal infectado a plantas de cebada de 7 días var. Golden Promise que se han cultivado a intervalos regulares a una densidad de 100 conidios/mm².

45 La inoculación con BghA6 se lleva a cabo usando plántulas de 7 días agitando los conidios de plantas infectadas en una torre de inoculación a una densidad de aproximadamente 100 conidios/mm² (a menos que se indique lo contrario).

Ejemplo 2: Extracción de ARN

Se extrae el ARN total de 8 a 10 segmentos de hoja primarios (de 5 cm de longitud) por medio de "tampón de extracción de ARN" (AGS, Heidelberg, Alemania).

50 Con este fin, se recogen segmentos de hojas centrales primarias de 5 cm de longitud y se homogeneizan en nitrógeno líquido usando un mortero y la mano. El homogeneizado se almacena a -70°C hasta que se extrae el ARN.

Se extrae el ARN total del material foliar congelado con la ayuda de un kit de extracción de ARN" (AGS, Heidelberg. Con este fin, 200 mg del material foliar congelado se cubre con 1,7 ml de tampón de extracción de ARN (AGS) en un

tubo de microcentrífuga (1 ml) e inmediatamente se someten a un mezclado total. Tras la adición de 200 µl de cloroformo, la mezcla se mezcla de nuevo extensamente y se agita durante 45 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital a 200 rpm. Después, la mezcla se centrifuga durante 15 minutos a 20.000 y a 4°C con el fin de separar las fases, la fase superior acuosa se transfiere a un tubo de microcentrífuga fresco y se desecha la fase inferior. La fase acuosa se purifica de nuevo con 900 µl de cloroformo homogeneizando 3 veces durante 10 segundos y se recentrifuga (véase anteriormente) y se elimina la fase superior. Para precipitar el ARN, se añaden 850 µl de 2-propanol, la mezcla se homogeneiza y se introduce en hielo durante de 30 a 60 minutos. Después, la mezcla se centrifuga durante 20 minutos (véase anteriormente), el sobrenadante se decanta cuidadosamente, se añaden 2 ml de etanol de fuerza 70% (-20°C), usando una pipeta, y el lote se mezcla y se centrifuga de nuevo durante 10 minutos. Después, el sobrenadante se decanta de nuevo y el sedimento se libera cuidadosamente del fluido residual, usando una pipeta, y después se seca en una corriente de aire puro en una bancada estéril. Después, el ARN se disuelve en 50 µl de agua DEPC en hielo y el lote se mezcla y se centrifuga durante 5 minutos (véase anteriormente). 40 µl del sobrenadante se transfieren a un tubo de microcentrífuga fresco como solución de ARN y se almacena a -70°C.

La concentración de ARN se determina fotométricamente. Con este fin, la solución de ARN se diluye a 1:99 (v/v) con agua destilada y la absorbancia (Fotómetro DU 7400, Beckman) se mide a 260 nm ($E_{260\text{ nm}} = 1$ a 40 µg de ARN/ml). De acuerdo con los contenidos calculados de ARN, las concentraciones de las soluciones de ARN se normalizan después con agua DEPC hasta 1 µg/µl y se verifican en un gel de agarosa.

Para verificar las concentraciones de ARN en un gel de agarosa horizontal (1% de agarosa en tampón 1 x MOPS con 0,2 µg/ml de bromuro de etidio), 1 µl de la solución de ARN se trata con 1 µl de 10 x MOPS, 1 µl de marcador de color y 7 µl de agua DEPC, se separa de acuerdo con el tamaño a una tensión de 120 V en el gel en 1 x MOPS de tampón de recorrido en el curso de 1,5 horas y se fotografían bajo luz UV. Todas las diferencias en la concentración de los extractos de ARN se normalizan con agua DEPC y la normalización se verifica de nuevo en el gel.

Ejemplo 3: Clonación de la secuencia de ADNc de la estomatina STM1 de cebada

Un contig para la estomatina STM1 se construyó a partir de las secuencias EST públicamente disponibles.

HW03O11, HO31J10 (Base de datos Crop EST de IPK Gatersleben) y BM368585 (SCRI). El clon se subclonó en pIPK-TA38 (véase más adelante) mediante escisión de restricción y unión. Se usó el siguiente enfoque para la PCR extremo a extremo del clon de longitud completa HvSTM1.

Cebador superior:

GATATGGCGATGTCGACGGCGACC

Cebador inferior:

AACTTACTTCTGGTGCGGAAAGG .

Programa del ciclador:

94° C		5 minutos
94° C		30 segundos
59,8° C	30 segundos	35 ciclos
72° C		1 minuto 30 segundos
72° C		10 minutos
4° C.		

Mezcla:

1 µl del molde (ADNc de cebada)
 5 µl de 10 x tampón
 20 pmol del cebador 1
 20 pmol del cebador 2
 1 µl de dNTP (Invitrogen, 10 mM)

1 µl de ADN polimerasa de Pfu clonada (Stratagene, 2,5 U/µl) H₂O hasta 50 µl

La PCR de extremo a extremo dio un producto de 1.086 pb. El producto de la pCR obtenido se aisló mediante un gel de agarosa de 1% de fuerza, se extrajo del gel, se clonó en pCR4-Topo (Invitrogen Life Technologies) por medio de unión T por encima y se secuenció.

5 Ejemplo 5: Realización del análisis del ARNi de células únicas transitoria

Material biológico

Líneas isogénicas próximas de cebada (NIL) de las variedades Ingrid (*Mlo*) elIngrid BC₇ *mlo5* o variedad de cebada Golden Promise se cultivaron en cámaras de ambiente controlado en macetas llenas de compost de cultivo (procedencia; IPK Gatersleben) (16 horas de luz procedentes de lámparas halógenas de metal; 8 horas de oscuridad, humedad atmosférica relativa de 70%, temperatura constante de 18° C). *Blumeria graminis* DC Speer f.sp. *hordei* (*Bgh*) (aislado 4,8 que comprende *AvrMla9*) se cultivó a 22° C y 16 hras de luz mediante transferencia semanal a hojas de cebada frescas de la variedad cv. Golden Promise. *Blumeria graminis* DC Speer f.sp. *hordei* (*Bgh*) del aislado suizo FAL (Reckenholtz) se propagó a 22°C y 16 horas de luz mediante transferencia semanal a hojas frescas de trigo de la variedad cv. Kanzler.

15 Vectores plasmídicos

El vector pIPKTA38 se usó como vector de entrada para el sistema de clonación Gateway™ (Invitrogen). El vector es un derivado de pENTR1a en el que el gen *ccdB* se ha eliminado y se ha insertado un nuevo sitio de clonación múltiple. El vector de destino usado fue pIPKTA30N, basado en un fondo de pUC18 y que comprende un promotor constitutivo, un terminador y dos casetes Gateway que comprenden sitios attR, el gen *ccdB* y un gen de resistencia al cloranfenicol. Los dos casetes están dispuestos en direcciones opuestas y separados uno de otro por un espaciador delgen RGA2 del trigo (número de acceso AF326781). Este sistema vector permite la transferencia en una etapa de dos copias de un fragmento de PCR mediante el vector de entrada en el vector de dsRNAi por medio de la reacción de clonasa Gateway LR (Invitrogen).

PCR y diseño de cebador

Las secuencias EST del gen diana se amplificaron mediante PCR. El ADN purificado de los clones de ADN seleccionados se usó como molde para la reacción de PCR. Los cebadores derivaron con la ayuda del paquete de software "Primer3" en modo de archivo de lote usando las secuencias 5'-EST. Las secuencias EST se amplificaron típicamente con un cebador directo universal y un cebador inverso específico de EST. Los productos de la amplificación estaban en el intervalo de 400 - 700 pb. Los cebadores tenían una longitud de 20 – 22 pb y tenían una T_m de aproximadamente 65° C. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos usando una ADN polimerasa que produce extremos romos (ThermalAce; Invitrogen). Los productos de la PCR se purificaron con la ayuda del kit MinElute UF (Qiagen, Hilden, Alemania) y eluyeron con 25 µl de agua.

Unión en el vector de entrada

Los fragmentos de la PCR se clonaron en el sitio de escisión *Swa* I de este vector pIPKTA38. La unión se llevó a cabo a 25°C en presencia de la N U T4 ADN ligasa (MBI Fermentas) y 5 U de *Swa* I por reacción. Para optimizar las condiciones de reacción para *Swa* I, el tampón se suplementó con NaCl HASTA UNA Concentración final de 0,05 M. Tras 1 h, la reacción se terminó calentando durante 15 minutos a 65° C. Después, se añadieron 5U adicionales de *Swa* I con el fin de suprimir una reunión del plásmido. El tampón *Swa* I se suplementó con NaCl adicional hasta una concentración final de 0,1 M. La mezcla de reacción se incubó durante una hora más a 25°C. Los clones pIPKTA38-EST recombinantes resultantes se usaron para la transformación de células *E.coli* DH10B químicamente competentes en placas de microtitulación de 96 pocillos (5 µl de mezcla de unión por 20 µl de células competentes) y se sembraron en placas de agar LB con kanamicina. Una colonia de cada reacción de clonación se eligió y se suspendió en 1,2 ml de cultivo líquido de LB + Kanamicina y se distribuyó en placas de 96 pocillos. Las placas se cubrieron con una película permeable al aire y se incubaron durante 18 horas 37°C en un agitador. Después, las placas de pocillos profundos se centrifugaron durante 10 minutos a 750 g y los sedimentos se usaron para aislar el plásmido por medio de un kit de plásmido (Macherey-Nagel). La presencia del plásmido pIPKTA38 se verificó mediante digestión de restricción con *Eco*RI. Los clones pIPKTA38 positivos se usaron como vector donante en la reacción LR

La reacción LR y preparación de construcciones de ARNi

Los fragmentos de EST en pIPKTA38 se clonaron como repeticiones invertidas en el vector de destino de ARNi pIPKTA30N a través de una reacción de recombinación de LR sencilla. El volumen de reacción se redujo a 6 µl y estaba compuesto por 1 µl del clon donante pIPKTA38, 1 µl el vector de destino pIPKTA30N (150 ng/µl), 0,8 µl de la mezcla de enzima clonasa LR y 3,2 µl de H₂O. La reacción se incubó durante la noche a temperatura ambiente y 5 µl se transformaron en 20 µl de células *E. coli* químicamente competentes en placas de PCR de 96 pocillos. Dos placas de PCR de 96 pocillos profundos con LB + Amplicilina se llenaron hasta la mitad con la mitad del volumen de la mezcla de transformación, se sellaron con una película permeable al aire y se incuban durante 245 horas a 37°C

en un agitador de placas. Después, las placas de pocillos profundos se centrifugaron durante 10 minutos a 750 g de dos duplicados de cada una se combinaron y sometieron a la preparación del plásmido. El kit de plásmido NucleoSpin Robot-96 (Macherey-Nagel) se usó para este fin. La cantidad de ADN fue, de media, 20 - 30 µg de ADN por clon.

5 Bombardeo de partículas e inoculación de esporas fúngicas

10 Segmentos de hojas primarias de plántulas de cebada de 7 días se introdujeron en Phytoagar al 0,5% en peso/volumen (Ducheve) en agua, que comprende benzimidazol y bombardeo con partículas de oro (diámetro 1 µm) in en un sistema PDS-1000/He (Bio-Rad, Munich, Alemania) usando el adaptador Hepta con una presión de helio de 900 psi. Siete segmentos de hoja se usaron por bombardeo. El recubrimiento de la partícula con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 M se llevó a cabo como han descrito Schweizer et al., 1999, a excepción de que la solución madre comprendía 25 mg ml^{-1} de oro. Después del recubrimiento se eliminó todo el sobrenadante y las partículas se resuspendieron en 30 µl de etanol puro. Para el bombardeo se usaron 2.18 ml de microportador de oro. Cuatro horas después del bombardeo, los segmentos de hoja se introdujeron en 1% en peso/v al 1 % (Ducheve) en agua, que comprenden 20 ppm de bencimidazol en placas de 20 x 20 cm y se pesaron en ambos extremos.

15 Los segmentos de hoja se inocularon con esporas de Bgt y Bgh 48 horas o 96 horas después del bombardeo de partículas. El plásmido pUbiGUS, que comprende el gen de la β -glucuronidasa (GUS) bajo el control del promotor de la ubiquitina de maíz, se usó como construcción indicadora para las células epidérmicas transformadas. 40 horas después de la inoculación, los segmentos de hoja se tiñeron con actividad GUS y se eliminó la tinción durante 5 minutos con 7,5% en peso/v de ácido tricloroacético y 50% de metanol. La solución de tinción de GUS se ha descrito en Schweizer et al. 1999.

20 Para evaluar la interacción de los fenotipos, las células teñidas con GUS se contaron con un microscopio óptico se determinó el número de haustorios en estas células transformadas, del que se derivó el índice de haustorios. Como alternativa, se determinó el número de células teñidas con GUS que comprendían al menos un haustorio y de este modo se calculó el índice de susceptibilidad.

25 Véase la figura 1. Incremento de la resistencia del huésped mediante el ARNi de la estomatina STM1.

Listado de secuencias

<110> BPS GmbH, 67056 Ludwigshafen, Alemania

<120> Uso de polinucleótidos de estomatina (STN1) para alcanzar una resistencia a patógenos en plantas

<130> PF57532

30 <160> 19

<170> PatentIn versión 3,1

<210> 1

<211> 2738

<212> ADN

35 <213> Hordeum vulgare

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2738)

<223> ADNc de HvStm1

40 <220>

<221> CDS

<222> (48)..(1127)

<223>

<400> 1

ES 2 464 315 T3

ataaaataaa tttcctcttc ctctcgactc ggatcgactc gactccg atg gcg atg	56
Met Ala Met 1	
tcg acg gcg acc cgg atg ctg gcg cgc cgc gcc gtc ccc ggc cac ctc	104
Ser Thr Ala Thr Arg Met Leu Ala Arg Arg Ala Val 15 Pro Gly His Leu 5 10	
ctc cgc aac gcc aac ccc gca gcc gcg acg gcg gct ctg ctg caa cgg	152
Leu Arg Asn Ala Asn Pro Ala Ala Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gln Arg 20 25 30 35	
cgg tkg tac cgc ggg gga gcg gac cct gyg ccg tcc ttg tac cac ccg	200
Arg Xaa Tyr Arg Gly Gly Ala Asp Pro Xaa Pro Ser Leu Tyr His Pro 40 45 50	
ccg ccg acc ccg gcg aac ctg ggc ctg agc atc gtc ccg gag aag aag	248
Pro Pro Thr Pro Ala Asn Leu Gly Leu Ser Ile Val Pro Glu Lys Lys 55 60 65	
gcg ttc gtg gtg gag cgc ttc ggc aag tac ctc aag acg ctg ccg tcg	296
Ala Phe Val Val Glu Arg Phe Gly Lys Tyr Leu Lys Thr 80 Leu Pro Ser 70 75 80	
ggg atc cac ctc ctc atg ccc ggc gtc gac cgc atc gcc tac gtc cac	344
Gly Ile His Leu Leu Met Pro Gly Val Asp Arg Ile Ala Tyr Val His 85 90 95	
tcg ctc aag gag gag gcc atc cca atc cca gac aac tcg gca atc aca	392
Ser Leu Lys Glu Glu Ala Ile Pro Ile Pro Asp Asn Ser Ala Ile Thr 100 105 110 115	
aag gac aac gta tca ata cag atc gga gga gtg cta tac gtc aag atc	440
Lys Asp Asn Val Ser Ile Gln Ile Gly Val Leu Tyr Val Lys Ile 120 125 130	
gtc gac ccc tac atg gcc tcg tac ggc gtc rag aac ccc atc tat gct	488
Val Asp Pro Tyr Met Ala Ser Tyr Gly Val Xaa Asn Pro Ile Tyr Ala 135 140 145	
gtc atc cag ctt gcc cag aca aca atg agg agt gag ctt ggc aag atc	536
Val Ile Gln Leu Ala Gln Thr Thr Met Arg Ser Glu Leu Gly Lys Ile 150 155 160	
acc ctc gac aag acc ttc gag gag agg gac acg ctc aac tta aac att	584
Thr Leu Asp Lys Thr Phe Glu Glu Arg Asp Thr Leu Asn Leu Asn Ile 165 170 175	
gtg aag tca atc aat gag gca gct gaa act tgg ggt ttg aag tgt ctt	632
Val Lys Ser Ile Asn Glu Ala Ala Glu Thr Trp Gly Leu Lys Cys Leu 180 185 190 195	
cgc tac gaa atc agg gac atc act cct cca gat gga gtc aag aag gcc	680
Arg Tyr Glu Ile Arg Asp Ile Thr Pro Asp Gly Val Lys Lys Ala 200 205 210	
atg gag atg cag gcc gca gca gag cgc aag aaa cgt gct cag atc ctt	728
Met Glu Met Gln Ala Ala Ala Glu Arg Lys Lys Arg Ala Gln Ile Leu 215 220 225	
gag tct gaa ggt gct atg atg gaa aaa gca aac aga gca aag ggt gaa	776
Glu Ser Glu Gly Ala Met Met Glu Lys Ala Asn Arg Ala Lys Gly Glu 230 235 240	
gct gaa gcg att ctt gcc agg tca caa gcc act gct gaa ggg atc agg	824
Ala Glu Ala Ile Leu Ala Arg Ser Gln Ala Thr Ala Glu Gly Ile Arg 245 250 255	
atg gtc tct gag tcg ttt aaa act gaa ggc agc aca gag gct gcc agc	872
Met Val Ser Glu Ser Phe Lys Thr Glu Gly Ser Thr Glu Ala Ala Ser 260 265 270 275	
ttg agg att gct gaa cag tac atc aga gca ttc agt gaa ctg gct aga	920
Leu Arg Ile Ala Glu Gln Tyr Ile Arg Ala Phe Ser Glu Leu Ala Arg 280 285 290	
act acg aac acg atg ctt ctc ccc agc gac gca ggc aat ccg ggg aca	968
Thr Thr Asn Thr Met Leu Leu Pro Ser Asp Ala Gly Asn Pro Gly Thr 295 300 305	
atg att gct cag gcc ctt cag ata tac aac cac acg tac aag cag aaa	1016
Met Ile Ala Gln Ala Leu Gln Ile Tyr Asn His Thr Tyr Lys Gln Lys	

ES 2 464 315 T3

310	315	320	
ctg acg ctg gga agc ccc agc ccc agc aag cag gcg gtg gcg gca gaa			1064
Leu Thr Leu Gly Ser Pro Ser Pro Ser Lys Gln Ala Val Ala Ala Glu			
325	330	335	
gag gct gat ttg tcc ctt ggg atg cca tcc gtg agc gac ctc ggc acc			1112
Glu Ala Asp Leu Ser Leu Gly Met Pro Ser Val Ser Asp Leu Gly Thr			
340	345	350	355
ttt ccg cac cag aag taaagcagtt ttttttttt tttactgttt tgtagggag			1167
Phe Pro His Gln Lys			
360			
gaatggatag ctgactgga tagatagatt gctagggagg cagtgcact gggtcacgag			1227
tgaagatttg ctgattaggt aggtcggctg gttaggagca gcttgagagc aagctttttg			1287
tggtgtctata tgaatgggtg gtgtagatg cagaaccttt gaatatgttg catgagatat			1347
ttgcggtttt ggtcttttaa aaataaaata aatttcctct tcctctcgac tcggatcgac			1407
tcgactccga tggcgatgac gacggcgacc cggatgctgg cgcgcccgcg cgtccccggc			1467
cacctcctcc gcaacgcaa ccccgagcc gcgacggcgg ctctgctgca acggcggtkg			1527
taccgctggg gagcggacc tgygccgtcc ttgtaccacc cgcgcccgac cccggcgaac			1587
ctgggcttga gcatcgtccc ggagaagaag gcgttcgtgg tggagcgctt cggcaagtac			1647
ctcaagagc tgccgtcgg gatccacctc ctatgcccg gcgtcgacc catcgctac			1707
gtccactcgc tcaaggagga ggccatccca atcccagaca actcggcaat cacaaaggac			1767
aacgtatcaa tacagatcgg aggagtgcta tacgtcaaga tcgtcgacc ctacatggcc			1827
tcgtacggcg tcragaacct catctatgct gtcatccagc ttgcccagac aacaatgagg			1887
agtgagcttg gcaagatcac cctcgacaag acctcgagg agagggacac gctcaactta			1947
aacattgtga agtcaatcaa tgaggcagct gaaacttggg gtttgaagtg tcttcgctac			2007
gaaatcaggg acatcactcc tccagatgga gtcaagaagg ccatggagat gcagcccga			2067
gcagagcgca agaaacgtgc tcagatcctt gagtctgaag gtgctatgat ggaaaaagca			2127
aacagagcaa aggggtgaagc tgaagcgatt cttgccaggt cacaagccac tgctgaaggg			2187
atcaggatgg tctctgagtc gtttaaaact gaaggcagca cagaggctgc cagcttgagg			2247
attgctgaac agtacatcag agcattcagt gaactggcta gaactacgaa cacgatgctt			2307
ctccccagcg acgcaggcaa tccggggaca atgattgctc aggcccttca gatatacaac			2367
cacacgtaca agcagaaact gacgtggga agccccagcc ccagcaagca ggcggtggcg			2427
gcagaagagg ctgatttgc ccttgggatg ccatccgtga gcgacctcg cacctttccg			2487
caccagaagt aaagcagttt ttttttttt ttactgtttt gttagggagg aatggatagc			2547
tagactggat agatagattg ctagggaggc agtgcaactg ggtcacgagt gaagatttgc			2607
tgattagga ggtcggtcgg ttaggagcag cttgagagca agctttttgt gtgtctatat			2667
gaatgggtgg tgtagatgc agaaccttg aatatgttgc atgagatatt tgcggtttg			2727
gtctttaaaa a			2738

<210> 2

<211> 360

5 <212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<220>

ES 2 464 315 T3

<221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> La 'Xaa' en la ubicación 37 representa Trp o Leu.

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (45)..(45)

<223> La 'Xaa' en la ubicación 45 representa Ala, o val.

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (142)..(142)

<223> La "xaa" en la ubicación142 representa Glu o Lys.

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (2738)

<223> ADNc de HvStm1

20 <400> 2

```

Met Ala Met Ser Thr Ala Thr Arg Met Leu Ala Arg Arg Ala Val Pro
 1                               5 10 15

Gly His Leu Leu Arg Asn Ala Asn Pro Ala Ala Ala Thr Ala Ala Leu
                20 25 30

Leu Gln Arg Arg Xaa Tyr Arg Gly Gly Ala Asp Pro Xaa Pro Ser Leu
                35 40 45

Tyr His Pro Pro Pro Thr Pro Ala Asn Leu Gly Leu Ser Ile Val Pro
 50 55 60

Glu Lys Lys Ala Phe Val Val Glu Arg Phe Gly Lys Tyr Leu Lys Thr
65 70 75 80

Leu Pro Ser Gly Ile His Leu Leu Met Pro Gly Val Asp Arg Ile Ala
                85 90 95

Tyr Val His Ser Leu Lys Glu Glu Ala Ile Pro Ile Pro Asp Asn Ser

```

ES 2 464 315 T3

100 105 110

Ala Ile Thr Lys Asp Asn Val Ser Ile Gln Ile Gly Gly Val Leu Tyr
115 120 125

Val Lys Ile Val Asp Pro Tyr Met Ala Ser Tyr Gly Val Xaa Asn Pro
130 135 140

Ile Tyr Ala Val Ile Gln Leu Ala Gln Thr Thr Met Arg Ser Glu Leu
145 150 155 160

Gly Lys Ile Thr Leu Asp Lys Thr Phe Glu Glu Arg Asp Thr Leu Asn
165 170 175

Leu Asn Ile Val Lys Ser Ile Asn Glu Ala Ala Glu Thr Trp Gly Leu
180 185 190

Lys Cys Leu Arg Tyr Glu Ile Arg Asp Ile Thr Pro Pro Asp Gly Val
195 200 205

Lys Lys Ala Met Glu Met Gln Ala Ala Ala Glu Arg Lys Lys Arg Ala
210 215 220

Gln Ile Leu Glu Ser Glu Gly Ala Met Met Glu Lys Ala Asn Arg Ala
225 230 235 240

Lys Gly Glu Ala Glu Ala Ile Leu Ala Arg Ser Gln Ala Thr Ala Glu
245 250 255

Gly Ile Arg Met Val Ser Glu Ser Phe Lys Thr Glu Gly Ser Thr Glu
260 265 270

Ala Ala Ser Leu Arg Ile Ala Glu Gln Tyr Ile Arg Ala Phe Ser Glu
275 280 285

Leu Ala Arg Thr Thr Asn Thr Met Leu Leu Pro Ser Asp Ala Gly Asn
290 295 300

Pro Gly Thr Met Ile Ala Gln Ala Leu Gln Ile Tyr Asn His Thr Tyr
305 310 315 320

Lys Gln Lys Leu Thr Leu Gly Ser Pro Ser Pro Ser Lys Gln Ala Val
325 330 335

Ala Ala Glu Glu Ala Asp Leu Ser Leu Gly Met Pro Ser Val Ser Asp
340 345 350

Leu Gly Thr Phe Pro His Gln Lys
355 360

<210> 3

<211> 1134

5 <212> ADN

<213> Oryza sativa (grupo de variedad japónica)

<220>

<221> CDS

ES 2 464 315 T3

<222> (1)..(1134)

<223>

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (1)..(1134)

<223> Proteina putativa de la banda 7 protein. ACCESO XP_480193. VERSIÓN XP_48019 3,1 GI:50941331. DBSOURCE REFSEQ: acceso XM_48019 3,1.

10 <400> 3

atg gcg acg ctc ctc cgg cga tcc gtc ggc ccc gcg cgc cag ctc ctc	48
Met Ala Thr Leu Leu Arg Arg Ser Val Gly Pro Ala Arg Gln Leu Leu	
1 5 10 15	
ctc cgc ccg cgc ccg ctc ccg ctc ccc cac gcc gcc tcc tcc acc cgc	96
Leu Arg Pro Arg Pro Leu Pro Leu Pro His Ala Ala Ser Ser Thr Arg	
20 25 30	
tcc ttc tcc cgc tac tac tcc cgc gac gac gtc tcg agg tac gag gcg	144
Ser Phe Ser Arg Tyr Tyr Ser Arg Asp Asp Val Ser Arg Tyr Glu Ala	
35 40 45	
ctg agc acg ccg gtg aac tgg ggg gtg agc atc gtg ccg gag aag aag	192
Leu Ser Thr Pro Val Asn Trp Gly Val Ser Ile Val Pro Glu Lys Lys	
50 55 60	
gcg ttc gtg gtg gag cgg ttc ggc aag tac gtc aag acg ctc gcc tcc	240
Ala Phe Val Val Glu Arg Phe Gly Lys Tyr Val Lys Thr Leu Gly Ser	
65 70 75 80	
ggg atc cac gtg ctc gtc ccc ctc gtc gac cgc atc gcc tac gtc cac	288
Gly Ile His Val Leu Val Pro Leu Val Asp Arg Ile Ala Tyr Val His	
85 90 95	
tcg ctc aag gag gag gcc atc ccc atc ccc gac cag tcc gcc atc acc	336
Ser Leu Lys Glu Glu Ala Ile Pro Ile Pro Asp Gln Ser Ala Ile Thr	
100 105 110	
aag gac aac gtc tcc atc cag atc gac ggc gtc ctc tac gtc aag att	384
Lys Asp Asn Val Ser Ile Gln Ile Asp Gly Val Leu Tyr Val Lys Ile	
115 120 125	
gtt gat ccc tac ctt gct tcc tat ggt gtg gag aat cca att ttt gca	432
Val Asp Pro Tyr Leu Ala Ser Tyr Gly Val Glu Asn Pro Ile Phe Ala	
130 135 140	
gtc ata cag ctt gcc caa aca act atg aga agt gag ctt gga aag att	480
Val Ile Gln Leu Ala Gln Thr Thr Met Arg Ser Glu Leu Gly Lys Ile	

ES 2 464 315 T3

145		150		155		160	
acg cta gac aag act ttt gag gag agg gat aca cta aat gag caa att		Thr Phe		Glu Glu Arg Asp Thr Leu Asn Glu Gln Ile			528
Thr Leu Asp Lys Thr 165				170		175	
gtg agg tcc att aat gag gct gca act gat tgg gga ctg aaa tgc ctc		Val Arg Ser Ile Asn Glu Ala Ala Thr 185		Trp Gly Leu Lys Cys Leu			576
Val Arg Ser Ile Asn Glu Ala Ala Thr 185				190			
cgt tat gag atc agg gat ata tct ccg cca cgt ggt gtt aag gtg gct		Arg Tyr Glu Ile Arg Asp Ile Ser Pro Pro Arg Gly Val Lys Val Ala					624
Arg Tyr Glu Ile Arg Asp Ile Ser Pro Pro Arg Gly Val Lys Val Ala				205			
atg gag atg caa gca gaa gca gaa agg aaa aag cgt gcc caa atc ctt		Met Glu Met Gln Ala Glu Ala Glu Arg Lys Lys Arg Ala Gln Ile Leu					672
Met Glu Met Gln Ala Glu Ala Glu Arg Lys Lys Arg Ala Gln Ile Leu				220			
gaa tca gaa ggt gct atg ttg gat cag gca aat cgc gca aag ggt gag		Glu Ser Val Glu Gly Ala Met 230		Gln Ala Asn Arg Ala Lys Gly Ala Lys Gly Glu			720
Glu Ser Val Glu Gly Ala Met 230				235		240	
gct gaa gca att ctt gca aag tct gaa gca act gct cga gga atc aga		Ala Glu Ala Ile Leu Ala Lys Ser Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ile Arg					768
Ala Glu Ala Ile Leu Ala Lys Ser Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ile Arg				250		255	
ttg gtc tct gag gcc atg agg acc aag ggc agc act gag gct gcg aac		Leu Val Ser Glu Ala Met Arg Thr Lys Gly Ser Thr Glu Ala Ala Asn					816
Leu Val Ser Glu Ala Met Arg Thr Lys Gly Ser Thr Glu Ala Ala Asn				265		270	
ctg aga gtt gct gaa caa tac atg aag gca ttt gct aat ctg gcc aaa		Leu Arg Val Ala Glu Gln Tyr Met 280		Lys Ala Phe Ala Asn Leu Ala Lys			864
Leu Arg Val Ala Glu Gln Tyr Met 280				285			
aag agc aac acg att ctc ctt cca agt gac gct ggc aac cca tca tcc		Lys Ser Asn Thr Ile Leu Leu Pro Ser Asp Ala Gly Asn Pro Ser Ser					912
Lys Ser Asn Thr Ile Leu Leu Pro Ser Asp Ala Gly Asn Pro Ser Ser				300			
ctc atc gcc cag tct ctc cag ata tac aag cac atc tgc cag acc aac		Leu Ile Ala Gln Ser Leu Gln Ile Tyr Lys His Ile Cys Gln Thr Asn					960
Leu Ile Ala Gln Ser Leu Gln Ile Tyr Lys His Ile Cys Gln Thr Asn				310		320	
agc ttg aag agt ggg aag tac ctc aca gat gct cta gag gag acg gaa		Ser Leu Lys Ser Gly Lys Tyr Leu Thr Asp Ala Leu Glu Glu Thr Glu					1008
Ser Leu Lys Ser Gly Lys Tyr Leu Thr Asp Ala Leu Glu Glu Thr Glu				330		335	
ccg gag gaa gaa gag ttg gac tct act gac cta cct tct ctg agc agc		Pro Glu Glu Glu Leu Asp Ser Thr Asp Leu Pro Ser Leu Ser Ser					1056
Pro Glu Glu Glu Leu Asp Ser Thr Asp Leu Pro Ser Leu Ser Ser				345		350	
ggg atg ccg tcc ccc gac atg cca gat gac cat gac aag act ttc tcc		Gly Met Pro Ser Pro Asp Met Pro Asp Asp His Asp Lys Thr Phe Ser					1104
Gly Met Pro Ser Pro Asp Met Pro Asp Asp His Asp Lys Thr Phe Ser				360		365	
ctg cag cgc cgc aac aag gac aag cac tga		Leu Gln Arg Arg Asn Lys Asp Lys His					1134
Leu Gln Arg Arg Asn Lys Asp Lys His				370		375	

<210> 4

<211> 377

5 <212> PRT

<213> Oryza sativa (grupo variedad japónica)

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(1134)

<223> proteína putativa de la banda 7. ACCESO XP_480193. VERSIÓN XP_48019 3,1 GI:50941331. DBSOURCE REFSEQ: acceso XM_48019 3,1.

ES 2 464 315 T3

<400> 4

Met Ala Thr Leu Leu Arg Arg Ser Val Gly Pro Ala Arg Gln Leu Leu
1 5 10 15

Leu Arg Pro Arg Pro Leu Pro Leu Pro His Ala Ala Ser Ser Thr Arg
20 25 30

Ser Phe Ser Arg Tyr Tyr Ser Arg Asp Asp Val Ser Arg Tyr Glu Ala
35 40 45

Leu Ser Thr Pro Val Asn Trp Gly Val Ser Ile Val Pro Glu Lys Lys
50 55 60

Ala Phe Val Val Glu Arg Phe Gly Lys Tyr Val Lys Thr Leu Gly Ser
65 70 75 80

Gly Ile His Val Leu Val Pro Leu Val Asp Arg Ile Ala Tyr Val His
85 90 95

Ser Leu Lys Glu Glu Ala Ile Pro Ile Pro Asp Gln Ser Ala Ile Thr
100 105 110

Lys Asp Asn Val Ser Ile Gln Ile Asp Gly Val Leu Tyr Val Lys Ile
115 120 125

Val Asp Pro Tyr Leu Ala Ser Tyr Gly Val Glu Asn Pro Ile Phe Ala
130 135 140

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

Thr Leu Asp Lys Thr Phe Glu Glu Arg Asp Thr Leu Asn Glu Gln Ile
165 170 175

Val Arg Ser Ile Asn Glu Ala Ala Thr Asp Trp Gly Leu Lys Cys Leu
180 185 190

Arg Tyr Glu Ile Arg Asp Ile Ser Pro Pro Arg Gly Val Lys Val Ala
195 200 205

Met Glu Met Gln Ala Glu Ala Glu Arg Lys Lys Arg Ala Gln Ile Leu
210 215 220

Glu Ser Glu Gly Ala Met Leu Asp Gln Ala Asn Arg Ala Lys Gly Glu

ES 2 464 315 T3

atg gca agc cta ctc cgg cga tct gcc gta ccc gcg cgc cag ctc ctc Met Ala Ser Leu Leu Arg Arg Ser Ala Val Pro Ala Arg Gln Leu Leu 1 5 10 15	48
ctc ctc ccg cgc cat ttc gcc gcc gcc ggc tcc gcc ccc gcc ttg tcc Leu Leu Pro Arg His Phe Ala Ala Ala Gly Ser Ala Pro Ala Leu Ser 20 25 30	96
cgc tcg ttc tcc cgc ttc aac ccc cga gac gac agc tct atg ttc gat Arg Ser Phe Ser Arg Phe Asn Pro Arg Asp Asp Ser Ser Met Phe Asp 35 40 45	144
cca ccg gag ccg ccg gtg aac tgg gcc gtg agc ata gtt ccg gag aag Pro Pro Glu Pro Pro Val Asn Trp Gly Val Ser Ile Val Pro Glu Lys 50 55 60	192
aag gct tac gtt gtg gag aga ttc ggg aag tat ctc aag acc ctc gcc Lys Ala Tyr Val Val Glu Arg Phe Gly Lys Tyr Leu Lys Thr Leu Gly 65 70 75 80	240
tcc ggg ttc cac ctc ctg atc ccc gcc gtc gac cgt att gcc tac gtg Ser Gly Phe His Leu Leu Ile Pro Ala Val Asp Arg Ile Ala Tyr Val 85 90 95	288
cac tcg ctc aag gaa gag acc atc cct atc cct cac cag aac gcc atc His Ser Leu Lys Glu Glu Thr Ile Pro Ile Pro His Gln Asn Ala Ile 100 105 110	336
acc aag gac aac gtc acc ata cag att gac agc gtc atc tat gtc aag Thr Lys Asp Asn Val Thr Ile Gln Ile Asp Ser Val Ile Tyr Val Lys 115 120 125	384
atc atg gac ccc tac ctt gct tcc tat ggt gtg gag aat cca atc tat Ile Met Asp Pro Tyr Leu Ala Ser Tyr Gly Val Glu Asn Pro Ile Tyr 130 135 140	432
gct gtc cta caa ctt gca caa aca acc atg aga agt gaa ctc ggg aag Ala Val Leu Gln Leu Ala Gln Thr Thr Met Arg Ser Glu Leu Gly Lys 145 150 155 160	480
ata acc tta gat aag act ttt gag gag aga gat gca tta aat gag aaa Ile Thr Leu Asp Lys Thr Phe Glu Glu Arg Asp Ala Leu Asn Glu Lys 165 170 175	528
att gtg agt gcc atc aat gaa gca gcc aca gat tgg ggc ctg aag tgt Ile Val Ser Ala Ile Asn Glu Ala Ala Thr Asp Trp Gly Leu Lys Cys 180 185 190	576
atc cgc tat gag atc agg gac ata aat cct cca gca ggg att agg cag Ile Arg Tyr Glu Ile Arg Asp Ile Asn Pro Pro Ala Gly Ile Arg Gln 195 200 205	624
gct atg gag atg cag gct gag gca gaa agg aaa aaa cgc gct caa atc Ala Met Glu Met Gln Ala Glu Ala Glu Arg Lys Lys Arg Ala Gln Ile 210 215 220	672
ctt gag tca gaa ggg atg aaa cag gcc caa atc ctt gaa tca gaa ggg Leu Glu Ser Glu Gly Met Lys Gln Ala Gln Ile Leu Glu Ser Glu Gly 225 230 235 240	720
aaa aag act gcc cag atc ctt gaa tct gaa gga gct atg ttg gat cta Lys Lys Thr Ala Gln Ile Leu Glu Ser Glu Gly Ala Met Leu Asp Leu 245 250 255	768
gca aac cgt gcc aag ggt gcg gct gaa gca att ctt gcc aag tca gaa Ala Asn Arg Ala Lys Gly Ala Ala Glu Ala Ile Leu Ala Lys Ser Glu 260 265 270 275 280 285	816

ES 2 464 315 T3

```

                260                265                270
gct act gct cgt gga atg aga ttg gtt tca gat gcg atg aca act gaa      864
Ala Thr Ala Arg Gly Met Arg Leu Val Ser Asp Ala Met Thr Thr Glu
                275                280                285

ggc agt gcc aag gct gct agc ctg aaa ctt gca gag caa tac atc gaa      912
Gly Ser Ala Lys Ala Ala Ser Leu Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Ile Glu
                290                295                300

gca ttc tca aat ctg gca caa aag aca aat aca atg ctt ctt cca ggt      960
Ala Phe Ser Asn Leu Ala Gln Lys Thr Asn Thr Met Leu Leu Pro Gly
                305                310                315

gat agt gcc agc cca gca tct ttc gtg gcc cag gca atg aag acg tat      1008
Asp Ser Ala Ser Pro Ala Ser Phe Val Ala Gln Ala Met Lys Thr Tyr
                320                325                330

gag caa atc cat tcc cac agc cag gca tta aag agc cac ccc cag ata      1056
Glu Gln Ile His Ser His Ser Gln Ala Leu Lys Ser His Pro Gln Ile
                335                340                345

gaa gag ctg aag gaa tca gga gag acc agt cct gct cca tct tct gag      1104
Glu Glu Leu Lys Glu Ser Gly Glu Thr Ser Pro Ala Pro Ser Ser Glu
                350                355                360

gcg agc aag aca cca cca ctc att gag gaa gca gat tct aac cag acc      1152
Ala Ser Lys Thr Pro Pro Leu Ile Glu Glu Ala Asp Ser Asn Gln Thr
                365                370                375                380

ttc tca ctg caa cgc ccc aag aac aag cag tga      1185
Phe Ser Leu Gln Arg Pro Lys Asn Lys Gln
                385                390

```

<210> 6

<211> 394

5 <212> PRT

<213> Zea mays

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(1185)

<223> proteína de tipo estomatina [zea mays]. ACCESO AAF68388 VERSIÓN AAF6838 8,1 GI:7716464 DBSOURCE ACCESO AF23637 2,1

<400> 6

15

```

Met Ala Ser Leu Leu Arg Arg Ser Ala Val Pro Ala Arg Gln Leu Leu
 1                    5                    10                    15

Leu Leu Pro Arg His Phe Ala Ala Ala Gly Ser Ala Pro Ala Leu Ser
                20                    25                    30

Arg Ser Phe Ser Arg Phe Asn Pro Arg Asp Asp Ser Ser Met Phe Asp
 35                    40                    45

```

ES 2 464 315 T3

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

ES 2 464 315 T3

Ile 65	Val	Pro	Glu	Arg	Lys 70	Ala	Phe	Val	Ile	Glu 75	Arg	Phe	Gly	Lys	Tyr 80	
gct Ala	acg Thr	acg Thr	ttg Leu	ccg Pro	tcg Ser	ggg Gly	att Ile	cat His	ttc Phe	ctc Leu	att Ile	ccg Pro	ttc Phe	gtg Val	gat Asp	288
cgt Arg	att Ile	gct Ala	tat Tyr	gtt Val	cat His	tct Ser	ctc Leu	aag Lys	gaa Glu	gaa Glu	gct Ala	atc Ile	ccg Pro	att Ile	ccg Pro	336
aat Asn	cag Gln	act Thr	gcg Ala	att Ile	act Thr	aaa Lys	gac Asp	aac Asn	gtt Val	agt Ser	atc Ile	cac His	atc Ile	gat Asp	ggt Gly	384
gtt Val	ctc Leu	tac Tyr	gtt Val	aag Lys	att Ile	gtg Val	gat Asp	cct Pro	aag Lys	tta Leu	gct Ala	tct Ser	tat Tyr	ggc Gly	gtt Val	432
gag Glu	agt Ser	cct Pro	atc Ile	tat Tyr	gct Ala	gtt Val	gta Val	cag Gln	ctg Leu	gct Ala	cag Gln	acc Thr	aca Thr	atg Met	cgt Arg	480
agt Ser	gag Glu	ctt Leu	ggt Gly	aag Lys	atc Ile	act Thr	ctt Leu	gat Asp	aag Lys	acc Thr	ttt Phe	gag Glu	gaa Glu	cga Arg	gac Asp	528
act Thr	ctc Leu	aac Asn	gag Glu	aag Lys	ata Ile	gtg Val	gaa Glu	gcc Ala	atc Ile	aat Asn	gtt Val	gct Ala	gca Ala	aaa Lys	gac Asp	576
tgg Trp	ggt Gly	ctt Leu	cag Gln	tgc Cys	ctt Leu	cgt Arg	tat Tyr	gag Glu	ata Ile	agg Arg	gat Asp	att Ile	atg Met	ccc Pro	cct Pro	624
cat His	gga Gly	gtg Val	cga Arg	gct Ala	gct Ala	atg Met	gaa Glu	atg Met	caa Gln	gct Ala	gaa Glu	gct Ala	gag Glu	cgt Arg	aaa Lys	672
aag Lys	aga Arg	gcc Ala	cag Gln	att Ile	ctt Leu	gag Glu	tct Ser	gaa Glu	gga Gly	gaa Glu	agg Arg	caa Gln	tcc Ser	cat His	atc Ile	720
aac Asn	att Ile	gct Ala	gat Asp	ggt Gly	aag Lys	aaa Lys	agt Ser	tct Ser	gta Val	atc Ile	ttg Leu	gca Ala	tct Ser	gaa Glu	gca Ala	768
gca Ala	aag Lys	atg Met	gac Asp	cag Gln	gtg Val	aat Asn	cga Arg	gca Ala	caa Gln	ggt Gly	gag Glu	gca Ala	gaa Glu	gca Ala	ata Ile	816
cta Leu	gct Ala	aga Arg	gca Ala	caa Gln	gca Ala	act Thr	gcg Ala	aaa Lys	ggc Gly	ctg Leu	gtc Val	ttg Leu	tta Leu	tct Ser	cag Gln	864
tcc Ser	ctc Leu	aag Lys	gaa Glu	act Thr	ggg Gly	gga Gly	gta Val	gag Glu	gcg Ala	gcg Ala	agt Ser	ttg Leu	aga Arg	gtt Val	gca Ala	912
gag Glu	caa Gln	tac Tyr	att Ile	aca Thr	gcc Ala	ttc Phe	ggt Gly	aac Asn	att Ile	gcc Ala	aag Lys	gag Glu	ggt Gly	acg Thr	ata Ile	960
atg Met	ttg Leu	ctt Leu	cca Pro	agt Ser	ggt Gly	gct Ala	tca Ser	aat Asn	cct Pro	gct Ala	agc Ser	atg Met	att Ile	gct Ala	caa Gln	1008
gct Ala	tta Leu	aca Thr	atg Met	tac Tyr	aaa Lys	agc Ser	ctt Leu	gtc Val	atc Ile	aat Asn	ggt Gly	cca Pro	agc Ser	aaa Lys	gat Asp	1056

ES 2 464 315 T3

	340	345	350	
	cac caa gaa aca caa gca ctt gat gaa aca gat ttg gaa gag ttg gaa			1104
	His Gln Glu Thr Gln Ala Leu Asp Glu Thr Asp Leu Glu Glu Leu Glu			
		355	360	365
	gac atg ggt gag aaa cat ata tca gaa ggc tct aat aac cga tca ggc			1152
	Asp Met Gly Glu Lys His Ile Ser Glu Gly Ser Asn Asn Arg Ser Gly			
		370	375	380
	tca ata tca ttt gac aca gag aaa cca gct ctt ccc att gta agt ttt			1200
	Ser Ile Ser Phe Asp Thr Glu Lys Pro Ala Leu Pro Ile Val Ser Phe			
		385	390	395
	ggt ttc caa act aat cct ttc aat cca aaa acc atg gga gcc tgt gcg			1248
	Val Phe Gln Thr Asn Pro Phe Asn Pro Lys Thr Met Gly Ala Cys Ala			
		405	410	415
	agc aaa cct aag gaa tct gac atc gtc gaa ggc tct gtc tcg acc gaa			1296
	Ser Lys Pro Lys Glu Ser Asp Ile Val Glu Gly Ser Val Ser Thr Glu			
		420	425	430
	aat gct gtt gtt gag tcc aag aat gcc gcg acc gag aca gat gcc aca			1344
	Asn Ala Val Val Glu Ser Lys Asn Ala Ala Thr Glu Thr Asp Ala Thr			
		435	440	445
	tta act cag gag aag aag gaa gag tcc att gaa gag aca aag aag gaa			1392
	Leu Thr Gln Glu Lys Lys Glu Glu Ser Ile Glu Glu Thr Lys Lys Glu			
		450	455	460
	ggt gag aca aaa gag gac tcc tct gag gca acc aag gct gag cca act			1440
	Gly Glu Thr Lys Glu Asp Ser Ser Glu Ala Thr Lys Ala Glu Pro Thr			
		465	470	475
	cca gaa gct gtg aag gca gaa gaa aaa aca tct tct gag act gag cca			1488
	Pro Glu Ala Val Lys Ala Glu Glu Lys Thr Ser Ser Glu Thr Glu Pro			
		485	490	495
	cca gca caa gag acc aca cct gct gct aaa acc gat gag gcc cct ctc			1536
	Pro Ala Gln Glu Thr Thr Pro Ala Ala Lys Thr Asp Glu Ala Pro Leu			
		500	505	510
	gtg atc ctt tga			1548
	Val Ile Leu			
		515		

<210> 8

<211> 515

5 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana (thale cress)

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(1548)

<223> proteína putativa [Arabidopsis thaliana]. ACCESO CAB81408 VERSIÓN CAB8140 8,1 GI:7269612 DBSOURCE embi locus ATCHRIV67, ACCESO AL16157 1,2.

<400> 8

15

ES 2 464 315 T3

Met Asn His Leu Val Arg Lys Ser Ser Val Gly Tyr Ser Ala Leu Arg
 1 5 10 15

Ser Val Ser Tyr Leu Arg Gln Ser Ala Val Thr Ser Pro Pro Pro Ile
 20 25 30

Phe Ser Ala Ala Ala Ser Thr Val Arg Gln Phe Thr Ser Ala Gly Tyr
 35 40 45

Pro Ser Asn Ser Phe Gln Leu Thr Pro Pro Thr Asn Trp Gly Ile Arg
 50 55 60

Ile Val Pro Glu Arg Lys Ala Phe Val Ile Glu Arg Phe Gly Lys Tyr
 65 70 75 80

Ala Thr Thr Leu Pro Ser Gly Ile His Phe Leu Ile Pro Phe Val Asp
 85 90 95

Arg Ile Ala Tyr Val His Ser Leu Lys Glu Glu Ala Ile Pro Ile Pro
 100 105 110

Asn Gln Thr Ala Ile Thr Lys Asp Asn Val Ser Ile His Ile Asp Gly
 115 120 125

Val Leu Tyr Val Lys Ile Val Asp Pro Lys Leu Ala Ser Tyr Gly Val
 130 135 140

Glu Ser Pro Ile Tyr Ala Val Val Gln Leu Ala Gln Thr Thr Met Arg
 145 150 155 160

Ser Glu Leu Gly Lys Ile Thr Leu Asp Lys Thr Phe Glu Glu Arg Asp
 165 170 175

Thr Leu Asn Glu Lys Ile Val Glu Ala Ile Asn Val Ala Ala Lys Asp
 180 185 190

Trp Gly Leu Gln Cys Leu Arg Tyr Glu Ile Arg Asp Ile Met Pro Pro
 195 200 205

His Gly Val Arg Ala Ala Met Glu Met Gln Ala Glu Ala Glu Arg Lys
 210 215 220

Lys Arg Ala Gln Ile Leu Glu Ser Glu Gly Glu Arg Gln Ser His Ile
 225 230 235 240

Asn Ile Ala Asp Gly Lys Lys Ser Ser Val Ile Leu Ala Ser Glu Ala
 245 250 255

Ala Lys Met Asp Gln Val Asn Arg Ala Gln Gly Glu Ala Glu Ala Ile
 260 265 270

Leu Ala Arg Ala Gln Ala Thr Ala Lys Gly Leu Val Leu Leu Ser Gln

ES 2 464 315 T3

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1236)

5 <223> proteína desconocida [Arabidopsis thaliana]. ACCESO NP_567778 VERSIÓN NP_56777 8,1 GI:18417021 DBSOURCE REFSEQ: ACCESO NM_11889 4,2

<400> 9

```

atg aac cac ctc gtt cgt aaa agc tcc gtc ggt tac tcc gcc ttg agg      48
Met Asn His Leu Val Arg Lys Ser Ser Val Gly Tyr Ser Ala Leu Arg
1          5          10          15

tcc gtt tcg tac ctc cgt caa tct gcc gtt acc tct cca cct ccg att      96
Ser Val Ser Tyr Leu Arg Gln Ser Ala Val Thr Ser Pro Pro Pro Ile
          20          25          30

ttc tcc gcc gcc gct tca acc gtt cgc cag ttc act tcc gcc ggc tat      144
Phe Ser Ala Ala Ala Ser Thr Val Arg Gln Phe Thr Ser Ala Gly Tyr
          35          40          45

cct tcc aac agt ttt caa ttg acg ccg ccg acg aat tgg gga atc cgg      192
Pro Ser Asn Ser Phe Gln Leu Thr Pro Pro Thr Asn Trp Gly Ile Arg
          50          55          60

ata gtt ccg gag agg aag gcg ttt gtg att gag cga ttc ggt aaa tac      240
Ile Val Pro Glu Arg Lys Ala Phe Val Ile Glu Arg Phe Gly Lys Tyr
65          70          75          80

gct acg acg ttg ccg tcg ggg att cat ttc ctc att ccg ttc gtg gat      288
Ala Thr Thr Leu Pro Ser Gly Ile His Phe Leu Ile Pro Phe Val Asp
          85          90          95

cgt att gct tat gtt cat tct ctc aag gaa gaa gct atc ccg att ccg      336
Arg Ile Ala Tyr Val His Ser Leu Lys Glu Glu Ala Ile Pro Ile Pro
100          105          110

aat cag act gcg att act aaa gac aac gtt agt atc cac atc gat ggt      384
Asn Gln Thr Ala Ile Thr Lys Asp Asn Val Ser Ile His Ile Asp Gly
115          120          125

gtt ctc tac gtt aag att gtg gat cct aag tta gct tct tat ggc gtt      432
Val Leu Tyr Val Lys Ile Val Asp Pro Lys Leu Ala Ser Tyr Gly Val
130          135          140

gag agt cct atc tat gct gtt gta cag ctg gct cag acc aca atg cgt      480
Glu Ser Pro Ile Tyr Ala Val Val Gln Leu Ala Gln Thr Thr Met Arg
145          150          155          160

agt gag ctt ggt aag atc act ctt gat aag acc ttt gag gaa cga gac      528
Ser Glu Leu Gly Lys Ile Thr Leu Asp Lys Thr Phe Glu Glu Arg Asp

```

10

ES 2 464 315 T3

	165	170	175	
	act ctc aac gag aag ata gtg gaa gcc atc aat gtt gct gca aaa gac Thr Leu Asn Glu Lys Ile Val Glu Ala Ile Asn Val Ala Ala Lys Asp 180 185 190			576
	tgg ggt ctt cag tgc ctt cgt tat gag ata agg gat att atg ccc cct Trp Gly Leu Gln Cys Leu Arg Tyr Glu Ile Arg Asp Ile Met Pro Pro 195 200 205			624
	cat gga gtg cga gct gct atg gaa atg caa gct gaa gct gag cgt aaa His Gly Val Arg Ala Ala Met Glu Met Gln Ala Glu Ala Glu Arg Lys 210 215 220			672
	aag aga gcc cag att ctt gag tct gaa gga gaa agg caa tcc cat atc Lys Arg Ala Gln Ile Leu Glu Ser Glu Gly Arg Gln Ser His Ile 225 230 235 240			720
	aac att gct gat ggt aag aaa agt tct gta atc ttg gca tct gaa gca Asn Ile Ala Asp Gly Lys Lys Ser Ser Val Ile Leu Ala Ser Glu Ala 245 250 255			768
	gca aag atg gac cag gtg aat cga gca caa ggt gag gca gaa gca ata Ala Lys Met Asp Gln Val Asn Arg Ala Gln Gly Glu Ala Glu Ala Ile 260 265 270			816
	cta gct aga gca caa gca act gcg aaa ggc ctg gtc ttg tta tct cag Leu Ala Arg Ala Gln Ala Thr Ala Lys Gly Leu Val Leu Leu Ser Gln 275 280 285			864
	tcc ctc aag gaa act ggg gga gta gag gcg gcg agt ttg aga gtt gca Ser Leu Lys Glu Thr Gly Val Glu Ala Ala Ser Leu Arg Val Ala 290 295 300			912
	gag caa tac att aca gcc ttc ggt aac att gcc aag gag ggt acg ata Glu Gln Tyr Ile Thr Ala Phe Gly Asn Ile Ala Lys Glu Gly Thr Ile 305 310 315 320			960
	atg ttg ctt cca agt ggt gct tca aat cct gct agc atg att gct caa Met Leu Leu Pro Ser Gly Ala Ser Asn Pro Ala Ser Met Ile Ala Gln 325 330 335			1008
	gct tta aca atg tac aaa agc ctt gtc atc aat ggt cca agc aaa gat Ala Leu Thr Met Tyr Lys Ser Leu Val Ile Asn Gly Pro Ser Lys Asp 340 345 350			1056
	cac caa gaa aca caa gca ctt gat gaa aca gat ttg gaa gag ttg gaa His Gln Glu Thr Gln Ala Leu Asp Glu Thr Asp Leu Glu Glu Leu Glu 355 360 365			1104
	gac atg ggt gag aaa cat ata tca gaa ggc tct aat aac cga tca ggc Asp Met Gly Glu Lys His Ile Ser Glu Gly Ser Asn Asn Arg Ser Gly 370 375 380			1152
	tca ata tca ttt gac aca gag aaa cca ggt cac acc ggt gaa cca cga Ser Ile Ser Phe Asp Thr Glu Lys Pro Gly His Thr Gly Glu Pro Arg 385 390 400			1200
	ttt tct ctt cag aac cgc aac aag gat ccg cag tag Phe Ser Leu Gln Asn Arg Asn Lys Asp Pro Gln 405 410			1236

<210> 10

<211> 411

5 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana (thale cress)

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(1236)

<223> proteína desconocida [Arabidopsis thaliana]. ACCESO NP_567778 VERSIÓN NP_56777 8,1 GI:18417021

ES 2 464 315 T3

DBSOURCE REFSEQ: ACCESO NM_11889 4,2

<400> 10

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

5

ES 2 464 315 T3

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

<210> 11

<211> 1206

5 <212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana (thale cress)

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1206)

<223>

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (1)..(1206)

<223> proteína desconocida [Arabidopsis thaliana]. ACCESO NP_200221 VERSIÓN NP_20022 1,1 GI:15239547

ES 2 464 315 T3

DBSOURCE REFSEQ: ACCESO NM_12479 0,2

<400> 11

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

5

ES 2 464 315 T3

210	215	220	
att gtg gaa gcc atc aat gtt gct gca aaa gat tgg ggt ctt cag tgc			720
Ile Val Glu Ala Ile Asn Val Ala Ala Lys Asp Trp Gly Leu Gln Cys			240
225	230	235	
ctt cgt tat gag atc agg gat atc atg cct cct aat gga gtg aga gtt			768
Leu Arg Tyr Glu Ile Arg Asp Ile Met Pro Pro Asn Gly Val Arg Val			255
245	250	255	
gct atg gaa atg caa gct gaa gct gaa cgt aaa aag aga gcc cag att			816
Ala Met Glu Met Gln Ala Glu Ala Glu Arg Lys Lys Arg Ala Gln Ile			270
260	265	270	
ctt gag tct gaa gga gaa cgt caa gcc cat atc aat aga gct gat ggt			864
Leu Glu Ser Glu Gly Glu Arg Gln Ala His Ile Asn Arg Ala Asp Gly			285
275	280	285	
aag aaa agt tct gta atc ttg gaa tca gaa gct gca atg atg gac caa			912
Lys Lys Ser Ser Val Ile Leu Glu Ser Glu Ala Ala Met Met Asp Gln			300
290	295	300	
gtc aat cgt gca caa ggt gag gct gaa gca ata tta gct aga gca caa			960
Val Asn Arg Ala Gln Gly Glu Ala Glu Ala Ile Leu Ala Arg Ala Gln			320
305	310	315	
gca aca gcc aag gga ctg gcc atg gta tct caa tcc ctc aag gaa gct			1008
Ala Thr Ala Lys Gly Leu Ala Met Val Ser Gln Ser Leu Lys Glu Ala			335
325	330	335	
ggt gga gag gag gct gcg agt ttg aga gtt gcg gag caa tac att caa			1056
Gly Gly Glu Glu Ala Ala Ser Leu Arg Val Ala Glu Gln Tyr Ile Gln			350
340	345	350	
gct ttt gcc aaa att gct aag gag ggt aca aca atg ctg ctt ccg agt			1104
Ala Phe Gly Lys Ile Ala Lys Glu Gly Thr Thr Met Leu Leu Pro Ser			365
355	360	365	
aat gtc gac aat cct gct agc atg atc gct caa gct tta gga atg tac			1152
Asn Val Asp Asn Pro Ala Ser Met Ile Ala Gln Ala Leu Gly Met Tyr			380
370	375	380	
aaa ggg ttg tca aca aag gtc cca aca gtg gtt tca ggg aaa ctt ctg			1200
Lys Gly Leu Ser Thr Lys Val Pro Thr Val Val Ser Gly Lys Leu Leu			400
385	390	395	
gag tag			1206
Glu			

<210> 12

<211> 401

5 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana (thale cress)

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(1206)

<223> proteína desconocida [Arabidopsis thaliana]. ACCESO NP_200221 VERSIÓN NP_20022 1,1 GI:15239547 DBSOURCE REFSEQ: ACCESO NM_12479 0,2

<400> 12

15

ES 2 464 315 T3

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

Phe Leu Pro Met Leu Ser Ala Ala Val Pro Lys Ile Leu Ser Ser Leu
20 25 30

Ala Ala Ala Ser Thr Val Arg Asn Phe Ser Ser Thr Gly Ser Pro Leu
35 40 45

Thr Ser Tyr Gln Ile Asn Lys Pro Ser Pro Ser Lys Ser Phe Thr Ser
50 55 60

Arg Leu Leu His Gln Ser Ser Ser Ala Gly Thr Pro Pro Gln Gln Leu
65 70 75 80

Phe Gly Ala Arg Ser Phe Ser Ser Pro Ser Ser Asp Phe Asn Ser Tyr
85 90 95

His Ile Asn Pro Pro Ser Asn Trp Gly Ile Arg Ile Val Pro Glu Arg
100 105 110

Lys Ala Cys Val Ile Glu Arg Phe Gly Lys Phe His Thr Thr Leu Pro
115 120 125

Ala Gly Ile His Phe Leu Val Pro Phe Val Asp Arg Ile Ala Tyr Val
130 135 140

His Ser Leu Lys Glu Glu Ala Ile Pro Ile Gly Asn Gln Thr Ala Ile
145 150 155 160

Thr Lys Asp Asn Val Ser Ile His Ile Asp Gly Val Leu Tyr Val Lys
165 170 175

Ile Val Asp Pro Lys Leu Ala Ser Tyr Gly Val Glu Asn Pro Ile Tyr
180 185 190

Ala Val Met Gln Leu Ala Gln Thr Thr Met Arg Ser Glu Leu Gly Lys
195 200 205

Ile Thr Leu Asp Lys Thr Phe Glu Glu Arg Asp Thr Leu Asn Glu Lys
210 215 220

Ile Val Glu Ala Ile Asn Val Ala Ala Lys Asp Trp Gly Leu Gln Cys
225 230 235 240

Leu Arg Tyr Glu Ile Arg Asp Ile Met Pro Pro Asn Gly Val Arg Val
245 250 255

Ala Met Glu Met Gln Ala Glu Ala Glu Arg Lys Lys Arg Ala Gln Ile

ES 2 464 315 T3

atg aat cag ctc gcg ctt tca aga tcc ggt tac acc gcc gcc gtg agg Met Asn Gln Leu Ala Leu Ser Arg Ser Gly Tyr Thr Ala Ala Val Arg 1 5 10 15	48
ttt ctc cct atg ctt tcc gca gct gtt ccg aag atc tta tca tct ctc Phe Leu Pro Met Leu Ser Ala Ala Val Pro Lys Ile Leu Ser Ser Leu 20 25 30	96
gcc gcc gca tcc acc gtc cgc aac ttc agc tct acc gga agt cct ctc Ala Ala Ala Ser Thr Val Arg Asn Phe Ser Ser Thr Gly Ser Pro Leu 35 40 45	144
acc agc tac caa atc aat aaa cct tcg ccg tca aaa tcc ttc act tcc Thr Ser Tyr Gln Ile Asn Lys Pro Ser Pro Ser Lys Ser Phe Thr Ser 50 55 60	192
agg ctt ctc cac caa tcc tcc tcc gcc ggt act cct ccg caa caa ctt Arg Leu Leu His Gln Ser Ser Ser Ala Gly Thr Pro Pro Gln Gln Leu 65 70 75 80	240
ttc ggc gcc cgt agc ttc tca tct ccc agc agt gat ttc aac agc tac Phe Gly Ala Arg Ser Phe Ser Ser Pro Ser Ser Asp Phe Asn Ser Tyr 85 90 95	288
cac att aat ccg ccg tct aac tgg gga atc cga atc gtg ccg gag agg His Ile Asn Pro Pro Ser Asn Trp Gly Ile Arg Ile Val Pro Glu Arg 100 105 110	336
aaa gct tgt gtg att gag cgg ttt ggt aaa ttc cac acg act ttg ccg Lys Ala Cys Val Ile Glu Arg Phe Gly Lys Phe His Thr Thr Leu Pro 115 120 125	384
gcg ggg att cac ttc ctt gtt ccg ttt gtg gat cgt atc gct tat gtt Ala Gly Ile His Phe Leu Val Pro Phe Val Asp Arg Ile Ala Tyr Val 130 135 140	432
cat tct cta aag gaa gaa gcg att cct att ggt aat cag act gcg att His Ser Leu Lys Glu Glu Ala Ile Pro Ile Gly Asn Gln Thr Ala Ile 145 150 155 160	480
aca aag gat aac gtt agc atc cac atc gat ggt ttt ctc tac gtt aag Thr Lys Asp Asn Val Ser Ile His Ile Asp Gly Phe Leu Tyr Val Lys 165 170 175	528
att gtg gat cct aag ttg gct tct tat ggc gtt gag aat ccg atc tat Ile Val Asp Pro Lys Leu Ala Ser Tyr Gly Val Glu Asn Pro Ile Tyr 180 185 190	576
gct gtt atg cag ttg gct cag act aca atg cgt agt gag ctc ggt aaa Ala Val Met Gln Leu Ala Gln Thr Thr Met Arg Ser Glu Leu Gly Lys 195 200 205	624
att act ctt gac aag act ttt gag gaa cgg gac act ctc aat gag aag Ile Thr Leu Asp Lys Thr Phe Glu Glu Arg Asp Thr Leu Asn Glu Lys 210 215 220	672
att gtg gaa gcc atc aat gtt gct gca aaa gat tgg ggt ctt cag tgc Ile Val Glu Ala Ile Asn Val Ala Ala Lys Asp Trp Gly Leu Gln Cys 225 230 235 240	720
ctt agt tat gag atc agg gat atc atg cct cct aat gga gtg aga gtt Leu Ser Tyr Glu Ile Arg Asp Ile Met Pro Pro Asn Gly Val Arg Val 245 250 255	768
gct atg gaa atg caa gct gaa gct gaa cgt aaa aag aga gcc cag att	816

ES 2 464 315 T3

```

Ala Met Glu Met Gln Ala Glu Ala Glu Arg Lys Lys Arg Ala Gln Ile
      260                               265                               270
ctt gag tct gaa gga gaa cgt caa gcc cat atc aat aga gct gat ggt      864
Leu Glu Ser Glu Gly Glu Arg Gln Ala His Ile Asn Arg Ala Asp Gly
      275                               280                               285

aag aaa agt tct gta atc ttg gaa tca gaa gct gca atg atg gac caa      912
Lys Lys Ser Ser Val Ile Leu Glu Ser Glu Ala Ala Met Met Asp Gln
      290                               295                               300

gtc aat cgt gca caa ggt gag gct gaa gca ata tta gct aga gca caa      960
Val Asn Arg Ala Gln Gly Glu Ala Glu Ala Ile Leu Ala Arg Ala Gln
      305                               310                               315

gca aca gcc aag gga ctg gcc atg gta tct caa tcc ctc aag gaa gct      1008
Ala Thr Ala Lys Gly Leu Ala Met Val Ser Gln Ser Leu Lys Glu Ala
      325                               330                               335

ggt gga gag gag gct gcg agt ttg aga gtt gcg gag caa tac att caa      1056
Gly Gly Glu Glu Ala Ala Ser Leu Arg Val Ala Glu Gln Tyr Ile Gln
      340                               345                               350

gct ttt ggc aaa att gct aag gag ggt aca aca atg ctg ctt ccg agt      1104
Ala Phe Gly Lys Ile Ala Lys Glu Gly Thr Thr Met Leu Leu Pro Ser
      355                               360                               365

aat gtc gac aat cct gct agc atg atc gct caa gct tta gga atg tac      1152
Asn Val Asp Asn Pro Ala Ser Met Ile Ala Gln Ala Leu Gly Met Tyr
      370                               375                               380

aaa ggc ttg tca aca aag gtc cca aca gtg gtt tca ggg aaa ctt ctg      1200
Lys Gly Leu Ser Thr Lys Val Pro Thr Val Val Ser Gly Lys Leu Leu
      385                               390                               395                               400

gag tag
Glu
      1206

```

<210> 14

<211> 401

5 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana (thale cress)

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(1206)

<223> proteína de tipo estomatina [Arabidopsis thaliana]. ACCESO AAM6320 5 VERSIÓN AAM6320 5,1
GI:21554125 DBSOURCE ACCESO AY08599 5,1

<400> 14

15

```

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

Phe Leu Pro Met Leu Ser Ala Ala Val Pro Lys Ile Leu Ser Ser Leu
 20                               25                               30

```

ES 2 464 315 T3

Ala Ala Ala Ser Thr Val Arg Asn Phe Ser Ser Thr Gly Ser Pro Leu
 35 40 45

Thr Ser Tyr Gln Ile Asn Lys Pro Ser Pro Ser Lys Ser Phe Thr Ser
 50 55 60

Arg Leu Leu His Gln Ser Ser Ser Ala Gly Thr Pro Pro Gln Gln Leu
 65 70 75 80

Phe Gly Ala Arg Ser Phe Ser Ser Pro Ser Ser Asp Phe Asn Ser Tyr
 85 90 95

His Ile Asn Pro Pro Ser Asn Trp Gly Ile Arg Ile Val Pro Glu Arg
 100 105 110

Lys Ala Cys Val Ile Glu Arg Phe Gly Lys Phe His Thr Thr Leu Pro
 115 120 125

Ala Gly Ile His Phe Leu Val Pro Phe Val Asp Arg Ile Ala Tyr Val
 130 135 140

His Ser Leu Lys Glu Glu Ala Ile Pro Ile Gly Asn Gln Thr Ala Ile
 145 150 155 160

Thr Lys Asp Asn Val Ser Ile His Ile Asp Gly Phe Leu Tyr Val Lys
 165 170 175

Ile Val Asp Pro Lys Leu Ala Ser Tyr Gly Val Glu Asn Pro Ile Tyr
 180 185 190

Ala Val Met Gln Leu Ala Gln Thr Thr Met Arg Ser Glu Leu Gly Lys
 195 200 205

Ile Thr Leu Asp Lys Thr Phe Glu Glu Arg Asp Thr Leu Asn Glu Lys
 210 215 220

Ile Val Glu Ala Ile Asn Val Ala Ala Lys Asp Trp Gly Leu Gln Cys
 225 230 235 240

Leu Ser Tyr Glu Ile Arg Asp Ile Met Pro Pro Asn Gly Val Arg Val
 245 250 255

Ala Met Glu Met Gln Ala Glu Ala Glu Arg Lys Lys Arg Ala Gln Ile
 260 265 270

Leu Glu Ser Glu Gly Glu Arg Gln Ala His Ile Asn Arg Ala Asp Gly
 275 280 285

Lys Lys Ser Ser Val Ile Leu Glu Ser Glu Ala Ala Met Met Asp Gln
 290 295 300

ES 2 464 315 T3

Val Asn Arg Ala Gln Gly Glu Ala Glu Ala Ile Leu Ala Arg Ala Gln
 305 310 315 320
 Ala Thr Ala Lys Gly Leu Ala Met Val Ser Gln Ser Leu Lys Glu Ala
 325 330 335
 Gly Gly Glu Glu Ala Ala Ser Leu Arg Val Ala Glu Gln Tyr Ile Gln
 340 345 350
 Ala Phe Gly Lys Ile Ala Lys Glu Gly Thr Thr Met Leu Leu Pro Ser
 355 360 365
 Asn Val Asp Asn Pro Ala Ser Met Ile Ala Gln Ala Leu Gly Met Tyr
 370 375 380
 Lys Gly Leu Ser Thr Lys Val Pro Thr Val Val Ser Gly Lys Leu Leu
 385 390 395 400
 Glu

<210> 15

<211> 282

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia consenso de la alineación de secuencia de las secuencias de STM1 mostradas

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(282)

15 <223> Secuencia consenso 1 (100 %): X puede ser cualquier aminoácido. X puede ser ninguno, uno o dos aminoácidos. Preferentemente, X es un aminoácido

<400> 15

Xaa Pro Xaa Asn Xaa Gly Xaa Xaa Ile Val Pro Glu Xaa Lys Ala Xaa
 1 5 10 15
 Val Xaa Glu Arg Phe Gly Lys Xaa Xaa Xaa Thr Leu Xaa Xaa Gly Xaa
 20 25 30
 His Xaa Leu Xaa Pro Xaa Val Asp Arg Ile Ala Tyr Val His Ser Leu
 35 40 45

ES 2 464 315 T3

Lys Glu Glu Xaa Ile Pro Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Ile Thr Lys Asp
 50 55 60

Asn Val Xaa Ile Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Val Lys Ile Xaa Asp
 65 70 75 80

Pro Xaa Xaa Ala Ser Tyr Gly Val Xaa Xaa Pro Ile Xaa Ala Val Xaa
 85 90 95

Gln Leu Ala Gln Thr Thr Met Arg Ser Glu Leu Gly Lys Ile Thr Leu
 100 105 110

Asp Lys Thr Phe Glu Glu Arg Asp Xaa Leu Asn Xaa Xaa Ile Val Xaa
 115 120 125

Xaa Ile Asn Xaa Ala Ala Xaa Xaa Trp Gly Leu Xaa Cys Xaa Xaa Tyr
 130 135 140

Glu Ile Arg Asp Ile Xaa Pro Pro Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Ala Met Glu
 145 150 155 160

Met Gln Ala Xaa Ala Glu Arg Lys Lys Arg Ala Gln Ile Leu Glu Ser
 165 170 175

Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Arg
 195 200 205

Ala Xaa Gly Xaa Ala Glu Ala Ile Leu Ala Xaa Xaa Xaa Ala Thr Ala
 210 215 220

Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa
 225 230 235 240

Xaa Ala Ala Xaa Leu Xaa Xaa Ala Glu Gln Tyr Xaa Xaa Ala Phe Xaa
 245 250 255

Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Leu Pro Xaa Xaa Xaa Xaa
 260 265 270

Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Gln Xaa Xaa
 275 280

<210> 16

<211> 282

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia consenso de la alineación de secuencia de las secuencias de STM1 mostradas

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

ES 2 464 315 T3

<222> (1) .. (282)

<223> Secuencia consenso 1: X puede ser cualquier aminoácido. X puede ser ninguno, uno o dos aminoácidos. Preferentemente, X es un aminoácido.

5 <400> 16

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

ES 2 464 315 T3

<210> 17

<211> 282

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia consenso de la alineación de secuencia de las secuencias de STM1 mostradas

10 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(282)

<223> Secuencia consenso 3: x puede ser cualquier aminoácido. X puede ser ninguno, uno o dos aminoácidos. Preferentemente, X es un aminoácido.

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(282)

20 <223> Un Stelle 3 kann auch v, T oder A stehen. An stelle 36 kann auch V oder M stehen. An Stelle 96 kann auch L, V oder M stehen. An st elle 182 kann auch S stehen.

<400> 17

Pro Pro Ser Asn Trp Gly Ile Arg Ile Val Pro Glu Arg Lys Ala Phe
1 5 10 15

ES 2 464 315 T3

Val Ile Glu Arg Phe Gly Lys Tyr Xaa Thr Thr Leu Pro Ser Gly Ile
 20 25 30

His Phe Leu Ile Pro Phe Val Asp Arg Ile Ala Tyr Val His Ser Leu
 35 40 45

Lys Glu Glu Ala Ile Pro Ile Pro Asn Gln Thr Ala Ile Thr Lys Asp
 50 55 60

Asn Val Ser Ile His Ile Asp Gly Val Leu Tyr Val Lys Ile Val Asp
 65 70 75 80

Pro Lys Leu Ala Ser Tyr Gly Val Glu Asn Pro Ile Tyr Ala Val Ile
 85 90 95

Gln Leu Ala Gln Thr Thr Met Arg Ser Glu Leu Gly Lys Ile Thr Leu
 100 105 110

Asp Lys Thr Phe Glu Glu Arg Asp Thr Leu Asn Glu Lys Ile Val Glu
 115 120 125

Ala Ile Asn Val Ala Ala Lys Asp Trp Gly Leu Gln Cys Leu Arg Tyr
 130 135 140

Glu Ile Arg Asp Ile Met Pro Pro Xaa Gly Val Arg Xaa Ala Met Glu
 145 150 155 160

Met Gln Ala Glu Ala Glu Arg Lys Lys Arg Ala Gln Ile Leu Glu Ser
 165 170 175

Glu Gly Glu Arg Gln Ala His Ile Asn Xaa Ala Asp Gly Lys Lys Ser
 180 185 190

Ser Val Ile Leu Xaa Ser Glu Ala Ala Met Met Asp Gln Val Asn Arg
 195 200 205

Ala Gln Gly Glu Ala Glu Ala Ile Leu Ala Arg Ala Gln Ala Thr Ala
 210 215 220

Lys Gly Leu Xaa Leu Val Ser Gln Ser Leu Lys Glu Xaa Gly Gly Xaa
 225 230 235 240

Glu Ala Ala Ser Leu Arg Val Ala Glu Gln Tyr Ile Xaa Ala Phe Gly
 245 250 255

Asn Ile Ala Lys Glu Gly Thr Thr Met Leu Leu Pro Ser Xaa Ala Xaa
 260 265 270

Asn Pro Ala Ser Met Ile Ala Gln Ala Leu
 275 280

<210> 18

<211> 24

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

ES 2 464 315 T3

<221> misc_feature

<222> (1)..(24)

<223> Cebador para PCR

5 <400> 18

gatatggcga tgtcgacggc gacc 24

<210> 19

10 <211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (1)..(23)

<223> Cebador para PCR

<400> 19

20

aacttacttc tggcgaggaa agg 23

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aumentar la resistencia a los patógenos en una planta, o una parte de la planta, en el que se reduce la actividad de una proteína estomatina STM1 en una planta, o una parte de la planta, en el que la proteína estomatina STM1 está codificada por un polinucleótido que comprende al menos una molécula de ácido nucleico seleccionada de grupo que consiste en:
- 5 a) molécula de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido que comprende la secuencia como se muestra en SEC ID N° 2;
- b) molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido de la secuencia como se muestra en la SEC ID N° 1;
- 10 c) molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido cuya secuencia tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia SEC ID N° 2; y
- d) molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que tiene una homología de al menos un 90% con la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1;
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la actividad en las células mesófilas y/o células epidérmicas está reducida.
- 15 3. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, en el que la actividad en el lema, palea y/o glumela (primordio de la antera) está reducida.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los patógenos se seleccionan de entre las familias Pucciniaceae, Mycosphaerellaceae y Hypocreaceae.
- 20 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que
- a) la expresión del polipéptido **caracterizado** en la reivindicación 1 está reducida;
- b) la estabilidad del polipéptido **caracterizado** en la reivindicación 1 o de las moléculas de ARNm que corresponden al polipéptido está reducida;
- c) la actividad del polipéptido **caracterizado** en la reivindicación 1 está reducida;
- 25 d) la transcripción de un gen que codifica el polipéptido **caracterizado** en la reivindicación 1 se reduce mediante la expresión de un factor de transcripción endógeno o artificial; o
- e) un factor exógeno que reduce la actividad del polipéptido **caracterizado** en la reivindicación 1 se añade a la comida o al medio.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la reducción de la actividad del polipéptido **caracterizado** en las reivindicaciones 1 a 5 se consigue aplicando al menos un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en:
- 30 a) introducir una molécula de ácido nucleico que codifica moléculas de ácido ribonucleico adecuadas para formar moléculas de ácido ribonucleico de doble hebra (dsARN), en las que la hebra sentido de la molécula de dsARN tiene una homología de al menos un 90% con la molécula de ácido nucleico caracterizada en la reivindicación 1 o comprende un fragmento de al menos 17 pares de bases, que tiene una homología de al menos un 90% con una molécula de ácido nucleico caracterizado en la reivindicación 1 (a) o (b),
- 35 b) introducir una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ácido ribonucleico antisentido que tiene una homología de al menos un 90% con la hebra no codificante de una molécula de ácido nucleico **caracterizada** en la reivindicación 1 o comprende un fragmento de al menos 15 pares de bases, con una homología de al menos un 90% con una hebra no codificante de una molécula de ácido nucleico **caracterizado** en la reivindicación 1 (a) o (b),
- 40 c) introducir una ribozima que escinde específicamente las moléculas de ácido ribonucleico codificadas por una de las moléculas de ácido nucleico mencionadas en la reivindicación 1 o un casete de expresión que asegura la expresión de dicha ribozima,
- 45 d) introducir una molécula de ácido nucleico antisentido como se especifica en b), en combinación con una ribozima o con un casete de expresión que garantiza la expresión de la ribozima, y
- e) introducir moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de ácido ribonucleico sentido que codifican un polipéptido que está codificado por una molécula de ácido nucleico **caracterizado** en la reivindicación 1, en particular, las proteínas como se muestra en la secuencia SEC ID N° 2, o polipéptidos con una homología de al menos un 90% con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por las moléculas de ácido
- 50

nucleico mencionadas en la reivindicación 1.

- 5 7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende
- a) la introducción, en una célula vegetal, de un casete de expresión recombinante que comprende, en unión operativa con un promotor que es activo en plantas, una secuencia de ácido nucleico como se **caracteriza** reivindicación 6 (ae);
 - b) la regeneración de la planta a partir de la célula vegetal, y
 - c) la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico en una cantidad suficiente y durante un período de tiempo suficiente para generar, o para aumentar, una resistencia a patógenos en dicha planta.
- 10 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el promotor que es activo en las plantas se selecciona del grupo que consiste en: promotor inducible por patógeno; promotor específico de epidermis o mesófilo; promotor específico de lema, palea y / o glumela (primordio de la antera) y promotor específico de epidermos o mesófilos específicos de lema, palea y / o glumela (primordio de la antera); y promotor específico de epidermos o mesófilos específicos de lema, palea y / o glumela (primordio de la antera) inducible por patógenos.
- 15 9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la actividad de un polipéptido de codificación el inhibidor 1 de Bax, ROR2, SnAP34 y / o la proteína de unión luminal BiP se incrementa en la planta, el órgano de la planta, el tejido de la planta o la célula vegetal .
- 20 10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la actividad de un polipéptido de codificación ARM1, RacB, CSL1, HvNaOX y / o MLO se reduce en la planta, el órgano de la planta, el tejido de la planta o la célula vegetal.
- 25 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el inhibidor de Bax 1 se expresa bajo el control del promotor específico del mesófilo-y / o la raíz.
12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el patógeno se selecciona de entre las especies Puccinia triticina, Puccinia striiformis, Mycosphaerella graminicola, Stagonospora nodorum, Fusarium graminearum, Fusarium culmorum, Fusarium avenaceum, Fusarium poae o Microdochium nivale.
13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la planta se selecciona entre los géneros vegetales Hordeum, Avena, Secale, Triticum, sorgo, Zea, Saccharum y Oryza.

Figura 1

Formación de HAU relativa al vector vacío control (%)

	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Media	SD	SDM	Cuantil t contra 100)	p (prueba t contra 100)
HW03O11 Estomatina	36,50		48,64	72,58	49,21	49,21	16,43	8,22	6,18	0,005
HO12F09 SNAP34	138,91	192,9	193,83	199,36	179,85	179,85	24,77	11,08	7,20	0,0025
TA30 (Media) Vector vacío	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00		

Figura 2 (página 2 de 3):

```

321
BlastX_1_STM_Os (248) SEATARGIRVSGEAMRTRKGTFAANLRVAEQYKAFANLAKRKNFTLLPDSAGNPSHIAQSLQRYKHHCOTNSLKGKRY 400
BlastX_2_STM_Zm (271) SEATARGIRVSDANTTRGSAKASLKGAEQYKAFANLAKRKNFTLLPDSAGNPSHIAQSLQRYKHHCOTNSLKGKRY
BlastX_3_STM_Ath (276) AQTAKGEVLSQSLKKEGTVGVEASLVAEQYKAFANLAKRKNFTLLPDSAGNPSHIAQSLQRYKHHCOTNSLKGKRY
BlastX_4_STM_Ath (276) AQTAKGEVLSQSLKKEGTVGVEASLVAEQYKAFANLAKRKNFTLLPDSAGNPSHIAQSLQRYKHHCOTNSLKGKRY
BlastX_5_STM_Ath (319) AQTAKGEVLSQSLKKEGTVGVEASLVAEQYKAFANLAKRKNFTLLPDSAGNPSHIAQSLQRYKHHCOTNSLKGKRY
BlastX_6_STM_Ath (319) AQTAKGEVLSQSLKKEGTVGVEASLVAEQYKAFANLAKRKNFTLLPDSAGNPSHIAQSLQRYKHHCOTNSLKGKRY
Traducción del ADINc consenso de (251) AQTAKGEVLSQSLKKEGTVGVEASLVAEQYKAFANLAKRKNFTLLPDSAGNPSHIAQSLQRYKHHCOTNSLKGKRY
HvSTM1 (321) AQTAKGL LVYSLKE GG EASLVAEQYI AFGNIAKEGTMLLPS A NPSMIAQAL NYK L PTL S

401
BlastX_1_STM_Os (328) LQDAEAEAEPEEELDSTDLPGLSGMPSDMPDQDHDK-----TSLQRNKDKH----- 480
BlastX_2_STM_Zm (351) QIEPKESG---E--TSPAPSEKSKTPPLIEEAPSNO-----TSLQRP-KNKO-----
BlastX_3_STM_Ath (355) EQAIDEDDLELEDMDGKHHISEGNRRSGSISFTEKPA-LPIVSVYFQNFNPKTMGACASKPKESDIVEGVSSTEN
BlastX_4_STM_Ath (355) EQAIDEDDLELEDMDGKHHISEGNRRSGSISFTEKPA-LPIVSVYFQNFNPKTMGACASKPKESDIVEGVSSTEN
BlastX_5_STM_Ath (399) LLE-----
BlastX_6_STM_Ath (399) LLE-----
Traducción del ADINc consenso de (331) PSQAVAAEADLSLGMPSVSDLGFPHQK-----
HvSTM1 (401) TE L ETD E S GS D F Q

481
BlastX_1_STM_Os (378) ----- 560
BlastX_2_STM_Zm (395) -----
BlastX_3_STM_Ath (434) AVESKNAATDATALTOEKKEEIEETKKEGTEKDESDSEATKAETPEAVKAEKTSSETEPPEAQETTPAAKTDEAPLV
BlastX_4_STM_Ath (412) -----
BlastX_5_STM_Ath (402) -----
BlastX_6_STM_Ath (402) -----
Traducción del ADINc consenso de (361) -----
HvSTM1 (481) -----

561
BlastX_1_STM_Os (378) -----
BlastX_2_STM_Zm (395) -----
BlastX_3_STM_Ath (514) IL-----
BlastX_4_STM_Ath (412) -----
BlastX_5_STM_Ath (402) -----
BlastX_6_STM_Ath (402) -----
Traducción del ADINc consenso de (361) -----
HvSTM1 (561) -----

```

Figura 2 (página 3 de 3):

Datos para **HvSTM1**

Secuencia 1 (solo coincidencias en amarillo)

XPXNXGXXIVPEKXAVXERFGKXXXTLXXGXHXLXPXVDRIAYVHSLKEEXIPIXXXXAITKDNVXIXLXXXXYVVKIXDPXXAS
YGVXXPIYAVXQLAQTTMRSELGKITLDKTFEERDLNXXIVXXINXAAXXWGLXCXXYEIRDIXPPXGXXAMEMQAXAERKKR
AQILLESEXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXATAXXXXXXGXXXXXAXLXXAEQYXXAF
XXXXXXXXXXLLPXXXXXXXXXXAQXX

Secuencia 2 (solo coincidencias en amarillo, azul y verde)

PPXNMGIRIVPERKAFVIERFGKYXTTLPSGJHFLPFVDRIAYVHSLKEEAIPINQTAITKDNVSIHIDGVLVYVKIVDPKLAS
YGVENPIYAVXQLAQTTMRSELGKITLDKTFEERDTLNEKIVEAINVAAKDWGLQCLRYEIRDIMPXGVRXAMEMQAEFAERKKR
AQILLESEGERQXHINXADGKKSSVILXSEAAMDQVNRAOGEAEAILARAQATAKGLXLVSQSLKEXGKXEAASLRVAEQYIXAF
GNIAKEGTTMLLPSXAXNPASMIAQAL

Secuencia 3 (solo coincidencias en amarillo, azul y verde)

PPSNMGIRIVPERKAFVIERFGKYXTTLPSGJHFLPFVDRIAYVHSLKEEAIPINQTAITKDNVSIHIDGVLVYVKIVDPKLAS
YGVENPIYAVIQLAQTTMRSELGKITLDKTFEERDTLNEKIVEAINVAAKDWGLQCLRYEIRDIMPXGVRXAMEMQAEFAERKKR
AQILLESEGERQAHINXADGKKSSVILXSEAAMDQVNRAOGEAEAILARAQATAKGLXLVSQSLKEXGKXEAASLRVAEQYIXAF
GNIAKEGTTMLLPSXAXNPASMIAQAL

Bases alternativas

La posición 3 puede también mostrar V, T o A. La posición 36 puede también mostrar V o M. La posición 96 puede también mostrar L V o M. La posición 182 puede también mostrar S.