

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 479**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2004 E 04719645 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 1602717**

54 Título: **Plantas y células vegetales que se han modificado en multiplicación celular y desarrollo/diferenciación**

30 Prioridad:

12.03.2003 JP 2003066064

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

16.03.2015

73 Titular/es:

**ISHIHARA SANGYO KAISHA, LTD. (100.0%)
3-15, EDOBORI 1-CHOME
NISHI-KU, OSAKA 550-0002, JP**

72 Inventor/es:

**ITO, MASAKI;
ARAKI, SATOSHI;
KODAMA, HIROAKI y
MACHIDA, YASUNORI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 531 479 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

Plantas y células vegetales que se han modificado en multiplicación celular y desarrollo/diferenciación

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a plantas con un gen controlado genéticamente implicado en su crecimiento celular.

10 **Antecedentes de la invención**

10 Las plantas tienen características embriológicas distintivas diferentes de las de otros eucariotas. Ya que las células vegetales no migran, se cree que la división celular, extensión y muerte celular programada determinan la morfogénesis. Las células proliferan en tejidos meristemáticos que existen en ambos polos de un extremo de brote y un extremo de raíz. Las células proliferadas se diferencian y se apilan para desarrollarse en una planta. El tamaño de una planta se determina por el número y tamaño de células constituyentes para formar la planta. Las plantas controlan el crecimiento celular (proliferación celular) regulando el ciclo celular de modo que los tamaños de las plantas se adaptan a condiciones ambientales cambiantes. La regulación del ciclo celular es importante para la diferenciación de plantas. Por ejemplo, las células pericíclicas de las raíces permanecen en un periodo específico (fase G2) del ciclo celular, y la diferenciación de las raíces laterales se determina por si las células comienzan o no a dividirse. El número de las células del hipocotilo está regulado en plantas, pero el ciclo celular cambia en oscuridad y el tamaño de la célula cambia por endorreduplicación.

20 Se cree que un método para controlar la división celular de plantas, en particular un método para regular el ciclo celular es importante como un nuevo método para cultivo de plantas que trata de forma colectiva asuntos tales como el crecimiento, las formas y la respuesta a tensión.

25 Una célula se divide en dos células descendientes mediante una serie de procesos denominados ciclo celular que consiste en cuatro fases; es decir fase de intervalo 1 (fase G1), fase de síntesis de ADN (fase S), fase de intervalo 2 (fase G2) y fase de mitosis (fase M). Se han observado y estudiado mecanismos relacionados con la regulación de las fases S y M del ciclo celular. En las dos fases, la fase M, denominada fase de división mitótica, es una fase para distribuir igualmente los cromosomas duplicados en la fase S en células descendientes. Para la entrada en la fase M, las ciclinas (un representante es la Ciclina B) se unen con quinasa dependiente de ciclina (CDK) para formar un complejo activado para potenciar la agregación de cromosomas y rotura de las membranas nucleares. La fase B termina después de un proceso llamado citocinesis (división citoplasmática) para dividir el citoplasma después de la distribución de los cromosomas en dos. En células vegetales, el fragmoplasto que es una estructura específica de la planta se forma y progresa la división citoplasmática. La formación de fragmoplastos se regula por proteínas de tipo quinesina; es decir NACK1 y NACK2.

30 La ciclina B, NACK1 y NACK2 que tienen funciones importantes en el proceso de la entrada en la fase M hasta la terminación de la fase M en células vegetales muestran patrones de expresión génica específicos de fases G2/M. Se ha indicado que una secuencia de control específica denominada activador específico de M (MSA) que existe en una región promotora controla la expresión específica de fase de estos genes (Documento No de Patente 1). Además de una CDK específica de planta, CDKB, y genes que tienen altas similitudes con enzimas E2 específicas de ciclina entre las enzimas E2 relacionadas con la proteólisis, se ha indicado que diversos genes funcionalmente desconocidos tiene patrones de expresión específicos de fase M. Muchos de estos genes se analizan para incluir secuencias de MSA en regiones promotoras. Por lo tanto, se cree que los mecanismos para regular la expresión génica específica de fase G2/M por secuencias de MSA están universalmente conservados en plantas.

35 Se han identificado NtmybA1, NtmybA2 y NtmybB (denominados de forma colectiva en lo sucesivo en el presente documento "Ntmyb") del tabaco como factores de unión a MSA. Las secuencias de aminoácidos de proteínas Ntmyb tienen característicamente altas similitudes con la región de unión a ADN de myb que tiene una secuencia compuesta de tres repeticiones imperfectas existentes en c-myb animal y otros (dichas proteínas que contienen esta región de unión a ADN se denominan en lo sucesivo en el presente documento "3Rmyb"). Muchas plantas tiene genes que portan regiones de unión al ADN de tipo myb, pero la mayoría de ellas están constituidas por dos repeticiones de región myb o regiones myb de tipo no repetido. Por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* la secuenciación de cuyo genoma se ha completado tiene más de cien genes que contienen región de unión a ADN de tipo myb, pero solamente cinco genes contienen la región de unión a ADN de tipo myb anteriormente mencionada compuesta de tres repeticiones de myb imperfectas (3Rmyb). Por lo tanto, dichos genes se conocen como miembros específicos entre superfamilias que constituyen el grupo de proteínas de tipo myb de plantas (Documento No de Patente 2). Se han realizado experimentos de control de la transcripción con genes indicadores para investigaciones sobre las funciones de Ntmyb usando sistemas de expresión transitoria en células vegetales. Se ha indicado que NtmybA1 y NtmybA2 activaban la transcripción del promotor de ciclina B (CYM) y el promotor de NACK 1 de vinca peruviana (*Catharanthus roseus*), y viceversa NtmybB suprimía esta transcripción, lo que indica por lo tanto que Ntmyb eran capaces de unirse con MSA, y actuaban como factores de control de la transcripción para genes que mostraban expresión específica de fase G2/M (Documento No de Patente 3). Sin embargo, estos informes se basan únicamente en los resultados de transcripción de genes indicadores activada por Ntmyb expresados de forma

transitoria en un punto en el ciclo celular regulado por la expresión cíclica de numerosos genes. Por lo tanto, no ha habido ningún informe que desvele funciones de Ntmyb en el ciclo celular y la división celular aún.

Ha habido ejemplos de informes que desvelan que el crecimiento y desarrollo de plantas se modificó por la transformación con genes de expresión específica de fase G2/M. Por ejemplo, la elongación de las raíces se potenció en plantas transformadas que expresaban ciclina B de forma ectópica (Documento No de Patente 4); y la división citoplasmática fue incompleta para acortar la altura de la planta en plantas que tenían expresión suprimida de NACK1 esencial para la terminación de la fase M o en plantas transformadas que tenían construcciones de NACK1 negativas dominantes (Documento No de Patente 5). Sin embargo, estos ejemplos son los enfoques para el control de crecimiento celular utilizando genes individuales que se relacionan con el progreso de la fase M. Por lo tanto, no ha habido informes que desvelen plantas transformadas en las que se regule de forma colectiva la expresión de genes específicos de fase G2/M incluyendo genes desconocidos funcionalmente, regulados por secuencias MSA.

Ntmyb contiene una región de unión a ADN de myb que tiene alta homología con c-myb. Se cree que la función transcripcional de c-myb es inactiva cuando el motivo EVES existente en dicha proteína se une con el dominio de unión a ADN de myb, y se activa cuando la fosforilación del motivo EVES con una proteína quinasa conduce a un cambio en la conformación proteica, permitiendo de este modo la unión del coactivador P100 con la región de unión a ADN de myb (Documento No de Patente 6). Ya que se observa que las regiones distintas de las regiones de unión a ADN de myb no son similares entre Ntmyb y c-myb, y secuencias reguladoras tales como el motivo EVES no están conservadas, el mecanismo para controlar la capacidad de Ntmyb para activar la transcripción se cree que es diferente del de la proteína c-myb. No ha habido informes que desvelen la presencia de una región para controlar la capacidad activadora de la transcripción de Ntmyb. Se han indicado ADN que codifican 3Rmyb de longitud completa solamente en tabaco y *Arabidopsis thaliana* que son plantas dicotiledóneas, pero no ha habido informes sobre 3Rmyb de longitud completa de plantas monocotiledóneas. Esto significa que no hay informes que revelen si los mecanismos para regular la expresión génica específica de fase G2/M, mediada por secuencia de MSA y 3Rmyb, están conservados o no en plantas monocotiledóneas y plantas dicotiledóneas.

La mayoría de los animales son diploides, pero se conocen ampliamente diversos niveles de ploidía en plantas. *Triticum* es hexaploide, y *Asterales* es decaploide. Un gran número de estas plantas con poliploidía tienen en general caracteres y propiedades útiles para la agricultura, y la creación de plantas con ploidía se usa como una herramienta para el cultivo. El tratamiento con colchicina se ha usado ampliamente como una tecnología para generar poliploides. Concretamente, el tratamiento con colchicina se realiza para plantar semillas, plantas embrionarias o células de cultivo celular de órganos, y después las plantas se seleccionan de plantas regeneradas. La colchicina inhibe la formación del huso de células con ploidía después de la duplicación del ADN, y las células con ploidía se generan saltando la fase mitótica. Sin embargo, son necesarias investigaciones de órganos para tratar con colchicina y el momento del tratamiento farmacológico; por lo tanto, no se realiza fácilmente en todas las plantas.

- [Documento No de Patente 1] Ito *et al.*, Plant Cell, 10: 331 (1998)
- [Documento No de Patente 2] Stracke *et al.*, Curr. Opin. Plant Biol. 4: 447 (2001)
- [Documento No de Patente 3] Ito *et al.*, Plant Cell, 13: 1891 (2001)
- [Documento No de Patente 4] Doerner *et al.*, Nature, 380: 520 (1996)
- [Documento No de Patente 5] Nishihama *et al.*, Cell, 109: 87 (2002)
- [Documento No de Patente 6] Dash *et al.*, Genes Dev., 10: 1858 (1996)

Sumario de la invención

Como se ha mencionado anteriormente, ya que la regulación del ciclo celular es importante para cultivar plantas, un objetivo de la presente invención es proporcionar una tecnología nueva para modificar el crecimiento o proliferación de células vegetales. Concretamente, un objetivo de la presente invención es proporcionar la tecnología para modificar el desarrollo/diferenciación de plantas en combinación con la modificación del crecimiento o proliferación de células vegetales. Los inventores han investigado exhaustivamente para desvelar que el gen 3Rmyb de planta es un factor esencial para el crecimiento (o proliferación) de células vegetales y para conseguir la tecnología para modificar el crecimiento de células vegetales dirigiéndose al gen de 3Rmyb y la tecnología para modificar el desarrollo/diferenciación de plantas. Además, los inventores han descubierto que estas tecnologías pueden aplicarse a diversas plantas.

Concretamente, se generan plantas que muestran actividades de proteína 3Rmyb vegetal modificadas. En estas plantas, el crecimiento celular (o proliferación celular) y/o el desarrollo/diferenciación celular pueden modificarse claramente. Además, se ha desvelado en primer lugar, usando las plantas que ejercen actividades de proteína 3Rmyb vegetal modificadas, que un miembro de 3Rmyb vegetal que contiene una secuencia de aminoácidos específica es un factor regulador positivo con respecto al ciclo celular y la división celular (uno representativo de la 3Rmyb vegetal es "NtmybA2").

Los inventores también han conseguido crear variantes de factores de transcripción, proteínas 3Rmyb vegetales, y han descubierto que sus funciones se modificaron. Los inventores han descubierto con éxito que estas variantes pueden usarse para modificar actividades poseídas por las proteínas 3Rmyb vegetales en células vegetales y en plantas. Concretamente, los inventores han descubierto regiones de control para regular las actividades de la transcripción de genes cadena abajo entre las secuencias de aminoácidos de proteínas 3Rmyb vegetales, y han generado con éxito moléculas que tienen la capacidad modificada para activar la transcripción génica.

Basándose en los hallazgos anteriores, los presentes inventores han conseguido la presente invención.

La presente invención se refiere a técnicas de control para regular el crecimiento celular de plantas y/o regular el desarrollo y diferenciación de plantas individuales en las que el gen diana es el gen de 3Rmyb vegetal.

Como se usa en el presente documento, la puntuación, "Puntuación Alineada" que indica la similitud entre un cierto aminoácido o secuencia de aminoácidos y uno específico de interés, se refiere al porcentaje de aminoácidos idénticos o similares, que ha resultado de un análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiples usando el programa ClustalW (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/clus-talw-j.html>). Además, la comparación de secuencias de aminoácidos anteriormente mencionadas se realiza con alineamiento óptimo de las secuencias de aminoácidos diana. Las secuencias de aminoácidos se alinean de forma óptima en el presente documento a no ser que se desvele otra cosa específicamente en el presente documento. El programa se ejecuta con las siguientes condiciones: los parámetros se ajustan por defecto (def), RESULTADO=clustal, ORDEN DE SALIDA=alineado, MATRIZ=blosum, DISTANCIA DE HUECO=8, DIVISIÓN MÁXIMA=40, HUECOS FINALES=APAGADO, HUECOS NOP=APAGADO y HUECOS NOH=APAGADO.

En un aspecto más específico, la presente invención proporciona lo siguiente: una planta transgénica que comprende o alberga una célula vegetal transformada con un vector que comprende los siguientes (i) a (iii):

- (i) un promotor transcribible en una célula vegetal,
- (ii) un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 53 ligada a dicha secuencia promotora en una dirección con sentido y
- (iii) una señal para terminación de la transcripción y poliadenilación de una molécula de ARN,

En la que la cantidad de ADN expresado que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 53 aumenta y su crecimiento celular está suprimido en comparación con la planta de tipo silvestre correspondiente que no comprende el vector.

Además, la proteína 3Rmyb vegetal es una proteína representada por una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 53.

Perfiles ventajosos de la invención

La presente invención proporciona células vegetales que tienen crecimiento celular modificado (o proliferación celular modificada). Estas células vegetales permiten la producción de plantas que tengan desarrollo/diferenciación modificados. Por lo tanto, se proporcionan técnicas novedosas para generar plantas que tengan propiedades deseables, tales como agrandamiento de órganos específicos, esterilidad masculina y resistencia a tensión mejorada.

Los objetivos anteriores y otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente invención resultan fácilmente evidentes para los expertos en la materia a partir de las siguientes divulgaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra resultados de comparación de análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando se alinean de forma óptima tanto la secuencia de aminoácidos de proteína del arroz potencial registrada con el N° DE REFERENCIA: BAB78687 en DDBJ (Banco de Datos de ADN de Japón) como la secuencia de aminoácidos de la proteína Os3RmybA1. Continúa en las Figuras 2 y 3.

La Figura 2 muestra resultados de comparación de análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando se alinean de forma óptima tanto la secuencia de aminoácidos de proteína del arroz potencial registrada con el N° DE REFERENCIA: BAB78687 en DDBJ como la secuencia de aminoácidos de la proteína Os3RmybA1. Continúa de la Figura 1 a la Figura 3.

La Figura 3 muestra resultados de comparación de análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando se alinean de forma óptima tanto la secuencia de aminoácidos de proteína del arroz potencial registrada con el N° DE REFERENCIA: BAB78687 en DDBJ como la secuencia de aminoácidos de la proteína Os3RmybA1. Continúa de las Figura 1 y 2.

La Figura 4 es un diagrama que muestra relaciones de aumento de la actividad específica de LUC en las que se examinaron las capacidades de Os3RmybA1 y NtmybA2 para activar la transcripción del gen fusionado de LUC-promotor de CYM usando plásmidos de expresión para Os3RmybA1 y NtmybA2 en combinación con el plásmido

indicador de LUC-promotor de CYM. Todas las actividades de LUC se expresan en relación con el control (tomado como 1,0). Los datos representan la media de experimentos por quintuplicado. Las barras de error indican la D.T.

La Figura 5 es un diagrama que muestra las relaciones de aumento de la actividad específica de LUC en las que se examinaron las capacidades de la versión mutante de NtmybA2 y NtmybA2 truncada en el extremo C terminal para activar la transcripción del gen fusionado con LUC-promotor de NACK1 usando diversos plásmidos de expresión para versiones mutantes truncadas en el extremo C terminal de NtmybA2 y NtmybA2 en combinación con el plásmido indicador de LUC-promotor de NACK1. Todas las actividades de LUC se expresan en relación con el control (tomado como 1,0). Los datos representan la media de experimentos por quintuplicado. Las barras de error indican D.T.

La Figura 6 es un diagrama que muestra relaciones de aumento de la actividad específica de LUC en las que las capacidades de coexpresión de (NtmybA2+NtmybA2T5) o (NtmybB+NtmybA2T5) para activar la transcripción del gen fusionado de LUC-promotor de CYM se examinaron usando el plásmido indicador de LUC-promotor de CYM. Todas las actividades de LUC se expresan en relación con el control (tomado como 1,0). Los datos representan la media de experimentos por quintuplicado. Las barras de error indican D.T.

La Figura 7 es un conjunto de fotografías que muestran cada tamaño de callos BY2 transformados por pPZP211-35S:A2ARNi, en el que los niveles de NtmybA2 expresado de forma endógena disminuyeron por mecanismos de interferencia de ARN, y callos BY2 transformados por pPZP211. Vector: callos BY2 transformados por pPZP211; y A2 ARNi: callos transformados por pPZP211-35S:A2ARNi.

La Figura 8 muestra resultados del ensayo de contenido de ADN nuclear para callos BY2 transformados por pPZP211-35S: A2 ARNi, en el que los niveles de NtmybA2 expresado de forma endógena se redujeron por mecanismos de interferencia de ARN, y callos BY2 transformados por pPZP211. Vector y vector de control: callos BY2 transformados por pPZP211; y A2 ARNi: callos transformados por pPZP211-35S:A2ARNi.

La Figura 9 es un conjunto de fotografías que muestran cada tamaño de callos BY2 transformados por pPZP211-35S:BARNi, en el que los niveles de NtmybB endógeno expresado se redujeron por mecanismos de interferencia de ARN, y callos transformados por pPZP211. Vector y vector de control: callos transformados por pPZP211; y B ARNi: callos transformados por pPZP211-35S:BARNi.

La Figura 10 muestra resultados del ensayo de contenido de ADN nuclear para callos BY2 transformados por pPZP211 y pPZP211-35S:BARNi, en el que los niveles de NtmybB expresado de forma endógena se redujeron por mecanismos de interferencia de ARN, y callos BY2 transformados por pPZP211. Vector y vector de control: callos transformados por pPZP211; y BARNi: callos transformados por pPZP211-35S:BARNi.

La Figura 11 es un conjunto de fotografías que muestran cada tamaño de callos BY2 transformados por pPZP211-35S:A2, en el que NtmybA2 se expresó de forma estable, callos BY2 transformados por pPZP211-35S:A2T2, en el que NtmybA2T2 se expresó de forma estable, y callos BY2 transformados por pPZP211. Vector: callos transformados por pPZP211; 35S:A2: callos transformados por pPZP211-35S:A2; y 35S:A2T2: callos transformados por pPZP211-35S:A2T2.

La Figura 12 muestra cada número de células de células constituyentes para callos BY2 transformados por pPZP211-35S:A2, en los que NtmybA2 se expresaba de forma estable, callos BY2 transformados por pPZP211-35S:A2T2, en los que NtmybA2T2 se expresaba de forma estable, y callos BY2 transformados por pPZP211. Vector: callos transformados por pPZP211; 35S:A2: callos transformados por pPZP211-35S:A2; y 35S:A2T2: callos transformados por pPZP211-35S:A2T2.

La Figura 13 muestra resultados del ensayo del nivel de ADN nuclear para callos BY2 transformados por pPZP211-35S:A2, en los que NtmybA2 se expresaba de forma estable, callos BY2 transformados por pPZP211-35S:A2T2 en los que NtmybA2T2 se expresaba de forma estable, y callos BY2 transformados por pPZP211. Control: callos transformados por pPZP211; 35S:A2: callos transformados por pPZP211-35S:A2; y 35S:A2T2: callos transformados por pPZP211-35S:A2T2.

La Figura 14 es un conjunto de fotografías que muestran cada crecimiento de tabaco transformado por pPZP211-35S:B, en el que NtmybB se expresaba de forma estable, tabaco transformado por pPZP211-35S:B.ARNi en el que la expresión de NtmybB endógeno se suprimió por mecanismos de ARNi, y tabaco transformado por pPZP211. Vector: callos transformados por pPZP211; 35S:B: callos transformados por pPZP211-35S:B; y B ARNi: callos transformados por pPZP211-35S:B.ARNi.

La Figura 15 muestra los resultados de comparación de análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos de las proteínas, NtmybA1, NtmybA2 y Os3RmybA1, se alinean de forma óptima.

En las Figuras 15 a 17, las flechas indican áreas para construcciones mutantes de NtmybA2 de delección C terminal respectivas y las regiones de aminoácidos correspondientes relacionadas con NtmybA1 y Os3RmybA1. En los dibujos, "*" significa que los restos de aminoácidos en esa columna son idénticos en todas las secuencias en el alineamiento (sitio de aminoácidos completamente conservado), ":" significa que se han observado sustituciones conservadas (sitio de aminoácido altamente conservado), y "." significa que se observan sustituciones semiconservadas (sitio de aminoácido moderadamente conservado), en relación con resultados de rendimiento de similitud de aminoácidos de análisis de alineamiento de secuencias múltiple por el programa ClustalW. Continúa en las Figuras 16 a 18.

La Figura 16 muestra resultados de comparación del análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos de las proteínas, NtmybA1, NtmybA2 y Os3RmybA1 se alinean de forma óptima. Continúa de la Figura 15 en las Figuras 17 y 18.

La Figura 17 muestra resultados de comparación de análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos

múltiple cuando las secuencias de aminoácidos de las proteínas, NtmybA1, NtmybA2 y Os3RmybA1, se alinean de forma óptima. En los dibujos, los segmentos de secuencia incluidos en la caja rectangular indican posiciones de aminoácidos consenso con NtmybA1 y Os3RmybA1, observado en o cerca de la región de delección de NtmybA2. Las secuencias de aminoácidos mostradas sobre las cajas rectangulares significan secuencias conservadas en las que X significa cualquier aminoácido. Continúa de las Figuras 15 y 16 en la Figura 18. La Figura 18 muestra resultados de comparación de análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos de proteínas, NtmybA1, NtmybA2 y Os3RmybA1, se alinean de forma óptima. Continúa de las Figuras 15 a 17.

La Figura 19 muestra resultados de comparación de análisis de alineamiento de secuencia de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos de las proteínas, NtmybA1, NtmybA2, Os3RmybA1, AtMYB3R1 (en las Figuras 19 a 25, designada "AtMYB3R-1"), y AtMYB3R4 (en las Figuras 19 a 25, designada "AtMYB3R-4"), se alinean de forma óptima. En los dibujos, "*" significa que los restos de aminoácidos en esa columna son idénticos en todas las secuencias en el alineamiento (sitio de aminoácido completamente conservado), ":" significa que se han observado sustituciones conservadas (sitio de aminoácido altamente conservado), y "." significa que se observan sustituciones semiconservadas (sitio de aminoácido moderadamente conservado), en relación con resultados de rendimiento de similitud de aminoácidos de análisis de alineamiento de secuencias múltiple por el programa ClustalW. Continúa en las Figuras 20 a 25.

La Figura 20 muestra los resultados de comparación del análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos de las proteínas NtmybA1, NtmybA2, Os3RmybA1, AtMYB3R-1, y AtMYB3R-4, se alinean de forma óptima. Continúa de la Figura 19 en las Figuras 21 a 25.

La Figura 21 muestra los resultados de comparación del análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos de las proteínas NtmybA1, NtmybA2, Os3RmybA1, AtMYB3R-1 y AtMYB3R-4, se alinean de forma óptima. Continúa de las Figuras 19 y 20 en las Figuras 22 a 25.

La Figura 22 muestra los resultados de comparación del análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos de las proteínas NtmybA1, NtmybA2, Os3RmybA1, AtMYB3R-1 y AtMYB3R-4, se alinean de forma óptima. Continúa de las Figuras 19 a 21 en las Figuras 23 a 25.

La Figura 23 muestra los resultados de comparación del análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos de las proteínas NtmybA1, NtmybA2, Os3RmybA1, AtMYB3R-1 y AtMYB3R-4, se alinean de forma óptima. En el dibujo, la barra transversal negra indica una región de secuencia particular en la que los aminoácidos están altamente conservados, excepto el dominio de unión a ADN de myb. La secuencia consenso observada en la región de barra transversal negra está escrita en letras negritas, en las que X es cualquier aminoácido; J es un aminoácido seleccionado de I, V y L; O es un aminoácido seleccionado de S y T; X₁ es un aminoácido seleccionado de K y R; U es un aminoácido seleccionado de V y L; y X₅ es un aminoácido seleccionado de D y E. Continúa de las Figuras 19 a 22 en las Figuras 24 y 25.

La Figura 24 muestra los resultados de comparación del análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos de las proteínas NtmybA1, NtmybA2, Os3RmybA1, AtMYB3R-1 y AtMYB3R-4, están alineadas de forma óptima. Continúa de las Figuras 19 a 23 en la Figura 25.

La Figura 25 muestra los resultados de comparación del análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos de las proteínas NtmybA1, NtmybA2, Os3RmybA1, AtMYB3R-1 y AtMYB3R-4, se alinean de forma óptima. Continúa de las Figuras 19 a 24.

La Figura 26 muestra los resultados de comparación del análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos de las proteínas NtmybB, AtMYB3R3 (en las Figuras 26 a 28, designada "AtMYB3R-3") y AtMYB3R5 (en las Figuras 26 a 28, designada "AtMYB3R-5"), se alinean de forma óptima. En los dibujos, "*" significa que los restos de aminoácidos en esa columna son idénticos en todas las secuencias en el alineamiento (sitio de aminoácido completamente conservado), ":" significa que se han observado sustituciones conservadas (sitio de aminoácido altamente conservado) y "." significa que se observan sustituciones semiconservadas (sitio de aminoácido moderadamente conservado), en relación con resultados de rendimiento de similitud de aminoácidos del análisis de alineamiento de secuencias múltiple por el programa ClustalW. En el dibujo, la barra transversal negra indica una región de secuencia particular en la que los aminoácidos están altamente conservados, excepto el dominio de unión a ADN de myb. La secuencia consenso observada en la región de barra transversal negra está escrita en letras negritas, en las que X es cualquier aminoácido, y X₆ es un aminoácido seleccionado de K, R, D, E y H. Continúa en las Figuras 27 y 28.

La Figura 27 muestra los resultados de comparación del análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos de las proteínas NtmybB, AtMYB3R-3 y AtMYB3R-5, se alinean de forma óptima. Continúa de la Figura 26 en la Figura 28.

La Figura 28 muestra los resultados de comparación del análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos de las proteínas NtmybB, AtMYB3R-3 y AtMYB3R-5, se alinean de forma óptima. Continúa de las Figuras 26 y 27.

La Figura 29 muestra los resultados de comparación del análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos constituyentes de dominios de unión a ADN de tipo myb de 3 repeticiones respectivos se alinean de forma óptima en relación con las proteínas, MYB3R-1 (aislado de *Physcomitrella patens*; en las Figuras 29 a 31, designado "PhpMYB3R-1"), MYB3R-1 (aislado de *Adiantum raddianum*; en las Figuras 29 a 31, designado "AdrMYB3R-1"), MYB3R-1 (aislado de *Hordeum vulgare*; en las Figuras 29 a 31, designado "HvMYB3R-1"), MYB3R-1 (aislado de *Secale cereale*; en las Figuras 29 a 31, designado "ScMYB3R-1"), dominio relacionado con Myb potencial (aislado de *Papaver rhoeas*; en las Figuras 29 a 31, designado "ParMYB3R-1"), AtMYB3R1 (en las Figuras 29 a 31, designado "AtMYB3R-1"), AtMYB3R3 (en

las Figuras 29 a 31, designado "AtMYB3R-3"), AtMYB3R4 (en las Figuras 29 a 31, designado "AtMYB3R-4"), AtMYB3R5 (en las Figuras 29 a 31, designado "AtMYB3R-5"), NtmybA1, NtmybA2, NtmybB, y Os3RmybA1. Entre 13 secuencias de aminoácidos, los sitios de aminoácidos conservativos se expresan en la secuencia consenso en los dibujos, en los que X es cualquier aminoácido; J es un aminoácido seleccionado de I, V y L; O es un aminoácido seleccionado de G, S, T, C y A; X₇ es un aminoácido seleccionado de K, R y H; U es un aminoácido seleccionado de H, W, Y y F; y X₅ es un aminoácido seleccionado de D y E. En los dibujos, las barras transversales negras indican segmentos consenso observados en los dominios de unión a ADN de myb de 3 repeticiones de c-myb, que se expresan con "MYB N° 1 (identificación de repetición de dominio de unión a ADN de Myb 1)" basándose en resultados de búsqueda obtenidos por el programa MOTIF (<http://motif.genome.ad.jp/>). Las flechas entre las barras transversales negras indican el número de aminoácidos existente entre las secuencias consenso anteriormente mencionadas. Continúa en las Figuras 30 y 31.

La Figura 30 muestra los resultados de comparación del análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos constituyentes de los dominios de unión a ADN de tipo myb de 3 repeticiones respectivos se alinean de forma óptima en relación con las proteínas, PhpMYB3R-1, ADrMYB3R-1, HvMYB3R-1, ScMYB3R-1, ParMYB3R-1, AtMYB3R1, AtMYB3R3, AtMYB3R4, AtMYB3R5, NtmybA1, NtmybA2, NtmybB y Os3RmybA1. Continúa de la Figura 29 en la Figura 31.

La Figura 31 muestra los resultados de comparación del análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple cuando las secuencias de aminoácidos constituyentes de los dominios de unión a ADN de tipo myb de 3 repeticiones respectivos se alinean de forma óptima en relación con las proteínas, PhpMYB3R-1, ADrMYB3R-1, HvMYB3R-1, ScMYB3R-1, ParMYB3R-1, AtMYB3R1, AtMYB3R3, AtMYB3R4, AtMYB3R5, NtmybA1, NtmybA2, NtmybB y Os3RmybA1. Continúa de las Figuras 29 y 30.

La Figura 32 muestra resultados de comparación para estados de crecimiento y desarrollo (altura de la hierba) entre plantas con transferencia del gen de NtmybA2 cultivadas (tabaco con alta expresión de NtmybA2) y plantas sin transferencia del gen de NtmybA2.

La Figura 33 muestra resultados de comparación para estados de crecimiento y desarrollo (número de verdaderas hojas) entre plantas con transferencia del gen de NtmybA2 cultivadas (tabaco con alta expresión de NtmybA2) y plantas sin transferencia del gen de NtmybA2.

Mejores modos para llevar a cabo la invención

En la presente invención, la utilización de "técnicas de recombinación génica" permite no solamente la adquisición, el aislamiento y la secuenciación de ácidos nucleicos diana, péptidos y fragmentos de los mismos, sino también la construcción y producción de recombinantes de los mismos. Las técnicas de recombinación génica (incluyendo técnicas de ADN recombinante) que pueden usarse en el presente documento incluyen las conocidas en la técnica, y pueden llevarse a cabo por los métodos descritos en, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª edición)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989); D. M. Glover *et al.* ed., "DNA Cloning", 2ª ed., Vol. 1 a 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); The Japanese Biochemical Society (JBS) ed., "Zoku-Seikagaku Jikken Koza 1, Idenshi Kenkyu-Hou II", Tokyo Kagaku Dozin Co. Ltd., Japón, (1986); JBS ed., "Shin-Seikagaku Jikken Koza 2, Kakusan III (Recombinant DNA technique)", Tokyo Kagaku Dozin Co. Ltd., Japón, (1992); serie "Methods in Enzymology", Academic Press, Nueva York, incluyendo, por ejemplo, R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, Nueva York (1980); R. Wu *et al.* ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) y 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, Nueva York (1983); R. Wu *et al.* ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) y 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, Nueva York (1987); J. H. Miller ed., "Methods in Enzymology", Vol. 204, Academic Press, Nueva York (1991); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 216 (Recombinant DNA, Part G), Academic Press, Nueva York (1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 217 (Recombinant DNA, Part H) y 218 (Recombinant DNA, Part I), Academic Press, Nueva York (1993); G. M. Attardi *et al.* ed., "Methods in Enzymology", Vol. 260 (Mitochondrial Biogenesis and Genetics, Part A), Academic Press, Nueva York (1995); J. L. Campbell ed., "Methods in Enzymology", Vol. 262 (DNA Replication), Academic Press, Nueva York (1995); G. M. Attardi *et al.* ed., "Methods in Enzymology", Vol. 264 (Mitochondrial Biogenesis and Genetics, Part B), Academic Press, Nueva York (1996); P. M. Conn ed., "Methods in Enzymology", Vol. 302 (Green Fluorescent Protein), Academic Press, Nueva York (1999); S. Weissman ed., "Methods in Enzymology", Vol. 303 (cDNA Preparation and Characterization), Academic Press, Nueva York (1999); J. C. Glorioso *et al.* ed., "Methods in Enzymology", Vol. 306 (Expression of Recombinant Genes in Eukaryotic Systems), Academic Press, Nueva York (1999); M. Ian Phillips ed., "Methods in Enzymology", Vol. 313 (Antisense Technology, Part A: General Methods, Methods of Delivery and RNA Studies) y 314 (Antisense Technology, Part B: Applications), Academic Press, Nueva York (1999); J. Thorne *et al.* ed., "Methods in Enzymology", Vol. 326 (Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins, Part A: Gene Expression and Protein Purification), 327 (Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins, Part B: Cell Biology and Physiology) y 328 (Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins, Part C: Protein-Protein Interactions and Genomics), Academic Press, Nueva York (2000), o por métodos descritos en las referencias citadas en las mismas o métodos sustancialmente equivalentes a los mismos o métodos modificados de los mismos.

La presente invención proporciona plantas que comprenden células vegetales, que tienen actividades modificadas de proteínas 3Rmyb vegetales. La modificación de las actividades de la proteína 3Rmyb vegetal de acuerdo con la presente invención incluye modificación de la expresión del gen de 3Rmyb vegetal.

La modificación anteriormente mencionada de la expresión del gen de 3Rmyb vegetal se refiere a la supresión de dicha expresión.

5 También se desvelan moléculas capaces de inhibir o suprimir la expresión (particularmente incluyendo la expresión *in vivo*) del gen o los genes de 3Rmyb vegetal en plantas. La expresión “suprimir la expresión” del gen o los genes de 3Rmyb vegetal o del gen vegetal 3Rmyb, o “expresión suprimida” o “expresión reprimida” del gen o los genes de 3Rmyb vegetal incluyen la supresión de la transcripción génica y la supresión de la traducción a proteína, así como no solamente el silenciamiento completo de la expresión de ADN sino también la reducción de la expresión de ADN.

10 Se emplean más habitualmente entre los expertos en la materia métodos que utilizan técnicas antisentido en la supresión de la expresión génica endógena específica en plantas. Se demostraron por primera vez experimentalmente efectos antisentido en células vegetales por Ecker *et al.* usando análisis de expresión transitoria en el que se transformó ARN antisentido en plantas por electroporación y el efecto antisentido ejercido por dicho ARN antisentido se observó en las plantas transgénicas (J. R. Ecker y R. W. Davis, Proc. Natl. Acad. USA. 83: 5372 (1986)). A continuación, se indicaron realizaciones de tabaco y petunia en las que la expresión de ARN antisentido condujo a la reducción de la expresión génica diana (A. R. van der Krol *et al.*, Nature 333: 866 (1988)). Por lo tanto, las técnicas se han establecido en la actualidad para inhibir o suprimir la expresión génica en plantas.

20 La inhibición o supresión de la expresión génica mediada por ácidos nucleicos antisentido incluye acciones plurales de la siguiente manera: concretamente, inhibición del inicio de la transcripción, inducido por formación de triple cadena; supresión de la transcripción, inducida por hibridación en sitios en los que se crea localmente una estructura de bucle abierto con ARN Polimerasa; inhibición de la transcripción, inducida por hibridación con ARN que se sintetiza en progreso; supresión del corte y empalme, inducida por la hibridación en puntos de unión de intrón-exón; supresión del corte y empalme, inducida por la hibridación con sitios formadores de espliceosoma; supresión de la transferencia de núcleos a citoplasmas, inducida por la hibridación con ARNm; supresión del corte y empalme, inducida por la hibridación con sitios de recubrimiento terminal y sitios poliadenilados; supresión del inicio de la traducción, inducida por hibridación con sitios de unión a iniciador de la traducción; supresión de la traducción, inducida por hibridación con sitios de unión a ribosomas cerca de codones de inicio; inhibición de la elongación de la cadena peptídica, inducida por hibridación con regiones de traducción de ARNm o sitios de unión a polisoma; y silenciamiento de la expresión génica, inducido por hibridación con sitios de interacción de proteína-ácido nucleico; y similares. Estos inhiben los procesos de transcripción, corte y empalme o traducción para suprimir la expresión de genes diana.

35 Las secuencias antisentido como se usa en el presente documento pueden suprimir o inhibir la expresión de genes diana basándose en cualquiera de las acciones o actividades anteriormente mencionadas. En una realización, cuando se diseña para que sea complementaria de la región no traducida (UTR) cerca del extremo 5' del ARNm del gen diana, las secuencias antisentido serán eficaces en la inhibición de la traducción del gen. Sin embargo, también son aplicables secuencias complementarias de la región codificante o la región no traducida 3' (3' UTR). Por lo tanto, el ADN antisentido utilizado en la presente invención también abarca ADN que contiene una secuencia antisentido en una secuencia no limitada a regiones para traducción sino que incluye regiones no traducidas. El ADN antisentido que se usa en el presente documento se liga al sitio cadena abajo de un promotor adecuado, preferentemente seguido de ligamiento con una secuencia que contiene una señal de terminación de la transcripción en el lado 3'. El ADN preparado de este modo puede transfectarse o transformarse en plantas deseadas por técnicas conocidas. Es preferible que la secuencia de ADN antisentido sea complementaria de un gen endógeno poseído por plantas para transformar, o partes de las mismas. Sin embargo, no es necesario que sea completamente complementario, siempre que pueda inhibir eficazmente la expresión del gen. El ARN del transcrito es preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 %, complementario del producto transcrito de un gen diana. La homología de secuencia puede determinarse por la búsqueda anteriormente mencionada.

50 Para inhibir eficazmente la expresión de genes diana usando secuencias antisentido, la longitud de ADN antisentido es de al menos 15 nucleótidos, preferentemente al menos 100 nucleótidos o más, y más preferentemente al menos 500 nucleótidos o más. Habitualmente, la longitud del ADN antisentido usado en el presente documento es menor de 5 kb, preferentemente menor de 2,5 kb.

55 La supresión de la expresión del gen endógeno puede llevarse a cabo usando ADN que codifica una ribozima. La ribozima se refiere a una molécula de ARN catalítica. Hay ribozimas con diversas actividades. Entre ellas, estudios sobre ribozimas que actúan como enzimas que escinden ARN posibilitan diseños de ribozimas que permiten la escisión específica de sitio de ARN. Las ribozimas no son solamente las que tienen un tamaño de aproximadamente 400 o más nucleótidos, tales como el intrón de grupo I y RNasa P incluyendo ARN M1, sino también las que tienen un dominio activo con aproximadamente 40 nucleótidos, indicado como la ribozima de cabeza de martillo y la ribozima en horquilla.

65 Por ejemplo, el dominio de autoescisión de ribozimas de cabeza de martillo escinde G13U14C15 en el lado 3' de C15; sin embargo, se considera que la formación de pares de bases entre U14 y A9 es crucial para la catálisis, y se muestra que el nucleótido en la posición 15. A o U, además de C, puede escindirse (M. Koizumi *et al.* (1988), FEBS Lett. 228: 225). Cuando el sitio de unión a sustrato de una ribozima se diseña para que sea complementario de la

secuencia de ARN cerca del sitio diana, será posible producir ribozimas que escindan ARN como una enzima de restricción y reconozcan la secuencia de UC, UU o UA dentro del ARN diana (M. Koizumi *et al.* (1988), FEBS Lett. 239: 285, M. Koizumi *et al.* (1989), Nucleic Acids Res. 17: 7059). Por ejemplo, existen sitios diana de potencial plural dentro de la región codificante del gen de NtmybA2 (SEC ID N°: 2).

Además, las ribozimas en horquilla son útiles para el fin de practicar la presente invención. La ribozima en horquilla se observa, por ejemplo, dentro de la cadena menos del ARN satélite del virus de las manchas anulares del tabaco (J. M. Buzayan, Nature, 323: 349, 1986). También se muestra que esta ribozima puede diseñarse para permitir la escisión de ARN específico de diana (Y. Kikuchi y N. Sasaki, Nucleic Acids Res., 19: 6751 (1992)).

La ribozima diseñada para permitir la escisión de dianas se ligará con un promotor tal como el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y una secuencia de terminación de la transcripción para proporcionar transcripción en células vegetales. En dichos casos, sin embargo, cuando se añaden secuencias extra al extremo 5' o 3' del ARN del transcrito, la actividad de la ribozima desaparecerá o no. En estos casos, para cortar una parte de ribozima de ARN que contiene una ribozima de transcrito con precisión, también puede situarse otra ribozima de corte de acción en cis en el lado 5' o 3' de la parte de ribozima para permitir el corte (K. Taira *et al.*, Protein Eng., 3: 733 (1990); A. M. Dzianott y J. J. Bujarski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86: 4823 (1989); C. A. Grosshans y R. T. Cech, Nucleic Acids Res., 19: 3875 (1991); K. Taira *et al.*, Nucleic Acids Res., 19: 5125 (1991)). Además, es posible colocar dichas unidades constituyentes en tándem para permitir la escisión de sitios plurales dentro de genes diana, potenciando de este modo los efectos más (N. Yuyama *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 186: 1271, 1992). Los productos de transcrito de genes diana en la presente invención pueden escindirse específicamente con dichas ribozimas, conduciendo de este modo a la supresión de dicha expresión génica.

La supresión de la expresión génica endógena puede conseguirse por cosupresión inducida por transformación con ADN que tiene una secuencia idéntica o análoga de la secuencia de genes diana. El término "cosupresión" se refiere a un fenómeno en el que la introducción de un gen que comprende una secuencia idéntica o similar a la secuencia de un gen endógeno diana en plantas suprime la expresión tanto del gen ajeno incorporado como del gen endógeno diana. Los detalles del mecanismo de cosupresión aún no son evidentes pero la cosupresión se ha observado con frecuencia entre plantas (Curr. Biol., 7: R793, 1997; Curr. Biol., 6: 810, 1996). Por ejemplo, pueden obtenerse plantas en las que el gen de NtmybA2 se cosuprime transformando o transfectando plantas diana con ADN de vector construido para permitir la expresión de ADN que comprende el gen de NtmybA2 o una secuencia análoga del mismo seguido de selección de plantas con más crecimiento celular suprimido de las plantas resultantes. No es necesario que los genes usados en cosupresión sean completamente idénticos al gen diana, pero son al menos 70 % (70 % o más), preferentemente 80 % o más, y más preferentemente al menos 90 % (por ejemplo, 95 % o más) idénticos en su secuencia. La identidad de secuencias puede determinarse usando la recuperación anteriormente mencionada.

La supresión de la expresión de genes endógenos puede conseguirse mediante interferencia de ARN (ARNi) inducida por transformación con ADN en el que una secuencia idéntica o análoga de la secuencia de genes diana se dispone de una manera repetida invertida. La "interferencia de ARN" o "ARNi" indica un fenómeno en el que la introducción de ADN en el que una secuencia idéntica o análoga a un gen endógeno diana se dispone de una manera repetida invertida, inducido por la transformación de plantas, provoca la expresión de ARN bicatenario (ARNbc) derivado del ADN ajeno, suprimiendo de este modo la expresión del gen diana. Se cree que el mecanismo de la interferencia de ARN incluye la etapa inicial de formar un complejo de ARNm del gen diana y ARN bicatenario derivado de una secuencia introducida seguido de síntesis de ARN complementario usando las secuencias asociadas como cebadores, la segunda etapa de fragmentar el complejo con RNasa endógena, y la tercera etapa de operar ARN bicatenarios fragmentados con una longitud de 20 a 30 pares de bases como señales para interferencia de ARN secundario para permitir la nueva degradación del ARNm de gen endógeno diana (Curr. Biol., 7: R793, 1997; Curr. Biol., 6: 810, 1996). Por ejemplo, el proceso para obtener plantas en las que el gen de NtmybB se suprime por interferencia de ARN puede incluir transformación de plantas diana con ADN de vector construido para permitir la expresión de ADN en el que una secuencia de ADN que tiene el gen de NtmybB o una secuencia análoga del mismo se dispone en forma de repetición invertida seguido de selección de plantas transformadas con crecimiento celular potenciado o acelerado de las plantas transformadas resultantes. No es necesario que los genes aplicados a la interferencia de ARN sean completamente idénticos a genes diana, pero son los que tienen al menos 10 nucleótidos continuos, preferentemente de 20 a 100 nucleótidos continuos, y más preferentemente de 50 o más nucleótidos continuos, idénticos en su secuencia al gen diana. Los genes aplicados a interferencia de ARN pueden ser los que tienen una secuencia al menos 70 %, preferentemente al menos 80 % y más preferentemente al menos 90 % (por ejemplo, 95 % o más) idénticos en su secuencia al gen diana de interés. Además, los genes más preferibles aplicados a interferencia de ARN incluyen los que tienen una secuencia que no es solamente al menos 70 %, preferentemente al menos 80 % y más preferentemente al menos 90 % (por ejemplo, 95 % o más) idéntica en su secuencia al gen diana de interés pero también dispuesto en una repetición invertida. Entre ellos, los genes deseables aplicados a interferencia de ARN son los que tienen una secuencia que tiene una identidad de secuencia con el gen diana y dispuestos mediante una secuencia espaciadora en forma de repetición invertida. La identidad de secuencias puede determinarse usando la recuperación anteriormente mencionada. Para la longitud del gen aplicado a interferencia de ARN, pueden ser genes diana en forma de longitud completa. Sin embargo, es suficiente que tengan al menos 25 nucleótidos, preferentemente 50 nucleótidos, más preferentemente 100 nucleótidos, más

preferentemente 500 nucleótidos.

Además, la ARNi puede practicarse mediante infección de virus vegetales. Un virus vegetal que tiene ARN monocatenario como un genoma toma una forma bicatenaria en el proceso de replicación. Por lo tanto, cuando la secuencia de un gen diana se inserta junto con un promotor adecuado en un genoma de virus vegetal, seguido de transfección de plantas con el virus recombinante resultante, el ARN bicatenario de la secuencia génica diana se producirá en asociación con replicación de dicho virus. Como resultado, pueden conseguirse efectos de ARNi (Angell *et al.*, Plant J. 20, 357-362 (1999)).

Además, la supresión de la expresión génica endógena puede conseguirse por transformación de plantas con genes que tienen propiedades negativas dominantes contra genes diana. El "ADN que codifica una proteína que tiene propiedades negativas dominantes" se refiere al ADN que codifica proteínas que actúan como silenciadores o reductores de las actividades de proteínas codificadas por los genes endógenos de la invención poseídos de forma intrínseca por plantas cuando se expresan dichos ADN. Si el ADN de interés actúa o no como un silenciador o reductor de la actividad del gen endógeno puede valorarse, como se ha mencionado anteriormente, dependiendo de si el ADN de interés inhibe o suprime o no la cantidad de transcritos génicos de genes de ciclina B vegetales, genes NACK1 o genes ortólogos de los mismos.

La reducción inducida por moléculas negativas dominantes en las funciones de proteínas 3Rmyb endógenas puede transformarse en especies vegetales diferentes de las que se aíslan las proteínas NtmybA1, las proteínas NtmybA2 o las proteínas Os3RmybA1.

Las plantas que tienen actividades modificadas de proteínas 3Rmyb vegetales son en el presente documento los miembros que tienen expresión alterada de genes de 3Rmyb vegetales o funciones alteradas de las proteínas 3Rmyb. Preferentemente, las plantas muestran cambios en las cantidades de expresión de dichos genes o en funciones de proteínas expresadas a un nivel detectablemente diferente de los de plantas de tipo silvestre. Los ejemplos del cambio de cantidades de expresión incluyen expresión estable, expresión inducida, sobreexpresión, expresión ectópica y supresión de dicha expresión. Estas plantas que muestran expresión o funciones alteradas pueden crearse por técnicas de mutagénesis y selección tradicionales además de técnicas de ingeniería genética mediante transformación.

También se desvelan ADN y vectores recombinantes (construcciones de vector) que comprende un inserto de ADN que suprime o inhibe el ADN anteriormente mencionado, expresión del ADN y la expresión de proteínas codificadas por el ADN. Los ADN y vectores recombinantes (construcciones de vector) incluyen, además de los vectores anteriormente mencionados (construcciones de vector) utilizados en la producción de proteínas recombinantes, vectores o construcciones de vector que permitan la expresión de ADN en células vegetales para producción de plantas transgénicas, dichos ADN que suprimen o inhiben el ADN, expresión del ADN y la expresión de proteínas codificadas por el ADN. Dichos ADN o vectores recombinantes (construcciones de vector) no se limitan a, pero incluyen cualquiera siempre que comprendan una secuencia promotora transcribible en células vegetales y una secuencia terminadora que contenga un sitio de poliadenilación requerido para estabilización de productos de transcrito. Son ejemplos de los ADN o vectores recombinantes (construcciones de vector) plásmidos, "pBI121", "pBI221", "pBI101" (todos, Clontech), "pTA7001", "pTA7002" (Aoyama *et al.* (1997) Plant J. 11: 605), "pPZP211" (Hajdukiewicz *et al.*, Plant Mol. Biol. 25: 989 (1994)).

El ADN o vector recombinante anteriormente mencionado (construcción de vector) puede comprender cualquiera de los promotores diseñados para permitir la expresión estable o inducible de las proteínas. Los promotores expresables *in vivo* en el presente documento son convenientemente los enumerados posteriormente en el presente documento. Son ejemplos de promotores diseñados para permitir la expresión estable el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell *et al.*, Nature, 313: 810 (1985)), el promotor de actina de arroz (Zhang *et al.*, Plant Cell, 3: 1155 (1991)), el promotor de ubiquitina de maíz (Cornejo *et al.*, Plant Mol. Biol., 23: 567 (1993)).

Los promotores diseñados para permitir la expresión inducible incluyen, por ejemplo, los conocidos como elementos que son expresables por factores exógenos incluyendo infección o invasión fúngica filamentosa, bacteriana o viral, temperaturas bajas, temperaturas elevadas, condiciones secas, radiación de luz UV, y aplicaciones de compuestos específicos. Son ejemplos de dichos promotores los que son para expresión inducida por infección o invasión fúngica filamentosa, bacteriana o viral, tales como el promotor del gen de la quitinasa de arroz (Xu *et al.*, Plant Mol. Biol., 30: 387 (1996)) y el promotor del gen de la proteína PR del tabaco (Ohshima *et al.*, Plant Cell 2: 95 (1990)); el promotor del gen "lip19" del arroz inducible por temperaturas bajas (Aguan *et al.*, Mol. Gen. Genet., 240: 1 (1993)); el gen de "hsp80" o promotor del gen "hsp72" del arroz inducible por altas temperaturas (Van Breusegem *et al.*, Planta, 193: 57 (1994)); el promotor del gen "rab16" de *Arabidopsis thaliana* inducible por desecación (Nundy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 1406 (1990)); el promotor del gen de chalcona sintasa de perejil inducible por radicación de luz UV (Schulze-Lefert *et al.*, EMBO J., 8: 651 (1989)); el promotor del gen del alcohol deshidrogenasa del maíz inducible por condiciones anaerobias (Walker *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 6624 (1987)). Además, el promotor del gen de la quitinasa de arroz y el promotor del gen de la proteína PR del tabaco pueden inducirse por compuestos específicos tales como ácido salicílico. El "rab16" también puede inducirse por aplicaciones de la fitohormona ácido abscísico. Se incluye el uso de sistemas de vectores que comprenden sistemas sensibles a

glucocorticoides o estrógenos para permitir la expresión inducible de genes en plantas. Los vectores sensibles a glucocorticoides para permitir expresión inducible incluyen pTA7001, pTA7002 (Aoyama *et al.*, Plant J., 11: 605 (1997)). Los vectores sensibles a estrógenos para permitir expresión inducible incluyen pER10 (Zuo *et al.*, Plant J., 24: 265 (2000)). Además, son ejemplos de los promotores que permiten la expresión específica de células en crecimiento de genes en plantas el promotor del gen NPK1 del tabaco expresable durante las fases S a M (Nishihama *et al.*, Genes Dev., 15: 352(2000)), el promotor del gen de NACK1 del tabaco como un promotor expresable en la fase M (Nishihama *et al.*, Cell, 109: 87 (2002)), el promotor del gen de CYM de *Catharanthus roseus* (Ito *et al.*, Plant J., 11: 983 (1997)), el promotor del gen de CYS de *Catharanthus roseus* expresable en la fase S (Ito *et al.*, Plant J., 11: 983 (1997)), el promotor del gen de cdc2a de *Arabidopsis thaliana* que se observa que está activo en células en crecimiento durante todo el ciclo celular (Chung *et al.*, FEBS Lett., 362: 215 (1995)). Pueden encontrarse ejemplos de los promotores específicos de tejido en los siguientes documentos: US 5.459.252 y US 5.633.363 (específica de raíz), US 5.097.025 ((i) semilla, (ii) planta madura), US 5.391.725 ((i) cloroplasto, (ii) citosol), US 4.886.753 (nódulo de raíz), US 5646333 (epidermis), US 5.110.732 ((i) raíz, (ii) raíz de almacenamiento), US 5.618.988 (órganos de almacenamiento), US 5.401.836 y US 5.792.925 (raíz), US 4.943.674 (fruto o nuez), US 5.495.007 (floema), US 5.824.857 (tejido vascular). Además de estos promotores, los promotores aplicables incluyen el promotor de AtHB8 de *Arabidopsis thaliana* que actúa como un promotor específico de procambio de haces vasculares (Baima *et al.* Development 121: 4171 (1995)), el promotor de ACL5 de *Arabidopsis thaliana* específico de tallo o raíz (Hanzawa *et al.* The EMBO Journal, 19: 4248 (2000)), el promotor de RBCS3A de tomate específico de cuerpo terrestre (Meier *et al.* Plant Physiol. 107: 1105 (1995)).

Los promotores que son activos a altos niveles de expresión génica en los órganos o células reproductores masculinos, incluyen el promotor del gen de AtNACK2 de *Arabidopsis thaliana* (documento PCT/JP02/12268), el promotor del gen de AVP1 de *Arabidopsis thaliana* (Mitsuda *et al.*, Plant Mol. Biol, 46: 185 (2001)), el promotor del gen de DAD 1 de *Arabidopsis thaliana* (Ishiguro *et al.*, Plant Cell, 13: 2191 (2001)), los promotores de los genes de TA20 y TA29 del tabaco (Goldberg *et al.*, Science, 240: 1460 (1988)), el promotor del gen de Osg6B del arroz (Tuchiya *et al.*, Plant Mol. Biol, 26: 1737 (1994)), el promotor del gen de Lat52 del tomate (Twell *et al.*, Development, 109: 705 (1990)), el promotor del gen de g10 del tabaco (Rogers *et al.*, Plant Mol. Biol., 45: 577 (2001)), y promotores artificiales derivados por inserción de una secuencia reguladora específica de antera para expresión génica en el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor (Ingrid *et al.*, Plant Cell, 4: 253 (1992)). Además, se desvelan células vegetales transformadas en las que se incorpora el ADN o vector (o construcción de vector) recombinante anteriormente mencionado. Las células vegetales en las que se incorpora el vector (o construcción de vector) incluyen las células vegetales para proporcionar cuerpos vegetales transformados (transformantes vegetales). La célula vegetal en la que se transfiere el vector o construcción de vector incluye células vegetales para producir o construir plantas o cuerpos vegetales transgénicos. La célula vegetal aplicable se selecciona de plantas conocidas, incluyendo por ejemplo plantas cultivadas, plantas útiles o valiosas y otras plantas. Dichas plantas incluyen las conocidas como cultivos de cereales, judías, cultivos de raíces y tubérculos, nueces, semillas, verduras, bayas, frutas o árboles de huerto, derivados además de cultivos de jardín, árboles de jardín o hierbas, especies hortícolas, árboles con flores y especies ornamentales. Son ejemplos de las células vegetales las seleccionadas del grupo que consiste en especies de Solanáceas, especies de Crucíferas (Brasicáceas), especies de Gramíneas, especies de Leguminosas, especies de Liliáceas, especies de Umbelíferas, especies de Cucurbitáceas y otras especies, preferentemente tabaco (*Nicotiana tabacum*), *Arabidopsis thaliana*, soja (*Glycine max*), judías Adzuki (judía roja pequeña), judías verdes (*Phaseolus vulgaris*), guisantes (*Lathyrus* spp. incluyendo tirabeques (*Pisum sativum*)), habas (*Vicia faba*), cacahuetes (*Arachis hypogaea*), sésamo (*Sesamum indicum* LINNE), arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), cebada, centeno (*Secale cereale*), avena (*Avena sativa*), maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), patata (*Solanum tuberosum*), tomate, pimiento verde, col, brócoli, perejil, espinaca, boniato (*Ipomoea batatas*), taro (*Colocasia* spp. incluyendo *C. esculenta*), konjac (*Amorphophallus rivieri* var. *konjac*), yuca (*Manihot* spp. incluyendo *M. esculenta*), uvas, manzana, melocotón, pera (*Pyrus* spp. incluyendo *Pyrus pyrifolia* var. *culta* y *Pyrus communis*), caqui (*Diospyros kaki*), fresas, arándanos, ciruela, melón, pepino, caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), mandarina, limón, naranja, oliva (*Olea europaea*), algodón (*Gossypium arboretum*) y otras células vegetales. Las células vegetales incluyen no solamente células de cultivo (líneas celulares) sino también células individuales presentes en cuerpos vegetales. Incluyen también protoplastos, primordios de brotes, brotes múltiples y brotes pilosos. La incorporación aplicable de un vector o construcción de vector en una célula vegetal incluye, por ejemplo, transformación mediada por *Agrobacterium* (Hood *et al.*, Transgenic Res., 2: 218 (1993); Hiei *et al.*, Plant J., 6: 271 (1994)), electroporación (Tada *et al.*, Theor. Appl. Genet, 80: 475 (1990)), método de polietilenglicol (Lazzeri *et al.*, Theor. Appl. Genet, 81: 437 (1991)), bombardeo de partículas (Sanford *et al.*, J. Part. Sci. tech., 5: 27 (1987)). La técnica de incorporación (introducción) se selecciona adecuadamente de las conocidas en la técnica y se describe bien en la bibliografía científica y de patentes.

Las células vegetales transformadas pueden volver a diferenciarse para regenerar cuerpos vegetales. La rediferenciación varía dependiendo de la especie de célula vegetal, pero incluye, por ejemplo, el método de Fujimura *et al.* (Plant Tissue Culture Lett., 2: 74 (1995)) para el arroz; el método de Shillito *et al.* (Bio/Technology, 7: 581 (1989)) y el método de Gorden-Kamm *et al.* (Plant Cell, 2: 603 (1990)) para el maíz; método de Visser *et al.* (Theor. Appl. Genet, 78: 594 (1989)) para la patata; método de Nagata y Takebe (Planta, 99: 12 (1971)) para el tabaco; y método de Akama *et al.* (Plant Cell Reports, 12: 7-11 (1992)) para *Arabidopsis thaliana*.

Una vez que se producen plantas transgénicas en las que se incorpora ADN inhibidor o supresor contra el ADN de la presente invención o expresión del ADN de la invención, es posible obtener descendencia de las plantas mediante reproducción sexual o asexual (vegetativa), Es posible propagar plantas a escala masiva basándose en materiales de propagación (por ejemplo, semillas, nueces, frutos, esquejes, tubérculos, rizomas, bulbos, brotes, raíces, recortes, callos vegetales, protoplastos) obtenidos de la planta de interés, y descendencia o clones de los mismos. La presente divulgación abarca células vegetales en las que se ha incorporado ADN supresor contra el ADN o expresión del ADN, plantas que albergan la misma célula vegetal, descendencia y clones derivados de la misma planta, dichas plantas o cuerpos vegetales, sus materiales de propagación (fuentes) tales como descendencia y clones.

Las plantas de la presente invención pueden cambiar su crecimiento celular y desarrollo/diferenciación controlando la expresión de ADN de la invención, en comparación con plantas normales individuales.

La expresión "modificación del crecimiento celular", "modificación de la proliferación celular" o "crecimiento de células modificadas" se refiere a, por ejemplo, acontecimientos que incluyen una reducción o retardo del tiempo requerido para el ciclo celular; una reducción o retardo del tiempo requerido para cada una de las fases constituyentes G1, S, G2 y M para el ciclo celular; inhibición o detención de la entrada en cada una de las fases constituyentes G1, S, G2 y M para el ciclo celular; supresión de la terminación de cada una de las fases constituyentes G1, S, G2 y M para el ciclo celular, supresión de la aparición de cada una de las fases constituyentes G1, S, G2 y M para el ciclo celular; un cambio del tamaño celular; un cambio de la expansión de fragmoplastos; un cambio de la formación de fragmoplastos; un cambio de la expansión de placas celulares; un cambio de la formación de placas celulares; un cambio de la frecuencia de división celular; un cambio del número de núcleos contenidos en una célula; y un cambio del nivel de contenido de ADN en un núcleo. Son ejemplos preferibles de los mismos acontecimientos que incluyen una reducción o retardo en el tiempo requerido para el ciclo celular, un cambio del tamaño celular; un cambio de la formación de fragmoplastos, un cambio de la formación de placas celulares; un cambio de la frecuencia de división celular; y un cambio del nivel de contenido de ADN nuclear. El cambio del nivel de contenido de ADN nuclear como se usa en el presente documento abarca un cambio en la poliploidía, preferentemente, un aumento de la poliploidía.

La expresión "modificación del desarrollo/diferenciación" o "desarrollo/diferenciación modificada" como se usa en el presente documento se refiere, por ejemplo, a acontecimientos que incluyen un aumento en el número de células constituyentes para una planta debida al crecimiento celular potenciado, una reducción del número de células constituyentes para una planta debido al crecimiento celular suprimido, un aumento en la tasa de crecimiento vegetal y desarrollo debido al crecimiento celular potenciado, una reducción de la tasa de crecimiento celular y desarrollo debido al crecimiento celular suprimido, aumento de la tasa de crecimiento vegetal y desarrollo para acortar un periodo requerido para la floración, reducción de la tasa de crecimiento vegetal y desarrollo para prolongar un periodo requerido para la floración, aumento de la tasa de crecimiento vegetal y desarrollo sin alteración de la maquinaria reguladora en la floración para formar capullos florales en una planta de gran tamaño, reducción de la tasa de crecimiento vegetal y desarrollo sin alteración de la maquinaria reguladora en la floración para formar capullos florales en una planta de tamaño pequeño, aumento de la tasa de crecimiento vegetal y desarrollo para acortar un periodo requerido hasta la senescencia, reducción de la tasa de crecimiento vegetal y desarrollo para prolongar un periodo hasta la senescencia, aumento de la tasa de crecimiento vegetal y desarrollo sin alteración de la maquinaria reguladora hasta el inicio de la senescencia para crecer hasta ser una planta de gran tamaño hasta el inicio de la senescencia, reducción de la tasa de crecimiento vegetal y desarrollo sin alteración de la maquinaria reguladora hasta el inicio de la senescencia para comenzar la senescencia después de crecer hasta ser una planta de tamaño pequeño, un cambio en la forma morfológica del tejido debido al crecimiento celular potenciado o suprimido, un cambio en el tamaño del tejido debido al crecimiento celular potenciado o suprimido, un cambio en la forma morfológica del órgano debido al crecimiento celular potenciado o suprimido, un cambio en el tamaño del órgano debido al crecimiento celular potenciado o suprimido, un cambio en la forma morfológica de la planta debido al crecimiento celular potenciado o suprimido, y un cambio en el tamaño de la planta debido al crecimiento celular potenciado o suprimido. Son ejemplos preferibles de los mismos acontecimientos que incluyen aumentar la tasa de crecimiento vegetal y desarrollo sin cambiar la maquinaria reguladora en la floración para formar capullos florales en una planta de gran tamaño, una reducción del número de células constituyentes para una planta debido al crecimiento celular suprimido, reducción de la tasa de crecimiento de la planta y desarrollo sin cambiar la maquinaria de regulación de la formación de capullos florales para formar capullos florales en una planta de tamaño pequeño, un cambio en el tamaño del órgano debido al crecimiento celular potenciado o suprimido, y un cambio en el tamaño de la planta debido al crecimiento celular potenciado o suprimido. Un ejemplo más preferible de los mismos es un cambio en el tamaño de la planta debido al crecimiento celular potenciado o suprimido. En la presente divulgación, el cambio en el tamaño de la planta debido al crecimiento celular potenciado o suprimido es un aumento del tamaño de la planta debido al crecimiento celular potenciado o una reducción del tamaño de la planta debido al crecimiento celular suprimido. La creación de plantas que permite una reducción de los niveles de expresión génica de NtmybA1 y NtmybA2 endógenos en el presente documento conduce a la producción de plantas que tienen crecimiento y desarrollo o proliferación suprimidos, acompañado de células que tienen su división celular o citocinesis suprimida o inhibida, y la creación de células cultivadas que tienen niveles de expresión génica reducidos de NtmybA2 endógeno da como resultado su ciclo celular modificado. Estos muestran que NtmybA1 y NtmybA2 son factores de regulación positiva con respecto al ciclo celular y la división celular, y que es posible generar plantas que tengan sus

propiedades de crecimiento y desarrollo suprimidas.

En la presente invención, la creación de plantas transgénicas y células transformadas que permiten la expresión estable de NtmybA2 da como resultado producción de plantas o células de cultivo que crecen lentamente. Esto muestra que la expresión ectópica de NtmybA2 permite la creación de plantas que tienen su ciclo celular retardado y crecimiento y desarrollo suprimidos.

En plantas transgénicas y células transformadas que tienen niveles de expresión génica reducidos de NtmybB endógeno, su crecimiento y desarrollo se suprime o inhibe en el presente documento. Esto muestra que NtmybB es un factor regulador negativo con respecto al ciclo celular y la división celular, y que es posible crear plantas que tengan propiedades de crecimiento y desarrollo potenciadas.

En plantas que permiten la expresión estable de NtmybB, su crecimiento y desarrollo se suprime o inhibe en el presente documento. Esto muestra que NtmybB es un factor regulador negativo con respecto al ciclo celular y la división celular, y que es posible proporcionar plantas que tengan propiedades de crecimiento y desarrollo suprimidas.

Se desvelan genes de Os3RmybA1 de arroz que actúan como activadores de la transcripción para genes de ciclina B y genes relacionados con NACK, Del arroz (*Oryza sativa*), se aísla ADNc de Os3RmybA1 que es el gen de 3Rmyb vegetal y su secuencia de nucleótidos se desvela con éxito en el presente documento. La secuencia de nucleótidos del ADNc de Os3RmybA1 se muestra en SEC ID N°: 31, y la secuencia de aminoácidos de la proteína Os3RmybA1 codificada por este gen también se muestra en SEC ID N°: 32.

Se desvelan proteínas 3Rmyb vegetales de Monocotiledóneas que son funcionalmente equivalentes a la proteína Os3RmybA1. Como se usa en el presente documento, la expresión "equivalentemente funcional" o "funcionalmente equivalente" indica que una proteína actúa o funciona como un activador de la transcripción para los genes de ciclina B y genes relacionados con NACK. Es posible evaluar si las proteínas actúan o no como factores para controlar la transcripción de los genes de ciclina B y genes relacionados con NACK, mediante ensayos de complementación funcional basados en la expresión de dichas proteínas en cepas mutantes, y activación del gen de ciclina B y transcripción del gen relacionado con NACK por dichas proteínas que se expresan de forma transitoria en células vegetales.

Pueden seleccionarse plantas utilizables para aislamiento o separación de proteínas funcionalmente equivalentes a las proteínas 3Rmyb vegetales caracterizadas en la presente invención de plantas Monocotiledóneas. Estas plantas pueden usarse también como fuentes de genes.

En una realización de métodos para obtener o aislar la proteína funcionalmente equivalente anteriormente mencionada, se conocen bien por los expertos en la materia técnicas para incorporar una mutación de aminoácidos en una proteína. Es posible para un experto en la materia incorporar una sustitución, delección (disrupción) y/o inserción (adición) de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de una proteína "Os3RmybA1" de origen natural (por ejemplo, la proteína mostrada en SEC ID N°: 32) de acuerdo con una técnica convencional para producir una proteína mutada (muteína) funcionalmente equivalente a dicha proteína de origen natural. También pueden producirse de forma natural mutaciones de aminoácidos. Las proteínas incluyen las que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene al menos una sustitución, delección (disrupción) o inserción (adición) de uno o varios restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicha proteína "Os3RmybA1" de origen natural. El número de restos de aminoácidos alterados en secuencias es habitualmente de 50 o menos por el total de restos de aminoácidos presentes en una proteína, preferentemente de 30 o menos, más preferentemente de 10 o menos y más preferentemente de 3 o menos. Pueden realizarse modificaciones de aminoácidos usando por ejemplo el "Kit de Mutagénesis dirigida Transformer" y "Kit de Mutagénesis Dirigida basado en PCR ExSite" (Clontech) para mutaciones y sustituciones, y el "Kit de Delección Anidada Quantum leap" (Clontech) para delecciones.

Dichas mutaciones, conversiones y modificaciones incluyen las descritas en JBS (Ed.), "Zoku-Seikagaku Jikken Koza 1, Idenshi Kenkyuhou II", p105 (Susumu Hirose), Tokyo Kagaku Dozin Co. Ltd., Japón (1986); JBS (Ed.), "Shin-Seikagaku Jikken Koza 2, Kakusan III (Recombinant DNA technique)", p 233 (Susumu Hirose), Tokyo Kagaku Dozin Co. Ltd., Japón (1992); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 154, p. 350 y p. 367, Academic Press, Nueva York (1987); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 457 y p. 468, Academic Press, Nueva York (1983); J. A. Wells *et al.*, Gene, 34: 315, 1985; T. Grundstroem *et al.*, Nucleic Acids Res., 13: 3305, 1985; J. Taylor *et al.*, Nucleic Acids Res., 13: 8765, 1985; R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 155, p. 568, Academic Press, Nueva York (1987); A. R. Oliphant *et al.*, Gene, 44: 177, 1986. Por ejemplo, se incluyen método tales como mutagénesis dirigida (mutagénesis específica de sitio) utilizando oligonucleótidos sintéticos (Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10: 6487, 1987; Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13: 4331, 1986), mutagénesis de casete (Wells *et al.*, Gene, 34: 315, 1985), mutagénesis de selección de restricción (Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317: 415, 1986), exploración de alanina (Cunningham y Wells, Science, 244: 1081-1085, 1989), mutagénesis por PCR, el método de Kunkel, el método de dNTP[αS] (Eckstein), mutagénesis dirigida a región usando ácido sulfuroso y ácido nitroso.

La sustitución, delección (disrupción) o inserción (adición) de aminoácidos puede producir una modificación deseable y puede provocar una alteración en las propiedades fisiológicas o químicas de un polipéptido constituyente para la proteína de interés. Hay con frecuencia casos en los que un polipéptido con sustitución, delección o inserción se considerará sustancialmente idéntico a un polipéptido sin dicha sustitución, delección o inserción. Pueden seleccionarse sustituyentes sustancialmente idénticos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de otros aminoácidos en la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, fenilalanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, triptófano, metionina y similares, los aminoácidos polares (neutros) incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina y similares, los aminoácidos que tienen una carga positiva (aminoácidos básicos) incluyen arginina, lisina, histidina y similares, y los aminoácidos que tienen una carga negativa (aminoácidos ácidos) incluyen ácido aspártico, ácido glutámico y similares. En algunos casos, la cisteína puede reemplazarse con serina; la glicina con alanina o leucina; y la leucina con alanina, isoleucina, valina u otros. En las proteínas, los restos de aminoácidos contenidos en las mismas pueden modificarse por técnicas químicas. Además, se pueden modificar y degradar parcialmente con enzimas tales como peptidasas (por ejemplo, pepsina, quimotripsina, papaína, bromelaína, endopeptidasa, exopeptidasa) para preparar derivados o mutantes de los mismos.

Además las proteínas pueden expresarse como proteínas de fusión cuando se producen por técnicas de recombinación génica y pueden convertirse o procesarse *in vivo* o *in vitro* en los productos que tienen actividad biológica sustancialmente equivalente en comparación con los de origen natural. Puede aplicarse el sistema de expresión de proteína de fusión usado habitualmente en la ingeniería genética. Dichas proteínas de fusión pueden purificarse por una cromatografía de afinidad y similares, aprovechando sus restos de fusión. Dichas proteínas de fusión incluyen las fusionadas con un marcador de histidina, y las fusionadas con la secuencia de aminoácidos de β -galactosidasa (β -gal), proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión S-transferasa (GST), tioredoxina (TRX) o Cre Recombinasa. De forma similar, el polipéptido puede unirse con un marcador de epítipo heterogéneo y puede aislarse/purificarse por una cromatografía de inmunoafinidad usando un anticuerpo que se una específicamente con el epítipo. En realizaciones más adecuadas, los representativos incluyen, por ejemplo, AU5, c-Myc, CruzTag 09, CruzTag 22, CruzTag 41, Glu-Glu, HA, Ha.11, KT3, FLAG (marca registrada, Sigma-Aldrich), Omni-probe, S-probe, T7, Lex A, V5, VP16, GAL4, VSV-G, y otros (Field *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 8: pp. 2159-2165 (1988); Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5: pp.3610-3616 (1985); Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3(6): pp.547-553 (1990); Hopp *et al.*, BioTechnology, 6: pp.1204-1210 (1988); Martin *et al.*, Science, 255: pp.192-194 (1992); Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266: pp.15163-15166 (1991); Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: pp.6393-6397 (1990)). También son aplicables sistemas de dos híbridos de levadura.

Además, las proteínas de fusión pueden ser las marcadas con un marcador de modo que se conviertan en proteínas detectables. En realizaciones más adecuadas, los marcadores detectables pueden ser marcador de Biotina-Avi que es un sistema de biotina/estreptavidina, y sustancias fluorescentes. Las sustancias fluorescentes incluyen proteínas verdes fluorescentes (GFP) derivadas de medusas luminiscentes tales como *Aequorea victoria* y similares, variantes modificadas de las mismas (variantes de GFP) tales como EGFP (GFP humanizada potenciada) y rsGFP (GFP de desplazamiento al rojo), proteínas amarillas fluorescentes (YFP), proteínas verdes fluorescentes (GFP), proteínas cian fluorescentes (CFP), proteínas azules fluorescentes (BFP), GFP derivada de *Renilla reniformis*, y similares (Atsushi Miyawaki ed., Jikken Igaku, supl., Postgenome Jidai no Jikken Kouza 3. GFP and Bioimaging, Youdosha, Japón, 2000). Además, puede llevarse a cabo detección usando anticuerpos (incluyendo anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos) que reconocen específicamente el marcador de fusión anterior.

Los métodos conocidos en la técnica de péptidos sintéticos, por ejemplo, métodos sintéticos químicos tales como métodos sintéticos de fase líquida, y métodos sintéticos de fase sólida pueden usarse para la síntesis de las proteínas y fragmentos peptídicos de las mismas. En dichos métodos, usando una resina para síntesis de proteínas o péptidos, se une secuencialmente un aminoácido protegido de forma apropiada a la secuencia de aminoácidos en la resina de acuerdo con diversos métodos de condensación como se conoce en la técnica. Se usan preferentemente diversos reactivos activadores como se conocen en la técnica para las reacciones de condensación. Por ejemplo, las carbodiimidias tales como dicitlohexilcarbodiimida pueden usarse preferentemente como dichos reactivos. Un reactivo objetivo puede obtenerse retirando apropiadamente un grupo protector cuando un producto tiene el grupo protector.

Las proteínas desveladas pueden producirse como proteínas de origen natural (proteínas nativas) por métodos conocidos por un experto en la materia o como alternativa como proteínas recombinantes que se preparan usando técnicas de recombinación génica. Dichas proteínas nativas pueden producirse, por ejemplo, por las siguientes etapas: de un animal pequeño tal como un conejo se inmuniza con proteína recombinantes preparadas por el método desvelado en el presente documento posteriormente para inducir anticuerpos, que se acoplan después con absorbentes adecuados (agarosa activada por CNBr o agarosa activada por tosilo), y un extracto de proteína de hoja de arroz se somete a purificación usando una columna que contiene el inmunoabsorbente resultante para proporcionar la proteína nativa. Las proteínas recombinantes pueden prepararse por métodos convencionales, por ejemplo por inserción del ADN codificante de proteína de la invención en un vector de expresión adecuado, introducción de dicha construcción de vector en una célula adecuada y purificación de la célula transformada resultante.

Las células hospedadoras empleadas para producción de proteínas recombinantes incluyen, por ejemplo, células vegetales, células de microorganismos tales como *Escherichia coli* y levadura, células animales, células de insecto y otras. Los vectores (o construcciones de vectores) para expresión *in vivo* de proteínas recombinantes incluyen, por ejemplo, plásmidos "pBI121" y "pBI101" (Clontech) para células vegetales o de levadura; plásmidos "sistema de Expresión de pET" (Stratagene) y "Vectores de fusión génica GST" (Pharmacia) para *E. coli*; el plásmido "pMAM" (Clontech) para células de mamífero; el plásmido "pBacPAK8.9" (Clontech). Puede llevarse a cabo inserción de ADN en un vector usando técnicas convencionales tales como métodos desvelados en Molecular Cloning (Maniatis *et al.*, Cold Spring harbor Laboratory Press). El vector o la construcción de vector pueden incorporarse en la célula hospedadora usando técnicas convencionales tales como electroporación, microinyección y bombardeo de partículas. La introducción de construcciones de vector puede realizarse con una técnica adecuada dependiendo de una célula hospedadora particular usada. Puede realizarse purificación de proteínas recombinantes de las células transformadas resultantes usando precipitación salina o precipitación con disolventes orgánicos, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía en columna usando una columna inmunoabsorbente, filtración en gel, electroforesis de SDS, electroforesis isoelectrónica y otras técnicas de purificación y separación solas u opcionalmente en combinación con cualquier otro método, dependiendo de las propiedades de las proteínas diana. Cuando la proteína recombinante se expresa como una proteína de fusión con un marcador tal como glutatión S-transferasa (GST), puede purificarse por una cromatografía de afinidad dirigida a dicho marcador.

La presente memoria descriptiva también describe ADN que codifica cada una de las proteínas anteriormente mencionadas. El ADN no se limita a, pero incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintetizado de forma química y otros siempre que sea capaz de codificar la proteína de la presente invención. Puede prepararse ADN genómico, por ejemplo realizando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la que se usa ADN genómico molde preparado de acuerdo con el método desvelado en el documento (Rogers y Bendich, Plant Mol. Biol. 5: 69 (1985)) en combinación con cebadores construidos basándose en las secuencias de ADN (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 31) de la presente invención. Para ADNc, se somete ARNm preparado a partir de plantas de acuerdo con técnicas convencionales (Maniatis *et al.* Molecular Cloning Cold Spring harbor Laboratory Press) a transcripción inversa seguido de PCR usando los cebadores anteriormente mencionados para preparar el ADNc. Además, pueden prepararse ADN genómico y ADNc mediante producción de bibliotecas de ADN genómico o bibliotecas de ADNc de acuerdo con técnicas convencionales, y exploración con respecto a las bibliotecas de ADN genómico resultantes o bibliotecas de ADNc con sondas sintetizadas en las bases de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 31).

Otras realizaciones de aislamiento de proteínas funcionalmente equivalentes incluyen técnicas de hibridación (Southern, J. Mol. Biol. 98: 503 (1975); Maniatis *et al.*, "Molecular Cloning", Cold Spring harbor Laboratory Press) y técnicas de PCR (H. A. Erlich (ed.), "PCR technology", Stockton Press, Nueva York (1989)). En otras palabras, es posible para un experto en la materia obtener proteínas funcionalmente equivalentes a la proteína "Os3RmybA1" mediante el uso de ADN aislado altamente homólogo de la secuencia de nucleótidos del gen de "Os3RmybA1" (SEC ID N°: 31) en el que dicho ADN aislado se obtiene usando la secuencia de nucleótidos del gen de "Os3RmybA1" (SEC ID N°: 31) o parte del mismo como una sonda así como usando oligonucleótidos hibridables con parte de la secuencia de nucleótidos del gen de "Os3RmybA1" (SEC ID N°: 31) como cebadores. Por lo tanto, la presente invención también abarca proteínas que se codifican por ADN aislado de acuerdo con técnicas de hibridación o PCR y son funcionalmente equivalentes a la proteína "Os3RmybA1".

La expresión "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" usada en el presente documento se refiere habitualmente a técnicas descritas en Saiki *et al.*, Science, 239: 487 (1988); Patente de Estados Unidos N° 4.683.195 y otros documentos. Por ejemplo, la PCR es un método *in vitro* para la amplificación enzimática de secuencias de nucleótidos específicas deseadas. En general, la PCR incluye series repetidas de ciclos en las que se construye una síntesis de elongación de cebadores usando dos cebadores oligonucleotídicos capaces de hibridar preferentemente con un ácido nucleico molde. Normalmente, los cebadores usados en PCR pueden incluir los que son complementarios de la secuencia de nucleótidos interna de interés en el molde. Por ejemplo, los pares de cebadores preferibles como se usan en el presente documento pueden ser los que son complementarios de ambos extremos de dicha secuencia de nucleótidos para amplificar, o regiones flanqueantes adyacentes a dicha secuencia de nucleótidos. Se prefiere seleccionar un cebador 5' terminal de modo que se contenga al menos un codón de inicio o pueda realizarse la amplificación incluyendo el codón de inicio, y seleccionar un cebador 3' terminal de modo que se contenga al menos un codón de parada o pueda realizarse una amplificación incluyendo codón de parada. Los cebadores incluyen oligonucleótidos compuestos de preferentemente 5 o más bases nucleotídicas, más preferentemente 10 o más bases nucleotídicas, y más preferentemente de 18 a 25 bases nucleotídicas.

Las reacciones de PCR pueden llevarse a cabo por métodos conocidos en la técnica o métodos sustancialmente equivalentes a los mismos y métodos modificados de los mismos. Por ejemplo, puede realizarse la PCR de acuerdo con métodos descritos en los documentos anteriormente mencionados así como R. Saiki, *et al.*, Science, 230: 1350, 1985; H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989; D. M. Glover *et al.* ed., "DNA Cloning", 2ª ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); M. A. Innis *et al.* ed., "PCR Protocols: a guide to methods and applications", Academic Press, Nueva York (1990); M. J. McPherson, P. Quirke y G. R. Taylor (Ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991); M. A. Frohman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988), y métodos modificados o variantes de los mismos. Los métodos de PCR también pueden

realizarse usando kits disponibles en el mercado adecuados para ello, y también pueden llevarse a cabo de acuerdo con protocolos desvelados por fabricantes o distribuidores de los kits.

Para la PCR, en un caso representativo, por ejemplo, se mezclan un molde (por ejemplo, ADN sintetizado usando ARNm como un molde; ADN de 1ª cadena) y cebadores sintetizados de acuerdo con diseños en dicho gen con un tampón de reacción 10x (unido con un kit de ADN polimerasa Taq), dNTP (desoxirribonucleósido trifosfatos; mezcla de dATP, dGTP, dCTP y dTTP), ADN polimerasa Taq y agua destilada desionizada. La mezcla se somete a de 25 a 60 ciclos de amplificación usando un termociclador automático tal como el sistema de PCR GeneAmp 2400 (Perkin-Elmer/Cetus) en condiciones de ciclo de PCR generales. El número de ciclos de amplificación puede ajustarse convenientemente a un valor apropiado dependiendo de los fines. El ciclo de PCR incluye, por ejemplo, desnaturalización a 90 a 95 °C durante 5 a 100 segundos, hibridación a 40 a 60 °C durante 5 a 150 segundos y extensión a 65 a 75 °C durante 30 a 300 segundos, y preferentemente desnaturalización a 94 °C durante 15 segundos, hibridación a 58 °C durante 15 segundos y extensión a 72 °C durante 45 segundos. Para la temperatura de hibridación y el tiempo de reacción, se selecciona convenientemente un valor apropiado por experimentación. Para el tiempo de desnaturalización y extensión, un valor apropiado varía convenientemente de acuerdo con la longitud de cadena de los productos de PCR esperados. En general, el tiempo de hibridación varía preferentemente dependiendo del valor de T_m de híbridos de ADN de cebador-molde. El periodo temporal de extensión se establece habitualmente con el objetivo de conseguir aproximadamente 1 minuto por cada 1000 pb de longitud de cadena, pero puede ser posible seleccionar un periodo de tiempo más corto en algunos casos.

La secuencia de nucleótidos de ADN obtenida de este modo puede secuenciarse fácilmente, por ejemplo, usando "Secuenciador Modelo 310" (ABI). El ADN puede usarse, por ejemplo, en preparación de proteínas recombinantes como se ha mencionado anteriormente. También es posible que el ADN se exprese *in vivo* en plantas para producir plantas transgénicas en las que el crecimiento celular se altera y plantas transgénicas con desarrollo y diferenciación modificados.

Para aislamiento o separación de genes que codifican proteínas funcionalmente equivalentes a Os3RmybA1, puede realizarse hibridación en condiciones de hibridación a 55 °C seguido de lavado 3 veces en total durante 10 minutos a 55 °C en SSC2X que contiene SDS 0,1 % (NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M) o SSPE2X (NaCl 3,6 M, solución de fosfato sódico 0,2 M (pH 7,7), Na₂-EDTA 0,02 M). La hibridación más rigurosa puede incluir preferentemente hibridación a 65 °C seguido de lavado 3 veces en total durante 10 minutos a 65 °C en SSC2X que contiene SDS 0,1 % o SSPE2X. La hibridación aún más rigurosa incluye preferentemente hibridación a 65 °C, después lavado durante 10 minutos a 65 °C en SSC2X que contiene SDS 0,1 % o SSPE2X seguido de lavado dos veces en total durante 10 minutos a 65 °C en SSC1X que contiene SDS 0,1 % o SSPE1X. Los tampones de hibridación aplicables pueden ser los desvelados en "Molecular cloning (Maniatis T. *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press)", y otros.

Las proteínas relacionadas, fragmentos de las mismas, y ácidos nucleicos (incluyendo ARNm y oligonucleótidos) como se desvela en el presente documento pueden ser aplicables, solos o en mezcla con otros elementos diversos, a la tecnología de genómica y proteómica, opcionalmente en combinación con técnica antisentido, anticuerpos incluyendo anticuerpos monoclonales, plantas transgénicas y otras tecnologías o materiales. Además, se pueden aplicar a tecnología de interferencia de ARN (ARNi) usando ARN bicatenario (ARNbc). Por lo tanto, estarán disponibles los siguientes: análisis de polimorfismo génico incluyendo análisis de "polimorfismo de un único nucleótido (SNP)" del núcleo; análisis de expresión génica, análisis de función génica, análisis de interacción proteína-proteína, análisis de genes relacionados y análisis de productos agroquímicos, usando matrices de ácido nucleico y matrices de proteínas. Por ejemplo, en la tecnología de matrices de ácido nucleico, se analizan muestras usando bibliotecas de ADNc, disponiendo ADN obtenido por PCR en una placa de apoyo a una alta densidad con un aparato de aplicación puntual y utilizando hibridación.

La disposición en matrices puede realizarse mediante inmovilización de ADN en cada sitio definido en una placa de apoyo tal como un portaobjetos de vidrio, una placa de silicio y una placa de plástico, con agujas o puntas o usando una técnica de impresión por chorro de tinta y otros. Los datos se adquieren por observación de señales que han resultado de hibridación en las matrices de ácidos nucleicos. Las señales pueden ser las obtenidas de marcadores tales como colorantes fluorescentes (por ejemplo, colorantes Cy3, Cy5, BODIPY, FITC, Alexa Fluor (nombre comercial) y Texas red (nombre comercial)). La detección puede realizarse con una exploración por láser y similares. Los datos resultantes pueden procesarse con un sistema informático con programas instalados de acuerdo con un algoritmo apropiado. Además, pueden utilizarse productos proteicos de expresión recombinante marcados en tecnología de matrices de proteínas. Los instrumentos y técnicas utilizables en la tecnología de matrices de proteínas pueden incluir electroforesis dimensional (2-DE); análisis de masas (MS), incluyendo técnicas tales como ionización por electropulverización (ESI) y desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI), en las que pueden emplearse analizadores de MALDI-TOF, analizadores de cuadrupolo triple de ESI, analizadores de trampa iónica de ESI y otros, para sustancias proteicas incluyendo fragmentos digeridos de forma enzimática; técnicas de tinción; marcaje y análisis de isótopos; técnicas de procesamiento de imágenes; y similares. Por lo tanto, la presente invención puede abarcar software, bases de datos y otros que pueden obtenerse o utilizarse en lo anterior en relación no solamente con NACK1 y NACK2 sino también con anticuerpos contra NACK2, y sustancias relacionadas con los mismos.

Como se usa en el presente documento el término "anticuerpo" puede usarse en el sentido más amplio y puede abarcar una única especie de anticuerpos monoclonales deseables contra cualquiera de las proteínas Os3RmybA1, polipéptidos constituyentes de Os3RmybA1 y fragmentos peptídicos relacionados con Os3RmybA1; composiciones de anticuerpos (o mezclas) que tienen una especificidad para diversos epítomos de las mismas; anticuerpos monovalentes o polivalentes adicionales y anticuerpos policlonales y monoclonales, y también los que son moléculas intactas o fragmentos y derivados de las mismas, incluyendo fragmentos F(ab')₂, Fab' y Fab; y también anticuerpos quiméricos, anticuerpos híbridos que tienen cada uno al menos dos sitios de unión a antígeno o epítomo, o anticuerpos recombinantes biespecíficos (por ejemplo, cuadromas, triomas), anticuerpos híbridos entre especies, anticuerpos antiidiotípicos y los que se han modificado o procesado de forma química y deben considerarse derivados de estos anticuerpos y que pueden producirse además adoptando técnicas de hibridoma o fusión de células o ingeniería genética de anticuerpos o usando técnicas sintéticas o semisintéticas de una manera conocida, que pueden prepararse bien por los métodos convencionales conocidos a la vista de la producción de anticuerpos o por técnicas de ADN recombinante, y que tienen propiedades neutralizadoras o de unión con respecto a las sustancias de antígeno diana o epítomos diana descritos y definidos en el presente documento. Específicamente, el anticuerpo preferible incluye los capaces de reconocer específicamente un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en dominios que varían de los restos de aminoácidos 53 a 202 de SEC ID N°: 32.

Se producen anticuerpos monoclonales preparados contra sustancias antigénicas por cualquier método capaz de proporcionar producción de moléculas de anticuerpo por una serie de líneas celulares en cultivo. El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo es que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no se interpreta que requiera producción del anticuerpo por ningún método particular. Los anticuerpos individuales son los que contienen una población de anticuerpos idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. A diferencia de preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan por el cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos híbridos y recombinantes. Se pueden obtener sustituyendo con un dominio constante de un anticuerpo un dominio variable, o con una cadena pesada o una cadena ligera, sustituyendo una cadena de una especie con una cadena de otra especie, o fusionando con proteínas heterogéneas, independientemente de la especie de origen o designación de clase o subclase de inmunoglobulina, siempre que muestren la actividad biológica deseada (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.79-97, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987).

Las técnicas preferibles para producir anticuerpos monoclonales incluyen, por ejemplo, los métodos que usan células de hibridoma (G. Kohler y C. Milstein, *Nature*, 256, pp.495-497 (1975)); los métodos que usan hibridomas de linfocitos B humanos (Kozbor *et al.*, *Immunology Today*, 4, pp.72-79 (1983); Kozbor, *J. Immunol.*, 133, pp.3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1987)); métodos de trioma; métodos de hibridoma de VEB (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96 (1985)) (técnicas para producción de anticuerpos monoclonales humanos); Patente de Estados Unidos N° 4.946.778 (técnicas para producción de anticuerpos monocatenarios), así como los siguientes documentos en relación con anticuerpos: S. Biocca *et al.*, *EMBO J.*, 9, pp.101-108 (1990); R. E. Bird *et al.*, *Science*, 242, pp.423-426 (1988); M. A. Boss *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 12, pp.3791-3806 (1984); J. Bukovsky *et al.*, *Hybridoma*, 6, pp.219-228 (1987); M. DAINO *et al.*, *Anal. Biochem.*, 166, pp.223-229 (1987); J. S. Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, pp.5879-5883 (1988); P. T. Jones *et al.*, *Nature*, 321, pp.522-525 (1986); J. J. Langone *et al.* (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, Nueva York (1986); S. Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, pp.6851-6855 (1984); V. T. Oi *et al.*, *BioTechniques*, 4, pp.214-221 (1986); L. Riechmann *et al.*, *Nature*, 332, pp.323-327 (1988); A. Tramontano *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, pp.6736-6740 (1986); C. Wood *et al.*, *Nature*, 314, pp.446-449 (1985); *Nature*, 314, pp.452-454 (1985) o documentos citados en los mismos. Los anticuerpos se pueden utilizar no solamente en el análisis y detección de los productos de expresión de genes de interés en el presente documento sino también en diversas aplicaciones.

Es conveniente aislar ADN que codifica proteínas 3Rmyb vegetales con los métodos anteriormente mencionados basándose en hibridación y métodos que se basan en PCR. En casos en los que se lleva a cabo el aislamiento con PCR, es posible aislar ADN que codifica la región de unión a ADN de myb que muestra un marco de 3 repeticiones por PCR usando, por ejemplo, cebadores degradados como se desvela en el Ejemplo 1. Para potenciar la especificidad de PCR, también es conveniente diseñar un segundo par de cebadores de PCR que tengan sitios de hibridación en una localización más interna que el primer sitio de hibridación con cebadores de PCR de la secuencia diana. Puede aplicarse PCR anidada con el segundo par de cebadores. Después de determinación de secuencia de nucleótidos de los productos de ADN resultantes, la aplicación de amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE, Dorit *et al.*, *Current protocols in molecular biology*. Unit 15.6 (1992)) permite el aislamiento y determinación de secuencias de ADNc 5' y 3' terminales.

Las plantas utilizables de las que se aísla o separa la proteína 3Rmyb vegetal pueden seleccionarse de Dicotiledóneas. Estas plantas pueden usarse también como fuentes de genes.

5 Las plantas Dicotiledóneas y Monocotiledóneas aplicables pueden seleccionarse de cualquier especie incluyendo las ampliamente conocidas como plantas de cultivo o plantas útiles. Las plantas incluyen cultivos de cereales, judías, cultivos de raíces y tubérculos, nueces, semillas, verduras, bayas, frutos o árboles de huerta, así como cultivos de jardín, árboles de jardín o hierbas, especies hortícolas, árboles en floración y especies ornamentales. Las plantas ejemplares incluyen especies de Solanáceas, especies de Crucíferas (Brasicáceas), especies de Gramíneas, especies de Leguminosas, especies de Liliáceas, especies de Umbelíferas, especies de Cucurbitáceas y otras especies, preferentemente tabaco (*Nicotiana tabacum*), *Arabidopsis thaliana*, soja (*Glycine max*), judía Adzuki (judía roja pequeña), judías verdes (*Phaseolus vulgaris*), guisantes (*Lathyrus* spp. incluyendo tirabeques (*Pisum sativum*)), haba (*Vicia faba*), cacahuetes (*Arachis hypogaea*), arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), cebada, centeno (*Secale cereale*), avena (*Avena sativa*), agróstide (*Agrostis* spp.), maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), colza (*Brassica napus*), patata (*Solanum tuberosum*), boniato (*Ipomoea batatas*), taro (*Colocasia* spp. incluyendo *C. esculenta*), konjac (*Amorphophallus rivieri* var. konjac), y yuca (*Manihot* spp. incluyendo *M. esculenta*)

20 Se desvelan métodos para construir o producir moléculas con al menos una propiedad de activación de la transcripción potenciada en comparación con la poseída inherentemente por un miembro seleccionado del grupo que consiste en proteínas, NtmybA1, NtmybA2, Os3RmybA1, AtMYB3R1 y AtMYB3R4, que comprende modificar la función de dicha proteína seleccionada de NtmybA1, NtmybA2, Os3RmybA1, AtMYB3R1 y AtMYB3R4, y seleccionar dicha molécula deseable con al menos dicha propiedad activadora potenciada para la función activadora de la transcripción de dicha proteína. La proteína NtmybA1 (incluyendo NtmybA1 modificada y proteína relacionada con NtmybA1) que actúa como una molécula con una propiedad activadora de la transcripción potenciada en comparación con la poseída de forma inherente por la proteína NtmybA1 es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 459 a 1003 de SEC ID N°: 51 de la proteína NtmybA1 mostrada en SEC ID N°: 51,
- 30 (b) más convenientemente, una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 579 a 1003 de SEC ID N°: 51 de la proteína NtmybA1 mostrada en SEC ID N°: 51, o una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 715 a 1003 de SEC ID N°: 51 de la proteína NtmybA1 mostrada en SEC ID N°: 51, y
- 35 (c) más convenientemente una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 641 a 1003 de SEC ID N°: 51 de la proteína NtmybA1 mostrada en SEC ID N°: 51.

La proteína NtmybA2 (incluyendo NtmybA2 modificada y proteína relacionada con NtmybA2) que actúa como una molécula con una propiedad activadora de la transcripción potenciada en comparación con la poseída de forma inherente por la proteína NtmybA2 es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en:

- 40 (a) una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 413 a 1042 de SEC ID N°: 53 de la proteína NtmybA2 mostrada en SEC ID N°: 53,
- (b) más convenientemente, una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 569 a 1042 de SEC ID N°: 53 de la proteína NtmybA2 mostrada en SEC ID N°: 53, o una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 705 a 1042 de SEC ID N°: 53 de la proteína NtmybA2 mostrada en SEC ID N°: 53, y
- 45 (c) más convenientemente una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 631 a 1042 de SEC ID N°: 53 de la proteína NtmybA2 mostrada en SEC ID N°: 53.

50 La proteína Os3RmybA1 (incluyendo Os3RmybA1 modificada y proteína relacionada con Os3RmybA1) que actúa como una molécula con una propiedad activadora de la transcripción potenciada en comparación con la poseída de forma inherente por la proteína Os3RmybA1 es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en:

- 55 (a) una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 426 a 993 de SEC ID N°: 32 de la proteína Os3RmybA1 mostrada en SEC ID N°: 32,
- (b) más convenientemente, una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 575 a 993 de SEC ID N°: 32 de la proteína Os3RmybA1 mostrada en SEC ID N°: 32, o una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 709 a 993 de SEC ID N°: 32 de la proteína Os3RmybA1 mostrada en SEC ID N°: 32, y
- 60 (c) más convenientemente una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 635 a 993 de SEC ID N°: 32 de la proteína Os3RmybA1 mostrada en SEC ID N°: 32.

65 La proteína AtMYB3R1 (incluyendo AtMYB3R1 modificada y proteína relacionada con AtMYB3R1) que actúa como una molécula con una propiedad activadora de la transcripción potenciada en comparación con la poseída de forma inherente por la proteína AtMYB3R1 es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 583 a 776 de SEC ID N°: 75 de la proteína AtMYB3R1 mostrada en SEC ID N°: 75, o una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 691 a 776 de SEC ID N°: 75 de la proteína AtMYB3R1 mostrada en SEC ID N°: 75 y
- (b) convenientemente, una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 621 a 776 de SEC ID N°: 75 de la proteína AtMYB3R1 mostrada en SEC ID N°: 75.

La proteína AtMYB3R4 (incluyendo AtMYB3R4 modificada y proteína relacionada con AtMYB3R4) que actúa como una molécula con una propiedad activadora de la transcripción potenciada en comparación con la poseída de forma inherente por la proteína AtMYB3R4 es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 570 a 961 de SEC ID N°: 76 de la proteína AtMYB3R4 mostrada en SEC ID N°: 76, o una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 667 a 961 de SEC ID N°: 76 de la proteína AtMYB3R4 mostrada en SEC ID N°: 76, y
- (b) convenientemente, una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 608 a 961 de SEC ID N°: 76 de la proteína AtMYB3R4 mostrada en SEC ID N°: 76.

Se desvelan métodos para construir o producir moléculas que actúan como agentes negativos dominantes contra moléculas 3Rmyb vegetales endógenas, que comprende modificar la función de un miembro seleccionado del grupo que consiste en proteínas NtmybA1, NtmybA2, Os3RmybA1, AtMYB3R1 y AtMYB3R4, y seleccionar dicha molécula deseable con al menos una actividad negativa dominante en dicha molécula 3Rmyb vegetal endógena, en los que dicha molécula negativa dominante incluye las que tienen al menos una propiedad activadora de la transcripción reducida o extinguida en comparación con la propiedad poseída de forma inherente por dicha proteína de tipo silvestre seleccionada del grupo que consiste en NtmybA1, NtmybA2, Os3RmybA1, AtMYB3R1 y AtMYB3R4.

La proteína NtmybA1, NtmybA2, Os3RmybA1, AtMYB3R1 o AtMYB3R4 (incluyendo NtmybA1, NtmybA2, Os3RmybA1, AtMYB3R1 o AtMYB3R4 modificada así como proteína relacionada con NtmybA1, NtmybA2, Os3RmybA1, AtMYB3R1 o AtMYB3R4) que actúa como una molécula dominante negativa contra al menos uno de los genes de 3Rmyb endógenos es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 299 a 1003 de SEC ID N°: 51 de la proteína NtmybA1 mostrada en SEC ID N°: 51,
- (b) más convenientemente, una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 186 a 1003 de SEC ID N°: 51 de la proteína NtmybA1 mostrada en SEC ID N°: 51,
- (c) una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 243 a 1042 de SEC ID N°: 53 de la proteína NtmybA2 mostrada en SEC ID N°: 53,
- (d) más convenientemente, una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 188 a 1042 de SEC ID N°: 53 de la proteína NtmybA2 mostrada en SEC ID N°: 53,
- (e) una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 257 a 993 de SEC ID N°: 32 de la proteína Os3RmybA1 mostrada en SEC ID N°: 32,
- (f) más convenientemente, una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 203 a 993 de SEC ID N°: 32 de la proteína Os3RmybA1 mostrada en SEC ID N°: 32,
- (g) una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 241 a 776 de SEC ID N°: 75 de la proteína AtMYB3R1 mostrada en SEC ID N°: 75,
- (h) más convenientemente, una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 187 a 776 de SEC ID N°: 75 de la proteína AtMYB3R1 mostrada en SEC ID N°: 75,
- (i) una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 235 a 961 de SEC ID N°: 76 de la proteína AtMYB3R4 mostrada en SEC ID N°: 76, y
- (j) más convenientemente, una molécula en la que se suprime una secuencia con restos en los aminoácidos 181 a 961 de SEC ID N°: 76 de la proteína AtMYB3R4 mostrada en SEC ID N°: 76.

Las propiedades activadoras de la transcripción ejercidas por la molécula relacionada con NtmybA2 que tiene una supresión de secuencia de aminoácidos con restos en los aminoácidos 242 a 1042 o 188 a 1042 de la proteína NtmybA2, se redujeron en comparación con la poseída de forma inherente por la proteína NtmybA2 de tipo silvestre; además, cuando la proteína NtmybA2 de forma de longitud completa se coexpresó con la molécula relacionada con NtmybA2 que tenía una delección de secuencia de aminoácidos con restos en los aminoácidos 188 a 1042 de la proteína NtmybA2, la propiedad activadora de la transcripción ejercida por la proteína NtmybA2 sola se suprimió, y además cuando se coexpresó la NtmybB en forma de longitud completa con la molécula que tenía una delección de secuencia de aminoácidos con restos en los aminoácidos 188 a 1042 de la proteína NtmybA2, la propiedad supresora de la transcripción ejercida por la proteína NtmybB sola se suprimió.

Estos hechos demuestran que la molécula relacionada con NtmybA2 que tiene una delección de secuencia de aminoácidos con restos en los aminoácidos 243 a 1042 o 188 a 1042 de la proteína NtmybA2 actúa de forma dominante negativa contra la proteína 3Rmyb vegetal endógena.

Para los términos (palabras), los símbolos y/o las abreviaturas usados en la memoria descriptiva y en los dibujos, se deben adaptar a la "Comisión de IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica" o se basan en los significados de las

definiciones o patrones que se usan habitualmente o convencionalmente en la técnica. Las abreviaturas representativas tienen significados de la siguiente manera:

Con respecto a símbolos para aminoácidos:

- 5
 A: Alanina (Ala)
 M: Metionina (Met)
 C: Cisteína (Cys)
 N: Asparagina (Asn)
 10 D: Ácido aspártico (Asp)
 P: Prolina (Pro)
 E: Ácido glutámico (Glu)
 Q: Glutamina (Gln)
 F: Fenilalanina (Phe)
 15 R: Arginina (Arg)
 G: Glicina (Gly)
 S: Serina (Ser)
 H: Histidina (His)
 T: Treonina (Thr)
 20 I: Isoleucina (Ile)
 V: Valina (Val)
 K: Lisina (Lys)
 W: Triptófano (Trp)
 L: Leucina (Leu)
 25 Y: Tirosina (Tyr)
 X: Cualquier aminoácido de los aminoácidos anteriormente mencionados o cualquier aminoácido específico (cuando se indica de forma específica) (Xaa)

Con respecto a símbolos para nucleótidos:

- 30
 A,a: Adenina
 G,g: Guanina
 C,c: Citosina
 T,t: Timina
 35 R,r: Guanina o Adenina
 Y,y: Timina/Uracilo o Citosina
 M,m: Adenina o Citosina
 K,k: Guanina o Timina/Uracilo
 S,s: Guanina o Citosina
 40 W,w: Adenina o Timina/Uracilo
 D,d: Adenina o Guanina o Timina/Uracilo
 H,h: Adenina o Citosina o Timina/Uracilo
 V,v: Adenina o Guanina o Citosina
 45 N,n: Adenina o Guanina o Citosina o Timina/Uracilo, desconocido, cualquier otro nucleótido o cualquier nucleótido específico (cuando se indica específicamente).

Ejemplos

50 Se describen detalles de la presente invención por los siguientes ejemplos. Los ejemplos no abarcados por el alcance de las reivindicaciones son para fines ilustrativos.

Debería observarse que los métodos generales requeridos para recombinación génica, incluyendo desconexión y ligamiento de ADN, transformación o transfección de *E. coli*, secuenciación de nucleótidos de genes, hibridación y otros son en principio de acuerdo con manuales de usuario y guías unidos a reactivos, dispositivos, instrumentos o máquinas disponibles en el mercado útiles en cada operación, y libros de guía para experimentos (por ejemplo, "Molecular cloning (Maniatis T. *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press)" incluyendo J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2ª Edición, 1989 y 3ª Edición, 2001)). Todos los ejemplos se llevaron a cabo o pueden llevarse a cabo, a no ser que se desvele de otro modo específicamente en el presente documento por técnicas convencionales que se conocen bien y son convencionales para los expertos en la materia.

Ejemplo 1

Aislamiento y secuenciación del gen de Os3RmybA1 de arroz

65 Se aisló del arroz ADNc codificante de 3Rmyb de arroz, seguido de secuenciación.

Para aislar ADNc, se diseñaron cebadores degradados basándose en secuencias de aminoácidos en cada dominio de unión ADN de myb de las proteínas 3Rmyb del tabaco, NtmybA1, NtmybA2 y NtmybB. Se realizó PCR con los cebadores degradados en combinación con ADNc preparado de callos de arroz como un molde. Para potenciar la especificidad de PCR degradada, se realizó PCR anidada. Como resultado, el aislamiento de fragmentos de ADNc que tenían 3 repeticiones en el dominio de unión a ADN de myb fue un éxito.

Los fragmentos resultantes se sometieron a 5' RACE y 3' RACE, y se secuenció cada secuencia terminal de ADNc de longitud completa.

El aislamiento de ADNc incluyendo el gen estructural de longitud completa fue un éxito con cebadores diseñados de la secuencia 5' terminal y la secuencia 3' terminal. Se desvelan detalles a continuación.

(1) Purificación de ARNm y síntesis de ADNc

Se sometieron semillas de arroz cultivado var. Nipponbare (japonica) a retirada de cáscaras, se esterilizaron con antiformalina, después se situaron en medio N6Cl (sales inorgánicas N6 y vitaminas N6) (Chu *et al.* (1975), Sientia Sinica 18: 659) complementado con sacarosa 30 g/l, 2,4-D 2 mg/l y Gelrite™ 2 g/l, pH 5,8), y se incubaron para inducir callos embriogénicos derivados de escutelo.

Se extrajo ARN total de los callos (130 mg) con el Mini Kit de Plantas RNeasy™ (QIAGEN). El ARN total resultante (50 µg) se sometió a purificación con Sistemas de Aislamiento de ARNm PolyATtract™ (Promega) para proporcionar ARNm. El ARNm purificado se concentró por precipitación con etanol y después se aplicó a síntesis de ADNc con sistema de síntesis de primera cadena Superscript™ para RT-PCR (Invitrogen).

(2) Clonación por PCR con cebadores degradados basándose en dominios de Myb

Se realizó PCR con una alícuota (2 µl) del ADNc sintetizado (50 µl).

Los cebadores usados en PCR fueron

DEGmybF:
5'- GAIGTICARTGYWICAYMGNTGG -3' (SEC ID N°: 1),
y
DEGmybR:
5'- YTTYTTDAVIGAISWRTKCCA -3' (SEC ID N°: 2).

La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl, usando TaKaRa Ex Taq™ (Takara, Japón), un tampón de reacción unido a TaKaRa Ex Taq™, 200 µM de cada uno de dATP, dTTP, dCTP y dGTP y 10 µM de cada uno de DEGmybF y DEGmybR. La amplificación se realizó usando el sistema de PCR GeneAmp™ 9700 (PE Applied Biosystems) preparado para repetir las etapas a 94 °C durante 30 segundos, a 42 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 30 segundos durante un total de 35 ciclos. Después de finalizarse la reacción, los productos se sometieron a purificación con el Kit de Purificación de PCR QIAquick™ (QIAGEN).

Se realizó PCR anidada con una alícuota (1 µl) de la solución de reacción de PCR purificada como molde.

Los cebadores usados en la segunda PCR fueron cebadores degradados (diseñados en regiones dentro de DEGmybF y DEGmybR),

DEGmybF2:
5'- CARTGYTICAYMGITGGCARAARG -3' (SEC ID N°: 3),
y
DEGmybR2:
5'- ACISWISWRTTCCARTTRTGYTT -3' (SEC ID N°: 4).

La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl, usando TaKaRa Ex Taq™ (Takara, Japón), un tampón de reacción unido a TaKaRa Ex Taq™, 200 µM de cada uno de dATP, dTTP, dCTP y dGTP y 10 µM de cada uno de DEGmybF2 y DEGmybR2. La amplificación se realizó usando el sistema de PCR 9700 GeneAmp™ (PE Applied Biosystems) preparado para repetir las etapas a 94 °C durante 30 segundos, a 58 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 30 segundos durante un total de 35 ciclos. Después de finalizarse la reacción, la solución de reacción de PCR se sometió a purificación con el Kit de Purificación de PCR QIAquick™ (QIAGEN).

Además, se realizó PCR anidada con una alícuota (1 µl) de la solución de segunda reacción de PCR purificada como un molde.

Los cebadores usados en la tercera PCR fueron cebadores degradados (diseñados en regiones dentro de DEGmybF2 y DEGmybR2),

DEGmybF3:

5 5'- CAYMGITGGCARGTIYTIRAYCC -3' (SEC ID N°: 5),

y

DEGmybR3:

5'- HIGCRTTITCISWICKICCIKGIA -3' (SEC ID N°: 6).

10 La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl, usando TaKaRa Ex Taq™ (Takara, Japón), un tampón de reacción unido a TaKaRa Ex Taq™, 200 µM de cada uno de dATP, dTTP, dCTP y dGTP y 10 µM de cada uno de DEGmybF3 y DEGmybR3. La amplificación se realizó usando el sistema de PCR GeneAmp™ 9700 (PE Applied Biosystems) preparado para repetir las etapas a 94 °C durante 30 segundos, a 56 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 30 segundos durante un total de 30 ciclos. Después de finalizarse la reacción, los productos se sometieron a purificación con el Kit de Purificación de PCR QIAquick™ (QIAGEN). La solución de reacción de PCR resultante se analizó usando geles de agarosa. Como resultado, se verificó que el producto amplificado era un ADN de aproximadamente 300 pb. A continuación, este fragmento de ADN se sometió a clonación de TA en pCR4-TOPO™ (Invitrogen). Se secuenciaron insertos de ADN de 3 clones a un nivel de nucleótidos con el cebador T7, 5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3' (SEC ID N°: 7) para proporcionar SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10.

20

(3) Secuenciación de la secuencia 5' terminal de ADNc de 3Rmyb de arroz

Para obtener ADNc del gen de 3Rmyb de arroz de longitud completa incluyendo el fragmento de dominio de unión a ADN de 3Rmyb, que se aisló en el (1) anterior, se realizó la amplificación de los extremos 5' para dicho ADNc. El aislamiento de los extremos de ADN 5' terminales se realizó por 5' RACE con el Kit GeneRacer™ (Invitrogen). Brevemente, se extrajo ARN total de callos embriogénicos derivados de escutelo de arroz (130 mg) (derivado de acuerdo con el método anteriormente mencionado (1)) con el Mini Kit de Plantas RNeasy™ (QIAGEN). La síntesis de ADNc se realizó usando el Kit GeneRacer™ (Invitrogen) con una alícuota (3 µg) del ARN total extraído como molde. Se realizó PCR con este ADNc como molde en combinación con los cebadores (diseñados en SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10),

25

30

78687-R1:

5'- CAGCTCGGCCCATTTATTTCCATACATT -3' (SEC ID N°: 11)

y

35 Cebador GeneRacer 5' (contenido en el Kit GeneRacer™, Invitrogen):

5'- CGACTGGAGCAGGAGGACTGA -3' (SEC ID N°: 12).

La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl, usando TaKaRa Ex Taq™ (Takara, Japón). La amplificación se realizó usando el sistema de PCR GeneAmp™ 9700 (PE Applied Biosystems) preparado para llevar a cabo una etapa inicial a 94 °C durante 2 minutos, después para repetir las etapas a 94 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 3 minutos durante un total de 5 ciclos, a continuación las etapas a 94 °C durante 30 segundos y a 70 °C durante 3 minutos durante un total de 5 ciclos, y las etapas a 94 °C durante 30 segundos, a 68 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 3 minutos durante un total de 25 ciclos, y para llevar a cabo una etapa final a 72 °C durante 10 minutos. Se realizó PCR con una alícuota (1 µl) de la solución de reacción de PCR resultante como molde en combinación con los cebadores,

40

45

78687-R2:

5'- CTTCTTGTGTCCATGCCTCCTTGTAT -3' (SEC ID N°: 13)

y

50 Cebador Anidado de GeneRacer 5' (contenido en el Kit GeneRacer™, Invitrogen):

5'- GGACTGACATGGACTGAAGGAGTA -3' (SEC ID N°: 14)

La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl, usando TaKaRa Ex Taq™ (Takara, Japón). La amplificación se realizó usando el sistema de PCR GeneAmp™ 9700 (PE Applied Biosystems) preparado para llevar a cabo una etapa inicial a 94 °C durante 2 minutos, después para repetir las etapas a 94 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 3 minutos durante un total de 5 ciclos, a continuación las etapas a 94 °C durante 30 segundos y a 70 °C durante 3 minutos durante un total de 5 ciclos, y las etapas a 94 °C durante 30 segundos, a 68 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 3 minutos durante un total de 25 ciclos, y para llevar a cabo una etapa final a 72 °C durante 10 minutos. Después de finalizarse la reacción, la solución de reacción de PCR se sometió a purificación con el Kit de Purificación de PCR QIAquick™ (QIAGEN). El ADN amplificado se sometió a clonación TA en pCR4-TOPO™ (Invitrogen). El inserto de ADN resultante del plásmido se secuenció a un nivel de nucleótidos con

55

60

cebador T7:

5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3' (SEC ID N°: 7)

65

y

ES 2 531 479 T3

cebador T3:

5'- AATTAACCCTCACTAAAGGG -3' (SEC ID N°: 15).

5 La secuencia de nucleótidos del clon N° 26 se muestra en SEC ID N°: 16. SEC ID N°: 17 es la secuencia de nucleótidos del clon N° 27.

(4) Secuenciación de la secuencia 3' terminal de ADNc de 3Rmyb de arroz

10 Para obtener ADNc del gen de 3Rmyb de arroz de longitud completa incluyendo el fragmento de unión a ADN de 3Rmyb, que se ha aislado en el (1) anterior, se realizó la amplificación de extremos 3' para dicho ADNc. El extremo 3' se secuenció por 3' RACE con el Kit GeneRacer™ (Invitrogen). Brevemente, se extrajo ARN total de callos embriogénicos derivados de escutelo de arroz (130 mg) (derivado de acuerdo con el método anteriormente mencionado (1)) con el Mini Kit de Plantas RNeasy™ (QIAGEN). La síntesis de ADNc se realizó usando el Kit GeneRacer™ Kit (Invitrogen) con una alícuota (5 µg) del ARN total extraído como molde. Se realizó PCR con este ADNc como molde en combinación con cebadores (diseñado en SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10),

78687-F1:

5'- AGGAGGCATGGACACAAGAAGAGGAAAT -3' (SEC ID N°: 18)

y

20 Cebador 3' de GeneRacer (contenido en el Kit GeneRacer™, Invitrogen):

5'- GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG -3' (SEC ID N°: 19).

25 La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl, usando TaKaRa Ex Taq™ (Takara, Japón). La amplificación se realizó usando el sistema de PCR GeneAmp™ 9700 (PE Applied Biosystems) preparado para llevar a cabo una etapa inicial a 94 °C durante 2 minutos, después para repetir las etapas a 94 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 3 minutos durante un total de 5 ciclos, a continuación las etapas a 94 °C durante 30 segundos y a 70 °C durante 3 minutos durante un total de 5 ciclos, y las etapas a 94 °C durante 30 segundos, a 68 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 3 minutos durante un total de 25 ciclos, y para llevar a cabo una etapa final a 72 °C durante 10 minutos. Se realizó PCR con una alícuota (1 µl) de la solución de reacción de PCR resultante como molde en combinación con cebadores,

78687-F2:

5'- GGAAATAAATGGGCCGAGCTGACAAAAT -3' (SEC ID N°: 20)

y

35 Cebador Anidado 3' de GeneRacer (contenido en el Kit GeneRacer™, Invitrogen):

5'- CGCTACGTAACGGCATGACAGTC -3' (SEC ID N°: 21).

40 La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl, usando TaKaRa Ex Taq™ (Takara, Japón). La amplificación se realizó usando el sistema de PCR GeneAmp™ 9700 (PE Applied Biosystems) preparado para llevar a cabo una etapa inicial a 94 °C durante 2 minutos, después para repetir las etapas a 94 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 3 minutos durante un total de 5 ciclos, a continuación las etapas a 94 °C durante 30 segundos y a 30 °C durante 3 minutos durante un total de 5 ciclos, y las etapas a 94 °C durante 30 segundos, a 68 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 3 minutos durante un total de 25 ciclos, y para llevar a cabo una etapa final a 72 °C durante 10 minutos. Después de finalizarse la reacción, la solución de reacción de PCR se sometió a purificación con el Kit de Purificación de PCR QIAquick™ (QIAGEN). El ADN amplificado se sometió a clonación TA en pCR4-TOPO™ (Invitrogen). El inserto de ADN resultante del plásmido se secuenció a un nivel de nucleótidos con

cebador T7:

5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3' (SEC ID N°: 7)

50

y

cebador T3:

5'- AATTAACCCTCACTAAAGGG -3' (SEC ID N°: 15).

55 Como resultado, se determinó cada secuencia de nucleótidos de los extremos tanto 5' como 3' del fragmento de inserto de ADN. La secuencia de nucleótidos del lado 5' del clon N° 31 se muestra en SEC ID N° 22. SEC ID N°: 23 es la secuencia de nucleótidos del lado 3' del clon N° 23.

(5) Aislamiento de ADNc incluyendo el gen estructural de 3Rmyb de Arroz de Longitud Completa y Secuenciación de Nucleótidos

60

Se extrajo ARN total de callos embriogénicos derivados de escutelo de arroz (130 mg) (derivado de acuerdo con el método anteriormente mencionado (1)) con el Mini Kit de Plantas RNeasy™ (QIAGEN). La síntesis de ADNc se realizó usando el sistema de síntesis de primera cadena Superscript™ para RT-PCR (Invitrogen) con una alícuota (5 µg) del ARN total extraído como un molde.

65

ES 2 531 479 T3

Se realizó PCR con una alícuota (1 µg) del ADNc sintetizado (50 µl). Los cebadores usados en PCR fueron

OsA1-1F:
5'- TGTCTTCAGTCATGATGACAAGCGA -3' (SEC ID N°: 24),
y
OsA1-2R:
5'- CAAGCTATCTAAAACCTTTTCAGAAGATGG -3' (SEC ID N°: 25).

La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl, usando ADN Polimerasa de Inicio en caliente PfuTurbo™ (Stratagene), un tampón de reacción unido a la ADN Polimerasa de Inicio en Caliente PfuTurbo™, 200 µM de cada uno de dATP, dTTP, dCTP y dGTP y 1 µM de cada uno de OsA1-1F y OsA1-2R. La amplificación se realizó usando sistema de PCR GeneAmp™ 9700 (PE Applied Biosystems) preparado para llevar a cabo una etapa inicial a 95 °C durante 2 minutos, después para repetir las etapas a 95 °C durante 30 segundos, a 60 °C durante 30 segundos, y a 72 °C durante 4 minutos durante un total de 40 ciclos, y para llevar a cabo una etapa final a 72 °C durante 10 minutos. Después de finalizarse la reacción, la solución de reacción de PCR se sometió a purificación con el Kit de Purificación de PCR QIAquick™ (QIAGEN).

Cuando la solución de reacción de PCR se analizó en geles de agarosa, se verificó que el ADN amplificado era un único fragmento de aproximadamente 3 kpb. Por lo tanto, este fragmento de ADN se sometió a clonación TA en pCR4-TOPO™ (Invitrogen). El plásmido resultante pCR4-Os3RmybA1 con este inserto de ADN se secuenció con los siguientes cebadores:

cebador T7:
5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3' (SEC ID N°: 7),
cebador T3:
5'- AATTAACCCTCACTAAAGGG -3' (SEC ID N°: 15),
cebador 78687-F1:
5'- AGGAGGCATGGACACAAGAAGAGGAAAT -3' (SEC ID N°: 18),
cebador OsA1-4F:
5'- GATCAACACTTGCAAGAGGA -3' (SEC ID N°: 26),
cebador OsA1-3F:
5'- ACAGGGCCTTCTTTTCTGGAC -3' (SEC ID N°: 27),
cebador OsA1-5F:
5'- AGCATACCTGAATGTGGGGA -3' (SEC ID N°: 28),
cebador OsA1-6F:
5'- TACTCATGATGAAAGCACGG -3' (SEC ID N°: 29),
cebador OsA1-7F:
5'- ATCTCCTTCACATGGAAGTC -3' (SEC ID N°: 30).

La secuencia de nucleótidos resultante se muestra en SEC ID N°: 31.

Ejemplo 2

La secuencia de aminoácidos codificada por el ADN de SEC ID N°: 31 se muestra en SEC ID N°: 32. La secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 32 incluye tres repeticiones de dominio de unión a ADN de myb, y el gen para esta secuencia codificante se designa "Os3RmybA1". Cuando tanto la secuencia de aminoácidos de la proteína Os3RmybA1 como la secuencia de aminoácidos potencial (SEC ID N°: 49) supuesta a partir de los datos de información genómica registrados con el N° de REFERENCIA: BAB78687 en DDBJ (Banco de Datos de ADN de Japón) se alinean de forma óptima, se descubre aparentemente que las regiones N terminales son altamente análogas entre la secuencia de aminoácidos codificada por ADNc de Os3RmybA1 y la secuencia de aminoácidos de BAB78687 mientras que las regiones C terminales son diferentes entre sí. La región cadena abajo en o de la posición de aminoácidos 783 de BAB78687 difiere de Os3RmybA1, y BAB78687 es una proteína compuesta de 787 aminoácidos mientras que Os3RmybA1 está compuesta de 993 aminoácidos. Por lo tanto, se concibe que los sitios de corte y empalme de BAB78687 se habían asumido erróneamente cuando se determinó la región estructural de BAB78687 a partir de la secuencia genómica (Figuras 1 a 3).

Ejemplo 3

Propiedad activadora de la transcripción de Os3RmybA1

La función de Os3RmybA1 aislada se confirmó mediante una capacidad activadora de la transcripción ejercida por el gen de CYM que portaba la secuencia de MSA en la región promotora.

Brevemente, se cotransfectaron cloroplastos de la línea celular de tabaco BY2 con plásmidos optimizados para expresión conducida por el promotor de 35S de virus del mosaico de la coliflor (CaMV) de Os3RmybA1, y plásmidos que portaban el gen indicador en los que el promotor de CYM se fusiona con el gen de luciferasa. Se realizó un

ensayo de expresión transitoria controlando las actividades luciferasa para cuantificación de la propiedad activadora de la transcripción de Os3RmybA1.

(1) Construcción de plásmidos

5

Construcción de plásmidos de expresión

Construcción de pEXP-Os3RmybA1

10 Se insertó un fragmento de ADN (que contenía Os3RmybA1), cortado de pCR4-Os3RmybA1 por escisión con EcoRI, en una dirección con sentido en el sitio derivado por escisión con EcoRI de pEXP35S para crear pEXP-Os3RmybA1. Este pEXP-Os3RmybA1 es un plásmido optimizado para expresión conducida por promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) de ORF de Os3RmybA1 de longitud completa.

15 También pueden construirse plásmidos que son sustancialmente funcionalmente equivalentes a pEXP-Os3RmybA1 de la siguiente manera:

20 Un extremo protruyente de ADN, cortado de pBI221 (Clontech) por escisión con EcoRI y SacI, se hace de extremos romos con el fragmento de Klenow, y después se inserta en el sitio derivado por escisión con XhoI seguido de formación de extremos romos con el fragmento de Klenow en el extremo cortado con XhoI de pBluescript (SK-) para crear el plásmido pTN. Un fragmento de ADN, que se corta de pBI221 por escisión con PstI, y formación de extremos romos en el extremo protruyente resultante con el fragmento de Klenow seguido de escisión con XbaI, se inserta en el sitio, derivado por escisión de NotI, y formación de extremos romos con el fragmento de Klenow en el extremo protruyente seguido de escisión con XbaI de pTN, para crear el plásmido

25 pP35S. Es decir, el plásmido pP35S es un plásmido con sitios de restricción plurales entre el promotor de 35S de CaMV y el terminador de nopalina sintetasa (NOS). Se inserta un fragmento de ADN (que contiene Os3RmybA1), cortado de pCR4-Os3RmybA1 por escisión con EcoRI, en una dirección con sentido en el sitio derivado por escisión con EcoRI de pP35S para crear pP35S-Os3RmybA1. pP35S-Os3RmybA1 es un plásmido optimizado para expresión conducida por promotor de 35S de CaMV de la ORF de Os3RmybA1 de longitud

30 completa.

Construcción de plásmido pEXP-GUS

35 Se insertó un fragmento de ADN, producido por escisión con SacI, y formación de extremos romos en el extremo protruyente resultante con el fragmento de Klenow seguido de escisión con HindIII de pBI-121 (Clontech), en el sitio, derivado por escisión con EcoRI, y formación de extremos romos en el extremo protruyente resultante con el fragmento de Klenow seguido por escisión con HindIII de pEXP35S, para crear pEXP-GUS. pEXP-GUS es un plásmido optimizado para expresión conducida por promotor de 35S de CaMV de GUS. Los plásmidos aplicables que son sustancialmente funcionalmente equivalentes a pEXP-GUS incluyen pBI221 (Clontech).

40

Construcción de plásmido R-LUC

45 Se insertó un fragmento de ADN producido por la escisión con BamHI y NheI del Vector nulo para plásmido pRL (Promega) en el sitio producido por la escisión con XbaI y BamHI de pBI-221 (Clontech). El plásmido resultante se escindió con XbaI y SacI, sus extremos se hicieron romos con el fragmento de Klenow en el extremo protruyente resultante, seguido de retirada de fragmentos de ADN. El producto resultante se sometió a autoligamiento para crear el plásmido R-LUC. El plásmido R-LUC es un plásmido optimizado para expresión conducida por promotor de 35S de CaMV de luciferasa derivada de *Renilla* (R-LUC).

Construcción del plásmido del promotor CYM-LUC

50 Se insertó un fragmento de ADN producido por la escisión con HindIII y SacI del plásmido pDO432 (Nishiuchi *et al.*, Plant Mol. Biol., 29: 599 (1995)) en el sitio derivado por escisión con HindIII y SacI seguido de retirada de fragmentos de ADN (que contienen la región promotora de 35S de CaMV de pBI221 (Clontech) para crear pUC-LUC. Se amplificaron regiones promotoras de CYM por PCR usando ADN genómico (preparado de *Catharanthus roseus* de acuerdo con técnicas convencionales) como molde. Los cebadores usados en PCR son

60 CYM3:
5'- CCGGATCCTTCAATAGAATTTCTTCCA -3' (SEC ID N°: 56)
y
CYM5-1:
5'- CCAAGCTTACCCATAAATTGTTGGTAAA -3' (SEC ID N°: 57).

65 La región promotora de CYM amplificada se escindió con BamHI y HindIII, y se insertó en el sitio derivado por escisión con BamHI y HindIII de pUC-LUC para crear el plásmido de promotor de CYM-LUC. Es decir, el plásmido de promotor de CYM es un plásmido optimizado para expresión de luciferasa (LUC), conducida por el promotor de

CYM que incluye la secuencia MSA como secuencia de control en tres posiciones.

(2) Preparación de protoplastos de BY-2, transferencia génica con plásmidos y ensayo de actividad LUC

- 5 Se prepararon protoplastos a partir de la línea celular de tabaco cultivada BY2 (3 días de edad; de pase de cultivo en medio líquido LSD nuevo (100 ml, Nagata *et al.* (1981), Mol. Gen. Genet. 184: 161)) de acuerdo con el método de Evans *et al.* (Evans *et al.* (1983), Int. Rev. Cytol. 33: 53).

10 Brevemente, se recogieron células BY2 de medio líquido LSD por centrifugación a 2.000 rpm a temperatura ambiente, después se mezcló con 100 ml de medio N2 (Celulasa 1 % "ONOZUKA" RS (Yakult Honsha Co., Ltd., Japón), Hemicelulasa al 0,5 % (SIGMA), Pectoliasa Y-23 0,1 % (Kikkoman Co., Japón), CaCl₂·2H₂O 7,4 g/l, acetato sódico 1,6 g/l, Manitol 45 g/l, pH 5,7) y se sometieron a cultivo suavemente rotatorio a 27 °C en oscuridad para digerir las paredes celulares. Tres horas después, las células se recogieron por centrifugación a 500 rpm a temperatura ambiente. Las células recogidas se mezclaron con 50 ml de medio N3 (CaCl₂ · 2H₂O 7,4 g/l, acetato sódico 1,6 g/l, Manitol 45 g/l, pH 5,7) y se lavaron. Las células se recogieron por centrifugación a 500 rpm a temperatura ambiente, y se suspendieron en 40 ml de medio N4 (Medio Salino Vegetal de Murashige y Skoog 4,6 g/l (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Japón), casaminoácidos 100 mg/l, mioinositol 100 mg/l, L-prolina 2,8 g/l, MES 97,6 mg/l, Tiamina-HCl 1 mg/l, KH₂PO₄ 357 mg/l, Sacarosa 102,6 g/l, pH 5,7). La suspensión celular se centrifugó a 700 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos para separar protoplastos de la capa superior del medio. Se realizó transfección de ADN plasmídico en los protoplastos por transferencia génica directa mediada por PEG (Bilang *et al.* (1994), En Plant Molecular Biology Manual, pp. A1, 1-16).

25 Brevemente, los protoplastos resultantes se lavaron con 40 ml de W5 (NaCl 154 mM, CaCl₂ 124 mM, KCl 5 mM, glucosa 5 mM, pH 5,8), se sometieron a centrifugación a 500 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente para separar protoplastos. Esta etapa de lavado se repitió 3 veces. Después de lavar, la suspensión de protoplastos se ajustó con MMM (MgCl₂ 15 mM, MES 0,1 %, Manitol 0,5 M, pH 5,8) a la concentración celular de 2×10^5 células/ml. Se distribuyó una alícuota (250 µl) de la suspensión de protoplastos en MMM a cada uno de los tubos de ensayo, y se mezcló con 20 µl de la solución de ADN plasmídico. Después de agitación suave, se añadió una solución de PEG (se añadieron 250 µl de PEG4000 a una solución de manitol 0,4 M-Ca(NO₃)₂ 0,1 M para formar una solución de PEG al 40 % p/v, que se ajustó a pH 8 y después se esterilizó por autoclave) a la suspensión de protoplastos tratados con ADN plasmídico, y después se agitó suavemente. Finalmente, se añadieron 5 ml de medio LSD complementado con manitol 0,4 M a la suspensión de protoplastos, y se incubó durante 20 horas en oscuridad. Después de cultivar, las células se recogieron por centrifugación a 500 rpm durante 3 minutos, y se sometieron a ensayos de actividad LUC y R-LUC. El sustrato usado en estos ensayos es el sistema de ensayo indicador de luciferasa doble (Promega). Se realizó control con el luminómetro LB955 (BERTHOLD)

(3) Activación del promotor CYM por Os3RmybA1

40 Se realizó una cotransfección con el plásmido de R-LUC para la expresión conducida por el promotor de 35S de CaMV de luciferasa de *Renilla* para proporcionar un control interno para la eficacia de transfección entre muestras con transferencia de genes. Cada actividad LUC se calibró con la actividad luciferasa de *Renilla* de control. Los plásmidos usados en el presente documento son pEXP-Os3RmybA1 para la expresión conducida por el promotor de 35S de CaMV de Os3RmybA1 de longitud completa, pEXP-GUS para la expresión conducida por el promotor de 35S de CaMV de GUS, el plásmido de promotor de CYM-LUC anteriormente mencionado y el plásmido de R-LUC. La transfección se realizó por quintuplicado. Las combinaciones plasmídicas fueron las siguientes:

- (i) Combinación sin plásmidos efectores:
plásmido de promotor de CYM-LUC (10 µg/1 muestra) + plásmido pEXP-GUS (10 µg/1 muestra) + plásmido R-LUC (muestra de 1 J,L g/l)
- 50 (ii) Combinación con pEXP-Os3RmybA1 como un plásmido efector:
plásmido promotor de CYM-LUC (10 µg/1 muestra) + plásmido pEXP-Os3RmybA1 (10 µg/1 muestra) + plásmido R-LUC (1 µg/1 muestra)
- (iii) Combinación con pEXP-NtmybA2 como un plásmido efector:
plásmido promotor de CYM-LUC (10 µg/1 muestra) + plásmido pEXP-NtmybA2 (10 µg/1 muestra) + plásmido R-LUC (1 µg/1 muestra).

60 Cuando la actividad enzimática específica de LUC se toma como "1" en caso de transfección con la combinación (i) (los niveles de actividad luciferasa se normalizan de acuerdo con niveles de actividad luciferasa de *Renilla*), la actividad específica de LUC en la combinación (ii) aumenta aproximadamente 2,5 veces más. De forma similar, la actividad específica de LUC en la combinación (iii) también aumenta aproximadamente 2,5 veces más (Figura 4). Se ha desvelado que Os3RmybA1 activa la transcripción del promotor de CYM. Sorprendentemente, aunque Os3RmybA1 es ADNc clonado de arroz, ejerce una capacidad de activación de la transcripción en células de tabaco en la medida de NtmybA2 de tabaco. El hecho de que Os3RmybA1, aislado de arroz, actúa en células de tabaco de forma equivalente a NtmybA2 de tabaco indica claramente que los mecanismos de control para la expresión génica específica de fase G2/M son conservativos entre plantas Dicotiledóneas y Monocotiledóneas.

65

Ejemplo 4

Asilamiento de ADN que codifica cada uno de NtmybA1, NtmybA2 y NtmybB

5 La secuencia de nucleótidos de ADN que codifica NtmybA1 como se usa en el presente documento, se muestra en SEC ID N°: 50, y la secuencia de aminoácidos de NtmybA1 en SEC ID N°: 51. La secuencia de nucleótidos de ADN que codifica NtmybA2 también se muestra en SEC ID N°: 52, y la secuencia de aminoácidos de NtmybA2 en SEC ID N°: 53. Además, la secuencia de nucleótidos de ADN que codifica NtmybB como se usa en el presente documento, se muestra en SEC ID N°: 54, y la secuencia de aminoácidos de NtmybB en SEC ID N°: 55.

10 Se aisló cada ADN que codificaba NtmybA1, NtmybA2 y NtmybB con un sistema de un híbrido de Levadura (Clontech) (Ito *et al.*, Plant Cell, 13:1891(2001)). Se insertó ADNc vegetal, preparado de células BY2 de 2 días cultivadas en el plásmido pGAD10 para construir bibliotecas de ADNc. Se creó la cepa de levadura deficiente en HIS, promotor de NACK1, se fusionó funcionalmente con el gen responsable de la biosíntesis de histidina (HIS3), y se transfirió con las bibliotecas de ADNc anteriormente mencionadas. Las células de levadura transformadas se sometieron a selección con medio sin histidina, y se recuperaron tres clones (plásmidos, OH53, OH60 y OH88) de colonias cultivadas. Se secuenció cada secuencia de nucleótidos de insertos de ADNc en los tres plásmidos (OH53, OH60 y OH88) y se obtuvieron los ADN que codificaban NtmybA1, NtmybA2 y NtmybB. Un inserto en el plásmido OH53 es un fragmento de ADN que codifica NtmybA1. Un inserto de ADN en el plásmido OH60 es un ADN que codifica NtmybA2 de longitud completa. Un ADN que codifica NtmybB está contenido en el plásmido OH88 como un inserto. Ya que OH53 no incluyó la región codificante de longitud completa, se realizó la determinación de extremos 3' por 3' RACE. Como resultado, se obtuvo el plásmido pGEMe-OH53i6 que tiene un inserto de ADNc de NtmybA1 de longitud completa.

25 Puede ser simplemente conveniente aislar estos ADN por PCR o técnicas de hibridación. Cuando se aplica hibridación, puede prepararse ADNc a partir de células BY2 durante crecimiento exponencial, y después clonarse en plásmido o fagos para construir bibliotecas que se someterán convenientemente a etapas de exploración. Pueden producirse sondas aplicables sobre información acerca del ADN de SEC ID N°: 50 para NtmybA1, el ADN de SEC ID N°: 52 para NtmybA2 y el ADN de SEC ID N°: 54 para NtmybB.

30 Cuando se lleva a cabo el aislamiento por PCR, puede usarse como un molde ADNc preparado a partir de células BY2 durante el crecimiento exponencial. Pueden diseñarse cebadores sobre información acerca del ADN de SEC ID N°: 50 para NtmybA1, el ADN de SEC ID N°: 52 para NtmybA2 y el ADN de SEC ID N°: 54 para NtmybB. En Ejemplos después de en los que la construcción de plásmidos se desvela en el presente documento, NtmybA2 y NtmybB pueden cortarse de OH60, OH88 y otros, y pueden obtenerse convenientemente fragmentos de ADN que codifican NtmybA2 y NtmybB usando cebadores de PCR con una incorporación de sitios de restricción adecuada.

Ejemplo 5

40 Construcción de plásmidos, pEXP-NtmybA2 y pEXP-NtmybB

45 Se construyeron plásmidos, pEXP-NtmybA2 y pEXP-NtmybB, para expresión conducida por el promotor de 35S de CaMV de NtmybA2 y NtmybB, respectivamente. Brevemente, se insertaron fragmentos de ADN, cortados por digestión con Sall de OH60 y OH88, en una dirección con sentido en el sitio derivado por digestión con Sall de pEXP35S para construir plásmidos, pEXP-NtmybA2 y pEXP-NtmybB para la expresión conducida por promotor de 35S de CaMV de NtmybA2 y NtmybB, respectivamente.

50 Pueden construirse plásmidos que son sustancialmente funcionalmente equivalentes a estos plásmidos de la siguiente manera:

55 Se inserta un fragmento de ADN, cortado por escisión con Sall de OH60 u OH88, en el sitio derivado por escisión con Sall del plásmido pP35S para crear pP35S-NtmybA2, o pP35S-NtmybB. Es decir, pP35S-NtmybA2 y pP35S-NtmybB son plásmidos para la expresión conducida por promotor de 35S de CaMV de NtmybA2 y NtmybB, respectivamente.

Ejemplo 6

60 La región funcional de NtmybA2 modula su capacidad activadora de la transcripción

65 NtmybA2 es una activación de la transcripción para el gen de NACK1 y el gen de CYM. Sin embargo, se desconocía que era una región funcional implicada en la capacidad activadora de la transcripción de la proteína NtmybA2. Para realizar una búsqueda con respecto a esta región funcional, se construyó una serie de versiones mutantes truncadas en el extremo C terminal de NtmybA2. Se ensayó la capacidad de activación de la transcripción del gen de NACK1 para estos mutantes y se determinó la región funcional de NtmybA2 que modula la capacidad activadora de la transcripción.

(1) Construcción de plásmidos

Construcción de plásmidos respectivos para cada mutante truncado en el extremo C terminal de la proteína de NtmybA2

5 Para examinar la región de NtmybA2 que actúa en activación de la transcripción génica, se crearon las siguientes proteínas NtmybA2 mutantes con delección C terminal en las que la secuencia de aminoácidos de NtmybA2 estaba truncada en el extremo C terminal:

- 10 (i) pEXP-NtmybA2T1 (que carece de una región del aminoácido 705 al extremo C terminal)
 (ii) pEXP-NtmybA2T2 (que carece de una región del aminoácido 631 al extremo C terminal)
 (iii) pEXP-NtmybA2T3 (que carece de una región del aminoácido 569 al extremo C terminal)
 (iv) pEXP-NtmybA2ΔEcoRI (que carece de una región del aminoácido 413 al extremo C terminal)
 (v) pEXP-NtmybA2T4 (que carece de una región del aminoácido 243 al extremo C terminal)
 15 (vi) pEXP-NtmybA2T5 (que carece de una región del aminoácido 188 al extremo C terminal)
 Para los plásmidos (i), (ii), (iii), (v) y (vi), cada fragmento de ADN de delección se produjo por PCR usando pEXP-NtmybA2 como molde. Los cebadores usados en la PCR son los siguientes:

- 20 cebador 35S0:
 5'- TATCCTTCGCAAGACCCTTC -3' (SEC ID N°: 48)
 en combinación con,
 para (i), cebador A2-T1-TAG:
 5'- CCGTCGACTATGCAGCCTCGTCAAACATAA -3' (SEC ID N°: 43), para (ii),
 cebador A2-T2-TAG:
 25 5'- CCGTCGACTACCACAGCCTAAATGGAGTA -3' (SEC ID N°: 44), para (iii),
 cebador A2-T3-TAG:
 5'- CCGTCGACTATATGCTCGAATTTTCGTTCCAC -3' (SEC ID N°: 45), para (v),
 cebador A2-T4-TAG:
 5'- CCGTCGACTAGCATTCTGAAGCTTCCTCC -3' (SEC ID N°: 46), y,
 30 para (vi), cebador A2-T5-TAG:
 5'- CCGTCGACTACTTTTTGACGGAAGTATTCC -3' (SEC ID N°: 47).

35 Se digirieron fragmentos de ADN amplificados por PCR que codificaban mutantes de NtmybA2 de delección C terminal respectivos con Sall, y después se insertaron en una dirección con sentido en el sitio derivado por digestión con Sall de pEXP35S para crear los plásmidos, (i), (ii), (iii), (v) y (vi), respectivamente.
 El plásmido (iv) se generó escindiendo pEXP-NtmybA2 con EcoRI, seguido de autoligamiento después de retirar el ADN cortado resultante. Además, pueden construirse plásmidos que son sustancialmente funcionalmente equivalentes a cualquiera de los plásmidos (i) a (vi) de la siguiente manera:

- 40 (vii) pP35S-NtmybA2T1 (que carece de una región del aminoácido 705 al extremo C terminal)
 (viii) pP35S-NtmybA2T2 (que carece de una región del aminoácido 631 al extremo C terminal)
 (ix) pP35S-NtmybA2T3 (que carece de una región del aminoácido 569 al extremo C terminal)
 (x) pP35S-NtmybA2ΔEcoRI (que carece de una región del aminoácido 413 al extremo C terminal)
 (xi) pP35S-NtmybA2T4 (que carece de una región del aminoácido 243 al extremo C terminal)
 45 (xii) pP35S-NtmybA2T5 (que carece de una región del aminoácido 188 al extremo C terminal)

Para los plásmidos, (vii), (viii), (ix), (xi) y (xii), se amplifican fragmentos de ADN de delección por PCR usando pP35S-NtmybA2 como molde. Los cebadores usados en la PCR son:

- 50 cebador 35S0:
 5'- TATCCTTCGCAAGACCCTTC -3' (SEC ID N°: 48),
 en combinación con
 para (vii), cebador A2-T1-TAG:
 5'- CCGTCGACTATGCAGCCTCGTCAAACATAA -3' (SEC ID N°: 43), para (viii),
 cebador A2-T2-TAG:
 55 5'- CCGTCGACTACCACAGCCTAAATGGAGTA -3' (SEC ID N°: 44),
 para (ix), cebador A2-T3-TAG:
 5'- CCGTCGACTATATGCTCGAATTTTCGTTCCAC -3' (SEC ID N°: 45),
 para (xi), cebador A2-T4-TAG:
 5'- CCGTCGACTAGCATTCTGAAGCTTCCTCC -3' (SEC ID N°: 46), y
 60 para (xii), cebador A2-T5-TAG:
 5'- CCGTCGACTACTTTTTGACGGAAGTATTCC -3' (SEC ID N°: 47).

65 Se digirieron fragmentos de ADN amplificados por PCR que codifican mutantes de NtmybA2 con delección C terminal respectivos con Sall, y después se insertaron en una dirección con sentido en el sitio derivado por digestión con Sall de pP35S para crear los plásmidos (vii), (viii), (ix), (xi) y (xii), respectivamente.

El plásmido (x) se genera escindiendo parcialmente pP35S-NtmybA2 con EcoRI, seguido de autoligamiento después de hacer romo el extremo protruyente con el fragmento de Klenow.

Construcción de plásmido para promotor de NACK1-LUC

Se insertó un fragmento de ADN derivado por escisión con HindIII y SacI del plásmido pDO432 (Nishiuchi *et al.*, Plant Mol. Biol., 29: 599(1995)) en el sitio, derivado por digestión con HindIII-SacI de pBI221 (Clontech) seguido de retirada de fragmentos de ADN incluyendo la región del promotor de 35S CaMV, para crear pUC-LUC. La región del promotor de NACK1 se amplificó por PCR usando ADN genómico, preparado a partir de células BY2 de tabaco cultivadas de acuerdo con una técnica convencional) como un molde.

Los cebadores usados en la PCR son:

NAK1P-3:

5'- CCGGATCCTCTAGATTTGCGCCTGAGATCTGAG -3' (SEC ID N°: 58),

y

NAK1P-5:

5'- CCAAGCTTCATAAGCCGATAGAATTCACC -3' (SEC ID N°: 59).

La región promotora de NACK1 amplificada se digirió con BamHI y HindIII, y después se insertó en el sitio, derivado por escisión con BamHI y HindIII de pUC-LUC, para crear el plásmido de promotor de NACK1-LUC. Es decir, el plásmido de promotor de NACK1-LUC es un plásmido para la expresión de LUC, conducida por el promotor de NACK1 incluyendo como secuencias de control los motivos de MSA en dos posiciones.

(2) Cambio en la propiedad activadora de la transcripción de proteínas mutantes de NtmybA2 con delección C terminal

Se realizó transfección de los plásmidos en protoplastos BY-2 de acuerdo con el método del Ejemplo 3 (2). Los plásmidos efectores usados en el presente documento fueron los plásmidos anteriormente mencionados, (1) (i) a (vi), para expresión de los mutantes de delección de NtmybA2, pEXP-NtmybA2 para expresión de NtmybA2 de longitud completa, y pEXP-GUS para expresión de GUS. El indicador usado en el presente documento fue el plásmido, promotor de NACK1-LUC. La activación de transcripción del gen indicador se evaluó midiendo los niveles de actividad LUC. Se ensayaron las actividades de LUC y R-LUC de la misma manera que en el Ejemplo 3. Cada actividad específica de LUC se expresa en relación con el valor normalizado de la actividad LUC según el nivel de actividad R-LUC.

Cuando la actividad específica de LUC se tomó como "1" en el caso del plásmido efector pEXP-GUS, se observó que la actividad específica de LUC de pEXP-NtmybA2 era aproximadamente 4 veces mayor. Cuando se usaron los plásmidos (i) a (iii), se observó que la actividad específica de LUC aumentaba en relación con el caso de pEXP-NtmybA2; en particular, fue aproximadamente 45 veces mayor en el caso del plásmido (ii). En el caso de la transfección con el plásmido (iv), la actividad específica de LUC se redujo en la medida del nivel de pEXP-NtmybA2, en comparación con el caso (iii). Para (v) y (vi), la actividad LUC se redujo más que el pEXP-NtmybA2.

A partir de los resultados anteriores, resulta evidente que la región de NtmybA2 C terminal que abarca del aminoácido 631 al extremo C es la región que regula negativamente la propiedad activadora de la transcripción poseída por la proteína NtmybA2. Resulta obvio que la secuencia de aminoácidos que abarca de los restos 413 a 630 actuará como una región potenciadora de la activación de la transcripción. Se ha demostrado que la delección de aminoácidos de restos que abarcan del aminoácido 569 al extremo C terminal, particularmente del aminoácido 631 al extremo C terminal, permite un aumento notable de la capacidad de NtmybA2 para activar la transcripción mientras que la delección de aminoácidos de restos que varían del aminoácido 188 al extremo C o del aminoácido 243 al extremo C, permite una reducción de la capacidad de NtmybA2 para activar la transcripción (Figura 5).

Ejemplo 7

Acciones negativas dominantes de NtmybA2T5 en NtmybA2 o NtmybB

En el Ejemplo 6, los niveles de capacidad para activar la transcripción se redujeron en casos de NtmybA2T4 para uso de un polipéptido con restos que abarcan de los aminoácidos 1 a 242 de la proteína NtmybA2 y NtmybA2T5 para uso de un polipéptido con restos que abarcan de los aminoácidos 1 a 187 de la proteína NtmybA2 más que en el caso de NtmybA2 de longitud completa.

Estos hechos indican que NtmybA2T4 y NtmybA2T5 en los que cada capacidad para activar la transcripción se reduce o se pierde se unen con la secuencia de MSA de promotores diana, inhibiendo de este modo la unión de NtmybA1, NtmybA2 y NtmybB endógenos con la secuencia de MSA de modo que NtmybA2T4 y NtmybA2T5 actúan de forma negativa dominante. Para demostrar la función negativa dominante de NtmybA2T5, se cuantificó la activación de la transcripción conducida por el promotor de CYM en casos de coexpresión de NtmybA2 en

combinación con NtmybA2T5, y coexpresión de NtmybB en combinación con NtmybA2T5.

Se transformaron protoplastos BY-2 preparados de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3 (2) con un conjunto de plásmidos, promotor de NACK1:LUC (10 µg/muestra), R-LUC (1 µg/muestra), pEXP-NtmybA2 (10 µg/muestra) y pEXP-NtmybA2T5 (10 µg/muestra), u otro conjunto de plásmidos, promotor de NACK1:LUC (10 µg/muestra), R-LUC (1 µg/muestra), pEXP-NtmybA2 (10 µg/muestra) y pEXP-GUS (10 µg/muestra). Las células BY2 transformadas resultantes se ensayaron con respecto a actividad LUC y actividad R-LUC de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3 (4). La transfección con plásmidos se realizó por quintuplicado. El nivel de actividad específica de LUC (que se expresa en relación con el nivel de actividad LUC normalizada de acuerdo con el nivel de actividad R-LUC) se redujo en la combinación de pEXP-NtmybA2 + pEXP-NtmybA2T5 más que en la combinación de pEXP-NtmybA2 + pEXP-GUS.

Estos resultados apoyan que NtmybA2T5 actúa en NtmybA2 de forma negativa dominante.

Además, se añadieron a protoplastos BY-2 el plásmido de promotor de NACK1:LUC (10 µg/muestra), R-LUC (1 µg/muestra), seguido de una transferencia génica con pEXP-NtmybB (10 µg/muestra) + pEXP-NtmybA2T5 (10 µg/muestra), o pEXP-NtmybB (10 µg/muestra) + pEXP-GUS (10 µg/muestra). Las células BY2 transformadas resultantes se ensayaron con respecto a actividad LUC y actividad R-LUC de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3 (4). El nivel de actividad específica de LUC (que se expresa en relación con el nivel de actividad LUC normalizada de acuerdo con el nivel de actividad R-LUC) aumentó en la combinación de pEXP-NtmybB + pEXP-NtmybA2T5 más que en la combinación de pEXP-NtmybB + pEXP-GUS. Estos resultados apoyan que NtmybA2T5 actúa en NtmybB de forma negativa dominante (Figura 6).

Ejemplo 8

Modificación del crecimiento y desarrollo vegetal en *Arabidopsis thaliana* transformada con NtmybA2-, NtmybA2T2-, y NtmybB

Se generaron plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas que expresaban de forma estable la forma activadora de la transcripción de NtmybA2, NtmybA2T2 que es una construcción mutante con capacidad de NtmybA2 notablemente potenciada para activar la transcripción, y represor de la transcripción de NtmybB, por una acción del promotor de 35S de CaMV, y en comparación con su crecimiento y desarrollo, respectivamente.

(1) Construcción de plásmidos para transformación

Se insertó un fragmento de ADN, derivado por escisión con KpnI de pEXP-NtmybA2T2, formando después extremos romos con el fragmento de Klenow seguido de escisión con XhoI, en el sitio, derivado por digestión con Sall y SmaI de pBI-RHL como se desvela en el documento PCT/JP02/12268 (2002), para crear pBIHm-NtmybA2T2. En el sitio, derivado por escisión con Sall de pBIHm-NtmybA2T2, seguido de la retirada de un fragmento de ADN cortado que incluye NtmybA2T2, se insertaron fragmentos de ADN, derivados por escisión con Sall de pEXP-NtmybB y pEXP-NtmybA2, para crear pBIHm-NtmybB y pBIHm-NtmybA2, respectivamente. Se insertó un fragmento de ADN que contenía sGFP, derivado por escisión con NotI del plásmido pTH2 (Chiu *et al.*, Curr Biol 1 Mar 1996; 6(3): 325-30), y corte de extremos romos con el fragmento de Klenow seguido de escisión con Sall, en el sitio, derivado por digestión con Sall-SmaI de pBIHm-NtmybA2T2 seguido de retirada de un fragmento de ADN incluyendo NtmybA2T2 para crear pBIHm-GFP.

Es decir, los anteriormente mencionados (i) pBIHm-NtmybA2T2, (ii) pBIHm-NtmybB, (iii) pBIHm-NtmybA2 y (iv) pBIHm-GFP son vectores binarios para expresión conducida por el promotor de 35S de CaMV de los respectivos NtmybA2T2, NtmybB, NtmybA2 y sGFP, respectivamente, que pueden transformar plantas de acuerdo con técnicas de transformación mediada por *Agrobacterium*. Estos plásmidos pueden transferirse genéticamente a plantas que pueden someterse a selección con higromicina para obtener plantas transformantes. Pueden construirse plásmidos que son sustancialmente equivalentes a cualquiera de los plásmidos (i) a (iv) de la siguiente manera:

Un fragmento de ADN, derivado por escisión con SacI-ApaI de pP35S-NtmybA2T2 seguido de formación de extremos romos con el fragmento de Klenow en el extremo protruyente resultante, se inserta en el sitio, derivado por escisión con Sall de pBI-RHL como se desvela en el documento PCT/JP02/12268 (2002), seguido de formación de extremos romos del extremo protruyente resultante con el fragmento de Klenow, para crear pBIHm35S-NtmybA2T2. Se insertan fragmentos de ADN, derivados por escisión con Sall de pP35S-NtmybB y pP35S-NtmybA2, en el sitio, derivado por escisión con Sall de pBIHm35S-NtmybA2T2 seguido de retirada del fragmento de ADN cortado resultante que incluye NtmybA2T2, para crear pBIHm35S-NtmybB y pBIHm35S-NtmybA2, respectivamente. Se inserta un fragmento de ADN que contiene sGFP, derivado por escisión con NotI-Sall del plásmido pTH2 (Chiu *et al.*, Curr Biol 1 Mar 1996; 6(3): 325-30) y formación de extremos romos del extremo protruyente resultante con el fragmento de Klenow, en el sitio derivado por escisión con Sall de pBIHm35S-NtmybA2T2, formación de extremos romos con el fragmento de Klenow en el extremo protruyente seguido de retirada del fragmento de ADN resultante que incluye NtmybA2T2, para crear pBIHm35S-GFP.

Es decir, los anteriormente mencionados (v) pBIHm35S-NtmybA2T2, (vi) pBIHm35S-NtmybB, (vii) pBIHm35S-NtmybA2 y (viii) pBIHm35S-GFP son vectores plasmídicos para expresión conducida por promotor de 35S de CaMV de NtmybA2T2, NtmybB, NtmybA2 y sGFP, respectivamente. Hay vectores binarios que permiten la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Estos plásmidos pueden transferirse genéticamente a plantas que pueden someterse a selección con higromicina para obtener transformantes vegetales.

(2) Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Se transformó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 con un vector binario seleccionado de los plásmidos (1) (i) a (iv) como se ha creado en el (1) anteriormente mencionado. A continuación, se transformó, *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-O por el método de inmersión floral para transformación mediada por *Agrobacterium* (Clough *et al.* (1998), Plant J. 16: 735) usando *Agrobacterium* que alberga el plásmido anteriormente mencionado. Se esterilizaron semillas recogidas de capullos florales infectados por *Agrobacterium* con ácido hipocloroso y agua estéril, y se sembraron en medio MS complementado con higromicina 25 µg/ml y carbenicilina 100 µg/ml. Se seleccionaron plantas transgénicas capaces de crecer en medio con higromicina añadida.

(3) Modificación del crecimiento y desarrollo vegetal en *Arabidopsis thaliana* transformada por NtmybA2, NtmybA2T2 y NtmybB.

Se trasplantaron transformante vegetales seleccionados en medio MS (sales inorgánicas MS, sacarosa al 30 % y goma Gellan al 0,4 %) solidificado en una placa de Petri (recipiente rectangular Nº 2, Eiken Chemical Co., Ltd., Japón), se permitió que se mantuvieran verticalmente, y se cultivaron a 21 °C durante 16 horas con luz continua, y después en oscuridad durante 8 horas. A los 25 días después del trasplante, se midió la longitud de las raíces primarias. Las plántulas más predominantes fueron líneas transformantes con la longitud de raíz primaria de 31 mm a 35 mm en el grupo de control (transformación con pBIHm-GFP), mientras que las plántulas distribuidas de forma más predominante fueron las líneas transformantes con la longitud de raíz primaria de 21 mm a 25 mm en los casos de transformación con pBIHm-NtmybA2, pBIHm-NtmybA2T2, y pBIHm-NtmybB. Por lo tanto, las plantas con crecimiento y desarrollo reprimidos se produjeron con éxito.

A partir de los resultados anteriores, resulta evidente que las plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas que expresan de forma estable NtmybA2, NtmybB, o NtmybA2T2 tienen propiedades de crecimiento y desarrollo modificadas.

Ejemplo 9

Modificación del crecimiento y desarrollo vegetal en *Arabidopsis thaliana* transformada por NtmybA2T2 y NtmybA2T5

Se generaron plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas que expresan de forma estable la forma negativa dominante de NtmybA2T5, mediante una acción del promotor de 35S de CaMV, y en comparación con su crecimiento y desarrollo. Se generaron plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas que expresan construcciones mutantes de NtmybA2T2 con capacidad de NtmybA2 notablemente potenciada para activar la transcripción, por una acción del promotor de ciclina B (CYM), y en comparación con su crecimiento y desarrollo.

(1) Construcción de plásmidos para transformación

Construcción de plásmidos pDBIHm-NtmybA2T5

Se insertó un fragmento de ADN para la Fase de Lectura A, proporcionado comercialmente por Invitrogen, en el sitio por escisión con SmaI de pUC19 (Takara, Japón) para crear pUC-RFA. Se insertó una Fase de Lectura A, cortada por digestión con BamHI-SpeI de pUC-RFA, en el sitio, derivado por digestión con BamHI-SpeI del plásmido pBI-RHL como se desvela en el documento PCT/JP02/12268 (2002), para crear pDESTBI-1.

Se insertó un fragmento de ADN, cortado por escisión con KpnI-XhoI del plásmido pEXP-NtmybA2T5, en el sitio derivado por escisión con KpnI-XhoI del plásmido pENTR2B (Invitrogen) para crear pENTR-NtmybA2T5. Se sometió una mezcla de pDESTBI-1 y pENTR-NtmybA2T5 a recombinación específica de sitio usando mezcla Gateway™ LR Clonase™ (Invitrogen) para construir pDBIHm-NtmybA2T5. La reacción con la mezcla Gateway™ LR Clonase™ se realizó de acuerdo con protocolos incluidos en el reactivo. El vector, pDBIHm-NtmybA2T5, es un vector plasmídico para expresión conducida por el promotor de 35S de CaMV de NtmybA2T5. También es un vector binario que permite la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Este plásmido puede transferirse genéticamente a plantas que pueden someterse a selección con higromicina para obtener transformantes vegetales.

También pueden construirse plásmidos que son sustancialmente funcionalmente equivalentes a pDBIHm-NtmybA2T5 de la siguiente manera:

El plásmido, pP35S-NtmybA2T5, se digiere con SacI y Apal seguido de formación de extremos romos del extremo protruyente con el fragmento de Klenow. El fragmento de ADN cortado resultante se inserta en el sitio, derivado por escisión con KpnI-XhoI de pENTR2B (Invitrogen), seguido de formación de extremos romos con el fragmento de Klenow en el extremo protruyente resultante, para crear pENTR35S-NtmybA2T5. Se somete una mezcla de pDESTBI-1 y pENTR35S-NtmybA2T5 a recombinación específica de sitio usando mezcla Gateway™ LR Clonase™ (Invitrogen) para construir pDBIHm35S-NtmybA2T5. La reacción con la mezcla Gateway™ LR Clonase™ se realiza de acuerdo con protocolos incluidos en el reactivo. El vector, pDBIHm35S-NtmybA2T5, es un vector plasmídico para expresión conducida por el promotor de 35S de CaMV de NtmybA2T5. También es un vector binario que permite la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Este plásmido puede transferirse genéticamente a plantas que pueden someterse a selección con higromicina para obtener transformantes vegetales.

Construcción del plásmido pPCYM-NtmybA2T2

Se preparó una región promotora de CYM por PCR usando como molde un ADN genómico preparado de *Catharanthus roseus* de acuerdo con técnicas convencionales.

Los cebadores usados en la PCR fueron

CYM3Pst:
5'- AACTGCAGTCTTCAATAGAATTTCTTCCAG -3' (SEC ID N°: 60)
y
CYM5-1:
5'- CCAAGCTTACCCATAAATTGTTGGTAAA -3' (SEC ID N°: 57).

La región promotor de CYM amplificada se digirió con PstI y HindIII, y después se insertó en el sitio, derivado por escisión con PstI-HindIII de pPZP211 (Hajdukiewicz *et al.*, Plant Mol. Biol. 25: 989 (1994)), para crear el plásmido pPZP211-CYM. Se insertó un fragmento cortado por escisión con Sall de pEXP-NtmybA2T2 en el sitio derivado por escisión con Sall de pPZP211-CYM para crear pPCYM-NtmybA2T2. El vector, pPCYM-NtmybA2T2, es un vector plasmídico para expresión conducida por el promotor de CYM de NtmybA2T2. También es un vector binario que permite la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Este plásmido puede transferirse genéticamente a plantas que pueden someterse a selección con kanamicina para obtener transformantes vegetales.

El plásmido pPCYM-NtmybA2T2 también puede construirse de la siguiente manera: puede construirse insertando un fragmento de ADN, cortado por escisión con Sall de pP35SNtmybA2T2, en el sitio derivado por escisión con Sall de pPZP211-CYM.

(2) Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Se transformaron plantas de *Agrobacterium thaliana* ecotipo Col-0 con pDBIHm-NtmybA2T5, pPCYM-NtmybA2T2 (construido en el (1) anterior) y pBIHm-GFP (grupo de control) de acuerdo con el método desvelado en el Ejemplo 5, y se sometió a selección, respectivamente. La selección de plantas transgénicas transformadas por pDBIHm-NtmybA2T5 y pBIHm-GFP se realizó en medio MS que contenía higromicina (25 µg/ml) y carbenicilina (100 µg/ml) para proporcionar transformantes vegetales capaces de crecer en el medio, respectivamente. La selección de plantas transgénicas transformadas por pPCYM-NtmybA2T2 se realizó en medio MS que contenía kanamicina (50 µg/ml) y carbenicilina (100 µg/ml) para proporcionar transformantes vegetales viables. Las líneas transformantes resultantes se trasplantaron en suelo de mezcla de vermiculita:turba en polvo (1:1), se aclimataron y se cultivaron a 21 °C durante 16 horas con luz continua, y después en oscuridad durante 8 horas. Estas líneas se autofertilizaron para proporcionar semillas de primera generación filial que se usaron para análisis.

(3) Modificación de la tasa de crecimiento vegetal en *Arabidopsis thaliana* por una acción de mutantes de NtmybA2.

Las semillas de primera generación filial de plantas autofertilizadas resultantes de la transformación se esterilizaron con ácido hipocloroso y agua estéril, se sembraron en medio MS (sales inorgánicas MS, sacarosa al 30 % y goma Gellan 0,4 %) solidificado en una placa de Petri (recipiente rectangular N° 2, Eiken Chemical Co., Ltd., Japón), y se vernalizaron a 4 °C en oscuridad durante 4 días. Después de la vernalización, se permitió que las plantas reposaran verticalmente, y se cultivaron a 21 °C durante 16 horas con luz continua, y después en oscuridad durante 8 horas. Tres días después de la vernalización, se midió la longitud de cada raíz principal.

Se observaron líneas transformantes plurales con fenotipos de crecimiento reprimido entre líneas transformadas por pDBIHm-NtmybA2T5 y pPCYM-NtmybA2T2, en comparación con la línea transformada con pBIHm-GFP de control.

Ejemplo 10

Supresión del crecimiento y el desarrollo vegetal por expresión reprimida de NtmybA1 y NtmybA2

Se usó el silenciamiento Génico Inducido por virus (VIGS) como una herramienta para suprimir la expresión de genes endógenos para evaluar el fenotipo de plantas con expresión reprimida de NtmybA1 y NtmybA2. Se presentaron plásmidos, LgJ y LGFPJ, usados en VIGS por cortesía del distribuidor, Yuichiro Watanabe, Departamento de Ciencias de la Vida (Ciencias Multidisciplinares), Escuela de Posgrado de Artes y Ciencias, Universidad de Tokio, Japón. LgJ es un plásmido que tiene un inserto de ADN que codifica virus derivado por modificación de virus de ARN vegetal, virus del mosaico del tomate (ToMV). La modificación de ToMV incluye una introducción de mutaciones de sustitución de aminoácidos en la región codificante de enzimas de replicación para aliviar los síntomas inducidos por virus debido a reducción de los niveles de virus replicado; una incorporación de una nueva secuencia promotora para permitir la expresión de ADN ajeno; y un inserto de sitios de recombinación del sistema Gateway™ cadena abajo del promotor para expresión de ADN ajeno para permitir una inserción de ADN ajeno por reacción con LR (disponible de Invitrogen). El plásmido LgJ puede someterse a transcripción de ARN *in vitro* para generar ARN viral recombinante que es infeccioso contra plantas. En plantas infectadas con este virus recombinante, se expresa ARN bicatenario derivado de ADN ajeno como un intermedio de replicación en las plantas. Cuando el ADN ajeno usado en el virus recombinante es un ADN derivado de la planta para infección viral, se suprime la expresión del gen vegetal endógeno correspondiente. LGFPJ deriva por inserción de ADN codificante de GFP en LgJ y permite la detección de infección viral controlando la expresión de GFP.

(1) Construcción de plásmidos

20 Construcción de LA1A2J

Se amplificó un fragmento de ADN que incluía parte de ADNc de NtmybA1 por PCR usando como molde pGEMe-OH53i6 en combinación con cebadores,

25 cebador VA1-F:
 5'- ATAGTTCTGTAAAAAGAACTG -3' (SEC ID N°: 37)
 y
 cebador VA1-R:
 5'- TAACATTGAACAAGAAACATCTTG -3' (SEC ID N°: 38).

30 Se amplificó un fragmento de ADN que incluía parte de ADNc de NtmybA2 por PCR usando como molde OH60 en combinación con cebadores,

35 cebador VA2-F:
 5'- ACAAAGTCTTCTCTAACTACG -3' (SEC ID N°: 39)
 y
 cebador VA2-R:
 5'- AGCTTCGAGTCGTCTAGCG -3' (SEC ID N°: 40).

40 La reacción de PCR se realizó usando Pyrobest™ (Takara, Japón). Los fragmentos de ADN resultantes se insertaron en el sitio EcoRV de pBluescript™ (Stratagene) para crear pBS-VA1 y pBS-VA2, respectivamente. Se insertó un fragmento de ADN, cortado por escisión con SmaI-Sall de pBS-VA2, en el sitio, derivado por escisión con HindIII de pBS-VA1, formación de extremos romos con el fragmento de Klenow seguido de escisión con Sall, para crear pBS-VA1A2. Se realizó PCR con pBS-VA1A2 como un molde en combinación con

45 cebador B1T3:
 5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATTAACCCCTCACTAAAGGG -3' (SEC ID N°: 41)
 y
 cebador B2T7:
 50 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (SEC ID N°: 42)

55 para proporcionar un fragmento de ADN que porta un segmento de ADN unido en tándem que codifica parte de NtmybA1 y un segmento de ADN unido en tándem que codifica parte de NtmybA2, en el que la secuencia attB1 (sistema Gateway™, Invitrogen) se añadió a un extremo y la secuencia attB2 (sistema Gateway™, Invitrogen) al otro extremo. Se sometió una mezcla de este fragmento de ADN y plásmido pDONR201 (Invitrogen) a reacción de BP usando BP Clonase™ (Invitrogen) para proporcionar pDONOR-VA1A2. Se hizo reacciona una mezcla de pDONR-VA1A2 y LgJ con LR Clonase™ (Invitrogen) para proporcionar LA1A2J. Las reacciones con BP Clonase™ y LR Clonase™ se realizaron de acuerdo con protocolos incluidos en el reactivo.

60 Se escindió una alícuota (5 µg) de LA1A2J con MluI para producir un plásmido linealizado. Después de tratar con fenol/cloroforno, el plásmido se precipitó con etanol, y se resolvió en agua esterilizada (10 µl).

Se usó el LA1A2J linealizado resultante como un molde para transcripción *in vitro*.

65 Brevemente, se incubó una mezcla de tampón T7 10 x (5 µl, Roche, unión de ARN Polimerasa T7), DTT 0,1 M (2,5 µl), inhibidor de Rnasa (1 µl, Roche, 40 unidades/µl), mezcla de A/C/U/G (5 µl, 20 mM cada uno para ATP, CTP y

UTP y 2 mM para GTP), m⁷G[5']ppp[5']G 5 mM (2,5 µl, CAP, Roche), agua esterilizada (14 µl) y LA1A2J linealizado (10 µl) a 37 °C durante 5 minutos. Se añadieron a la mezcla 10 µl de ARN Polimerasa T7 (20 unidades/µl, Roche) y la mezcla resultante se incubó a 37 °C durante 25 minutos, seguido de la adición de GTP 20 mM (5 µl). La mezcla se incubó después a 37 °C durante 35 minutos. Después de finalizarse la reacción, se sometió una alícuota (2 µl) de la solución de reacción a electroforesis en geles de agarosa para confirmar la transcripción de ARN.

Se usó ARN de LA1A2J para inocular *Nicotiana benthamiana*. Brevemente, se incubaron plantas a 25 °C, y se espolvorearon 2 hojas superiores del estadio de 4 a 5 hojas de *Nicotiana benthamiana* con polvo de carborundo, y se inocularon con ARN de LA1A2J (5 µl/hoja). En un periodo de 5 minutos después de la inoculación, las hojas inoculadas se aclararon con agua destilada.

Se inocularon cinco plantas individuales, y se cultivaron a 23 °C después de la inoculación.

Se realizó transcripción de ARN *in vitro* usando LGFPJ como el grupo de control, como LA1A2J, y se usó ARN de LGFPJ para inocular plantas.

(2) Supresión del crecimiento y desarrollo vegetal en plantas con expresión reprimida de NtmybA1 y NtmybA2

Se comprueban los niveles de ARNm de NtmybA1 y ARNm de NtmybA2 expresados por RT-PCR. Brevemente, se comprueban los niveles de ARNm de NtmybA1 y ARNm de NtmybA2 expresados por RT-PCR en plantas infectadas por LA1A2J y LGFPJ. Se extrae ARN total de la punta de cada brote de plantas inoculadas con ARN de LA1A2J con la altura de la hierba reprimida, y plantas inoculadas con ARN de LGFPJ con el Mini Kit de Plantas RNeasy™ (QIAGEN). La síntesis de ADNc se realiza usando el sistema de síntesis de primera cadena Superscript™ para RT-PCR (Invitrogen) con el ARN total extraído como un molde. El ADNc sintetizado se usa como un molde y la detección de NtmybA1 y NtmybA2 se realizó con

cebador A2-583F:
5'- GTACAATGCTTGCACCGGTGG -3' (SEC ID N°: 33)
y
cebador A2-1089R:
5'- TGTAGACTGGGAACAGCCAGC -3' (SEC ID N°: 34).

El nivel de ADNc se normaliza de acuerdo con la cantidad expresada por ARNm de EF1α en combinación con

cebador EFF:
5'- AGACCACCAAGTACTACTGC -3' (SEC ID N°: 35)
y
cebador EF R:
5'- GTCAAGAGCCTCAAGGAGAG -3' (SEC ID N°: 36).

La PCR se realiza usando una alícuota (1 µl) del ADNc sintetizado (50 µl), permitiendo de este modo la normalización de cantidades de ADNc aplicadas y el análisis del nivel de expresión para NtmybA1 y NtmybA2.

El crecimiento y desarrollo vegetal está extremadamente suprimido en plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas con ARN de LA1A2J con niveles reprimidos de ARNm de NtmybA1 y ARNm de NtmybA2 expresado de forma endógena, en comparación con el grupo de control, grupo inoculado con ARN de LGFPJ.

A partir de las observaciones anteriores, resultará evidente que la reducción de los niveles de expresión de NtmybA1 y NtmybA2 endógeno permite la supresión del crecimiento y desarrollo vegetal.

(3) Supresión de citocinesis y progreso de fase M en plantas con expresión reprimida de NtmybA1 y NtmybA2

Se examinaron células epidérmicas de hoja y células de guarda estomáticas con respecto a hojas de plantas individuales con expresión reprimida de NtmybA1 y NtmybA2 endógeno como se ha desvelado en el (2) anterior.

Las células epidérmicas se desprenden de la superficie inferior de las hojas con un par de pinzas, y se someten a tinción nuclear con una mezcla de ácido láctico-ácido propiónico (1:1) que contiene Orceína 1 %. Estas células se examinan con un Microscopio de Contraste de Interferencia Diferencial. Como resultado, se observan células multinucleadas que tienen núcleos plurales. También se encuentran núcleos grandes y pequeños entre los núcleos existentes en las células multinucleadas. La célula multinucleada indica que los procesos de división nuclear están en progreso y se inhibe la citocinesis. El hecho de que haya núcleos que difieran en tamaño indica que los cromosomas nucleares se multiplican debido a la aparición de división nuclear aberrante y salto de la fase M. Es decir, las etapas para entrada en, progreso en y terminación de la fase M están afectadas en las células con expresión reprimida de NtmybA1 y NtmybA2. A partir de lo anterior, se desvela que NtmybA1 y NtmybA2 son genes esenciales para el progreso normal en la fase M.

(4) Cambios en el ciclo celular de plantas con expresión reprimida de NtmybA1 y NtmybA2

Se ensayan los niveles de ADN nuclear para hojas de plantas de tabaco individuales con expresión reprimida de NtmybA1 y NtmybA2 endógeno como se ha desvelado en el (2) anterior. Se corta la tercera hoja superior por encima de la hoja inoculada, mezclada con 1 ml de un tampón de extracción de núcleos contenido en Cystain™ UV Precise P (kit de tinción de ADN de Alta Resolución, Partec) en una placa de Petri, y se tritura con la hoja de una cuchilla durante 1 minuto. Después de mantener a temperatura ambiente durante 10 minutos, la muestra resultante se filtra a través de unidades de filtro desechables Partec Cell Trics™ (malla de 50 µm, Partec) para proporcionar un filtrado al que se añaden 2 ml de un tampón de tinción contenido en Cystain™ UV Precise P (kit de tinción de ADN de alta resolución, Partec). Se realizan mediciones con el Analizador de Ploidía PA (Partec).

En muestras nucleares preparadas de hojas de plantas de tabaco individuales con expresión reprimida de NtmybA1 y NtmybA2, aumentan los picos 4C (que indican las fases S, G2), en comparación con el grupo de control, y se observan también más picos 8C (que no se observaron en el grupo de control) lo que indica núcleos multiplicados.

El hecho de que los picos 4C aumenten indica progreso retardado en las fases S, G2, o entrada retardada en la fase M.

El hecho de que haya picos 8C para multiplicados indica inhibición de la entrada en la fase M o salto de la fase M. A partir de lo anterior, se desvela que NtmybA1 y NtmybA2 son genes esenciales para el progreso normal en la fase M y el silenciamiento de la expresión de estos genes permite la modulación del ciclo celular.

Ejemplo 11

Modificación de la tasa de crecimiento celular en líneas celulares BY2 de tabaco transformadas con expresión reprimida de Ntmyb

(1) Construcción de plásmido para cada ARNi contra NtmybA1, NtmybA2 y NtmybB

Se insertó un fragmento de ADN, cortado por escisión con KpnI de pEXP35S, con formación de extremos romos con ADN Polimerasa T4 en el extremo protruyente seguido de escisión con EcoRV, en el sitio, derivado por escisión con EcoRI-HindIII de pZP211 seguido de formación de extremos romos con el fragmento de Klenow en el extremo protruyente, para crear pZP211-355.

Se realizó PCR usando pBI121 (Clontech) como un molde en combinación con los cebadores

SEC ID N°: 61,
5'- GGAATTCGTGTGATATCTACCCGCTTCG -3' (SEC ID N°: 61), y
SEC ID N°: 62,
5'- CGGGATCCGTTTTTACCGAAGTTCATGC -3' (SEC ID N°: 62)

para amplificar un fragmento de ADN que porta ORF de GUS.

Este fragmento de ADN se escindió con EcoRI y BamHI, y después se insertó en el sitio, derivado por escisión con EcoRI-BamHI de pBluescript™ II (SK+, Stratagene), para crear pGUS1.0.

Se realizó PCR con OH60 como un molde en combinación con

cebador A2ia3:
5'- TTGAATCCAAGTCTTGGGCTTGACAGAAGAG -3' (SEC ID N°: 63)

y

cebador A2ia5:
5'-TTCTCGAGAAGCTTCGTCAAGAATCATTCTCTGATCTG-3' (SEC ID N°: 64)

para amplificar un fragmento de ADN que codifica parte de NtmybA2, que se escindió después con EcoRI y XhoI. El fragmento de ADN resultante se insertó en el sitio derivado por escisión con EcoRI-XhoI de pGUS1.0 para crear pGUS-A2.ARNi-a.

Se realizó PCR con OH60 como un molde en combinación con

cebador A2ib3:
5'- TTGGATCCAAGTCTTGGGCTTGACAGAAGAG -3' (SEC ID N°: 65)

y

cebador A2ib5:
5'- CCTCTAGACTAGTGTGACCGTCAAGAATCATTCTCTGATCTG -3' (SEC ID N°: 66)

para amplificar un fragmento de ADN que codifica parte de NtmybA2, que después se escindió con BamHI y XbaI. El fragmento de ADN resultante se insertó en el sitio derivado por escisión con BamHI-XbaI de pGUS-A2.ARNi-a para

crear pGUS-A2.ARNi-a.

Se realizó PCR con OH88 como un molde en combinación con

5 cebador Bia3:
5'- TTGAATTCTTGTTCCTGATAAGGTCGTCTC -3' (SEC ID N°: 67)

y

cebador Bia5:
5'- TTCTCGAGAAGCTTGAATTTGCCTAGTAGGTTAGTGC -3' (SEC ID N°: 68)

10 para amplificar un fragmento de ADN que codifica parte de NtmybB, que se escindió con EcoRI y XhoI. El fragmento de ADN resultante se insertó en el sitio derivado por escisión con EcoRI-XhoI de pGUS1.0, para crear pGUS-B.ARNi-a.

15 Se realizó PCR con OH88 como un molde en combinación con

cebador Bib3:
5'- TTGGATCCTTGTTCCTGATAAGGTCGTCTC -3' (SEC ID N°: 69)

y

20 cebador Bib5:
5'- CCTCTAGACTAGTGTGACGAATTTGCCTAGTAGGTTAGTGC -3' (SEC ID N°: 70)

25 para amplificar un fragmento de ADN que codifica parte de NtmybB, que se escindió con BamHI y XbaI. El fragmento de ADN resultante se insertó en el sitio, derivado por escisión con BamHI-XbaI de pGUS-B.ARNi-a, para crear pGUS-B.ARNi-a.

Se insertó un fragmento de ADN, cortado por escisión con HindIII de pGUS-A2.ARNi, en el sitio, derivado por escisión con HindIII de pPZP211-35S, para crear pPZP211-35S:A2ARNi.

30 Se insertó un fragmento de ADN, cortado por escisión con HindIII-Sall de pGUS-B.ARNi, en el sitio, derivado por escisión con HindIII-Sall de pPZP211-35S, para crear pPZP211-35S:B:ARNi.

35 Los vectores, pPZP211-35S:A2ARNi y pPZP211-35S:B:ARNi, son vectores plasmídicos para expresión conducida por el promotor de 35S de CaMV de una secuencia parcial de NtmybA2, y una secuencia parcial de NtmybB en forma de repeticiones invertidas, en los que las secuencias parciales de NtmybA2 y secuencias parciales de NtmybB formarán configuraciones de ARN bicatenario en plantas, respectivamente. Son vectores binarios que permiten la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Los plásmidos pueden transferirse genéticamente a plantas que pueden someterse a selección con canamicina para obtener transformantes vegetales.

40 En plantas de tabaco y células de cultivo de tabaco transformadas con estos plásmidos, pueden obtenerse acciones de ARNi en NtmybA2 y NtmybB por una acción de ARN bicatenario expresado.

Pueden construirse plásmidos que son sustancialmente funcionalmente equivalentes a pPZP211-35S:A2ARNi y pPZP211-35S:B:ARNi de la siguiente manera:

45 Se inserta un fragmento de ADN, cortado por escisión con SacII y KpnI de pP35S seguido de formación de extremos romos con ADN Polimerasa T4 en el extremo protruyente, en el sitio, derivado por escisión con EcoRI-HindIII de pPZP211 seguido de formación de extremos romos con el fragmento de Klenow en el extremo protruyente, para crear pPZP211-P35S. Se inserta un fragmento de ADN, cortado por escisión con HindIII de pGUS-A2.ARNi, en el sitio, derivado por escisión con HindIII de pPZP211-P35S, para crear pPZP211-P35S:A2ARNi. Se inserta un fragmento de ADN, cortado por escisión con HindIII-Sall de pGUS-B.ARNi, en el sitio, derivado por escisión con HindIII-Sall de pPZP211-P35S para crear pPZP211-P35S:B:ARNi. Los vectores, pPZP211-P35S:A2ARNi, y pPZP211-P35S:B:ARNi, son vectores plasmídicos para expresión conducida por el promotor de 35S de CaMV de una secuencia parcial de NtmybA2, y una secuencia parcial de NtmybB en forma de repeticiones invertidas, en los que las secuencias parciales de NtmybA2 y secuencias parciales de NtmybB formarán configuraciones de ARN bicatenario en plantas, respectivamente. Son vectores binarios que permiten transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Los plásmidos pueden transferirse genéticamente a plantas que pueden someterse a selección con kanamicina para obtener transformantes vegetales.

60 (2) Transformación de la línea celular BY2 de tabaco

65 Para determinar los efectos de la expresión de NtmybA2 y NtmybB reprimida en el crecimiento celular, se transformaron células BY2 de tabaco con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 que alberga un miembro seleccionado de pPZP211-35S:A2ARNi, pPZP211-35S:B:ARNi y pPZP211 (como vector de control). Brevemente, se cultivó conjuntamente una mezcla de células BY-2 de tabaco de pase de 3 días de edad, cultivadas en medio líquido LSD nuevo, y cultivos de medio YEB de 2 días de edad de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 que

alberga un miembro seleccionado de pPZP211-35S:A2ARNi, pPZP211-35S:B:ARNi y pPZP211 (como vector de control), a 25 °C en condiciones de oscuridad. Dos días después, las células BY-2 se aclararon con medio líquido LSD, se sembraron en medio Gelrite™ 0,2 %-LSD que contenía kanamicina 200 µg/ml y carbenicilina 300 µg/ml, y se incubaron a 25 °C en oscuridad. Veintidós días después, se ensayaron los callos resistentes a kanamicina resultantes con respecto a niveles de NtmybA2 y NtmybB expresados por RT-PCR. Se extrajo ARN total de estos callos con reactivo Trizol™ de Invitrogen (Invitrogen). La síntesis de ADNc se realizó usando el sistema de síntesis de primera cadena Superscript™ para RT-PCR (Invitrogen) con el ARN total extraído como molde. La amplificación y detección de ADNc de NtmybA2 se realizó usando el ADNc resultante como un molde en combinación con el cebador OH60DB1:

5'- CCGGATCCTTCAGTTCAGCACCATGCTCTG -3' (SEC ID N°: 73)
y cebador OH60DS6:
5'- CCGTGCACCTAAGAGATCTGATAGTTCGATG -3' (SEC ID N°: 74).

La amplificación y detección de ADNc de NtmybB se realizó con el cebador OH88Bam5:

5'- CCGGATCCTTCCTCAGTAAAGAAAAGATTGAACTTG -3' (SEC ID N°: 71)
y cebador OH88DS2:
5'- CCGTGCACCTAACAGTTAGGATCATTAAACAG -3' (SEC ID N°: 72).

Se realizó PCR con una alícuota (1 µl) del ADNc sintetizado (50 µl). La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl, usando TaKaRa Ex Taq™ (Takara, Japón), un tampón de reacción unido a TaKaRa Ex Taq™, 200 µM de cada uno de dATP, dTTP, dCTP y dGTP y 1 µM de cada uno de los cebadores. La etapa consistente en incubación a 93 °C durante 30 segundos, incubación a 56 °C durante 1 minuto e incubación a 73 °C durante 2 minutos se repitió durante 27 ciclos para la detección de NtmybB y 26 ciclos para la detección de NtmybA2, respectivamente. Estos productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Como resultado, los niveles de NtmybA2 expresado se redujeron en callos transformados por pPZP211-35S:A2ARNi, en comparación con los de los callos transformados por el vector de control pPZP211, y los niveles de NtmybB expresado disminuyeron en callos transformados por pPZP211-35S:B:ARNi, en comparación con los del vector de control.

(3) Cambio en la tasa del crecimiento celular de células BY2 transgénicas con niveles reprimidos de NtmybA2 expresado

Cuando se compararon los tamaños de los callos transformados por pPZP211-35S:A2ARNi con niveles reprimidos de NtmybA2 expresado con los del grupo de vector de control, se desveló que el tamaño del callo se reducía (Figura 7).

Se ensayaron los niveles de ADN nuclear para examinar el ciclo celular de células constituyentes para estos callos. El ensayo se realizó de la siguiente manera:

A cada uno de los callos congelados y almacenados se añadió 1 ml de un tampón de extracción de núcleos, contenido en Cystain™ UV Precise P (kit de tinción de ADN de Alta Resolución, Partec), se disolvieron y después se mezclaron. Después de mantenerla a temperatura ambiente durante 10 minutos, la muestra resultante se filtró a través de unidades de filtro desechables Partec Cell Trics™ (malla de 50 µm, Partec) para proporcionar un filtrado al que se añadieron 2 ml de un tampón de tinción contenido en Cystain™ UV Precise P (kit de tinción de ADN de alta resolución, Partec). Se realizaron mediciones con el Analizador de Ploidía PA (Partec).

En comparación con el grupo de vector de control, aumentaron los picos 4C (que indican las fases S, G2), y se observaron también más picos 8C (que no se observaron en el grupo de vector de control) lo que indica cromosomas duplicados en callos transformados por pPZP211-35S:A2ARNi con niveles reprimidos de ARNm de NtmybA2 expresado (Figura 8). El hecho de que los picos 4C aumenten indica la prolongación de los periodos de fase S, G2, debido a que es difícil entrar en la fase M en células con expresión reprimida de NtmybA2. El hecho de que haya picos 8C indica que tiene lugar inhibición de entrada en la fase M y se salta la fase M, conduciendo de este modo a duplicación de los cromosomas. Como resultado de estos, se desvela que el ciclo celular se retarda y se suprime el crecimiento celular, conduciendo de este modo a la formación de callos más pequeños.

(4) Cambio en la tasa del crecimiento celular de células BY2 transgénicas con niveles reprimidos de NtmybB expresado

Cuando se compararon los tamaños de los callos transformados por pPZP211-35S:B:ARNi anteriormente mencionados con niveles reprimidos de ARNm de NtmybB expresado con los del grupo de vector de control, se desveló que el tamaño del callo aumentaba (Figura 9).

Se ensayaron los niveles de ADN nuclear para examinar el ciclo celular de células constituyentes para estos callos. Se realizó el ensayo de la misma manera que en el (4) anteriormente mencionado. En comparación con el grupo de

vector de control, los picos 4C (que indican cromosomas de fase S, G2), se redujeron en callos transformados por pPZP211-35S:BARNi con niveles reprimidos de NtmybB expresado (Figura 10). El hecho de que los picos 4C se reduzcan indica el acortamiento de las fases S, M, es decir, aceleración de la entrada en la fase M. La inhibición de la expresión de NtmybB conduce a expresión avanzada de genes o aumento de los niveles de genes expresados, que son esenciales para la entrada en la fase M. Como resultado del adelantamiento de la entrada en la fase M, se desvela que el ciclo celular se acorta, y se potencia el crecimiento celular, permitiendo de este modo la formación de callos más grandes.

Ejemplo 12

Modificación de las tasas de crecimiento celular en células BY2 de tabaco transgénicas con expresión estable de NtmybA2 y NtmybA2T2

(1) Construcción de plásmidos de expresión estable para NtmybA2 y NtmybA2T2

Se insertó un fragmento de ADN, cortado por escisión con Sall de OH60, en el sitio, derivado por escisión con Sall de pPZP211-35S, para crear pPZP211-35S:A2.

Se insertó un fragmento de ADN, cortado por escisión con Sall de pEXP-NtmybA2T2, en el sitio, derivado por escisión con Sall de pPZP211-35S, para crear pPZP211-35S:A2T2.

Brevemente, los vectores, pPZP211-35S:A2 y pPZP211-35S:A2T2, son vectores plasmídicos para expresión conducida por el promotor de 35S de CaMV de NtmybA2 y NtmybA2T2, respectivamente. Son vectores binarios que permiten la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Los plásmidos pueden transferirse genéticamente en plantas que pueden someterse a selección con kanamicina para obtener transformantes vegetales.

Los plásmidos que son sustancialmente funcionalmente equivalentes a pPZP211-35S:A2T2 pueden construirse de la siguiente manera:

se insertan fragmentos de ADN, cortados por escisión con Sall de pP35S-NtmybA2T2 y OH60 en el sitio, derivado por escisión con Sall de pPZP211-35S, para crear pPZP211-P35S:A2T2 y pPZP211-P35S:A2, respectivamente.

(2) Transformación de la línea celular de tabaco BY2

Para determinar los efectos de la expresión estable de NtmybA2 y NtmybA2T2 en el crecimiento celular, se transformaron células BY2 de tabaco por mediación con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 que alberga un miembro seleccionado de pPZP211-35S:A2, pPZP211-35S:A2T2 y pZP211 (como vector de control). La transformación de células BY-2 de tabaco se realizó de acuerdo con el método desvelado en el Ejemplo 11 (2). Veintidós días después los callos resistentes a kanamicina resultantes se ensayaron con respecto a niveles de ARNm de NtmybA2 expresado y ARNm de NtmybA2T2 por RT-PCR. Se extrajo ARN total de estos callos con reactivo Trizol™ de Invitrogen (Invitrogen). La síntesis de ADNc se realizó usando el sistema de síntesis de Primera Cadena Superscript™ para RT-PCR (Invitrogen) con el ARN total extraído como un molde. La amplificación y detección de NtmybA2 y NtmybA2T2 se realizó usando el ADNc resultante como un molde en combinación con

cebador OH60DB1:
5'- CCGGATCCTTCCAGTTCAGCACCATGCTCTG -3' (SEC ID N°: 73),

y
cebador OH60DS6:
5'- CCGTGCACCTAAGAGATCTGATAGTTCGATG -3' (SEC ID N°: 74).

Se realizó PCR con una alícuota (1 µl) del ADNc sintetizado (50 µl). La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl, usando TaKaRa Ex Taq™ (Takara, Japón), un tampón de reacción unido a TaKaRa Ex Taq™, 200 µM de cada uno de dATP, dTTP, dCTP y dGTP y 1 µM de cada uno de los cebadores. La etapa que consistía en incubación a 93 °C durante 30 segundos, incubación a 56 °C durante 1 minuto e incubación a 73 °C durante 1 minuto se repitió durante 24 ciclos. Estos productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Como resultado, los niveles de NtmybA2 expresado aumentaron en callos transformados por pPZP211-35S:A2, en comparación con el grupo de vector de control, y se observó la expresión de NtmybA2T2 en callos transformados por pPZP211-35S:A2T2.

(3) Cambio en las tasas de crecimiento celular de células BY2 transgénicas que expresan de forma estable NtmybA2 y mutantes de NtmybA2

Los tamaños de los callos transformados por pPZP211-35S:A2- o pPZP211-35S:A2T2 anteriormente mencionados con expresión verificada de ARNm de NtmybA2 o ARNm de NtmybA2T2 se compararon con los del grupo de vector

de control, se desveló que el tamaño de los callos se redujo (Figura 11).

Se ensayaron los niveles de ADN nuclear para examinar el ciclo celular de células constituyentes para estos callos. El ensayo se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 11 anteriormente mencionado (3).

En comparación con el grupo de vector de control, los picos 4C (que indican cromosomas en fase S, G2) disminuyeron en callos que expresaban NtmybA2 de forma estable. Esta tendencia también se observó en los callos que expresaban de forma estable NtmybA2T2 que era un mutante con capacidad de NtmybA2 potenciada para activar la transcripción (Figura 13).

Estas células transformantes se examinaron con un microscopio. Como resultado, no se observaron células polinucleadas, y el número de núcleos detectados indicó por lo tanto el número de células. Los números de células resultantes se compararon entre el grupo de vector de control, callos transformados por NtmybA2 y callos transformados por NtmybA2T2. Como resultado, se ha desvelado que el número de células se reduce para NtmybA2 en correlación con el tamaño de los callos y además es notable una reducción del número de células para NtmybA2T2 (Figura 12).

Esto indica que el crecimiento celular se suprime y se reduce el número de células, conduciendo de este modo a la formación de callos más pequeños, aunque la entrada en la fase M se adelanta en los callos con expresión estable de NtmybA2 y mutantes de NtmybA2.

Ejemplo 13

Cambio del crecimiento y desarrollo de plantas de tabaco transgénicas con niveles modulados de NtmybB expresado

(1) Construcción de plásmidos

Se insertó un fragmento de ADN, derivado por escisión con Sall de OH88 en el sitio derivado por escisión con Sall de pPZP211 para crear pPZP211-35S:B.

(2) Producción de plantas de tabaco transgénicas

Se usó el plásmido, pPZP211-35S:B:ARNi (como se desvela en el Ejemplo 11 (3)), para producir plantas de tabaco transgénicas con expresión de ARNi de NtmybB endógeno reprimida por la maquinaria de ARNi. El plásmido, pPZP211-35S:B, se usó para producir plantas de tabaco transgénicas que expresaban NtmybB de una manera estable. Se usó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 que albergaba un miembro seleccionado de pPZP211-35S:B:ARNi, pPZP211-35S:B y pPZP211 (como vector de control) de acuerdo con un método de transformación de disco de hoja convencional para generar transformantes de *Nicotiana tabacum* ver. SR1.

(3) Cambio de crecimiento en plantas de tabaco transgénicas

Las plantas resistentes a kanamicina resultantes individuales se cultivaron para proporcionar semillas autofertilizadas. Las semillas resultantes se esterilizaron con etanol y ácido hipocloroso, después se sembraron en medio Gelrite™ al 0,2 %-MS que contenía kanamicina 50 µg/ml, y se cultivó a 28 °C con luz continua para generar plantas. Después del cultivo durante 12 días, las plantas individuales resistentes a kanamicina resultantes se trasplantaron en suelo, y se cultivaron a 28 °C en condiciones de luz continua durante 25 días.

Las plantas individuales resistentes a kanamicina resultantes se ensayaron por RT-PCR para verificar cambios en el nivel de ARN de NtmybB expresado. Se extrajo ARN total con reactivo Trizol™ de Invitrogen (Invitrogen) de plantas (peso en bruto de 0,5 a 0,8 g) a los 22 días después de la siembra. La síntesis de ADNc se realizó usando sistema de síntesis de Primera cadena Superscript™ para RT-PCR (Invitrogen) con el ARN total extraído como molde. La amplificación y detección de ADNc de NtmybB se realizó usando el ADNc resultante como un molde en combinación con el cebador OH88Bam5:

5'-CCGGATCCTTCCTCAGTAAAGAAAAGATTGAACTTG-3' (SEC ID N°: 71) y
 cebador OH88DS2:
 5'-CCGTCGACTTAACAGTTAGGATCATTAAACAG-3' (SEC ID N°: 72).

El nivel de ADNc se normalizó de acuerdo con el nivel de ARNm de EF1α expresado, en combinación con

cebador EFF:
 5'- AGACCACCAAGTACTACTGC -3' (SEC ID N°: 35)

y
 cebador EFR:
 5'- GTCAAGAGCCTCAAGGAGAG -3' (SEC ID N°: 36).

Se realizó PCR con una alícuota (1 µl) del ADNc sintetizado (50 µl). La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl, usando TaKaRa Ex Taq™ (Takara, Japón), un tampón de reacción unido a TaKaRa Ex Taq™, 200 µM de cada uno de dATP, dTTP, dCTP y dGTP y 1 µM de cada uno de los cebadores. La etapa que consistía en incubación a 93 °C durante 30 segundos, incubación a 56 °C durante 1 minuto e incubación a 73 °C durante 1 minuto se repitió durante 27 ciclos. La misma etapa se repitió durante 18 ciclos para detección de EF1α. Estos productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Como resultado, se observó un alto nivel de ADNc de NtmybB amplificado en la línea celular transformada por pPZP211-35S:B N° 6, en relación con el grupo de vector de control, aunque EF1α se detectó de forma equivalente entre todas las muestras y se verificó la elevación del nivel de expresión. Además, el nivel de ADNc de NtmybB amplificado apenas se observó en la línea celular transformada con pPZP211-35S:B:ARNi N° 2, en relación con el grupo de vector de control, y se verificó la reducción del nivel de expresión.

Se suprime el crecimiento y desarrollo en la línea de tabaco transgénica que expresa NtmybB de forma estable (N° 6) en relación con el grupo de vector de control, mientras que el crecimiento y desarrollo se potencia en la línea de tabaco transgénica (N° 2) con expresión reprimida por ARNi de NtmybB endógeno, en relación con el grupo de vector de control (Figura 14). Se cree que, ya que NtmybB reprime la expresión de genes indispensables para el progreso en la fase M, la entrada en y/o progreso en, la fase M se retarda en plantas transgénicas que sobreexpresan NtmybB, conduciendo de este modo a inhibición de la división celular y extensión del tiempo requerido para el ciclo celular, con el resultado de que las líneas presentan un fenotipo de crecimiento y desarrollo suprimidos. Por el contrario, se cree que la expresión de NtmybB endógeno se reprime, adelantando de este modo la expresión de genes necesarios para el progreso en la fase M, o aumentando el nivel de expresión, con el resultado de que la entrada en, y/o progreso en, la fase M se acelera y el tiempo requerido para el ciclo celular se acorta, por lo que las líneas presentan un fenotipo de crecimiento y desarrollo potenciado.

Ejemplo 14

Similitud de secuencias de aminoácidos entre las proteínas, NtmybA1, NtmybA2 y Os3RmybA1

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas, NtmybA1, NtmybA2 y Os3RmybA1, se alinean de forma óptima y se realiza un análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple. Los resultados de comparación se muestran en las Figuras 15 a 18. La alta similitud de secuencias de aminoácidos se encuentran no solamente en la región de unión a ADN de myb compuesta de 3 repeticiones sino también en la región (posiciones de aminoácidos 631 a 1042) que regula negativamente, y la región (posiciones de aminoácidos 413 a 630) que potencia, la capacidad activadora de la transcripción poseída por la proteína NtmybA2, como se desvela en el Ejemplo 6. Los miembros que actúan como activadores de la transcripción NtmybA1, NtmybA2 y Os3RmybA1, son altamente similares a un nivel de aminoácidos entre las regiones que regulan la capacidad activadora de la transcripción, y por lo tanto se muestra que tienen la maquinaria de control similar. En las Figuras 15 a 18, las flechas indican áreas para construcciones mutantes de NtmybA2 de delección respectivas como se desvela en el Ejemplo 6 y las regiones de aminoácidos correspondientes relacionadas con NtmybA1 y Os3RmybA1. Se reconoce que las partes de delección de NtmybA2 para crear los mutantes de NtmybA2 con alta capacidad activadora de la transcripción, NtmybA2T1, NtmybA2T2 y NtmybA2T3, son altamente similares a NtmybA1 y Os3RmybA1, y se encuentran aminoácidos conservados entre estas tres proteínas. Es decir, para NtmybA2T1, la secuencia de TPSILKKRHR (SEC ID N°: 89), se encuentra cerca de la región de delección; para NtmybA2T2, la secuencia de NXXTPXRLWX (SEC ID N°: 90); y para NtmybA2T3, la secuencia de PPRFPSXDXPF (SEC ID N°: 91), en la que X es cualquier aminoácido. Para NtmybA1 y Os3RmybA1, la delección de la parte C terminal que abarca de cualquiera de estas secuencias conservadas al extremo C terminal permitirá la creación de mutantes funcionalmente equivalentes a NtmybA2T1, NtmybA2T2 y NtmybA2T3.

Ejemplo 15

Similitud de secuencias de aminoácidos entre 3Rmyb, NtmybA1, NtmybA2, NtmybB y Os3RmybA1 de *Arabidopsis thaliana*

Aunque se conocen 100 o más proteínas que contienen el motivo de unión a ADN de tipo myb en el genoma de *Arabidopsis thaliana* completo, se ha indicado que solamente 5 miembros son proteínas 3Rmyb que tienen una configuración estructural compuesta de 3 repeticiones de secuencia de myb imperfectas (Stracke *et al.*, Curr. Opin. Plant Biol. 4: 447 (2001)). Sin embargo, no ha habido proteínas con funciones reveladas entre estas proteínas 3Rmyb aún. (1) Similitud de secuencia de aminoácidos entre 3Rmyb vegetal en forma activadora de la transcripción.

Los miembros de 3Rmyb de *Arabidopsis thaliana* presentados, las secuencias de aminoácidos de AtMYB3R1 (N° de Referencia de GenBank™. AAD46772, SEC ID N°: 75) y AtMYB3R4 (N° de Referencia de GenBank™ AAK54739, SEC ID N°: 76) y las secuencias de aminoácidos de NtmybA1, NtmybA2 y Os3RmybA1 se alinearon de forma óptima y se realizó un análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple. Se muestran los resultados de comparación de similitud en las Figuras 19 a 25. Se reconoce que las secuencias de aminoácidos de AtMYB3R1 y AtMYB3R4 son altamente similares a las de NtmybA1, NtmybA2 y Os3RmybA1 no solamente en los dominios de

unión a ADN de tipo myb sino también en las regiones importantes para NtmybA2 para regular la activación de la transcripción. En particular, la secuencia consenso característica compuesta de 22 aminoácidos constituyentes de la fórmula:

5 SILX₁KRXRXLUOPJXX₅X₁RXX₅KK (SEC ID N°: 94),
 en la que X es cualquier aminoácido, J es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en I, V y L; O es un aminoácido seleccionado de S y T; X₁ es un aminoácido seleccionado de K y R; U es un aminoácido seleccionado de V y L; y X₅ es un aminoácido seleccionado de D y E,

10 se observa entre segmentos con alta similitud. Esta secuencia consenso indica que AtMYB3R1 y AtMYB3R4 pueden actuar como activadores de la transcripción para el gen de ciclina B y el gen de NACK1 de una manera similar a NtmybA1, NtmybA2 y Os3RmybA1.

(2) Similitud de secuencias de aminoácidos entre 3Rmyb vegetales en forma represora de la transcripción

15 Ya que la similitud de secuencias de aminoácidos no se encuentra entre un miembro seleccionado de los miembros de 3Rmyb de *Arabidopsis thaliana* AtMYB3R3 (N° de Referencia de GenBank™ AAF25950, SEC ID N°: 77) y AtMYB3R5 (N° de Referencia de GenBank™ AAK54740, SEC ID N°: 78) y un miembro seleccionado de los 3Rmyb vegetales en forma activadora de la transcripción anteriormente mencionados, excepto por los dominios de unión a ADN de myb, se espera que AtMYB3R3 y AtMYB3R5 no actúen como activadores de la transcripción. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de AtMYB3R3 y AtMYB3R5, y la secuencia de aminoácidos de NtmybB se alinearon de forma óptima. Como resultado, se encontraron similitudes de secuencias de aminoácidos entre las secuencias de aminoácidos de AtMYB3R3, AtMYB3R5 y NtmybB. Los resultados de comparación se muestran en las Figuras 26 a 28. Se reconoce que no solamente las secuencias de aminoácidos de AtMYB3R3 y AtMYB3R5 son altamente similares a la secuencia de aminoácidos de NtmybB en el dominio de unión a ADN de tipo myb sino que también están presentes un gran número de aminoácidos similares en otros dominios, y además la secuencia consenso característica compuesta de 7 aminoácidos constituyentes (incluyendo cuatro restos de núcleo Ser) de la fórmula:

20 SCSSXSX₆ (SEC ID N°: 95),
 25 en la que X es cualquier aminoácido y X₆ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K, R, D, E y H,

30 se localiza en una posición más cercana al extremo N terminal que el dominio de unión a ADN de myb. Esta secuencia consenso no se observa en las secuencias de aminoácidos de AtMYB3R1, AtMYB3R4, NtmybA1, NtmybA2 y Os3RmybA1. Este hecho indica que esta secuencia consenso es, como NtmybB, un represor de la transcripción para el gen de ciclina B y el gen de NACK1.

(3) Miembros de la familia de 3Rmyb vegetal, clasificados en subfamilias de forma activadora y forma represora

40 Resulta evidente a partir del (1) y (2) anteriores que los miembros de 3Rmyb ocupan posiciones estructural y funcionalmente especiales incluso en la superfamilia de myb vegetal, y actúan como factores para controlar la transcripción del gen de ciclina B y el gen de NACK1. También se ha descubierto que pueden clasificarse, basándose en su similitud, en subfamilias de forma activadora de la transcripción y forma represora de la transcripción, incluso dentro de la familia de 3Rmyb.

45 El alineamiento de secuencias de aminoácidos óptimo se realizó por el programa ClustalW (<http://www.dbj.nig.ac.jp/E-mail/clustalw-j.html>) con todos los parámetros en sus ajustes por defecto. En los dibujos que ilustran los resultados de salida del programa ClustalW, los símbolos que indican la similitud e identidad de aminoácidos, “*” significa que los restos de aminoácidos en esa columna son idénticos en todas las secuencias en el alineamiento (sitio de aminoácido completamente conservado); “:” significa que se han observado sustituciones conservadas (sitio de aminoácido altamente conservado); y “.” significa que se observan sustituciones conservadas (sitio de aminoácido moderadamente conservado).

Ejemplo 16

55 Conservación en segmentos de aminoácidos constituyentes de motivos de unión a ADN de myb entre miembros de 3Rmyb vegetal divergentes

60 Hasta ahora, se ha indicado que los fragmentos de ADNc para 3Rmyb con una configuración estructural compuesta de tres repeticiones de motivos myb se aíslan de diversos miembros vegetales (Kranz *et al.*, Plant J. 21: 231 (2000)). Las secuencias de aminoácidos de motivos de unión a ADN de myb de estos miembros de 3Rmyb vegetal divergentes se compararon con la secuencia de aminoácidos de longitud completa de c-myb humano. Los miembros de 3Rmyb de estas plantas divergentes se compararon en su segmento de aminoácidos de motivo de unión a ADN de myb. El 3Rmyb usado en la comparación de secuencias de aminoácidos incluye MYB3R-1 derivado de *Physcomitrella patens* (n° de referencia de GenBank™ AAF78888, SEC ID N°: 79, indicado como “PhpMYB3R-1” en las Figuras 29 a 31), MYB3R-1 derivado de *Adiantum raddianum* (n° de referencia de GenBank™ AAF67053, SEC ID

Nº: 80, indicado como "AdrMYB3R-1" en las Figuras 29 a 31), MYB3R-1 derivado de *Hordeum vulgare* (nº de referencia de GenBank™ AAF78890, SEC ID Nº: 81, indicado como "HvMYB3R-1" en las Figuras 29 a 31), MYB3R-1 derivado de *Secale cereale* (nº de referencia de GenBank™ AAF67050, SEC ID Nº: 82, indicado como "ScMYB3R-1" en las Figuras 29 a 31), dominio relacionado con Myb potencial derivado de *Papaver rhoeas* (nº de referencia de GenBank™ AAF43043, SEC ID Nº: 83, indicado como "ParMYB3R-1" en las Figuras 29 a 31), AtMYB3R1 (indicado como "AtMYB3R-1" en las Figuras 29 a 31), AtMYB3R3 (indicado como "AtMYB3R-3" en las Figuras 29 a 31), AtMYB3R4 (indicado como "AtMYB3R-4" en las Figuras 29 a 31), AtMYB3R5 (indicado como "AtMYB3R-5" en las Figuras 29 a 31), NtmybA1, NtmybA2, NtmybB, Os3RmybA1, c-myb humano (nº de referencia de SWISS-PROT P10242, SEC ID Nº: 88). Ya que los ADNc derivados de *Adiantum raddianum*, *Hordeum vulgare* y *Secale cereale* son fragmentos, no se muestran repeticiones constituyentes iniciales para los motivos de unión a ADN de myb en formas de longitud perfecta. La secuencia de aminoácidos del motivo de unión a ADN de myb que abarca de las posiciones 43 a 192 de la proteína c-myb humana (nº de referencia de SWISS-PROT P10242, SEC ID Nº: 88) y las secuencias de aminoácidos de los miembros de 3Rmyb, aislados de las plantas anteriormente mencionadas, se alinearon de forma óptima. Las secuencias de longitud completa ya indicadas se compararon entre otros miembros de 3Rmyb vegetal distintos de los de *Adiantum raddianum*, *Hordeum vulgare* y *Secale cereale* que no abarcaban el motivo de unión a ADN de myb de longitud completa. Cada puntuación alineada que indica la similitud de aminoácidos en relación con c-myb se muestra de la siguiente manera:

La puntuación alineada es 62 para NtmybA1; 65 para NtmybA2; 60 para NtmybB; 64 para AtMYB3R1; 64 para AtMYB3R3; 63 para AtMYB3R4; 66 para AtMYB3R5; 66 para PhpMYB3R-1; 66 para ParMYB3R-1; y 60 para Os3RmybA1. Resulta evidente a partir de lo anterior que los dominios de unión a ADN de myb de miembros de 3Rmyb vegetales están altamente conservados en comparación con c-myb. También se desvela que los dominios de unión a ADN de myb de miembros de 3Rmyb vegetal tienen la puntuación alineada de 60 o más, en relación con c-myb.

Mediante análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos óptimo de motivos de unión a ADN de tipo c-myb de NtmybA1, NtmybA2, NtmybB, AtMYB3R1, AtMYB3R3, AtMYB3R4, AtMYB3R5, -PhpMYB3R-1, ParMYB3R-1, Os3RmybA1, HvMYB3R-1, AdrMYB3R-1 y ScMYB3R-1, el presente inventor *et al.* han conseguido encontrar secuencias comunes conservadas en dichos motivos entre estos 13 miembros de 3Rmyb vegetal (Figuras 29 a 31).

La secuencia de aminoácidos común (secuencia de aminoácidos consenso) conservada en el motivo de unión a ADN de myb entre diversos miembros de 3Rmyb vegetal contiene tres repeticiones de motivos de myb c-myb, acompañados de 42 aminoácidos arbitrarios intermedios (aminoácidos entre las flechas en los dibujos) localizados entre dichas repeticiones, en los que dicho motivo de myb c-myb es una secuencia, compuesta de 9 restos de aminoácidos, de la fórmula:

(i) W[S,T]XXE[D,E]XX[L,I,V]

(correspondiente a SEC ID Nº: 92)

en la que X es cualquier aminoácido, y [] indica un aminoácido seleccionado de los aminoácidos expuestos entre corchetes,

(cada uno de los segmentos consenso (marcado con barras transversales en el dibujo) que constituyen la región de unión a ADN de myb de 3 repeticiones de c-myb, indicado por el símbolo, MYB Nº 1 (identificación de repetición de dominio de unión a ADN de Myb 1), en resultados de recuperación obtenidos usando el programa MOTIF (<http://motif.genome.ad.jp/>)).

Más específicamente, cuando los sitios constituidos por aminoácidos consenso o aminoácidos análogos químicos entre las 13 secuencias de aminoácidos se expresan en la "Secuencia Consenso", la secuencia potencial es una secuencia (indicada como "Secuencia Consenso" en los dibujos) con 150 aminoácidos, de la siguiente fórmula:

(ii) WTXEEDXXLXXXVXXUXGX₇XWKXIAXXXXROX₅JQCLHRWQKVLXPXLJKG

XWOXEEDXXJXXXJXX₇XGXXKWSXJOXXXGRIGKQCRERWUNHLPXIXX₇XXWTXXEX₅XXLXXXH

XXXGNX₇WAEJXX₇XLGX₇ODNOIKNXWSOXKKX₇

(correspondiente a SEC ID Nº: 93)

en la que X es cualquier aminoácido; J es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en I, V y L; O es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en G, S, T, C y A; X₇ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K, R y H; U es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en H, W, Y y F; y X₅ es un aminoácido seleccionado D y E.

El alineamiento óptimo de las secuencias de aminoácidos se realizó con el programa ClustalW (<http://www.dd-bj.nig.ac.jp/E-mail/clustalw-j.html>) en el que todos los parámetros fueron los establecidos por defecto.

Ejemplo 17

Aislamiento de 3Rmyb vegetal

Para aislar ADN que codifica proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos de (i), específicamente (ii), como se desvela en el Ejemplo 16, puede realizarse el proceso del Ejemplo 1.

5 Brevemente, la amplificación puede realizarse con ADNc preparado a partir de tejidos o células vegetales diana con crecimiento celular vigoroso como molde por PCR usando cebadores degradados en combinación con PCR Anidada. Los cebadores degradados usados en la primera PCR son un conjunto de cebadores de SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2. La primera solución de reacción resultante se usa como molde para la segunda PCR. La segunda PCR, PCR Anidada, se realiza con un conjunto de cebadores de SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 4. La segunda solución de reacción se usa como un molde para la tercera PCR. La tercera PCR, PCR Anidada, se realiza con un conjunto de cebadores de SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 6 para permitir la amplificación de ADN que codifica parte del dominio de unión a ADN de myb. Es posible secuenciar las secuencias de nucleótidos del extremo 5' y 3' de ADNc de longitud completa mediante adaptaciones de 5' RACE y 3' RACE basándose en las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADN resultantes. Puede realizarse PCR con cebadores diseñados en las secuencias terminales caracterizadas por RACE para amplificar ADNc de longitud completa. El tejido y célula con crecimiento celular vigoroso incluye callos, células de cultivo, plántones o plántulas, derivados de plantas diana; brotes apicales, raíces apicales; y otros.

Ejemplo 18

20 Determinación de las funciones de 3Rmyb vegetal

Para determinar la función de 3Rmyb vegetal como se aísla de acuerdo con el proceso del Ejemplo 17, se construyen plásmidos 3Rmyb vegetal para expresión conducida por promotor de 35S de CaMV de ADNc diana, y se cotransfectan después protoplastos, preparados a partir de células BY2 de tabaco, con una combinación de plásmidos seleccionada de las siguientes (i) y (ii):

- 25 (i) plásmido de 3Rmyb vegetal (10 µg/muestra), plásmido de LUC-promotor de NACK1 (10 µg/muestra) y plásmido de R-LUC (1 µg/muestra)
- 30 (ii) plásmido de pBI221 (10 µg/muestra), plásmido de LUC-promotor de NACK1 (10 µg/muestra) y plásmido de R-LUC (1 µg/muestra).

Los protoplastos resultantes se ensayan con respecto a actividad LUC y actividad R-LUC. El nivel de actividad LUC se normaliza (actividad específica de LUC) de acuerdo con el nivel de la actividad R-LUC. Cuando la actividad específica de LUC se eleva en la combinación (i) en relación con la de la combinación (ii), se puede determinar que los miembros de 3Rmyb vegetal usados son formas activadoras de la transcripción. Cuando la actividad específica de LUC se reduce en la combinación (i) en relación con la de la combinación (ii), se puede determinar que los miembros de 3Rmyb vegetal usados son formas represoras de la transcripción. Puede realizarse preparación de protoplastos, transferencia génica de plásmidos y ensayos de actividad LUC y R-LUC de acuerdo con los métodos desvelados en el Ejemplo 3.

Ejemplo 19

Creación de plantas estériles masculinas por expresión específica de órganos reproductores masculinos de NtmybB

45 Las plantas pueden transformarse con plásmidos para expresión conducida por promotor expresable específico de órgano reproductor masculino del gen de NtmybB que reprime la transcripción de genes expresables específicos de fase G2/M. La modificación del crecimiento celular en el órgano reproductor masculino conduce a la inhibición o supresión de la formación de polen normal, permitiendo de este modo la producción de plantas transgénicas con fertilidad de semillas reducida.

(1) Construcción de plásmidos

Se describe posteriormente una realización de construcción de plásmidos para transformación, que permiten la expresión específica de órgano reproductor masculino de NtmybB. Los plásmidos desvelados en el documento PCT/JP02/12268 (2002), pENTRAVP1 y pENTR0.6, son plásmidos que portan un inserto del promotor del gen AtNACK2 de *Arabidopsis thaliana* y el promotor del gen AVP1 de *Arabidopsis thaliana*, respectivamente. Se realiza PCR usando cada uno de estos plásmidos como un molde en combinación con el cebador HindIII-AVP1-298S:

- 5' -CCCAAGCTTAAATTCGGACAARTAGAGCGTAGTCAAC-3' (SEC ID N°: 84),
- 60 y
 cebador AVP1+5A:
 5' - GCCATCTTCTCCTCCGTATAAGAG -3' (SEC ID N°: 85)
 para pENTRAVP1, o
 cebador HindIII-NACK2-575S: 5' - CCCAAGCTTCTCGTTAAGAACCCTTGATC-3' (SEC ID N°: 86), y
 65 cebador NACK2+3A+2:
 5' - GCCATCTTCTACACACAAAATCGAAACC-3' (SEC ID N°: 87)

para pENTR0.6.

Los fragmentos de ADN amplificados se escinden con HindIII, y después se insertan junto con un fragmento de ADN para NtmybB, cortado por Sall y EcoRV de pEXP-NtmybB, en el sitio Sall-HindIII de pUC18 (Takara, Japón) para crear pUC-AVP1-NtmybB y pUC-0.6-NtmybB, respectivamente. Se insertan fragmentos de ADN, cortados por escisión con SacI de pUC-AVP1-NtmybB y pUC-0.6-NtmybB, creando después extremos romos con ADN polimerasa T4 en el extremo protruyente seguido de escisión con HindIII, en el sitio, derivado por escisión con SacI de pBI121 (Clontech), formando después extremos romos con ADN polimerasa T4 en el extremo protruyente seguido de escisión con HindIII, para crear pBI-PAVP1-NtmybB y pBI-N0.6-NtmybB, respectivamente.

El plásmido pBI-PAVP1-NtmybB es un vector binario para expresión conducida por promotor de AVP1 de NtmybB. Este plásmido permite la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. El plásmido pBI-N0.6-NtmybB es un vector plasmídico para expresión conducida por promotor de AtNACK2 de NtmybB. Este plásmido permite la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Las plantas transformadas con estos plásmidos pueden seleccionarse con kanamicina.

(2) Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Se transforma *Agrobacterium tumefaciens* con un vector binario seleccionado de dos plásmidos como se han creado en el (1) anteriormente mencionado. A continuación, se transforma *Arabidopsis thaliana* de ecotipo Col-0 por el método de inmersión Floral (como se desvela en el Ejemplo 8) para transformación mediada por *Agrobacterium* usando *Agrobacterium* que alberga el plásmido anteriormente mencionado. Las semillas obtenidas de capullos florales infectados por *Agrobacterium* se esterilizan con ácido hipoclorico y agua estéril, y se siembran en medio MS complementado con kanamicina 50 µg/ml, y carbenicilina 100 µg/ml. Se seleccionan plantas transgénicas capaces de crecer en medio con kanamicina añadida.

(3) Reducción de la fertilidad de plantas transgénicas

Cuando las plantas resultantes, obtenidas usando el vector binario del (1) anteriormente mencionado en la etapa (2) anterior, se examinan con respecto a sus semillas formadas en las vainas, se observa que el número de semillas se reduce en relación con plantas de tipo silvestre y se crean plantas transgénicas con fertilidad reducida.

Ejemplo 20

Creación de plantas estériles masculinas por expresión específica de órgano reproductor masculino de NtmybB

Las plantas pueden transformarse con plásmidos para expresión conducida por promotor expresable específico de órgano reproductor masculino del gen de NtmybB que reprime la transcripción de genes expresables específicos de fase G2/M. La modificación del crecimiento celular en el órgano reproductor masculino conduce a la inhibición o supresión de la formación de polen normal, permitiendo de este modo la producción de plantas transgénicas con fertilidad de semillas reducida.

(1) Construcción de plásmidos

El gen aplicable para expresión específica de órganos reproductores masculinos detectable incluye el gen de AVP1 de *Arabidopsis thaliana* y el gen de AtNACK2 de *Arabidopsis thaliana*. Las regiones promotoras de estos genes se usan para construir plásmidos. El ADN disponible que codifica cada región promotora de estos genes incluye insertos de regiones promotoras en los plásmidos pENTRAVP1 (AVP1) y pENTR0.6 (AtNACK2), como se desvela en el documento PCT/JP02/12268 (2002). El ADN que codifica NtmybB puede prepararse a partir de OH88. Estos fragmentos de ADN se insertan en el sitio, derivado por retirada del promotor de 35S de CaMV y el gen GUS de pBI121 (Clontech), para crear plásmidos en los que el promotor de AVP1, NtmybB y el terminador de Nos están fusionados de forma operativa, o plásmidos en los que el promotor de AtNACK2, NtmybB y el terminador de Nos están fusionados operativamente. Estos plásmidos son vectores binarios para expresión conducida por el promotor de AVP1 o promotor de AtNACK1 de NtmybB, que permiten la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*.

Las plantas transgénicas resultantes son seleccionables con kanamicina.

(2) Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Los plásmidos resultantes de la etapa (1) anteriormente mencionada se usan para transformar *Agrobacterium tumefaciens*. A continuación, se transforma *Arabidopsis thaliana* de ecotipo Col-0 por el método de inmersión Floral (de la misma manera que en el Ejemplo 8) para transformación mediada por *Agrobacterium* usando *Agrobacterium* que alberga el plásmido anteriormente mencionado. Las semillas obtenidas de capullos florales infectados por *Agrobacterium* se esterilizan con ácido hipoclorico y agua estéril, y se siembran en medio MS complementado con kanamicina 50 µg/ml, y carbenicilina 100 µg/ml. Se seleccionan plantas transgénicas capaces de crecer en medio al

que se ha añadido kanamicina.

(3) Reducción de la fertilidad de plantas transgénicas

- 5 Cuando las plantas resultantes, obtenidas usando el vector binario del (1) anteriormente mencionado en la etapa (2) anterior, se examinan con respecto a sus semillas formadas en las vainas, se observa que el número de semillas se reduce en relación con plantas de tipo silvestre y se crean plantas transgénicas con fertilidad reducida.

Ejemplo 21

10 Modificación del crecimiento y desarrollo en plantas de tabaco transgénicas con expresión reprimida de NtmybA1 y NtmybA2

15 Se usa ARNi para reprimir la expresión de NtmybA1 y NtmybA2 endógenos en plantas de tabaco transgénicas con crecimiento y desarrollo suprimido.

(1) Construcción de plásmidos

20 Se construye ADN uniendo parte del ADN para NtmybA1 o NtmybA2, o ADN para tanto NtmybA1 como NtmybA2 en una configuración de repetición invertida. Cuando los elementos se unen en una repetición invertida, se inserta ADN que codifica GUS como un espaciador entre las repeticiones. Los ADN de repetición invertida resultantes se usan como ADN de ARNi. Se inserta ADN fusionado operativamente que porta el promotor de 35S de CaMV, ADN de ARNi, y el terminador de Nos en el plásmido pBI-RHL. Estos plásmidos son los de expresión conducida por el promotor de 35S de CaMV de ARN en forma bicatenaria que codifica NtmybA1, NtmybA2 o tanto NtmybA1 como NtmybA2, que permiten la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Las plantas transgénicas resultantes son seleccionables con higromicina. En las plantas transgénicas resultantes, la expresión de NtmybA1 o NtmybA2 endógenos, o tanto NtmybA1 como NtmybA2 endógenos se reduce, desencadenado por ARN bicatenario expresado. Es decir, la maquinaria de ARNi se puede obtener en plantas.

30 (2) Transformación de plantas de tabaco

35 Los plásmidos construidos resultantes de la etapa (1) anteriormente mencionada se usan para transformar *Agrobacterium tumefaciens*. A continuación, se transforma *Nicotiana tabacum* ver. SR1 por el método de disco de hoja usando *Agrobacterium* que alberga cada plásmido. Los callos resistentes a higromicina resultantes se diferencian para regenerar plantas transgénicas individuales que permiten la producción de semillas autofertilizadas.

(3) Modificación del crecimiento y desarrollo en plantas transgénicas

40 Las semillas autofertilizadas de las plantas transgénicas resultantes, obtenidas usando el vector binario del (1) anteriormente mencionado en la etapa (2) anterior, se siembran y se cultivan. Cuando se examinan sus estados de crecimiento y desarrollo, se observa que el crecimiento y desarrollo de las plantas de tabaco transgénicas resultantes se suprime, en relación con el de plantas de tipo silvestre.

Ejemplo 22

45 Modulación del crecimiento y desarrollo de plantas de tabaco transformadas por Ntmyb

50 En plantas de tabaco transgénicas que expresan un miembro seleccionado de NtmybA2, NtmybA2T5, NtmybA2T2 y NtmybB endógenos, su crecimiento y desarrollo se inhibe o suprime.

55 En plantas de tabaco transgénicas en las que la expresión de un miembro en forma activadora de la transcripción seleccionado de NtmybA1 endógeno, NtmybA2 endógeno y tanto NtmybA1 como NtmybA2 endógenos, se silencia o se suprime con ARNi, su crecimiento y desarrollo se inhibe o se suprime.

(1) Construcción de plásmidos

60 El plásmido, pRHL (desvelado en el documento PCT/JP02/12268 (2002)), se escindió con Apal, sus extremos se hicieron romos con ADN polimerasa T4 en el extremo protruyente, y después se sometió a autoligamiento para crear pRHL2. El plásmido, pRHL2, se escindió con XhoI, sus extremos se hicieron romos con el fragmento de Klenow en el extremo protruyente, y después se sometieron a autoligamiento para crear pRHL3. El plásmido, pRHL3, se escindió con SpeI, sus extremos se hicieron romos con el fragmento de Klenow en el extremo protruyente y después se sometió a autoligamiento para crear pRHL4.

65 Un fragmento de ADN que portaba el casete ccdB, cortado por escisión con EcoRI de pENTR2B (Invitrogen), se hizo de extremos romos con el fragmento de Klenow en el extremo protruyente y se insertó en el sitio XmnI-BsaAI de pDONR201 (Invitrogen) para crear pDONR201ΔCml. El plásmido que porta un inserto del fragmento de ADN en una

dirección inversa a pDONR201ΔCml se designa "pDONR201 ΔCm3".

Un fragmento de ADN, cortado por escisión con Apal-Smal de pDONR201ΔCml, se insertó en el sitio Apal-Smal de pBluescript™ II (Stratagene) para crear pBS-attP.

5 Un fragmento de ADN, cortado por escisión con EcoRI de pDHu1-1 (presentado por cortesía de Yoshihisa UENO, Escuela de Posgrado de Ciencia, Universidad de Nagoya, Japón), se hizo de extremos romos con el fragmento de Klenow en el extremo protruyente, y después se insertó en el sitio Smal de pRHL4 para crear pRHGUSRiL.

10 Un fragmento de ADN, cortado por escisión con Apal y NruI de pDONR201ΔCm3, se insertó en el sitio, derivado por escisión con Apal y Smal de pRHGUSRiL, para crear pRHGUSRiP1.

15 Se insertó un fragmento de ADN, cortado por escisión con Apal de pBS-attP, formando extremos romos con ADN polimerasa T4 en el extremo protruyente seguido de escisión con SpeI, en el sitio, derivado por escisión con XhoI de pRHGUSRiP1, formando extremos romos con el fragmento de Klenow en el extremo protruyente seguido de escisión con SpeI, para crear pRHGUSRiP2.

20 Se insertó un fragmento de ADN, cortado por escisión con BglII de pRHGUSRiP2, en el sitio, derivado por escisión con BglII de pBI121 seguido de retirada del fragmento de ADN cortado, para crear pBI-GUSRiP1.

25 Se realizó PCR con pBS-VA1A2 como molde como se desvela en el Ejemplo 10 (1), en combinación con el cebador B1T3:

5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATTAACCCTCACTAAAGGG-3' (SEC ID N°: 41)

y

25 cebador B2T7:

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (SEC ID N°: 42)

30 para proporcionar un fragmento de ADN que portaba un segmento de ADN unido en tándem que codificaba parte de NtmybA1 y un segmento de ADN unido en tándem que codificaba parte de NtmybA2, en el que la secuencia attB1 (sistema Gateway™, Invitrogen) se añadió a un extremo y la secuencia attB2 (sistema Gateway™, Invitrogen) al otro extremo. Se somete una mezcla de este fragmento de ADN y plásmido pBI-GUSRiP1 (Invitrogen) a reacción de BP usando BP Clonase™ (Invitrogen) para generar pBIHm-AIA2ARNi en el que el ADN que porta el segmento de ADN unido en tándem que codifica parte de NtmybA1 y el fragmento de ADN unido en tándem que codifica parte de NtmybA2 se insertan en una configuración de repetición invertida en pBI-GUSRiP1

35 Se realiza PCR con pBS-VA1 como molde como se desvela en el Ejemplo 10 (1), en combinación con cebador B1T3:

5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATTAACCCTCACTAAAGGG-3' (SEC ID N°: 41)

y

40 cebador B2T7:

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (SEC ID N°: 42)

45 para proporcionar un fragmento de ADN que porta un segmento de ADN que codifica parte de NtmybA1, en el que la secuencia attB1 (sistema Gateway™, Invitrogen) se añade a un extremo y la secuencia attB2 (sistema Gateway™, Invitrogen) al otro extremo. Se somete una mezcla de este fragmento de ADN y plásmido pBI-GUSRiP1 (Invitrogen) a reacción de BP usando BP Clonase™ (Invitrogen) para generar pBIHm-AIA2ARNi en el que el ADN que porta el segmento de ADN que codifica parte de NtmybA1 se insertan en una configuración de repetición invertida en pBI-GUSRiP1.

50 Se realiza PCR con pBS-VA2 como molde como se desvela en el Ejemplo 10 (1), en combinación con cebador B1T3:

5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATTAACCCTCACTAAAGGG-3' (SEC ID N°: 41)

y

55 cebador B2T7:

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (SEC ID N°: 42)

60 para proporcionar un fragmento de ADN que porta un segmento de ADN que codifica parte de NtmybA2, en el que la secuencia attB1 (sistema Gateway™, Invitrogen) se añade a un extremo y la secuencia attB2 (sistema Gateway™, Invitrogen) al otro extremo. Una mezcla de este fragmento de ADN y el plásmido pBI-GUSRiP1 (Invitrogen) se somete a reacción de BP usando BP Clonase™ (Invitrogen) para generar pBIHm-A2ARNi en el que el ADN que porta el segmento de ADN que codifica parte de NtmybA2 se insertan en una configuración de repetición invertida en pBI-GUSRiP1

65 Es decir, los plásmidos, (i) pBIHm-A1A2ARNi, (ii) pBIHm-A1ARNi y (iii) pBIHm-A2ARNi, son vectores binarios para expresión conducida por el promotor de 35S de CaMV de ARN de forma bicatenaria (i) que codifica tanto NtmybA1 como NtmybA2, (ii) ARN que codifica NtmybA1 y (iii) ARN que codifica NtmybA2, respectivamente, que permite la transformación de plantas mediadas por *Agrobacterium*. Las plantas transgénicas resultantes son seleccionables con higromicina. En las plantas transgénicas resultantes por transformación con un miembro seleccionado de los vectores binarios (i) a (iii), los niveles *in vivo* de tanto NtmybA1 como NtmybA2 endógenos expresados para el vector

(i), NtmybA1 endógeno expresado para el vector (ii), y NtmybA2 endógeno expresado para el vector (iii), disminuyen, desencadenado por ARN bicatenario expresado. Es decir, la maquinaria de ARNi se puede obtener en plantas.

(2) Transformación de plantas de tabaco

5

Se transforman plantas de tabaco con los siguientes plásmidos:

- (i) plásmido pBIHm-A1A2ARNi (el (1) anterior)
- (ii) plásmido pBIHm-A1ARNi (el (1) anterior)
- 10 (iii) plásmido pBIHm-A2ARNi (el (1) anterior)
- (iv) plásmido pBIHm-NtmybA2 (Ejemplo 8 (1))
- (v) plásmido pBIHm-NtmybA2T2 (Ejemplo 8 (1))
- (vi) plásmido pBIHm-NtmybB (Ejemplo 8 (1))
- (vii) plásmido pDBIHm-NtmybA2T5 (Ejemplo 9 (1))
- 15 (viii) plásmido pBIHm-GFP (Ejemplo 8 (1))
- (ix) plásmido pPZP211 (Ejemplo 9 (1))
- (x) plásmido pPCYM-NtmybA2T2 (Ejemplo 9 (1))
- (xi) plásmido pPZP211-35S:A2ARNi (Ejemplo 11 (1))
- (xii) plásmido pPZP-35S:A2 (Ejemplo 12 (1))
- 20 (xiii) plásmido pPZP-35S:A2T2 (Ejemplo 12 (1))

Los plásmidos (i) a (xiii) se usan para transformar *Agrobacterium tumefaciens*. A continuación, se transforma *Nicotiana tabacum* ver. SR1 por el método de disco de hoja usando *Agrobacterium* que alberga cada plásmido. Se producen plantas transgénicas resistentes a higromicina cuando se usan los plásmidos (i) a (viii), mientras que se producen plantas transgénicas resistentes a kanamicina cuando se usan los plásmidos (ix) a (xiii). Los callos resultantes se diferencian para regenerar plantas transgénicas individuales que permiten la producción de semillas autofertilizadas.

25

(3) Modificación del crecimiento y desarrollo en plantas transgénicas

30

Las semillas autofertilizadas de las plantas transgénicas resultantes, obtenidas en la etapa (2) anterior, se siembran y se cultivan. Cuando se examinan sus estados de crecimiento y desarrollo, se observa que el crecimiento y desarrollo de las plantas de tabaco transgénicas resultantes obtenidas usando un miembro seleccionado de los vectores (i) a (vii) del (2) anteriormente mencionado está inhibido o suprimido, en relación con el de las plantas transgénicas obtenidas usando el vector (viii) del (2) anterior, o plantas de tipo silvestre. También se observa que el crecimiento y desarrollo de las plantas de tabaco transgénicas resultantes obtenidas usando un miembro seleccionado de los vectores (x) a (xiii) del (2) anteriormente mencionado se inhibe o se suprime, en relación con el de las plantas transgénicas obtenidas usando el vector (ix) del (2) anterior, o plantas de tipo silvestre.

35

40 Ejemplo 23

Creación de mutantes de NtmybA1, Os3RmybA1, AtMYB3R1 y AtMYB3R4 con capacidad activadora de la transcripción alterada

45

Los miembros de 3Rmyb vegetal en forma activadora de la transcripción, NtmybA1, Os3RmybA1, AtMYB3R1 y AtMYB3R4, pueden truncarse en el extremo C terminal para generar moléculas con capacidad activadora de la transcripción potenciada o moléculas con capacidad activadora de la transcripción reducida. Los sitios o regiones para suprimir pueden determinarse en el Ejemplo 14, y en las Figuras 15 a 18, o Ejemplo 15 y Figuras 19 a 25.

50

Es decir, para NtmybA1, la delección de aminoácidos de restos que abarcan de las posiciones 579 a 1003, 641 a 1003 o 715 a 1003, de la secuencia de aminoácidos de NtmybA1 permitirá la creación de mutantes de NtmybA1 que tienen capacidad activadora de la transcripción potenciada. Para Os3RmybA1, la delección de aminoácidos de restos que abarcan de las posiciones 575 a 993, 635 a 993 o 709 a 993, de la secuencia de aminoácidos de Os3RmybA1 permitirá la creación de mutantes de Os3RmybA1 que tienen capacidad activadora de la transcripción potenciada. Para AtMYB3R1, la delección de aminoácidos de restos que varían de las posiciones 583 a 776, 621 a 776, o 691 a 776, de la secuencia de aminoácidos de AtMYB3R1 permitirá la creación de mutantes de AtMYB3R1 que tienen capacidad activadora de la transcripción potenciada. Para AtMYB3R4, la delección de aminoácidos de restos que varían de las posiciones 570 a 961, 608 a 961 o 667 a 961, de la secuencia de aminoácidos de AtMYB3R4 permitirá la creación de mutantes de AtMYB3R4 que tienen capacidad activadora de la transcripción potenciada.

60

Además, para NtmybA1, la delección de aminoácidos de restos que abarcan de las posiciones 186 a 1003 o 299 a 1003, de la secuencia de aminoácidos de NtmybA1 permitirá la creación de mutantes de NtmybA1 que tienen capacidad activadora de la transcripción reducida. Para Os3RmybA1, la delección de aminoácidos de restos que abarcan de las posiciones 203 a 993 o 257 a 993, de la secuencia de aminoácidos de Os3RmybA1 permitirá la creación de mutantes de Os3RmybA1 que tengan capacidad activadora de la transcripción reducida. Para AtMYB3R1, la delección de aminoácidos de restos que abarcan de las posiciones 187 a 776 o 241 a 776, de la

65

secuencia de aminoácidos de AtMYB3R1 permitirá la creación de mutantes de AtMYB3R1 que tengan capacidad activadora de la transcripción reducida. Para AtMYB3R4, la delección de aminoácidos de restos que varían de las posiciones 181 a 961 o 235 a 961, de la secuencia de aminoácidos de AtMYB3R4 permitirá la creación de mutantes de AtMYB3R4 que tengan capacidad activadora de la transcripción reducida.

La capacidad activadora de la transcripción ejercida por los mutantes anteriormente mencionados puede determinarse según los métodos desvelados en los Ejemplos 3 y 18 controlando los niveles de transcripción conducida por el promotor de NACK1 en condiciones de expresión transitoria en protoplastos BY2. Cada capacidad activadora de la transcripción de estos mutantes de delección se eleva o disminuye, en relación con la de las especies de tipo silvestre.

Ejemplo 24

Inhibición del crecimiento de plantas de tabaco transgénicas que sobreexpresan NtmybA2

(1) Transformación de plantas de tabaco

Se transformó *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA101 con un miembro seleccionado de los plásmidos anteriormente mencionados, pBIHm-NtmybA2 y pBIHm-GFP. A continuación, se transformaron plantas de *Nicotiana tabacum* ver. SR1 por el método de disco de hojas usando *Agrobacterium* que albergaba cada plásmido.

(2) Niveles de expresión de genes transferidos en plantas de tabaco transgénicas

Las plantas resistentes a higromicina resultantes individuales se cultivaron para producir semillas autofertilizadas. Las semillas autofertilizadas resultantes de las líneas transformadas por NtmybA2, AW N° 3 y AW N° 23, y línea transformada por GFP, G N° 3, se sembraron en una maceta de plástico (13 cm) llena de un compuesto de suelo (Kureha-Engei-Baido, Kureha Chemical Industry Co., Ltd.), y se cultivó a 27 °C. Las condiciones de luz incluyeron cultivo durante 18 horas con luz continua, y cultivo durante 6 horas en oscuridad. La expresión de genes transferidos se comprobó por RT-PCR en estas líneas. Se tomaron muestras de hojas terminales no expandidas de 5 plantas individuales por línea, y se realizó amplificación de NtmybA2 de acuerdo con el método del Ejemplo 10 (2) anteriormente mencionado. Los productos de PCR resultantes se analizaron por técnicas electroforéticas en agarosa. Como resultado, los niveles de NtmybA2 expresados aumentaron en las líneas, AW N° 3 y AW N° 23, en relación con la línea, G N° 3 y se verificó la sobreexpresión de genes transferidos en las líneas AW N° 3 y AW N° 23.

(3) Inhibición del crecimiento de plantas de tabaco transformadas por NtmybA2

Se continúa el cultivo de plantas respectivas individuales con NtmybA2, sobreexpresado, verificado en la etapa anteriormente mencionada (2), y se examinó sucesivamente la altura de la hierba y el número de hojas del follaje de las mismas. Como resultado, las plantas individuales con niveles elevados de NtmybA2 expresado, AW N° 3 y AW N° 23, tuvieron una altura de hierba reducida (Figura 32), y un menor tamaño de las hojas, en relación con G N° 3. Se observó que, en AW N° 3 y AW N° 23, los números de hojas verdaderas mostraban una tendencia a reducirse ligeramente (Figura 33). Sus internodos también se acortaron significativamente. Estos hechos indican que las plantas de tabaco transgénicas con expresión conducida por el promotor de 35S de CaMV de NtmybA2 tienen su crecimiento inhibido.

(4) Número de células reducido y células de tamaño reducido en plantas de tabaco transformadas por NtmybA2

La línea de plantas transgénicas AW N° 23, cultivada en la etapa (3) anterior, se comparó con el tabaco de tipo silvestre con respecto a su tamaño de hoja de follaje y células de la epidermis. Para observar las hojas del follaje, se usaron hojas completamente expandidas que se localizaron en la misma posición de hoja entre el tabaco de tipo silvestre y AW N° 23. Cuando se comparó el tamaño de estas hojas, el tamaño de la hoja de AW N° 23 se hizo aproximadamente 80 % más pequeño que el del tabaco de tipo silvestre. Para examinar células de la epidermis en esta hoja, se prepararon muestras de discos de hoja y se fijaron decolorados con una mezcla de etanol:ácido acético (9:1). Las muestras de discos de hojas resultantes se fotografiaron con un microscopio de contraste de interferencia diferencial, y se midió el área de 50 células de la epidermis por cada muestra. Como resultado, el área de la célula se hizo aproximadamente 45 % más pequeño en AW N° 23 que en la planta de tipo silvestre, se desveló que el tamaño de las células se reducía en AW N° 23. A partir de los resultados anteriores, el tamaño de células constituyentes para hojas se hizo 45 % más pequeño en AW N° 23, el tamaño de las hojas se redujo adicionalmente a una tasa de miniaturización mayor, es decir, se hizo 80 % más pequeño, y se cree por lo tanto que la causa de hojas enanas es una reducción en el número de células además de una reducción en el tamaño de las células. También se cree que el número de células se reduce debido a un retardo en el ciclo celular.

Ejemplo 25

Inhibición del crecimiento de plantas de tabaco transgénicas para expresión conducida por el promotor de AtHB8 de *Arabidopsis thaliana* de NtmybA2

5 Se crearon plantas de tabaco transgénicas para expresión conducida por el promotor del gen AtHB8 de *Arabidopsis thaliana* de NtmybA2, y se compararon sus estados de crecimiento y desarrollo.

(1) Construcción de plásmidos para transformación

10 Construcción del plásmido pDBIHm-PAtHB8-NtmybA2

Se realizó una PCR usando ADN del genoma de *Arabidopsis thaliana* como molde en combinación con cebador PAtHB8-1F:

15 5'-AACTGCAGCGGATAAACCAATTTTCAAATGATA-3' (SEC ID N°: 96)

y

cebador PAtHB8-1700R:

5'-CGGGATCCCTTTGATCCTCTCCGATCTCTCTAT-3' (SEC ID N°: 97)

20 para proporcionar un fragmento de ADN que portaba la región promotora del gen de AtHB8 de *Arabidopsis thaliana* (SEC ID N°: 98, promotor AtHB8 N° de Referencia de GenBank AL161582; nucleótidos usados 89580 a 91279). Se realizó una PCR usando OH60 como molde en combinación con

cebador A2-ATG-Bam:

5'-CGGGATCCATGGAAAGTGATAGAATAAGCAC-3' (SEC ID N°: 99)

y

25 cebador A2T2-TAA-Not:

5'-TTTTCTTTTTCGCGCCGCTTAACAGCCTAAATGGAGTAAGACAG-3' (SEC ID N°: 100)

para proporcionar un fragmento de ADN que portaba un segmento para parte de NtmybA2.

30 El producto de PCR, ADN del promotor de AtHB8, se escindió con PstI y BamHI. El fragmento de ADN que portaba un segmento para parte del NtmybA2 se escindió con BamHI y NotI. Estos dos fragmentos de ADN se insertaron en el sitio, derivado por escisión con PstI-NotI de pBluescript (Stratagene), para crear el plásmido pBS-PAtHB8-NtmybA2T2.

35 El plásmido pTH2 (Chiu *et al.*, Curr Biol 1 mar 1996; 6 (3): 325-30) se escindió con EcoRI, sus extremos se hicieron romos con el fragmento de Klenow en el extremo protruyente, y después se escindió con NotI para cortar un fragmento de ADN que portaba el terminador de NOS. El fragmento de ADN resultante se insertó en el sitio, derivado por escisión con NotI-EcoRV del plásmido pENTR2B (Invitrogen), para crear el plásmido pENTR-NOST1.

40 Se insertó un fragmento de ADN, cortado por escisión con Sall-NotI de pBS-PAtHB8-NtmybA2T2, en el sitio, derivado por escisión con Sall-NotI de pENTR-NOST1, para crear el plásmido pENTR-PAtHB8-NtmybA2T2.

45 Se escindió OH60 con Sall, sus extremos se hicieron romos con el fragmento de Klenow en el extremo protruyente, y después se escindió con SpeI para cortar un fragmento de ADN que portaba la región C terminal de NtmybA2. Este fragmento de ADN se insertó en el sitio, derivado por escisión con SpeI-SmaI de pENTR-PAtHB8-NtmybA2T2, para crear el plásmido pENTR-PAtHB8-NtmybA2.

50 Se sometió una mezcla del plásmido pDESTBI-1 (como se ha construido en el Ejemplo 9) y pENTR-PAtHB8-NtmybA2 a recombinación específica de sitio con mezcla de Gateway LR Clonase™ (Invitrogen) para generar pDBIHm-HB8-NtmybA2. La reacción con mezcla de Gateway™ LR Clonase™ se realizó de acuerdo con los protocolos incluidos en el reactivo. El vector, pDBIHm-HB8-NtmybA2, es un vector plasmídico para expresión conducida por el promotor de AtHB8 de NtmybA2 de longitud completa. También es un vector binario que permite la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Las plantas transgénicas son seleccionables con higromicina de plantas transformadas con estos plásmidos.

55 (2) Transformación de plantas de tabaco

El plásmido anteriormente mencionado, pDBIHm-HB8-NtmybA2, se usó para transformar la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA101. A continuación, se transformaron plantas de *Nicotiana tabacum* ver. SR1 y *Nicotiana benthamiana* por el método de disco de hojas usando *Agrobacterium* que albergaba cada uno de estos plásmidos.

60 (3) Inhibición del crecimiento de plantas de tabaco transgénicas que expresan NtmybA2, conducida por el promotor de AtHB8

65 Se producen las semillas autofertilizadas de líneas transformantes respectivas obtenidas del (2) anterior. Estas semillas se siembran en una maceta de plástico (13 cm) llena de un compuesto de suelo (Kureha-Engei-Baido, Kureha Chemical Industry Co., Ltd.), y se cultivan a 27 °C. Las condiciones de luz incluyen cultivo durante 18 horas

con luz continua, y cultivo durante 6 horas en oscuridad. Se inhibe el crecimiento de estas plantas transgénicas, en comparación con plantas de tabaco de tipo silvestre y plantas transformadas por vector de control.

Ejemplo 26

Modificación de la poliploidía de plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas con expresión reprimida de Atmyb3R1 y Atmyb3R4

(1) Construcción de plásmidos para expresión de ARNi de Atmyb3R1 y Atmyb3R4

Para crear plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* para inducción de ARNi para Atmyb3R1 y Atmyb3R4, se construyen plásmidos adecuados. Se amplifican secuencias de ADN que contienen 250 o más pares de bases por PCR de ADNc de Atmyb3R1 como se muestra en la SEC ID N°: 75 y ADNc de Atmyb3R4 como se muestra en la SEC ID N°: 76. Estos dos fragmentos de ADN se unen en tándem para generar una construcción de ADN. Se construyen plásmidos ligando la construcción de ADN resultante en una configuración de repetición invertida que tiene GUS insertado entre las repeticiones de la misma manera que para la construcción de plásmidos como en el Ejemplo 11. Este plásmido es un vector binario que permite no solamente la expresión controlada por el promotor de 35S de CaMV de ADN insertado sino también transformación mediada por *Agrobacterium* de plantas de *Arabidopsis thaliana*, en el que los transformantes resultantes son seleccionables con kanamicina. La maquinaria de ARNi se obtiene con ARN expresado por el gen transferido en plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con este plásmido, conduciendo de este modo a una reducción en los niveles de Atmyb3R1 y Atmyb3R4 expresados.

(2) Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Se transforma *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 por el método de inmersión Floral (de forma similar al Ejemplo 8) usando *Agrobacterium* que alberga el plásmido construido en la etapa (1) anteriormente mencionada. Se esterilizan semillas autofertilizadas obtenidas de plantas infectadas por *Agrobacterium* con etanol y ácido hipocloroso, y se aclaran bien con agua destilada estéril. Estas semillas se cultivan en medio agar MS complementado con kanamicina a una concentración de 50 µg/ml. Las plantas transgénicas son seleccionables como individuos resistentes a kanamicina.

(3) Cambio en la endopoliploidía de plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas

Los transformantes vegetales resultantes seleccionados en la etapa (2) anteriormente mencionada se plantan en una maceta y se cultivan. Las semillas autofertilizadas obtenidas de estas plantas transgénicas se esterilizan con etanol y ácido hipocloroso, y se aclaran bien con agua destilada estéril. Estas semillas se cultivan en medio de agar MS complementado con kanamicina a una concentración de 50 µg/ml. Los niveles de contenido de ADN nuclear se miden usando hojas en roseta de plantas individuales resistentes a kanamicina cultivadas de la misma manera que en el Ejemplo 11. Ya que *Arabidopsis thaliana* es una planta diploide, se observan picos 2C y 4C, y más picos 8C y 16 C que indican un nivel de contenido de ADN nuclear aumentado debido a la endoreduplicación cuando se mide el nivel de contenido de ADN en *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre. Pueden identificarse plantas individuales con endopoliploidía aumentada ensayando el nivel de contenido de ADN nuclear en plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas con niveles reducidos de Atmyb3R1 y Atmyb3R4 expresados, afectados por la maquinaria de ARNi. Puede determinarse que las plantas individuales en las que no se observan picos 2C (detectables en el tipo silvestre) son tetraploides. Puede determinarse que las plantas individuales en las que desaparecen picos 2C y 4C y son detectables picos 8C y 16 C son octaploides.

Aplicabilidad industrial

Se proporcionan técnicas para regular el ciclo celular que es importante para el cultivo de plantas, y para modificar la proliferación de células vegetales, y técnicas para modificar el desarrollo/diferenciación de plantas individuales. Se proporcionan genes vegetales útiles para la regulación del crecimiento de células vegetales y la regulación del desarrollo y diferenciación de plantas individuales y sus tecnologías de aplicación. Pueden desarrollarse nuevas líneas vegetales y técnicas de cultivo de plantas utilizando las tecnologías. En particular, se proporcionan tecnologías para modificar o regular las funciones de genes de 3Rmyb vegetales, nuevos genes mutantes de 3Rmyb que tienen funciones modificadas, sus productos génicos y moléculas relacionadas. También se proporcionan variantes de proteínas 3Rmyb vegetales que mejoran drásticamente en funciones activadoras de la transcripción y moléculas que actúan de forma negativa dominante contra transcritos de genes de 3Rmyb vegetales, y pueden desarrollarse tecnologías que las utilizan. Además, dirigiéndose a dichos genes, se proporcionan tecnologías para modificar la proliferación de células vegetales y tecnologías para modificar el desarrollo/diferenciación de plantas individuales. Por lo tanto, pueden obtenerse células vegetales y plantas que conservan crecimiento de células y desarrollo/diferenciación modificados, y pueden desarrollarse plantas que tengan propiedades deseables, tales como agrandamiento de órganos específicos, esterilidad masculina o resistencia a la tensión mejorada.

<Texto libre de listado de secuencias>

- SEC ID Nº: 1, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR, n significa inosina en las posiciones 3, 6 y 15 y para cualquier base en la posición 21
- 5 SEC ID Nº: 2, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR, n significa inosina
SEC ID Nº: 3, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR, n significa inosina
SEC ID Nº: 4, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR, n significa inosina
SEC ID Nº: 5, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR, n significa inosina
SEC ID Nº: 6, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR, n significa inosina
- 10 SEC ID Nº: 7, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR, Cebador T7
SEC ID Nº: 11, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 12, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 13, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 14, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
- 15 SEC ID Nº: 15, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR, cebador T3
SEC ID Nº: 16, n significa cualquier base
SEC ID Nº: 18, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 19, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 20, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
- 20 SEC ID Nº: 21, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 24, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 25, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 26, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 27, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
- 25 SEC ID Nº: 28, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 29, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 30, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 31, ORF de Os3RmybA1
SEC ID Nº: 33, Cebador de RT-PCR para NtmybA1/A2
- 30 SEC ID Nº: 34, Cebador de RT-PCR para NtmybA1/A2
SEC ID Nº: 35, Cebador de RT-PCR para EF1 α
SEC ID Nº: 36, Cebador de RT-PCR para EF1 α
SEC ID Nº: 37, Cebador de PCR para ADN de VIGS A1
SEC ID Nº: 38, Cebador de PCR para ADN de VIGS A1
- 35 SEC ID Nº: 39, Cebador de PCR para ADN de VIGS A2
SEC ID Nº: 40, Cebador de PCR para ADN de VIGS A2
SEC ID Nº: 41, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 42, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 43, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
- 40 SEC ID Nº: 44, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 45, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 46, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 47, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 48, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
- 45 SEC ID Nº: 50, Nº de Referencia de DDBJ AB056122, NtmybA1 (Nº de Referencia de DDBJ BAB70510)
SEC ID Nº: 52, Nº de Referencia de DDBJ AB056123, NtmybA2 (Nº de Referencia de DDBJ BAB70511)
SEC ID Nº: 54, Nº de Referencia de DDBJ AB056124, NtmybB (Nº de Referencia de DDBJ BAB70512)
SEC ID Nº: 56, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 57, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
- 50 SEC ID Nº: 58, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 59, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 60, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 61, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 62, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
- 55 SEC ID Nº: 63, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 64, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 65, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 66, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 67, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
- 60 SEC ID Nº: 68, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 69, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 70, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 71, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 72, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
- 65 SEC ID Nº: 73, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 74, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

- SEC ID N°: 84, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 SEC ID N°: 85, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 SEC ID N°: 86, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 SEC ID N°: 87, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 5 SEC ID N°: 89, Secuencia de aminoácidos diseñada
 SEC ID N°: 90, Secuencia de aminoácidos diseñada, X significa cualquier resto de aminoácido
 SEC ID N°: 91, Secuencia de aminoácidos diseñada, X significa cualquier resto de aminoácido
 SEC ID N°: 92, Secuencia de aminoácidos diseñada, X significa cualquier resto de aminoácido en las posiciones
 10 3, 4, 7 y 8, S o T en la posición 2, D o E en la posición 6 y L o I o V en la posición 9
 SEC ID N°: 93, Secuencia de aminoácidos diseñada, X significa H, W, Y o F en 16 y 93, K, H o R en 19, 67, 102,
 123, 129, 134 y 150, S, T, G, C o A en 32, 54, 77, 135, 138 y 146, D o E en 33 y 110, L, I o V en 34, 49, 61, 65,
 76 y 127 y cualquier resto en otros
 SEC ID N°: 94, Secuencia de aminoácidos diseñada, X significa K o R en 4 y 17, L o V en 11, S o T en 12, L, I o
 V en 14, D o E en 16 y 20 y cualquier resto de aminoácido en otros
 15 SEC ID N°: 95, Secuencia de aminoácidos diseñada, X significa K o R o D o E o H en la posición 7 y cualquier
 resto de aminoácido en la posición 5
 SEC ID N°: 96, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 SEC ID N°: 97, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 SEC ID N°: 99, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 20 SEC ID N°: 100, Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd.
 <120> Células vegetales y cuerpos vegetales con crecimiento, desarrollo y diferenciación de células modificados
 <130> IS-09PCT
 30 <150> JP 2003-66064
 <151> 12-03-2003
 <160> 100
 35 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 24
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR, n significa inosina en las posiciones 3, 6 y 15 y
 cualquier base en la posición 21
 45 <220>
 <221> misc feature
 <222> (3)..(3)
 <223> I
 50 <220>
 <221> misc feature
 <222> (6).. (6)
 <223> I
 55 <220>
 <221> misc feature
 <222> (15)..(15)
 <223> I
 60 <220>
 <221> misc feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n significa cualquier base
 65 <400> 1

gangtncart gyywncaymg ntgg 24

5 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR, n significa inosina

15 <220>
 <221> misc feature
 <222> (10)..(10)
 <223> I

20 <220>
 <221> misc feature
 <222> (13)..(13)
 <223> I

25 <400> 2
 ytytttdavn ganswr tkcc a 21

30 <210> 3
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR, n significa inosina

40 <220>
 <221> misc feature
 <222> (9)..(9)
 <223> I

45 <220>
 <221> misc feature
 <222> (15)..(15)
 <223> I

50 <400> 3
 cartgyytnc aymngtggca raarg 25

55 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR, n significa inosina

65 <220>
 <221> misc feature
 <222> (3)..(3)
 <223> I

70 <220>
 <221> misc feature
 <222> (6)..(6)
 <223> I

75 <400> 4
 acnswns wrt tccarttrtg ytt 23

80 <210> 5

<211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR, n significa inosina

10

<220>
 <221> misc feature
 <222> (6)..(6)
 <223> I

15

<220>
 <221> misc feature
 <222> (18)..(18)
 <223> I

20

<220>
 <221> misc feature
 <222> (21)..(21)
 <223> I

25

<400> 5
 caymgntggc araargtnyt nraycc 26

30

<210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <221> misc feature
 <222> (2)..(2)
 <223> I

40

<220>
 <221> misc feature
 <222> (8)..(8)
 <223> I

45

<220>
 <221> misc feature
 <222> (11)..(11)
 <223> I

50

<220>
 <221> misc feature
 <222> (14)..(14)
 <223> I

55

<220>
 <221> misc feature
 <222> (17)..(17)
 <223> I

60

<220>
 <221> misc feature
 <222> (20)..(20)
 <223> I

65

<220>
 <221> misc feature
 <222> (23)..(23)

ES 2 531 479 T3

<223> I

<400> 6
 hngcrtntc nswncnkccn kгна 24

5

<210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR, cebador T7

<400> 7
 taatacgact cactataggg 20

15

<210> 8
 <211> 228
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

20

<400> 8

 cācagggtggc aaaaggttct aaaccctgaa ttagtcaaag ggccatggtc caaagaagaa 60
 gatgāaatca ttgttcagat ggtaaacaaa cttggaccaa agaaatggtc aaccattgct 120

 caagcittgc ctggacgtat aggaaagcaa tgtcgagaac ggtggtacaa ccatctaac 180
 cctggcataa acaaggaggc atggacacaa gaagaggaaa ttaccctc 228

25

<210> 9
 <211> 305
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

30

<400> 9

 caccggtggc agaaagtgct ggatcctgaa ttggtcaaag ggccatggtc caaagaagaa 60
 gatgacatca ttgittcagat ggtaaacaaa cttgggcaa agaaatggtc aaccattgct 120
 caagcittgc ctggacgtat aggaaagcaa tgtcggaac ggtggcacia ccatctaac 180
 cctggcataa acaaggaggc atggacacaa gaagaggaaa ttaccctcat acatgctcat 240
 cgaatgtatg gaaataaatg ggctgagttg acagaatttt tccacggccg ctccgacaac 300
 gccga 305

35

<210> 10
 <211> 305
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

40

<400> 10

ES 2 531 479 T3

cataggtggc agaaggtgct ggaccctgaa ttggtcaaag ggccatggtc caaagaagaa 60
gatgacatca ttgttcagat ggtaaacaaa ctggaccaa agaaatggtc aaccattgct 120
caagctttgc ctggacgtat aggaaagcaa tgtcggggac ggtggcacia ccatettaac 180
cctggcgtaa acaaggaggc atggacacia gaagaggaaa ttaccctcat acatgctcat 240
cgaatgtatg gaaataaatg ggctgagctg acaaaatfff tccacggccg taccgacaac 300
gccta 305

5 <210> 11
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

<400> 11
cagctcggcc catttattc catacatt 28

15 <210> 12
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

<400> 12
cgactggagc acgaggacac tga 23

25 <210> 13
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

35 <400> 13
cttctgtgt ccatgcctcc ttgttat 28

40 <210> 14
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

<400> 14
ggacactgac atggactgaa ggagta 26

50 <210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR, cebador T3

ES 2 531 479 T3

<400> 15
aattaaccct cactaaaggg 20

5 <210> 16
<211> 726
<212> ADN
<213> *Oryza sativa*

10 <220>
<221> misc feature
<222> (542)..(542)
<223> n significa cualquier base

15 <400> 16
acgctctgaa attgaaatc gcagacgagg cgagacgaag acgaagagga agagcaagag 60

ctagggtag gaggaggcga ttgctccgc ccgcagatcg gatccccac ctgctctcgc 120
ccccgatctc gctgtattcc ttgaagcaac tccctgaagg ccttactcag gcttgaccgt 180
ataatgattt ttatatccct tagaggtttc tattgcaaag tgaggattga atgtcttcag 240
tcatgatgac aagcgacaac ggaaaggctc cagagaaggg tggagaagct tctggacctt 300
catcagctcc ccaagaaggt gaaatcagca atgaaccaca aaggcgccgg ccgctcagtg 360
ggaggaccac tggccaaca cggcgttcca cgaaaggaaa ttggaccect gaagaggatt 420
ccatattgtc cagagctgtt cagacatata aagggaggaa ttggaaaaaa atagcggaat 480
gttttccgga tagaaccgat gtacaatgct tgcacaggtg gcaaaagggt ctaaaccctg 540
anttggtaa agggccatgg tccaaagaag aagatgacat cattgttcag atggtaaaca 600
aacttgacc aaagaaatgg tcaaccattg ctcaagcttt gcctggacgt ataggaaagc 660
aatgtcggga acggtggcac aaccatctta accctggcat aaacaaggag gcatggacac 720
aagaag 726

20 <210> 17
<211> 574
<212> ADN
<213> *Oryza sativa*

25 <400> 17

cctgaaggcc tcaactgaggc ttgacagtat aatgatTTTT atatcccttg gaggtttcta 60
 ctgcaaagtg aggattgatt gtcttcactc atgatgacaa gcgataacgg aaaggctcca 120
 gataaggatg gagagccttc tggacctccg tcggtcctc aagaaggaga aatcagcaat 180
 gaaccaaaaa ggcgacgacc tctcaatggg aggaccaccg gtccgacacg gcgttccacc 240
 aaaggaaatt ggaccctga agaggatgcc atattgtcca gagctgttca gacatacaac 300
 gggaagaact ggaaaaaat agcggaatgc tttccggata gaaccgatgt acaatgcttg 360
 cacaggtggc aaaaggttct aaaccctgaa ttagtcaaag ggccatggtc caaagaagaa 420
 gatgaaatca ttgttcagat ggtaaacaaa cttggaccaa agaaatggtc aaccattgct 480
 caagctttgc ctggacgtat aggaaagcaa tgtcgagaac ggtggtacaa ccatcttaac 540
 cctggcataa acaaggaggc atggacacaa gaag 574

5 <210> 18
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

<400> 18
 aggaggcatg gacacaagaa gaggaaat 28

15 <210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

<400> 19
 gctgtcaacg atacgctacg taacg 25

25 <210> 20
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

35 <400> 20
 ggaaataaat gggccgagct gacaaaat 28

40 <210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

45 <400> 21
 cgctacgtaa cggcatgaca gtc 23

5 <210> 22
 <211> 757
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

<400> 22

```

ggaaataaat gggccgagct gacaaaattt ttaccaggaa ggacggacaa ttcaattaa 60
aatcactgga acagttcagt aaagaagaaa gtcaattcat acatgtcatc aggtttactt 120
acccaagttt cgtgtctccc tctaaatgaa tattctgcaa attgtaattc ctcaccagcg 180
atgaccogac aaaacagtga agatagtggg tgttttctg tccgagaggt tgaaaattca 240
tcagggtgta gtcaatcatc acttgccaag gtttcttctt cccaagtgca tgatactact 300

gtgccattgg gctgtgattt gcaagtaaac gcgaatttg acaagaatga agcacatgat 360
tctcaatctt ccatgggtcc ccaagcatgc tatactctcg cggaggctgt tgcatctgct 420
ttgectgctg tgcattgcca tgtttcttcc tctaacttgg atccagatca acacttgcaa 480
gaggactttg ctcaaggact gaatttggac atgactatag atgaaatgcc aactgttctt 540
agttttgcag acaaccagac tgtttgtagt atagaaaatc atgaaagatc tctggagcca 600
tatgatgtag caatggaggt gcctctctct atgttatcaa gtgattctgg agctgagcaa 660
aaactacatt tcatgtctga ggctgacttc aacagtccta actgtctgaa atctgaacte 720
tggcaggata tttccttaca gggccttctt tctggac 757
  
```

10 <210> 23
 <211> 209
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

15 <400> 23

```

ggcagagggt agagtcttgg atttcgagtg taccacacct gaaagatcat cagacaaaaa 60
tgctggcagc aatctgggaa gatatctgag ctcacctatt ccttctccc atcttctgaa 120
aagttttaga tagcttgata taccatgtga ggaatacacc tcagacttgc tgaacaatc 180
attatgCGaa cgatcttggt cattaccgt 209
  
```

20 <210> 24
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

<400> 24
 30 tgtcttcagt catgatgaca agcga 25

<210> 25

ES 2 531 479 T3

<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

<400> 25
caagctatct aaaacttttc agaagatgg 29

10 <210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

20 <400> 26
gatcaacact tgcaagagga 20

<210> 27
<211> 21
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

30 <400> 27
acagggcctt cttttctgga c 21

<210> 28
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

40 <400> 28
agcatacctg aatgtgggga 20

<210> 29
<211> 20
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

50 <400> 29
tactcatgat gaaagcacgg 20

<210> 30
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

<400> 30
atctcctca catggaagtc 20

65 <210> 31

<211> 2996
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

5 <220> <221> CDS
 <222> (11).. (2992)
 <223> ORF de Os3RmybAl

<400> 31

10

tgtcttcgtc	atg atg aca agc gat aac gga aag gct cca gat aag gat	49
	Met Met Thr Ser Asp Asn Gly Lys Ala Pro Asp Lys Asp	
	1 5 10	
gga gag cct tct gga cct ccg tgc gct cct caa gaa gga gaa atc agc	97	
Gly Glu Pro Ser Gly Pro Pro Ser Ala Pro Gln Glu Gly Glu Ile Ser		
	15 20 25	
aat gaa cca aaa agg cga cga cct ctc aat ggg agg acc acc ggt ccg	145	
Asn Glu Pro Lys Arg Arg Arg Pro Leu Asn Gly Arg Thr Thr Gly Pro		
	30 35 40 45	
aca cgg cgt tcc acc aaa gga aat tgg acc cct gaa gag gat gcc ata	193	
Thr Arg Arg Ser Thr Lys Gly Asn Trp Thr Pro Glu Glu Asp Ala Ile		
	50 55 60	
ttg tcc aga gct gtt cag aca tac aac ggg aag aac tgg aaa aaa ata	241	
Leu Ser Arg Ala Val Gln Thr Tyr Asn Gly Lys Asn Trp Lys Lys Ile		
	65 70 75	
gcg gaa tgc ttt ccg gat aga acc gat gta caa tgc ttg cac agg tgg	289	
Ala Glu Cys Phe Pro Asp Arg Thr Asp Val Gln Cys Leu His Arg Trp		
	80 85 90	
caa aag gtt cta aac cct gaa tta gtc aaa ggg cca tgg tcc aaa gaa	337	
Gln Lys Val Leu Asn Pro Glu Leu Val Lys Gly Pro Trp Ser Lys Glu		
	95 100 105	
gaa gat gaa atc att gtt cag atg gta aac aaa ctt gga cca aag aaa	385	
Glu Asp Glu Ile Ile Val Gln Met Val Asn Lys Leu Gly Pro Lys Lys		
	110 115 120 125	
tgg tca acc att gct caa gct ttg cct gga cgt ata gga aag caa tgt	433	
Trp Ser Thr Ile Ala Gln Ala Leu Pro Gly Arg Ile Gly Lys Gln Cys		
	130 135 140	
cga gaa cgg tgg tac aac cat ctt aac cct ggc ata aac aag gag gca	481	
Arg Glu Arg Trp Tyr Asn His Leu Asn Pro Gly Ile Asn Lys Glu Ala		
	145 150 155	
tgg aca caa gaa gag gaa att acc ctc ata cat gct cat cga acg tat	529	
Trp Thr Gln Glu Glu Glu Ile Thr Leu Ile His Ala His Arg Thr Tyr		
	160 165 170	
gga aat aaa tgg gcc gag ctg aca aaa ttt tta cca gga agg acg gac	577	

Gly	Asn	Lys	Trp	Ala	Glu	Leu	Thr	Lys	Phe	Leu	Pro	Gly	Arg	Thr	Asp	
	175					180					185					
aat	tca	att	aaa	aat	cac	tgg	aac	agt	tca	gta	aag	aag	aaa	gtc	aat	625
Asn	Ser	Ile	Lys	Asn	His	Trp	Asn	Ser	Ser	Val	Lys	Lys	Lys	Val	Asn	205
190					195					200						
tca	tac	atg	tca	tca	ggt	tta	ctt	acc	caa	gtt	tcg	tgt	ctc	cct	cta	673
Ser	Tyr	Met	Ser	Ser	Gly	Leu	Leu	Thr	Gln	Val	Ser	Cys	Leu	Pro	Leu	
				210					215					220		
aat	gaa	tat	tct	gca	aat	tgt	aat	tcc	tca	cca	gcg	atg	acc	caa	caa	721
Asn	Glu	Tyr	Ser	Ala	Asn	Cys	Asn	Ser	Ser	Pro	Ala	Met	Thr	Gln	Gln	
			225					230					235			
aac	agt	gaa	gat	agt	ggt	tgt	ttt	gct	gtc	cga	gag	ggt	gaa	aat	tca	769
Asn	Ser	Glu	Asp	Ser	Gly	Cys	Phe	Ala	Val	Arg	Glu	Val	Glu	Asn	Ser	
		240					245					250				
tca	ggg	tgt	agt	caa	tca	tca	ctt	gcc	aag	gtt	tct	tgc	tcc	caa	gtg	817
Ser	Gly	Cys	Ser	Gln	Ser	Ser	Leu	Ala	Lys	Val	Ser	Cys	Ser	Gln	Val	
	255					260					265					
cat	gat	act	act	gtg	cca	ttg	ggc	tgt	gat	ttg	caa	gta	aac	gcg	aat	865
His	Asp	Thr	Thr	Val	Pro	Leu	Gly	Cys	Asp	Leu	Gln	Val	Asn	Ala	Asn	285
270					275					280						
ttt	gac	aag	aat	gaa	gca	cat	gat	tct	caa	tct	tcc	atg	ggt	ccc	caa	913
Phe	Asp	Lys	Asn	Glu	Ala	His	Asp	Ser	Gln	Ser	Ser	Met	Gly	Pro	Gln	
			290						295					300		
gca	tgc	tat	act	tct	gcg	gag	gct	gtt	gca	tct	gct	ttg	cct	gct	gtg	961
Ala	Cys	Tyr	Thr	Ser	Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Leu	Pro	Ala	Val	
			305					310					315			
cat	tgc	cat	gtt	tct	tcc	tct	aac	ttg	gat	cca	gat	caa	cac	ttg	caa	1009
His	Cys	His	Val	Ser	Ser	Ser	Asn	Leu	Asp	Pro	Asp	Gln	His	Leu	Gln	
		320					325					330				
gag	gac	ttt	gct	caa	gga	ctg	aat	ttg	gac	atg	act	ata	gat	gaa	atg	1057
Glu	Asp	Phe	Ala	Gln	Gly	Leu	Asn	Leu	Asp	Met	Thr	Ile	Asp	Glu	Met	
	335					340					345					
cca	act	gtt	cct	agt	ttt	gca	gac	aac	cag	act	gtt	tgt	agt	ata	gaa	1105
Pro	Thr	Val	Pro	Ser	Phe	Ala	Asp	Asn	Gln	Thr	Val	Cys	Ser	Ile	Glu	365
350					355					360						
aat	cat	gaa	aga	tct	ctg	gag	cca	tat	gat	gta	gca	atg	gag	gtg	cct	1153
Asn	His	Glu	Arg	Ser	Leu	Glu	Pro	Tyr	Asp	Val	Ala	Met	Glu	Val	Pro	
				370					375					380		
ctc	tct	atg	tta	tca	agt	gat	tct	gga	gct	gag	caa	aaa	cta	cat	ttc	1201
Leu	Ser	Met	Leu	Ser	Ser	Asp	Ser	Gly	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	His	Phe	
			385					390					395			
atg	tct	gag	gct	gac	ttc	aac	agt	cct	aac	tgt	ctg	aaa	tct	gaa	ctc	1249
Met	Ser	Glu	Ala	Asp	Phe	Asn	Ser	Pro	Asn	Cys	Leu	Lys	Ser	Glu	Leu	
		400					405					410				

tgg Trp	cag Gln 415	gat Asp	att Ile	tcc Ser	tta Leu	cag Gln 420	ggc Gly	ctt Leu	ctt Leu	tct Ser	gga Gly 425	cct Pro	gat Asp	gca Ala	gtt Val	1297
gaa Glu 430	gct Ala	gat Asp	tca Ser	att Ile	tca Ser 435	aga Arg	tca Ser	aat Asn	cac His	caa Gln 440	tcg Ser	gat Asp	gta Val	tat Tyr	tcc Ser 445	1345
tct Ser	gaa Glu	gca Ala	gat Asp	acc Thr 450	cat His	ttt Phe	tta Leu	gca Ala 455	cca Pro	ccc Pro	tac Tyr	atg Met	cca Pro 460	cag Gln	aca Thr	1393
tca Ser	aat Asn	tct Ser	tca Ser 465	agt Ser	gtg Val	atg Met	ggg Gly	ctt Leu 470	gct Ala	gat Asp	gac Asp	cag Gln	agt Ser 475	cca Pro	cag Gln	1441
atg Met	tca Ser	gta Val 480	cct Pro	cca Pro	tct Ser	ctt Leu	att Ile 485	tgt Cys	tca Ser	aat Asn	gct Ala	atg Met 490	act Thr	gat Asp	gat Asp	1489
gca Ala 495	cct Pro	ttc Phe	gat Asp	aat Asn	aga Arg	cca Pro 500	ggg Gly	cgg Arg	aag Lys	gaa Glu	atg Met 505	cca Pro	ctt Leu	tct Ser	cag Gln	1537
gca Ala 510	gaa Glu	gtg Val	gtt Val	acc Thr	caa Gln 515	tct Ser	tcc Ser	agt Ser	tct Ser	tct Ser 520	ggt Gly	gat Asp	gct Ala	gaa Glu	atg Met 525	1585
ttt Phe	gct Ala	aac Asn	cct Pro	ggt Gly 530	tgt Cys	agc Ser	aat Asn	gac Asp	aga Arg 535	cat His	gtt Val	cct Pro	tct Ser	tca Ser 540	acg Thr	1633
atg Met	gaa Glu	agc Ser	ata Ile 545	cct Pro	gaa Glu	tgt Cys	ggg Gly	gac Asp 550	caa Gln	cag Gln	gtt Val	act Thr	aat Asn 555	gcg Ala	gaa Glu	1681
gaa Glu	cct Pro	gaa Glu 560	gcc Ala	agt Ser	cta Leu	gag Glu	aaa Lys 565	gaa Glu	cca Pro	tcg Ser	ctt Leu	aca Thr 570	cag Gln	agt Ser	gtg Val	1729
act Thr	gca Ala 575	cca Pro	gat Asp	gaa Glu	cag Gln	gac Asp 580	aag Lys	gga Gly	gcc Ala	ctc Leu	ttc Phe 585	tac Tyr	gaa Glu	cct Pro	cct Pro	1777
cgt Arg 590	ttt Phe	cca Pro	agc Ser	ctg Leu	gat Asp 595	gtt Val	cca Pro	ttt Phe	gtc Val	agt Ser 600	tgc Cys	gat Asp	ctt Leu	gta Val	acc Thr 605	1825
tct Ser	ggt Gly	gat Asp	ctc Leu	caa Gln 610	gag Glu	ttt Phe	agt Ser	ccc Pro	ctt Leu 615	ggc Gly	att Ile	cgg Arg	cag Gln	tta Leu 620	atg Met	1873
cat His	tca Ser	acc Thr	atg Met 625	aat Asn	gtc Val	tgc Cys	acg Thr	cca Pro 630	atg Met	aga Arg	ttg Leu	tgg Trp	ggc Gly 635	tcc Ser	cct Pro	1921
act	cat	gat	gaa	agc	acg	ggc	gtt	ttg	ctg	aag	agt	gct	gcc	aaa	agc	1969

Thr	His	Asp	Glu	Ser	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Lys	Ser	Ala	Ala	Lys	Ser		
		640					645					650					
ttc	ata	tcg	acg	cca	tca	ata	ctg	aag	aaa	cgt	cac	aga	gat	ctc	ttg		2017
Phe	Ile	Cys	Thr	Pro	Ser	Ile	Leu	Lys	Lys	Arg	His	Arg	Asp	Leu	Leu		
	655					660					665						
tct	cct	att	cca	gat	aaa	aga	atc	gag	aag	aaa	tat	ggg	act	gaa	aag		2065
Ser	Pro	Ile	Pro	Asp	Lys	Arg	Ile	Glu	Lys	Lys	Tyr	Gly	Thr	Glu	Lys		
670					675					680					685		
gat	cgt	ggg	gta	tca	gac	aca	tcc	tcc	acc	ggc	att	caa	aca	agt	tgt		2113
Asp	Arg	Gly	Val	Ser	Asp	Thr	Ser	Ser	Thr	Gly	Ile	Gln	Thr	Ser	Cys		
				690					695					700			
atc	aat	gcc	act	aaa	gat	gat	gca	ctt	ata	act	aca	gtt	ttg	cgt	att		2161
Ile	Asn	Ala	Thr	Lys	Asp	Asp	Ala	Leu	Ile	Thr	Thr	Val	Leu	Arg	Ile		
			705					710					715				
gag	cga	tct	gct	tct	tct	aaa	tct	ctg	gaa	aag	aaa	ctt	gtt	ttc	tct		2209
Glu	Arg	Ser	Ala	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Glu	Lys	Lys	Leu	Val	Phe	Ser		
		720				725						730					
gat	gaa	aac	aag	gaa	aat	ttg	ggc	tac	aca	act	gaa	cag	aca	aaa	gat		2257
Asp	Glu	Asn	Lys	Glu	Asn	Leu	Gly	Tyr	Thr	Thr	Glu	Gln	Thr	Lys	Asp		
	735					740					745						
gga	cag	agt	gct	gga	aat	gac	gaa	cac	atg	gac	gag	cag	aca	aca	ggg		2305
Gly	Gln	Ser	Ala	Gly	Asn	Asp	Glu	His	Met	Asp	Glu	Gln	Thr	Thr	Gly		
750				755						760					765		
gaa	cgc	agt	tct	gca	aca	aat	gta	gct	act	aat	gat	gac	ctg	tca	ggc		2353
Glu	Arg	Ser	Ser	Ala	Thr	Asn	Val	Ala	Thr	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	Gly		
				770					775					780			
aat	tta	caa	cct	gca	ggt	att	ctt	att	gaa	cac	agc	ggc	gat	gat	ccc		2401
Asn	Leu	Gln	Pro	Ala	Gly	Ile	Leu	Ile	Glu	His	Ser	Gly	Asp	Asp	Pro		
			785				790						795				
att	tcc	cca	gat	tat	ggc	aaa	aat	acc	atg	aat	cag	aag	ctg	aac	aca		2449
Ile	Ser	Pro	Asp	Tyr	Gly	Lys	Asn	Thr	Met	Asn	Gln	Lys	Leu	Asn	Thr		
		800					805					810					
aat	gtg	aaa	tct	tta	tca	gtc	tgt	aag	gag	gga	gtg	tgt	gct	aaa	tca		2497
Asn	Val	Lys	Ser	Leu	Ser	Val	Cys	Lys	Glu	Gly	Val	Cys	Ala	Lys	Ser		
	815					820					825						
aag	ccc	act	gaa	ctc	atc	gtg	gag	aaa	tct	tca	cca	tgt	ata	aat	gtg		2545
Lys	Pro	Thr	Glu	Leu	Ile	Val	Glu	Lys	Ser	Ser	Pro	Cys	Ile	Asn	Val		
830				835						840					845		
gat	tat	gaa	tat	gtg	aac	ata	ttg	gct	gat	acc	cca	ggt	atc	aaa	aga		2593
Asp	Tyr	Glu	Tyr	Val	Asn	Ile	Leu	Ala	Asp	Thr	Pro	Gly	Ile	Lys	Arg		
				850					855					860			
gga	cta	gaa	tct	cct	tca	gca	tgg	aag	tcc	cct	tgg	ttc	gtc	gat	atg		2641
Gly	Leu	Glu	Ser	Pro	Ser	Ala	Trp	Lys	Ser	Pro	Trp	Phe	Val	Asp	Met		
			865					870					875				

cat ttt cag ggt tca tac ttc acc agc cca gct gat agt tac gac gca 2689
 His Phe Gln Gly Ser Tyr Phe Thr Ser Pro Ala Asp Ser Tyr Asp Ala
 880 885 890

cta gga ttg atg aag cag ata aat gtg cag act gct gct gct ttg gtg 2737
 Leu Gly Leu Met Lys Gln Ile Asn Val Gln Thr Ala Ala Ala Leu Val
 895 900 905

gaa gcc cgt gag gta ctg gca agc ggc ggc caa tgt gac aac ata agc 2785
 Glu Ala Arg Glu Val Leu Ala Ser Gly Gly Gln Cys Asp Asn Ile Ser
 910 915 920 925

tct gat aag gaa aac acg ggg aat cca gat gcc aag aag gaa cca ggg 2833
 Ser Asp Lys Glu Asn Thr Gly Asn Pro Asp Ala Lys Lys Glu Pro Gly
 930 935 940

aca acc aaa ttg caa aca aaa atc atg gca gag ggt aga gtc ctg gat 2881
 Thr Thr Lys Leu Gln Thr Lys Ile Met Ala Glu Gly Arg Val Leu Asp
 945 950 955

ttc gag tgt acc aca cct gaa aga tca tca gac aaa aat gct ggc agc 2929
 Phe Glu Cys Thr Thr Pro Glu Arg Ser Ser Asp Lys Asn Ala Gly Ser
 960 965 970

aat ctg gga aga tat ctg agc tca cct att cct tcg tcc cat ctt ctg 2977
 Asn Leu Gly Arg Tyr Leu Ser Ser Pro Ile Pro Ser Ser His Leu Leu
 975 980 985

aaa agt ttt aga tag cttg 2996
 Lys Ser Phe Arg
 990

<210> 32
 <211> 993
 <212> PRT
 <213> *Oryza sativa*
 <400> 32

5

Met Met Thr Ser Asp Asn Gly Lys Ala Pro Asp Lys Asp Gly Glu Pro
 1 5 10 15

Ser Gly Pro Pro Ser Ala Pro Gln Glu Gly Glu Ile Ser Asn Glu Pro
 20 25 30

Lys Arg Arg Arg Pro Leu Asn Gly Arg Thr Thr Gly Pro Thr Arg Arg
 35 40 45

Ser Thr Lys Gly Asn Trp Thr Pro Glu Glu Asp Ala Ile Leu Ser Arg
 50 55 60

Ala Val Gln Thr Tyr Asn Gly Lys Asn Trp Lys Lys Ile Ala Glu Cys

10

Thr Ser Ala Glu Ala Val Ala Ser Ala Leu Pro Ala Val His Cys His
 305 310 315 320
 Val Ser Ser Ser Asn Leu Asp Pro Asp Gln His Leu Gln Glu Asp Phe
 325 330 335
 Ala Gln Gly Leu Asn Leu Asp Met Thr Ile Asp Glu Met Pro Thr Val
 340 345 350
 Pro Ser Phe Ala Asp Asn Gln Thr Val Cys Ser Ile Glu Asn His Glu
 355 360 365
 Arg Ser Leu Glu Pro Tyr Asp Val Ala Met Glu Val Pro Leu Ser Met
 370 375 380
 Leu Ser Ser Asp Ser Gly Ala Glu Gln Lys Leu His Phe Met Ser Glu
 385 390 395 400
 Ala Asp Phe Asn Ser Pro Asn Cys Leu Lys Ser Glu Leu Trp Gln Asp
 405 410 415
 Ile Ser Leu Gln Gly Leu Leu Ser Gly Pro Asp Ala Val Glu Ala Asp
 420 425 430
 Ser Ile Ser Arg Ser Asn His Gln Ser Asp Val Tyr Ser Ser Glu Ala
 435 440 445
 Asp Thr His Phe Leu Ala Pro Pro Tyr Met Pro Gln Thr Ser Asn Ser
 450 455 460
 Ser Ser Val Met Gly Leu Ala Asp Asp Gln Ser Pro Gln Met Ser Val
 465 470 475 480
 Pro Pro Ser Leu Ile Cys Ser Asn Ala Met Thr Asp Asp Ala Pro Phe
 485 490 495
 Asp Asn Arg Pro Gly Arg Lys Glu Met Pro Leu Ser Gln Ala Glu Val
 500 505 510
 Val Thr Gln Ser Ser Ser Ser Ser Gly Asp Ala Glu Met Phe Ala Asn
 515 520 525
 Pro Gly Cys Ser Asn Asp Arg His Val Pro Ser Ser Thr Met Glu Ser

530		535		540											
Ile 545	Pro	Glu	Cys	Gly	Asp 550	Gln	Gln	Val	Thr	Asn 555	Ala	Glu	Glu	Pro	Glu 560
Ala	Ser	Leu	Glu	Lys 565	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr 570	Gln	Ser	Val	Thr	Ala 575	Pro
Asp	Glu	Gln	Asp 580	Lys	Gly	Ala	Leu	Phe 585	Tyr	Glu	Pro	Pro	Arg 590	Phe	Pro
Ser	Leu	Asp 595	Val	Pro	Phe	Val	Ser 600	Cys	Asp	Leu	Val	Thr 605	Ser	Gly	Asp
Leu	Gln 610	Glu	Phe	Ser	Pro	Leu 615	Gly	Ile	Arg	Gln	Leu 620	Met	His	Ser	Thr
Met 625	Asn	Val	Cys	Thr	Pro 630	Met	Arg	Leu	Trp	Gly 635	Ser	Pro	Thr	His	Asp 640
Glu	Ser	Thr	Gly	Val 645	Leu	Leu	Lys	Ser	Ala 650	Ala	Lys	Ser	Phe	Ile 655	Cys
Thr	Pro	Ser	Ile 660	Leu	Lys	Lys	Arg	His 665	Arg	Asp	Leu	Leu	Ser 670	Pro	Ile
Pro	Asp	Lys 675	Arg	Ile	Glu	Lys	Lys 680	Tyr	Gly	Thr	Glu	Lys 685	Asp	Arg	Gly
Val	Ser 690	Asp	Thr	Ser	Ser	Thr 695	Gly	Ile	Gln	Thr	Ser 700	Cys	Ile	Asn	Ala
Thr 705	Lys	Asp	Asp	Ala	Leu 710	Ile	Thr	Thr	Val	Leu 715	Arg	Ile	Glu	Arg	Ser 720
Ala	Ser	Ser	Lys	Ser 725	Leu	Glu	Lys	Lys	Leu 730	Val	Phe	Ser	Asp	Glu 735	Asn
Lys	Glu	Asn	Leu 740	Gly	Tyr	Thr	Thr	Glu 745	Gln	Thr	Lys	Asp	Gly 750	Gln	Ser
Ala	Gly	Asn 755	Asp	Glu	His	Met	Asp 760	Glu	Gln	Thr	Thr	Gly 765	Glu	Arg	Ser

Ser Ala Thr Asn Val Ala Thr Asn Asp Asp Leu Ser Gly Asn Leu Gln
770 775 780

Pro Ala Gly Ile Leu Ile Glu His Ser Gly Asp Asp Pro Ile Ser Pro
785 790 795 800

Asp Tyr Gly Lys Asn Thr Met Asn Gln Lys Leu Asn Thr Asn Val Lys
805 810 815

Ser Leu Ser Val Cys Lys Glu Gly Val Cys Ala Lys Ser Lys Pro Thr
820 825 830

Glu Leu Ile Val Glu Lys Ser Ser Pro Cys Ile Asn Val Asp Tyr Glu
835 840 845

Tyr Val Asn Ile Leu Ala Asp Thr Pro Gly Ile Lys Arg Gly Leu Glu
850 855 860

Ser Pro Ser Ala Trp Lys Ser Pro Trp Phe Val Asp Met His Phe Gln
865 870 875 880

Gly Ser Tyr Phe Thr Ser Pro Ala Asp Ser Tyr Asp Ala Leu Gly Leu
885 890 895

Met Lys Gln Ile Asn Val Gln Thr Ala Ala Ala Leu Val Glu Ala Arg
900 905 910

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

Glu Asn Thr Gly Asn Pro Asp Ala Lys Lys Glu Pro Gly Thr Thr Lys
930 935 940

Leu Gln Thr Lys Ile Met Ala Glu Gly Arg Val Leu Asp Phe Glu Cys
945 950 955 960

Thr Thr Pro Glu Arg Ser Ser Asp Lys Asn Ala Gly Ser Asn Leu Gly
965 970 975

Arg Tyr Leu Ser Ser Pro Ile Pro Ser Ser His Leu Leu Lys Ser Phe
980 985 990

Arg

<210> 33
<211> 21
<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador de RT-PCR para NtmybA1/A2
 5
 <400> 33
 gtacaatgct tgcaccggtg g 21
 <210> 34
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador de RT-PCR para NtmybA1/A2
 <400> 34
 tgtagactgg gaacagccag c 21
 20 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR para EF1 α
 <400> 35
 30 agaccaccaa gtactactgc20
 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR para EF1 α
 <400> 36
 40 gtcaagagcc tcaaggagag 20
 <210> 37
 <211> 23
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR para ADN de VIGS A1
 50 <400> 37
 atagttctgt taaaagaaa ctg 23
 <210> 38
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR para ADN de VIGS de A1
 60 <400> 38
 taacattgaa caagaaacat ctg 24
 <210> 39
 65 <211> 21
 <212> ADN

ES 2 531 479 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR para ADN de VIGS de A2

5

<400> 39
acaaagtctt ctctaactac g 21

<210> 40
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Cebador de PCR para ADN de VIGS de A2

15

<400> 40
agctcgagt cgtctagcg 19

20

<210> 41
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

<400> 41
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc aattaaccct cactaaagg50

30

<210> 42
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

<400> 42
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggctc gtaatacgac tcactatagg gc 52

40

<210> 43
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

50

<400> 43
ccgtcgacta tgcagcctcg tcaaataaa 30

<210> 44
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

60

<400> 44
ccgtcgacta ccacagccta aatggagta 29

<210> 45
<211> 31
<212> ADN

65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 5
 <400> 45
 ccgctcgacta tatgctcgaa tttcgtca c 31
 <210> 46
 10 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 <400> 46
 ccgctcgacta gcattctgaa gcttctcc 29
 20 <210> 47
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 <400> 47
 30 ccgctcgacta cttttgacg gaactattcc 30
 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 <400> 48
 40 ttcctctgc aagacccttc 20
 <210> 49
 <211> 788
 <212> PRT
 45 <213> *Oryza sativa*
 <400> 49

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

Ala Gln Ala Leu Pro Gly Arg Ile Gly Lys Gln Cys Arg Glu Arg Trp
 130 135 140

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

Glu Glu Ile Thr Leu Ile His Ala His Arg Met Tyr Gly Asn Lys Trp
 165 170 175

Ala Glu Leu Thr Lys Phe Leu Pro Gly Arg Thr Asp Asn Ser Ile Lys
 180 185 190

Asn His Trp Asn Ser Ser Val Lys Lys Lys Val Asn Ser Tyr Met Ser
 195 200 205

Ser Gly Leu Leu Thr Gln Val Ser Cys Leu Pro Leu Asn Glu Tyr Ser
 210 215 220

Ala Asn Cys Asn Ser Ser Pro Ala Met Thr Gln Gln Asn Ser Glu Asp
 225 230 235 240

Ser Gly Cys Phe Ala Val Arg Glu Val Glu Asn Ser Ser Gly Cys Ser
 245 250 255

Gln Ser Ser Leu Ala Lys Val Ser Cys Ser Gln Val His Asp Thr Thr
 260 265 270

Val Pro Leu Gly Cys Asp Leu Gln Val Asn Ala Asn Phe Asp Lys Asn
 275 280 285

Glu Ala His Asp Ser Gln Ser Ser Met Gly Pro Gln Ala Cys Tyr Thr
 290 295 300

Ser Ala Glu Ala Val Ala Ser Ala Leu Pro Ala Val His Cys His Val
 305 310 315 320

Ser Ser Ser Asn Leu Asp Pro Asp Gln His Leu Gln Glu Asp Phe Ala
 325 330 335

Gln Gly Leu Asn Leu Asp Met Thr Ile Asp Glu Met Pro Thr Val Pro
 340 345 350

Ser Phe Ala Asp Asn Gln Thr Val Cys Ser Ile Glu Asn His Glu Arg
 355 360 365

Ser Leu Glu Pro Tyr Asp Val Ala Met Glu Val Pro Leu Ser Met Leu
 370 375 380

Ser Ser Asp Ser Gly Ala Glu Gln Lys Leu His Phe Met Ser Glu Ala
 385 390 395 400

Asp Phe Asn Ser Pro Asn Cys Leu Lys Ser Glu Leu Trp Gln Asp Ile
 405 410 415

Ser Leu Gln Gly Leu Leu Ser Gly Pro Asp Ala Val Glu Ala Asp Ser
 420 425 430

Ile Ser Arg Ser Asn His Gln Ser Asp Val Tyr Ser Ser Glu Ala Asp
 435 440 445

Thr His Phe Leu Ala Pro Pro Tyr Met Pro Gln Thr Ser Asn Ser Ser
 450 455 460

Ser Val Met Gly Leu Ala Asp Asp Gln Ser Pro Gln Met Ser Val Pro
 465 470 475 480

Pro Ser Leu Ile Cys Ser Asn Ala Met Thr Asp Asp Ala Pro Phe Asp
 485 490 495

Asn Arg Pro Gly Arg Lys Glu Met Pro Leu Ser Gln Ala Glu Val Val
 500 505 510

Thr Gln Ser Ser Ser Ser Ser Gly Asp Ala Glu Met Phe Ala Asn Pro
 515 520 525

Gly Cys Ser Asn Asp Arg His Val Pro Ser Ser Thr Met Glu Ser Ile
 530 535 540

Pro Glu Cys Gly Asp Gln Gln Val Thr Asn Ala Glu Glu Pro Glu Ala
 545 550 555 560

Ser Leu Glu Lys Glu Pro Ser Leu Thr Gln Ser Val Thr Ala Pro Asp
 565 570 575

Glu Gln Asp Lys Gly Ala Leu Phe Tyr Glu Pro Pro Arg Phe Pro Ser
 580 585 590

Leu Asp Val Pro Phe Val Ser Cys Asp Leu Val Thr Ser Gly Asp Leu
 595 600 605
 Gln Glu Phe Ser Pro Leu Gly Ile Arg Gln Leu Met His Ser Thr Met
 610 615 620
 Asn Val Cys Thr Pro Met Arg Leu Trp Gly Ser Pro Thr His Asp Glu
 625 630 635 640
 Ser Thr Gly Val Leu Leu Lys Ser Ala Ala Lys Ser Phe Ile Cys Thr
 645 650 655
 Pro Ser Ile Leu Lys Lys Arg His Arg Asp Leu Leu Ser Pro Ile Pro
 660 665
 Asp Lys Arg Ile Glu Lys Lys Tyr Gly Thr Glu Lys Asp Arg Gly Val
 675 680 685
 Ser Asp Thr Ser Ser Thr Gly Ile Gln Thr Ser Cys Ile Asn Ala Thr
 690 695 700
 Lys Asp Asp Ala Leu Ile Thr Thr Val Leu Arg Ile Glu Arg Ser Ala
 705 710 715 720
 Ser Ser Lys Ser Leu Glu Lys Lys Leu Val Phe Ser Asp Glu Asn Lys
 725 730 735
 Glu Asn Leu Gly Tyr Thr Thr Glu Gln Thr Lys Asp Gly Gln Ser Ala
 740 745 750
 Gly Asn Asp Glu His Met Asp Glu Gln Thr Thr Gly Glu Arg Ser Ser
 755 760 765
 Ala Thr Asn Val Ala Thr Asn Asp Asp Leu Ser Gly Asn Leu Val Ser
 770 775 780
 Thr Ser Ser Phe
 785

<210> 50
 <211> 3012
 <212> ADN
 <213> *Nicotiana tabacum*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(3012)
 <223> N° de referencia DDBJ AB056122, NtmybA1 (N° de referencia DDBJ BAB70510)

10

<400> 50

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

195					200					205						
aac	caa	tca	gtc	cct	tct	tct	tct	atg	acg	ttg	caa	caa	aat	agt	gaa	672
Asn	Gln	Ser	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Met	Thr	Leu	Gln	Gln	Asn	Ser	Glu	
	210						215					220				
gat	gaa	agc	ggt	cac	aaa	gaa	gga	aca	gaa	gcg	gag	gat	agt	tct	gtt	720
Asp	Glu	Ser	Val	His	Lys	Glu	Gly	Thr	Glu	Ala	Glu	Asp	Ser	Ser	Val	
225					230					235					240	
aaa	aag	aaa	ctg	gac	tca	tat	tcg	gca	tca	ggt	cta	ctt	gga	cag	ttc	768
Lys	Lys	Lys	Leu	Asp	Ser	Tyr	Ser	Ala	Ser	Gly	Leu	Leu	Gly	Gln	Phe	
				245					250					255		
tct	gct	ctg	cct	aat	gtc	aac	cat	cag	aac	caa	tca	gtc	cct	tct	tct	816
Ser	Ala	Leu	Pro	Asn	Val	Asn	His	Gln	Asn	Gln	Ser	Val	Pro	Ser	Ser	
			260					265					270			
tct	atg	acg	ttg	caa	caa	aat	agt	gaa	gat	gaa	agc	gtt	cac	aaa	gaa	864
Ser	Met	Thr	Leu	Gln	Gln	Asn	Ser	Glu	Asp	Glu	Ser	Val	His	Lys	Glu	
		275					280					285				
gga	atg	gaa	gcg	gag	gaa	gtg	cct	gaa	tgc	agt	caa	ggc	tcg	aat	ttt	912
Gly	Met	Glu	Ala	Glu	Glu	Val	Pro	Glu	Cys	Ser	Gln	Gly	Ser	Asn	Phe	
	290					295					300					
gct	ggc	tgt	tct	cag	tct	aca	agt	gac	ttg	ggc	aac	aca	ttt	gtg	cat	960
Ala	Gly	Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu	Gly	Asn	Thr	Phe	Val	His	
305					310					315					320	
ata	aga	gag	aac	ggt	ggg	atg	tcg	gag	gaa	tca	att	tgt	aaa	aag	gat	1008
Ile	Arg	Glu	Asn	Gly	Gly	Met	Ser	Glu	Glu	Ser	Ile	Cys	Lys	Lys	Asp	
				325					330					335		
gca	acc	tcc	agc	act	gct	cca	tgt	tgt	agg	aac	tat	agc	cca	gtt	ttt	1056
Ala	Thr	Ser	Ser	Thr	Ala	Pro	Cys	Cys	Arg	Asn	Tyr	Ser	Pro	Val	Phe	
				340				345					350			
caa	gat	ggt	tct	tgt	tca	atg	tta	aaa	ggt	cct	agt	gaa	ctt	gcg	gat	1104
Gln	Asp	Val	Ser	Cys	Ser	Met	Leu	Lys	Val	Pro	Ser	Glu	Leu	Ala	Asp	
		355					360					365				
tcc	aag	ttc	ctt	gag	cat	aat	tta	tca	cat	gac	tgg	ggc	aat	tcc	atg	1152
Ser	Lys	Phe	Leu	Glu	His	Asn	Leu	Ser	His	Asp	Trp	Gly	Asn	Ser	Met	
	370					375					380					
gaa	gaa	gat	tgg	cag	ttt	aat	agg	gat	gac	ata	cct	aat	att	tct	cct	1200
Glu	Glu	Asp	Trp	Gln	Phe	Asn	Arg	Asp	Asp	Ile	Pro	Asn	Ile	Ser	Pro	
385					390					395					400	
ccg	gag	ttt	att	cag	gaa	tct	tca	ggg	att	tcc	gtg	cac	tgt	tta	act	1248
Pro	Glu	Phe	Ile	Gln	Glu	Ser	Ser	Gly	Ile	Ser	Val	His	Cys	Leu	Thr	
				405					410					415		
ggc	aac	gac	aac	cat	gac	atg	gta	gca	act	gct	aat	gta	gga	aac	gtg	1296
Gly	Asn	Asp	Asn	His	Asp	Met	Val	Ala	Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Asn	Val	
			420					425					430			

gtt gag gat cca tat aag ccc aac gaa atg ttt gtt tct gtg gac ggt Val Glu Asp Pro Tyr Lys Pro Asn Glu Met Phe Val Ser Val Asp Gly	1344
435 440 445	
tcc atg atg gta tac ccc gag gaa gga att cct caa tgc tct ccg tct Ser Met Met Val Tyr Pro Glu Glu Gly Ile Pro Gln Cys Ser Pro Ser	1392
450 455 460	
gaa act ggg gtt aat ggc tgt ggt caa cct tca tac tct tta ttt tac Glu Thr Gly Val Asn Gly Cys Gly Gln Pro Ser Tyr Ser Leu Phe Tyr	1440
465 470 475 480	
caa tca tca aac tat cag atc cct gaa gca gga gat atg gtt cca caa Gln Ser Ser Asn Tyr Gln Ile Pro Glu Ala Gly Asp Met Val Pro Gln	1488
485 490 495	
aac tgc aat gct tta aat ttt gat gat ttt gaa gct tca ttc cat cag Asn Cys Asn Ala Leu Asn Phe Asp Asp Phe Glu Ala Ser Phe His Gln	1536
500 505 510	
cca ttt tct gtt cct tca caa ttt tct tca gag gat aga tcg tct gtg Pro Phe Ser Val Pro Ser Gln Phe Ser Ser Glu Asp Arg Ser Ser Val	1584
515 520 525	
ttt gac att gtt tta aat cag ttc cat aat cct ccg ctt gaa ggc cca Phe Asp Ile Val Leu Asn Gln Phe His Asn Pro Pro Leu Glu Gly Pro	1632
530 535 540	
gat cat atg aaa gat tcc tca agg ata gtt ccc gtg aat gat att ggc Asp His Met Lys Asp Ser Ser Arg Ile Val Pro Val Asn Asp Ile Gly	1680
545 550 555 560	
tca act aca tca aac act gtt caa aca tgt ctg ctg aat gaa aat tca Ser Thr Thr Ser Asn Thr Val Gln Thr Cys Leu Leu Asn Glu Asn Ser	1728
565 570 575	
ttt gta caa gaa gag cag aaa gat gga gga gct tta tgc tat gac cct Phe Val Gln Glu Glu Gln Lys Asp Gly Gly Ala Leu Cys Tyr Asp Pro	1776
580 585 590	
cct cgt ttt cca agc tcg gat gtt cct ttc ttt tgt tgt gat ctt ata Pro Arg Phe Pro Ser Ser Asp Val Pro Phe Phe Cys Cys Asp Leu Ile	1824
595 600 605	
caa tct ggt tca gat aca cag gaa gag tat agc cct ttt ggc atc cgg Gln Ser Gly Ser Asp Thr Gln Glu Glu Tyr Ser Pro Phe Gly Ile Arg	1872
610 615 620	
cag ttg atg atg act tcg gcg aac tgc ctt act cca tta agg ttg tgg Gln Leu Met Met Thr Ser Ala Asn Cys Leu Thr Thr Pro Leu Arg Leu Trp	1920
625 630 635 640	
gat tca cca tca aga gat gat agt cca gat gct atc ttg aaa agt gct Asp Ser Pro Ser Arg Asp Asp Ser Pro Asp Ala Ile Leu Lys Ser Ala	1968
645 650 655	
gcc aaa act ttt aca ggg aca cct tct ata cta aag aag cga cat cgt Ala Lys Thr Phe Thr Gly Thr Pro Ser Ile Leu Lys Lys Arg His Arg	2016

660					665					670						
cat	tta	ctg	tcg	cct	ttg	tca	gaa	aag	aga	tgt	gag	aaa	aag	ctt	gaa	2064
His	Leu	Leu	Ser	Pro	Leu	Ser	Glu	Lys	Arg	Cys	Glu	Lys	Lys	Leu	Glu	
		675					680					685				
agc	aat	ctc	aat	cag	gaa	tca	ttc	tat	aat	atg	tct	aca	aac	ttt	tcc	2112
Ser	Asn	Leu	Asn	Gln	Glu	Ser	Phe	Tyr	Asn	Met	Ser	Thr	Asn	Phe	Ser	
	690				695						700					
cga	cca	gac	gat	atg	ttt	gat	gag	tca	gca	aat	gaa	aaa	gca	tct	atg	2160
Arg	Pro	Asp	Asp	Met	Phe	Asp	Glu	Ser	Ala	Asn	Glu	Lys	Ala	Ser	Met	
705					710					715					720	
gaa	gac	aaa	gaa	aat	cta	cat	cca	tcc	tca	gaa	gat	gga	aga	aaa	gag	2208
Glu	Asp	Lys	Glu	Asn	Leu	His	Pro	Ser	Ser	Glu	Asp	Gly	Arg	Lys	Glu	
				725					730					735		
gag	ggc	gaa	att	tct	gga	gcc	aat	gat	gca	acg	gga	atg	gta	aaa	cag	2256
Glu	Gly	Glu	Ile	Ser	Gly	Ala	Asn	Asp	Ala	Thr	Gly	Met	Val	Lys	Gln	
			740					745					750			
cat	cct	gga	gtg	ctg	gtt	gag	ctt	agc	tca	aat	gac	ttg	ttc	ttt	tct	2304
His	Pro	Gly	Val	Leu	Val	Glu	Leu	Ser	Ser	Asn	Asp	Leu	Phe	Phe	Ser	
		755				760						765				
cct	gat	cgt	ttc	tta	atc	aag	tgt	gat	aga	gct	aca	agt	cta	agt	aat	2352
Pro	Asp	Arg	Phe	Leu	Ile	Lys	Cys	Asp	Arg	Ala	Thr	Ser	Leu	Ser	Asn	
	770					775					780					
aaa	gct	ctg	ggt	agg	cag	tat	gct	aga	cga	ctt	gaa	gct	gca	tca	aat	2400
Lys	Ala	Leu	Gly	Arg	Gln	Tyr	Ala	Arg	Arg	Leu	Glu	Ala	Ala	Ser	Asn	
785					790					795					800	
caa	gtt	act	ggt	tcg	tcc	tct	ttt	gaa	act	tca	tgc	ttg	tct	gtt	gta	2448
Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Phe	Glu	Thr	Ser	Cys	Leu	Ser	Val	Val	
				805				810						815		
tgc	tct	cct	gac	ata	tgt	ggg	aag	cat	aga	ggc	agt	ggt	gtc	ata	gct	2496
Cys	Ser	Pro	Asp	Ile	Cys	Gly	Lys	His	Arg	Gly	Ser	Val	Val	Ile	Ala	
			820					825					830			
aca	tca	act	gct	ttg	gag	aat	aca	gct	gaa	gat	tct	gaa	aat	gga	ttt	2544
Thr	Ser	Thr	Ala	Leu	Glu	Asn	Thr	Ala	Glu	Asp	Ser	Glu	Asn	Gly	Phe	
		835					840					845				
ggt	gct	gag	act	tta	agc	ata	ttt	gga	gag	aca	cct	ttt	aaa	agg	agt	2592
Gly	Ala	Glu	Thr	Leu	Ser	Ile	Phe	Gly	Glu	Thr	Pro	Phe	Lys	Arg	Ser	
	850					855					860					
ttt	gaa	tct	cct	tca	gca	tgg	aaa	tct	cca	tgg	ttc	atg	agt	tct	ttt	2640
Phe	Glu	Ser	Pro	Ser	Ala	Trp	Lys	Ser	Pro	Trp	Phe	Met	Ser	Ser	Phe	
865					870					875					880	
ccg	cca	agc	aca	aga	tat	gat	aca	gaa	ctt	gaa	ttt	gag	gat	ttt	gcc	2688
Pro	Pro	Ser	Thr	Arg	Tyr	Asp	Thr	Glu	Leu	Glu	Phe	Glu	Asp	Phe	Ala	
				885					890					895		

ctt ttt atg agc ccg ggt gac aga agc tat gat gct att ggg tta atg 2736
 Leu Phe Met Ser Pro Gly Asp Arg Ser Tyr Asp Ala Ile Gly Leu Met
 900 905 910
 aag caa tta agt gag cag aca gca cct tca att gca gat gcc cat cag 2784
 Lys Gln Leu Ser Glu Gln Thr Ala Pro Ser Ile Ala Asp Ala His Gln
 915 920 925
 atc ttg gga agt gaa act cca gaa aca aac ttg tcg aaa agg aat tcc 2832
 Ile Leu Gly Ser Glu Thr Pro Glu Thr Asn Leu Ser Lys Arg Asn Ser
 930 935 940
 aaa aaa ccg aaa gca gat gaa aat tgt acc ctt ctg gct tca aat gct 2880
 Lys Lys Pro Lys Ala Asp Glu Asn Cys Thr Leu Leu Ala Ser Asn Ala
 945 950 955 960
 acg agt gag aga cga aca ctc gat ttt aat gaa tgt gga att cca gga 2928
 Thr Ser Glu Arg Arg Thr Leu Asp Phe Asn Glu Cys Gly Ile Pro Gly
 965 970 975
 aag gga aag gaa act acc aaa ttt ggc agc aac aac aac agc ttt tca 2976
 Lys Gly Lys Glu Thr Thr Lys Phe Gly Ser Asn Asn Asn Ser Ser Phe Ser
 980 985 990
 agt cct tcc tcc tac ctg ttg aaa tat tgc aga taa 3012
 Ser Pro Ser Ser Tyr Leu Leu Lys Tyr Cys Arg
 995 1000

<210> 51
 <211> 1003
 <212> PRT
 <213> *Nicotiana tabacum*

5

<400> 51

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

10

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

Ile Arg Glu Asn Gly Gly Met Ser Glu Glu Ser Ile Cys Lys Lys Asp
 325 330 335
 Ala Thr Ser Ser Thr Ala Pro Cys Cys Arg Asn Tyr Ser Pro Val Phe
 340 345 350
 Gln Asp Val Ser Cys Ser Met Leu Lys Val Pro Ser Glu Leu Ala Asp
 355 360 365
 Ser Lys Phe Leu Glu His Asn Leu Ser His Asp Trp Gly Asn Ser Met
 370 375 380
 Glu Glu Asp Trp Gln Phe Asn Arg Asp Asp Ile Pro Asn Ile Ser Pro
 385 390 395 400
 Pro Glu Phe Ile Gln Glu Ser Ser Gly Ile Ser Val His Cys Leu Thr
 405 410 415
 Gly Asn Asp Asn His Asp Met Val Ala Thr Ala Asn Val Gly Asn Val
 420 425 430
 Val Glu Asp Pro Tyr Lys Pro Asn Glu Met Phe Val Ser Val Asp Gly
 435 440 445
 Ser Met Met Val Tyr Pro Glu Glu Gly Ile Pro Gln Cys Ser Pro Ser
 450 455 460
 Glu Thr Gly Val Asn Gly Cys Gly Gln Pro Ser Tyr Ser Leu Phe Tyr
 465 470 475 480
 Gln Ser Ser Asn Tyr Gln Ile Pro Glu Ala Gly Asp Met Val Pro Gln
 485 490 495
 Asn Cys Asn Ala Leu Asn Phe Asp Asp Phe Glu Ala Ser Phe His Gln
 500 505 510
 Pro Phe Ser Val Pro Ser Gln Phe Ser Ser Glu Asp Arg Ser Ser Val
 515 520 525
 Phe Asp Ile Val Leu Asn Gln Phe His Asn Pro Pro Leu Glu Gly Pro
 530 535 540
 Asp His Met Lys Asp Ser Ser Arg Ile Val Pro Val Asn Asp Ile Gly
 545 550 555 560

Ser Thr Thr Ser Asn Thr Val Gln Thr Cys Leu Leu Asn Glu Asn Ser
 565 570 575
 Phe Val Gln Glu Glu Gln Lys Asp Gly Gly Ala Leu Cys Tyr Asp Pro
 580 585 590
 Pro Arg Phe Pro Ser Ser Asp Val Pro Phe Phe Cys Cys Asp Leu Ile
 595 600 605
 Gln Ser Gly Ser Asp Thr Gln Glu Glu Tyr Ser Pro Phe Gly Ile Arg
 610 615 620
 Gln Leu Met Met Thr Ser Ala Asn Cys Leu Thr Pro Leu Arg Leu Trp
 625 630 635 640
 Asp Ser Pro Ser Arg Asp Asp Ser Pro Asp Ala Ile Leu Lys Ser Ala
 645 650 655
 Ala Lys Thr Phe Thr Gly Thr Pro Ser Ile Leu Lys Lys Arg His Arg
 660 665 670
 His Leu Leu Ser Pro Leu Ser Glu Lys Arg Cys Glu Lys Lys Leu Glu
 675 680 685
 Ser Asn Leu Asn Gln Glu Ser Phe Tyr Asn Met Ser Thr Asn Phe Ser
 690 695 700
 Arg Pro Asp Asp Met Phe Asp Glu Ser Ala Asn Glu Lys Ala Ser Met
 705 710 715 720
 Glu Asp Lys Glu Asn Leu His Pro Ser Ser Glu Asp Gly Arg Lys Glu
 725 730 735
 Glu Gly Glu Ile Ser Gly Ala Asn Asp Ala Thr Gly Met Val Lys Gln
 740 745 750
 His Pro Gly Val Leu Val Glu Leu Ser Ser Asn Asp Leu Phe Phe Ser
 755 760 765
 Pro Asp Arg Phe Leu Ile Lys Cys Asp Arg Ala Thr Ser Leu Ser Asn
 770 775 780

Lys Ala Leu Gly Arg Gln Tyr Ala Arg Arg Leu Glu Ala Ala Ser Asn
 785 790 795 800
 Gln Val Thr Val Ser Ser Ser Phe Glu Thr Ser Cys Leu Ser Val Val
 805 810
 Cys Ser Pro Asp Ile Cys Gly Lys His Arg Gly Ser Val Val Ile Ala
 820 825 830
 Thr Ser Thr Ala Leu Glu Asn Thr Ala Glu Asp Ser Glu Asn Gly Phe
 835 840 845
 Gly Ala Glu Thr Leu Ser Ile Phe Gly Glu Thr Pro Phe Lys Arg Ser
 850 855 860
 Phe Glu Ser Pro Ser Ala Trp Lys Ser Pro Trp Phe Met Ser Ser Phe
 865 870 875 880
 Pro Pro Ser Thr Arg Tyr Asp Thr Glu Leu Glu Phe Glu Asp Phe Ala
 885 890 895
 Leu Phe Met Ser Pro Gly Asp Arg Ser Tyr Asp Ala Ile Gly Leu Met
 900 905 910
 Lys Gln Leu Ser Glu Gln Thr Ala Pro Ser Ile Ala Asp Ala His Gln
 915 920 925
 Ile Leu Gly Ser Glu Thr Pro Glu Thr Asn Leu Ser Lys Arg Asn Ser
 930 935 940
 Lys Lys Pro Lys Ala Asp Glu Asn Cys Thr Leu Leu Ala Ser Asn Ala
 945 950 955 960
 Thr Ser Glu Arg Arg Thr Leu Asp Phe Asn Glu Cys Gly Ile Pro Gly
 965 970 975
 Lys Gly Lys Glu Thr Thr Lys Phe Gly Ser Asn Asn Asn Ser Phe Ser
 980 985 990
 Ser Pro Ser Ser Tyr Leu Leu Lys Tyr Cys Arg
 995 1000

<210> 52
 <211> 3129
 <212> ADN
 <213> *Nicotiana tabacum*

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3129)

<223> N° de referencia DDBJ AB056123, NtmybA2 (N° de referencia DDBJ BAB70511)

5

<400> 52

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

ttg gca tca ggt tta ctt gca cag ttc cct gct ttg cct aat gtc aac	624
Leu Ala Ser Gly Leu Leu Ala Gln Phe Pro Ala Leu Pro Asn Val Asn	
195	200
205	
cgt cag aac caa tca atc cct tct tcg gcg aag ttg caa cag agt agt	672
Arg Gln Asn Gln Ser Ile Pro Ser Ser Ala Lys Leu Gln Gln Ser Ser	
210	215
220	
gaa gat gat agt gtt cgt aaa gaa gga acc gaa atg gag gaa gct tca	720
Glu Asp Asp Ser Val Arg Lys Glu Gly Thr Glu Met Glu Glu Ala Ser	
225	230
235	240
gaa tgc agt caa ggg tca aat ctt gct ggc tgt tcc cag tct aca agt	768
Glu Cys Ser Gln Gly Ser Asn Leu Ala Gly Cys Ser Gln Ser Thr Ser	
245	250
255	
gac atg ggc aac aaa ttt gta cat aca aga gag gag ggc aag ttg ctg	816
Asp Met Gly Asn Lys Phe Val His Thr Arg Glu Glu Gly Lys Leu Leu	
260	265
270	
gag gat tca aat tat agg aag gac cca agc tcc agt tca gca cca tgc	864
Glu Asp Ser Asn Tyr Arg Lys Asp Pro Ser Ser Ser Ser Ala Pro Cys	
275	280
285	
tct gaa tac tat acc cca gcc ttt gaa gat att acc ttt tca atg gca	912
Ser Glu Tyr Tyr Thr Pro Ala Phe Glu Asp Ile Thr Phe Ser Met Ala	
290	295
300	
gaa gtg cct agt gaa ctt gac gaa tcc aag ctc ctg gag cat acc ttc	960
Glu Val Pro Ser Glu Leu Asp Glu Ser Lys Leu Leu Glu His Thr Phe	
305	310
315	320
tca cat gac tgg gca gca tcc att gga aaa gaa tgg cag ttt aat cca	1008
Ser His Asp Trp Ala Ala Ser Ile Gly Lys Glu Trp Gln Phe Asn Pro	
325	330
335	
gat gac ata cct aat att tct ccg ctg gag ttg atg cag gat tct tca	1056
Asp Asp Ile Pro Asn Ile Ser Pro Leu Glu Leu Met Gln Asp Ser Ser	
340	345
350	
ggg ctc ttc atg cag tgt tta act ggt aat ggg aat cac gat atg gtt	1104
Gly Leu Phe Met Gln Cys Leu Thr Gly Asn Gly Asn His Asp Met Val	
355	360
365	
acc ttt cca cag caa aat gca gtg aag ttt gaa acg act aat gtc ggg	1152
Thr Phe Pro Gln Gln Asn Ala Val Lys Phe Glu Thr Thr Asn Val Gly	
370	375
380	
agc atg gtt gtg ggt ttt gat aag ccc aat gag atg ttt acc tct gtg	1200
Ser Met Val Val Gly Phe Asp Lys Pro Asn Glu Met Phe Thr Ser Val	
385	390
395	400
gag ggt tgc agg atg gta tac cct gag gca gga att cca caa tac att	1248
Glu Gly Cys Arg Met Val Tyr Pro Glu Ala Gly Ile Pro Gln Tyr Ile	
405	410
415	
ccc tct gaa gct ggt acg aac ggt gct gat gaa act gca gat tct ttg	1296
Pro Ser Glu Ala Gly Thr Asn Gly Ala Asp Glu Thr Ala Asp Ser Leu	

			420			425						430				
att	tgc	caa	tca	tcg	aac	tat	cag	atc	tct	gaa	ggt	gga	aat	atg	tct	1344
Ile	Cys	Gln	Ser	Ser	Asn	Tyr	Gln	Ile	Ser	Glu	Gly	Gly	Asn	Met	Ser	
		435					440					445				
ata	gag	aat	tgc	aac	cct	ctc	tgt	tca	gat	ggt	atg	gga	act	tca	tcc	1392
Ile	Glu	Asn	Cys	Asn	Pro	Leu	Cys	Ser	Asp	Val	Met	Gly	Thr	Ser	Ser	
	450					455					460					
ggc	caa	cca	ttt	tcc	att	cct	tca	cag	ttt	tct	tca	gag	caa	agc	tca	1440
Gly	Gln	Pro	Phe	Ser	Ile	Pro	Ser	Gln	Phe	Ser	Ser	Glu	Gln	Ser	Ser	
465					470					475					480	
ctc	atg	ttt	ggt	act	gcc	gca	aat	cag	ttt	cat	aat	cca	ttg	cag	gga	1488
Leu	Met	Phe	Gly	Thr	Ala	Ala	Asn	Gln	Phe	His	Asn	Pro	Leu	Gln	Gly	
				485					490					495		
aac	cca	gca	cag	gag	tcc	cac	aca	agt	aac	tct	gat	ggt	ttt	cta	tat	1536
Asn	Pro	Ala	Gln	Glu	Ser	His	Thr	Ser	Asn	Ser	Asp	Gly	Phe	Leu	Tyr	
			500					505					510			
ccc	ttt	gaa	tct	ggt	act	cct	tgt	gac	aac	ata	atg	gac	gat	cct	ctc	1584
Pro	Phe	Glu	Ser	Gly	Thr	Pro	Cys	Asp	Asn	Ile	Met	Asp	Asp	Pro	Leu	
		515					520					525				
ctg	gaa	gag	caa	ctg	gat	caa	act	aaa	gat	tct	cta	cag	cta	ggt	tct	1632
Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	Asp	Gln	Thr	Lys	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Val	Ser	
	530					535					540					
gtc	aat	gat	ttt	cgc	aca	act	cct	tca	aat	act	att	caa	aca	tgt	cca	1680
Val	Asn	Asp	Phe	Arg	Thr	Thr	Pro	Ser	Asn	Thr	Ile	Gln	Thr	Cys	Pro	
	545				550					555					560	
ttg	gtg	aac	gaa	aat	tcg	agc	ata	cca	gta	gag	cag	aag	gat	gga	gga	1728
Leu	Val	Asn	Glu	Asn	Ser	Ser	Ile	Pro	Val	Glu	Gln	Lys	Asp	Gly	Gly	
				565				570						575		
gcc	tta	tac	tat	gag	cct	cct	cgt	ttt	ccg	agc	ttg	gac	att	cca	ttt	1776
Ala	Leu	Tyr	Tyr	Glu	Pro	Pro	Arg	Phe	Pro	Ser	Leu	Asp	Ile	Pro	Phe	
			580					585					590			
ttc	agt	tgt	gat	ctt	ata	caa	tct	ggt	aca	gat	gca	cag	caa	gag	tac	1824
Phe	Ser	Cys	Asp	Leu	Ile	Gln	Ser	Gly	Thr	Asp	Ala	Gln	Gln	Glu	Tyr	
		595					600					605				
agc	cct	ctt	ggc	atc	cgc	cag	ttg	atg	atg	act	tct	gtg	aac	tgt	ctt	1872
Ser	Pro	Leu	Gly	Ile	Arg	Gln	Leu	Met	Met	Thr	Ser	Val	Asn	Cys	Leu	
	610					615					620					
act	cca	ttt	agg	ctg	tgg	gat	tca	cca	tct	aga	gat	gga	agt	aca	gat	1920
Thr	Pro	Phe	Arg	Leu	Trp	Asp	Ser	Pro	Ser	Arg	Asp	Gly	Ser	Thr	Asp	
	625				630					635					640	
gcc	gtc	ctg	aga	agt	gct	gcc	aaa	act	ttc	acc	agc	aca	cct	tct	ata	1968
Ala	Val	Leu	Arg	Ser	Ala	Ala	Lys	Thr	Phe	Thr	Ser	Thr	Pro	Ser	Ile	
				645					650					655		

tta	aag	aag	cga	cac	cgt	gat	ttg	gtg	tca	cct	ttg	tca	gaa	aag	aga	2016
Leu	Lys	Lys	Arg	His	Arg	Asp	Leu	Val	Ser	Pro	Leu	Ser	Glu	Lys	Arg	
			660					665					670			
tgt	gaa	aag	aag	ctt	gga	agt	gat	ttc	cgt	caa	gaa	tca	ttc	tct	gat	2064
Cys	Glu	Lys	Lys	Leu	Gly	Ser	Asp	Phe	Arg	Gln	Glu	Ser	Phe	Ser	Asp	
		675					680					685				
ctg	tct	aag	gat	ttt	tct	cga	cta	gat	ggt	atg	ttt	gac	gag	gct	gca	2112
Leu	Ser	Lys	Asp	Phe	Ser	Arg	Leu	Asp	Val	Met	Phe	Asp	Glu	Ala	Ala	
	690					695					700					
aat	gaa	aaa	gca	aca	aag	tct	tct	cta	act	acg	gat	caa	aca	ttg	gaa	2160
Asn	Glu	Lys	Ala	Thr	Lys	Ser	Ser	Leu	Thr	Thr	Asp	Gln	Thr	Leu	Glu	
705					710					715					720	
ctt	gaa	gct	tca	tct	gaa	gat	aaa	gaa	aac	ata	aat	cca	act	gaa	gat	2208
Leu	Glu	Ala	Ser	Ser	Glu	Asp	Lys	Glu	Asn	Ile	Asn	Pro	Thr	Glu	Asp	
			725						730					735		
gga	agt	aag	gag	gag	gac	aag	gta	cgt	aat	gga	ctt	tcc	aac	gag	aga	2256
Gly	Ser	Lys	Glu	Glu	Asp	Lys	Val	Arg	Asn	Gly	Leu	Ser	Asn	Glu	Arg	
			740					745					750			
cag	tta	gat	gga	ggt	gaa	ggt	cac	tat	aaa	gag	aaa	gga	aca	agg	gag	2304
Gln	Leu	Asp	Gly	Gly	Glu	Val	His	Tyr	Lys	Glu	Lys	Gly	Thr	Arg	Glu	
		755					760					765				
ggc	aca	aag	ggt	gga	gcc	aat	agt	gca	att	gga	aag	ata	aaa	caa	cct	2352
Gly	Thr	Lys	Gly	Gly	Ala	Asn	Ser	Ala	Ile	Gly	Lys	Ile	Lys	Gln	Pro	
	770					775					780					
tct	gga	ggt	ctg	ggt	gaa	ctg	aac	gca	agt	gac	ctg	ttc	ttc	tct	cct	2400
Ser	Gly	Val	Leu	Val	Glu	Leu	Asn	Ala	Ser	Asp	Leu	Phe	Phe	Ser	Pro	
785					790					795					800	
gat	cgt	ttt	gga	gcc	aag	tct	ggt	aga	gct	aca	tat	ctc	agc	agt	aaa	2448
Asp	Arg	Phe	Gly	Ala	Lys	Ser	Gly	Arg	Ala	Thr	Tyr	Leu	Ser	Ser	Lys	
			805						810					815		
gct	cta	gga	aat	cag	tac	gct	aga	cga	ctc	gaa	gct	gca	tca	aat	caa	2496
Ala	Leu	Gly	Asn	Gln	Tyr	Ala	Arg	Arg	Leu	Glu	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	
			820					825					830			
ggt	tct	ggt	tca	tct	tca	ttt	gag	act	tca	tgt	ttt	tct	ggt	att	tgc	2544
Gly	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Phe	Glu	Thr	Ser	Cys	Phe	Ser	Val	Ile	Cys	
		835					840					845				
tct	cct	cgt	ata	cgt	gga	aag	aaa	gac	gga	agt	agt	ttt	atc	atc	act	2592
Ser	Pro	Arg	Ile	Arg	Gly	Lys	Lys	Asp	Gly	Ser	Ser	Phe	Ile	Ile	Thr	
	850					855					860					
aca	tca	atg	caa	tct	gct	cca	gca	cca	aca	gcc	ttg	gac	aac	tca	gct	2640
Thr	Ser	Met	Gln	Ser	Ala	Pro	Ala	Pro	Thr	Ala	Leu	Asp	Asn	Ser	Ala	
865					870					875					880	
gaa	act	tca	gga	aat	gga	ggt	ggc	gcg	gag	act	gta	agc	ata	tct	gga	2688
Glu	Thr	Ser	Gly	Asn	Gly	Val	Gly	Ala	Glu	Thr	Val	Ser	Ile	Ser	Gly	

				885					890				895					
	gaa	acg	cct	tat	aaa	agg	agt	att	gaa	tct	cct	tca	gct	tgg	aaa	tct		2736
	Glu	Thr	Pro	Tyr	Lys	Arg	Ser	Ile	Glu	Ser	Pro	Ser	Ala	Trp	Lys	Ser		
				900					905					910				
	cca	tgg	ttc	atc	aac	tct	ctt	ctg	tca	agc	cca	aga	ctt	gat	aat	gaa		2784
	Pro	Trp	Phe	Ile	Asn	Ser	Leu	Leu	Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Asp	Asn	Glu		
			915					920					925					
	ctt	aat	ttt	gag	gat	ctt	gca	ctg	ttt	atg	agt	cca	ggt	gac	aga	agc		2832
	Leu	Asn	Phe	Glu	Asp	Leu	Ala	Leu	Phe	Met	Ser	Pro	Gly	Asp	Arg	Ser		
		930					935					940						
	tat	gat	gct	att	gga	ttg	atg	aag	caa	ttg	agt	gag	cag	act	gca	ggg		2880
	Tyr	Asp	Ala	Ile	Gly	Leu	Met	Lys	Gln	Leu	Ser	Glu	Gln	Thr	Ala	Gly		
	945				950						955					960		
	gca	ttt	gca	gac	gca	cag	gag	gtc	ttg	gga	ggt	gaa	act	cca	gag	tca		2928
	Ala	Phe	Ala	Asp	Ala	Gln	Glu	Val	Leu	Gly	Gly	Glu	Thr	Pro	Glu	Ser		
				965						970					975			
	atc	cta	cgg	ggg	agg	aac	tcc	aaa	aac	cag	aaa	gca	gat	gaa	aat	cat		2976
	Ile	Leu	Arg	Gly	Arg	Asn	Ser	Lys	Asn	Gln	Lys	Ala	Asp	Glu	Asn	His		
			980						985					990				
	tca	ctt	ttg	tct	gca	aat	gtt	atg	agt	gag	agg	cgt	act	ctt	gat	ttc		3024
	Ser	Leu	Leu	Ser	Ala	Asn	Val	Met	Ser	Glu	Arg	Arg	Thr	Leu	Asp	Phe		
			995					1000					1005					
	agt	gaa	tgt	gga	tca	cct	gga	aag	gga	aag	gaa	act	gaa	aat	ttt			3069
	Ser	Glu	Cys	Gly	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Lys	Glu	Thr	Glu	Asn	Phe			
		1010					1015					1020						
	tgc	acg	agc	aac	aac	agc	ttt	tca	agt	cct	tcc	tcc	tac	cta	ttg			3114
	Cys	Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser	Pro	Ser	Ser	Tyr	Leu	Leu			
		1025					1030					1035						
	aaa	ggc	tgc	agg	tag													3129
	Lys	Gly	Cys	Arg														
		1040																

<210> 53
 <211> 1042
 <212> PRT
 <213> *Nicotiana tabacum*

5

<400> 53

Met	Glu	Ser	Asp	Arg	Ile	Ser	Thr	Pro	Ser	Asp	Gly	Thr	Ser	Ser	Ser
1				5					10					15	
Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Pro	Leu	His	Gly	Arg	Thr	Ser	Gly	Pro	Thr	Arg
			20					25					30		

10

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

Glu Asp Ser Asn Tyr Arg Lys Asp Pro Ser Ser Ser Ser Ala Pro Cys
 275 280 285

Ser Glu Tyr Tyr Thr Pro Ala Phe Glu Asp Ile Thr Phe Ser Met Ala
 290 295 300

Glu Val Pro Ser Glu Leu Asp Glu Ser Lys Leu Leu Glu His Thr Phe
 305 310 315 320

Ser His Asp Trp Ala Ala Ser Ile Gly Lys Glu Trp Gln Phe Asn Pro
 325 330 335

Asp Asp Ile Pro Asn Ile Ser Pro Leu Glu Leu Met Gln Asp Ser Ser
 340 345 350

Gly Leu Phe Met Gln Cys Leu Thr Gly Asn Gly Asn His Asp Met Val
 355 360 365

Thr Phe Pro Gln Gln Asn Ala Val Lys Phe Glu Thr Thr Asn Val Gly
 370 375 380

Ser Met Val Val Gly Phe Asp Lys Pro Asn Glu Met Phe Thr Ser Val
 385 390 395 400

Glu Gly Cys Arg Met Val Tyr Pro Glu Ala Gly Ile Pro Gln Tyr Ile
 405 410 415

Pro Ser Glu Ala Gly Thr Asn Gly Ala Asp Glu Thr Ala Asp Ser Leu
 420 425 430

Ile Cys Gln Ser Ser Asn Tyr Gln Ile Ser Glu Gly Gly Asn Met Ser
 435 440 445

Ile Glu Asn Cys Asn Pro Leu Cys Ser Asp Val Met Gly Thr Ser Ser
 450 455 460

Gly Gln Pro Phe Ser Ile Pro Ser Gln Phe Ser Ser Glu Gln Ser Ser
 465 470 475 480

Leu Met Phe Gly Thr Ala Ala Asn Gln Phe His Asn Pro Leu Gln Gly
 485 490 495

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

Gly Ser Lys Glu Glu Asp Lys Val Arg Asn Gly Leu Ser Asn Glu Arg
 740 745 750
 Gln Leu Asp Gly Gly Glu Val His Tyr Lys Glu Lys Gly Thr Arg Glu
 755 760 765
 Gly Thr Lys Gly Gly Ala Asn Ser Ala Ile Gly Lys Ile Lys Gln Pro
 770 775 780
 Ser Gly Val Leu Val Glu Leu Asn Ala Ser Asp Leu Phe Phe Ser Pro
 785 790 795 800
 Asp Arg Phe Gly Ala Lys Ser Gly Arg Ala Thr Tyr Leu Ser Ser Lys
 805 810 815
 Ala Leu Gly Asn Gln Tyr Ala Arg Arg Leu Glu Ala Ala Ser Asn Gln
 820 825
 Gly Ser Val Ser Ser Ser Phe Glu Thr Ser Cys Phe Ser Val Ile Cys
 835 840 845
 Ser Pro Arg Ile Arg Gly Lys Lys Asp Gly Ser Ser Phe Ile Ile Thr
 850 855 860
 Thr Ser Met Gln Ser Ala Pro Ala Pro Thr Ala Leu Asp Asn Ser Ala
 865 870 875 880
 Glu Thr Ser Gly Asn Gly Val Gly Ala Glu Thr Val Ser Ile Ser Gly
 885 890 895
 Glu Thr Pro Tyr Lys Arg Ser Ile Glu Ser Pro Ser Ala Trp Lys Ser
 900 905 910
 Pro Trp Phe Ile Asn Ser Leu Leu Ser Ser Pro Arg Leu Asp Asn Glu
 915 920 925
 Leu Asn Phe Glu Asp Leu Ala Leu Phe Met Ser Pro Gly Asp Arg Ser
 930 935 940
 Tyr Asp Ala Ile Gly Leu Met Lys Gln Leu Ser Glu Gln Thr Ala Gly
 945 950 955 960

Ala Phe Ala Asp Ala Gln Glu Val Leu Gly Gly Glu Thr Pro Glu Ser
 965 970 975

Ile Leu Arg Gly Arg Asn Ser Lys Asn Gln Lys Ala Asp Glu Asn His
 980 985 990

Ser Leu Leu Ser Ala Asn Val Met Ser Glu Arg Arg Thr Leu Asp Phe
 995 1000 1005

Ser Glu Cys Gly Ser Pro Gly Lys Gly Lys Glu Thr Glu Asn Phe
 1010 1015 1020

Cys Thr Ser Asn Asn Ser Phe Ser Ser Pro Ser Ser Tyr Leu Leu
 1025 1030 1035

Lys Gly Cys Arg
 1040

<210> 54
 <211> 1767
 <212> ADN
 <213> *Nicotiana tabacum*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1767)
 <223> N° de referencia DDBJ AB056124, NtmybB (N° de referencia DDBJ BAB70512)

<400> 54

atg ata caa gtt aag gag gaa tct cag act ctg gac ttc agt gga ttt 48
 Met Ile Gln Val Lys Glu Glu Ser Gln Thr Leu Asp Phe Ser Gly Phe
 1 5 10 15

gct tct tgt tca tct ttc tct gat agc agt tac gag gct agc act ccg 96
 Ala Ser Cys Ser Ser Phe Ser Asp Ser Ser Tyr Glu Ala Ser Thr Pro
 20 25 30

aga tac tcc tcc gaa cct ggt tct agt tat cga agg agc tct ggt cca 144
 Arg Tyr Ser Ser Glu Pro Gly Ser Ser Tyr Arg Arg Ser Ser Gly Pro
 35 40 45

act aaa cgt tct tcc cag gca ggc tgg acg gaa gaa gag gat aat ctg 192
 Thr Lys Arg Ser Ser Gln Ala Gly Trp Thr Glu Glu Glu Asp Asn Leu
 50 55 60

ttg act gaa gtg gtg aaa agg ttc aaa ggg aga aac tgg aaa aag ata 240
 Leu Thr Glu Val Val Lys Arg Phe Lys Gly Arg Asn Trp Lys Lys Ile
 65 70 75 80

gct gag tgc atg aat gga agg act gat gtg cag tgc ttg cat cgc tgg 288
 Ala Glu Cys Met Asn Gly Arg Thr Asp Val Gln Cys Leu His Arg Trp

5

10

15

										85						90						95	
cag	aag	gtt	ctg	aat	cct	gaa	ctt	gta	aag	ggt	cct	tgg	tca	aag	gag		336						
Gln	Lys	Val	Leu	Asn	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Gly	Pro	Trp	Ser	Lys	Glu								
			100						105						110								
gag	gat	gac	ctg	att	ggt	gag	tta	ggt	gag	aaa	tat	ggc	tgt	aag	aag		384						
Glu	Asp	Asp	Leu	Ile	Val	Glu	Leu	Val	Glu	Lys	Tyr	Gly	Cys	Lys	Lys								
			115						120						125								
tgg	tct	ttt	att	gct	aag	tct	atg	cct	ggt	cgc	att	ggc	aag	caa	tgt		432						
Trp	Ser	Phe	Ile	Ala	Lys	Ser	Met	Pro	Gly	Arg	Ile	Gly	Lys	Gln	Cys								
			130						135						140								
cgg	gaa	agg	tgg	cac	aac	cat	ctt	gac	cca	aca	ata	aaa	aga	gat	gct		480						
Arg	Glu	Arg	Trp	His	Asn	His	Leu	Asp	Pro	Thr	Ile	Lys	Arg	Asp	Ala								
			145						150						155	160							
tgg	acg	gaa	cag	gaa	gaa	tca	gtc	cta	tgc	cac	tat	cac	caa	ata	tac		528						
Trp	Thr	Glu	Gln	Glu	Glu	Ser	Val	Leu	Cys	His	Tyr	His	Gln	Ile	Tyr								
			165						170						175								
ggg	aac	aag	tgg	gca	gaa	att	gcg	agg	ttt	ctg	cct	gga	agg	act	gat		576						
Gly	Asn	Lys	Trp	Ala	Glu	Ile	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Gly	Arg	Thr	Asp								
			180						185						190								
aat	gca	att	aaa	aat	cat	tgg	aat	tcc	tca	gta	aag	aaa	aga	ttg	aac		624						
Asn	Ala	Ile	Lys	Asn	His	Trp	Asn	Ser	Ser	Val	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn								
			195						200						205								
ttg	aat	ttg	cct	agt	agg	tta	gtg	ctg	gat	aca	gaa	agt	gag	gga	tct		672						
Leu	Asn	Leu	Pro	Ser	Arg	Leu	Val	Leu	Asp	Thr	Glu	Ser	Glu	Gly	Ser								
			210						215						220								
cct	aat	ttc	tct	agt	gac	aag	aaa	aaa	ata	gag	atc	aag	aag	cat	ccg		720						
Pro	Asn	Phe	Ser	Ser	Asp	Lys	Lys	Lys	Ile	Glu	Ile	Lys	Lys	His	Pro								
			225						230						235	240							
gta	caa	gct	caa	aat	gca	gaa	caa	aca	atc	ttt	tta	ggc	aag	cag	aca		768						
Val	Gln	Ala	Gln	Asn	Ala	Glu	Gln	Thr	Ile	Phe	Leu	Gly	Lys	Gln	Thr								
			245						250						255								
gga	ttg	gat	aat	gct	gct	gtt	gct	ttg	tca	act	gat	ctg	aga	att	gga		816						
Gly	Leu	Asp	Asn	Ala	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Thr	Asp	Leu	Arg	Ile	Gly								
			260						265						270								
tat	gct	tat	tct	gct	gga	aat	gct	aag	cat	aag	gat	act	tct	tta	ttt		864						
Tyr	Ala	Tyr	Ser	Ala	Gly	Asn	Ala	Lys	His	Lys	Asp	Thr	Ser	Leu	Phe								
			275						280						285								
gga	gcc	tgt	ata	tca	gca	gaa	gaa	aat	gtg	agg	gat	ctg	ata	aag	cca		912						
Gly	Ala	Cys	Ile	Ser	Ala	Glu	Glu	Asn	Val	Arg	Asp	Leu	Ile	Lys	Pro								
			290						295						300								
ctt	ggt	gga	ata	caa	ttt	ggc	aag	gca	gat	gtt	ctt	ccg	att	ggt	gag		960						
Leu	Gly	Gly	Ile	Gln	Phe	Gly	Lys	Ala	Asp	Val	Leu	Pro	Ile	Gly	Glu								
			305						310						315	320							

aca gat aaa cca tgc caa tcc aat tta agt cgc act aaa ata tca tat	1008
Thr Asp Lys Pro Cys Gln Ser Asn Leu Ser Arg Thr Lys Ile Ser Tyr	
	325 330 335
cca ctc tca gcc tct tct tca gat ttt cct ttg gat cag ttg cac cac	1056
Pro Leu Ser Ala Ser Ser Ser Asp Phe Pro Leu Asp Gln Leu His His	
	340 345 350
aca agt tgg agt act tct caa gtt gag gct gtt cat cct act act ttt	1104
Thr Ser Trp Ser Thr Ser Gln Val Glu Ala Val His Pro Thr Thr Phe	
	355 360 365
agg agc atg tat gaa tct ccc aaa agg tct agg cac gat act gtt aat	1152
Arg Ser Met Tyr Glu Ser Pro Lys Arg Ser Arg His Asp Thr Val Asn	
	370 375 380
gat cct aac tgt gat ttt ttg agt ttg tca ttg gct agc ttt act gag	1200
Asp Pro Asn Cys Asp Phe Leu Ser Leu Ser Leu Ala Ser Phe Thr Glu	
	385 390 395 400
gtt cat tcc caa agt acc aag aag aat aaa gca tat gat aca caa tct	1248
Val His Ser Gln Ser Thr Lys Lys Asn Lys Ala Tyr Asp Thr Gln Ser	
	405 410 415
tct ttg ggt ctc aag cag cag ggc tcc tta tat tat gaa cca cca cag	1296
Ser Leu Gly Leu Lys Gln Gln Gly Ser Leu Tyr Tyr Glu Pro Pro Gln	
	420 425 430
tta aag gac atg atg att cct tta aca gat gaa aac ctt agt aga gac	1344
Leu Lys Asp Met Met Ile Pro Leu Thr Asp Glu Asn Leu Ser Arg Asp	
	435 440 445
gac ctt atc agg caa caa aat ggt cat cca ttt tgc tct aca cct cct	1392
Asp Leu Ile Arg Gln Gln Asn Gly His Pro Phe Cys Ser Thr Pro Pro	
	450 455 460
agt ctt aaa tta aca gtc tct gct aat ggt agc agt cca gaa tct gtc	1440
Ser Leu Lys Leu Thr Val Ser Ala Asn Gly Ser Ser Pro Glu Ser Val	
	465 470 475 480
tta agg aat tcc gca atg agt tac aca aga act cct tca atc ata aga	1488
Leu Arg Asn Ser Ala Met Ser Tyr Thr Arg Thr Pro Ser Ile Ile Arg	
	485 490 495
aag aag aat tcc aga ttt cct gaa gct gca acg cat tct aga tgc aca	1536
Lys Lys Asn Ser Arg Phe Pro Glu Ala Ala Thr His Ser Arg Cys Thr	
	500 505 510
ggt acc acc agt ccc aca cat att ttc cca aga gca tct gac agg gaa	1584
Gly Thr Thr Ser Pro Thr His Ile Phe Pro Arg Ala Ser Asp Arg Glu	
	515 520 525
gac acc tca aac ctg aag gac aga ttt tct gga tgt aaa tca tca gct	1632
Asp Thr Ser Asn Leu Lys Asp Arg Phe Ser Gly Cys Lys Ser Ser Ala	
	530 535 540
tcg gga aaa tct ctt gga aga cgg ttg gaa tat gcc ttt gat atg gaa	1680
Ser Gly Lys Ser Leu Gly Arg Arg Leu Glu Tyr Ala Phe Asp Met Glu	

ES 2 531 479 T3

545					550					555				560		
tgg	gat	gcc	tct	aga	tgt	tgc	aca	cca	gtt	tct	gca	gct	tca	cct	tgt	1728
Trp	Asp	Ala	Ser	Arg	Cys	Cys	Thr	Pro	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Pro	Cys	
				565					570					575		
gca	ctt	aga	ctt	ggt	ggt	aat	acc	atg	ctg	aca	cca	taa				1767
Ala	Leu	Arg	Leu	Gly	Gly	Asn	Thr	Met	Leu	Thr	Pro					
			580					585								

<210> 55
 <211> 588
 <212> PRT
 <213> *Nicotiana tabacum*
 <400> 55

5

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

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

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 5
 <400> 58
 ccggatcctc tagattgcg cctgagatct gag 33
 <210> 59
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 15
 <400> 59
 ccaagctca taagccgata gaattcacc 29
 <210> 60
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 25
 <400> 60
 aactgcagtc tcaatagaa ttcttcag30
 30
 <210> 61
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 40
 <400> 61
 ggaattcgtg tgatatctac ccgcttcg 28
 <210> 62
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 50
 <400> 62
 cgggatccgt tttcaccga agtcatgc 29
 <210> 63
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 60
 <400> 63
 ttgaattcca agtcttgggc ttgacagaag ag 32
 <210> 64
 <211> 38
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 5
 <400> 64
 ttctcgagaa gctctgcaa gaatcattct ctgatctg 38
 <210> 65
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 15
 <400> 65
 ttggatccaa gtcttgggct tgacagaaga g 31
 <210> 66
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 25
 <400> 66
 cctctagact agtgtcgacc gtcaagaatc attctctgat ctg 43
 30
 <210> 67
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 40
 <400> 67
 ttgaattctt gttgcctgat aaggctgtct c31
 <210> 68
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 50
 <400> 68
 ttctcgagaa gcttgaattt gcctagtagg ttagtgc 37
 <210> 69
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 60
 <400> 69
 ttggatcctt gttgcctgat aaggctgtct c 31
 <210> 70
 <211> 42
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 5
 <400> 70
 cctctagact agtgtcgacg aattgccta gtaggttagt gc 42
 <210> 71
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 15
 <400> 71
 ccggatcct cctcagtaa gaaaagattg aacttg 36
 20
 <210> 72
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 <400> 72
 ccgtcgactt aacagtagg atcattaaca g 31
 30
 <210> 73
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 <400> 73
 ccggatcctt ccagtcagc accatgctct g 31
 40
 <210> 74
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
 50
 <400> 74
 ccgtcgacct aagagatctg atagttcgat g 31
 <210> 75
 <211> 776
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 55
 <400> 75

Met Lys Arg Glu Met Lys Ala Pro Thr Thr Pro Leu Glu Ser Leu Gln
 1 5 10 15
 Gly Asp Leu Lys Gly Lys Gln Gly Arg Thr Ser Gly Pro Ala Arg Arg
 20 25 30
 Ser Thr Lys Gly Gln Trp Thr Pro Glu Glu Asp Glu Val Leu Cys Lys
 35 40 45
 Ala Val Glu Arg Phe Gln Gly Lys Asn Trp Lys Lys Ile Ala Glu Cys
 50 55 60

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

Glu Thr Glu Cys Ser Lys Lys Phe Gln Asn Leu Asn Cys Ser His Glu
 305 310 315 320
 Leu Arg Thr Thr Thr Ala Thr Glu Asp Gln Leu Pro Gly Val Ser Asn
 325 330 335
 Asp Ala Lys Gln Asp Arg Gly Leu Glu Leu Leu Thr His Asn Met Asp
 340 345 350
 Asn Gly Gly Lys Asn Gln Ala Leu Gln Gln Asp Phe Gln Ser Ser Val
 355 360 365
 Arg Leu Ser Asp Gln Pro Phe Leu Ser Asn Ser Asp Thr Asp Pro Glu
 370 375 380
 Ala Gln Thr Leu Ile Thr Asp Glu Glu Cys Cys Arg Val Leu Phe Pro
 385 390 395 400
 Asp Asn Met Lys Asp Ser Ser Thr Ser Ser Gly Glu Gln Gly Arg Asn
 405 410 415
 Met Val Asp Pro Gln Asn Gly Lys Gly Ser Leu Cys Ser Gln Ala Ala
 420 425 430
 Glu Thr His Ala His Glu Thr Gly Lys Val Pro Ala Leu Pro Trp His
 435 440 445
 Pro Ser Ser Ser Glu Gly Leu Ala Gly His Asn Cys Val Pro Leu Leu
 450 455 460
 Asp Ser Asp Leu Lys Asp Ser Leu Leu Pro Arg Asn Asp Ser Asn Ala
 465 470 475 480
 Pro Ile Gln Gly Cys Arg Leu Phe Gly Ala Thr Glu Leu Glu Cys Lys
 485 490 495
 Thr Asp Thr Asn Asp Gly Phe Ile Asp Thr Tyr Gly His Val Thr Ser
 500 505 510
 His Gly Asn Asp Asp Asn Gly Gly Phe Pro Glu Gln Gln Gly Leu Ser
 515 520 525

Tyr Ile Pro Lys Asp Ser Leu Lys Leu Val Pro Leu Asn Ser Phe Ser
 530 535 540
 Ser Pro Ser Arg Val Asn Lys Ile Tyr Phe Pro Ile Asp Asp Lys Pro
 545 550 555 560
 Ala Glu Lys Asp Lys Gly Ala Leu Cys Tyr Glu Pro Pro Arg Phe Pro
 565 570 575
 Ser Ala Asp Ile Pro Phe Phe Ser Cys Asp Leu Val Pro Ser Asn Ser
 580 585 590
 Asp Leu Arg Gln Glu Tyr Ser Pro Phe Gly Ile Arg Gln Leu Met Ile
 595 600 605
 Ser Ser Met Asn Cys Thr Thr Pro Leu Arg Leu Trp Asp Ser Pro Cys
 610 615 620
 His Asp Arg Ser Pro Asp Val Met Leu Asn Asp Thr Ala Lys Ser Phe
 625 630 635 640
 Ser Gly Ala Pro Ser Ile Leu Lys Lys Arg His Arg Asp Leu Leu Ser
 645 650 655
 Pro Val Leu Asp Arg Arg Lys Asp Lys Lys Leu Lys Arg Ala Ala Thr
 660 665 670
 Ser Ser Leu Ala Asn Asp Phe Ser Arg Leu Asp Val Met Leu Asp Glu
 675 680 685
 Gly Asp Asp Cys Met Thr Ser Arg Pro Ser Glu Ser Pro Glu Asp Lys
 690 695 700
 Asn Ile Cys Ala Ser Pro Ser Ile Ala Arg Asp Asn Arg Asn Cys Ala
 705 710 715 720
 Ser Ala Arg Leu Tyr Gln Glu Met Ile Pro Ile Asp Glu Glu Pro Lys
 725 730 735
 Glu Thr Leu Glu Ser Gly Gly Val Thr Ser Met Gln Asn Glu Asn Gly
 740 745 750
 Cys Asn Asp Gly Gly Ala Ser Ala Lys Asn Val Ser Pro Ser Leu Ser
 755 760 765
 Leu His Ile Ile Trp Tyr Gln Leu
 770 775

<210> 76
 <211> 961
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 76

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

				645						650					655
Arg	Leu	Asp	Val	Met	Phe	Asp	Glu	Thr	Glu	Asn	Arg	Gln	Ser	Asn	Phe
			660					665					670		
Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Val	Ile	His	Gly	Asp	Arg	Glu	Asn	His	Phe	His
		675					680					685			
Ile	Leu	Asn	Gly	Asp	Gly	Glu	Glu	Trp	Ser	Gly	Lys	Pro	Ser	Ser	Leu
	690					695					700				
Phe	Ser	His	Arg	Met	Pro	Glu	Glu	Thr	Met	His	Ile	Arg	Lys	Ser	Leu
705					710					715					720
Glu	Lys	Val	Asp	Gln	Ile	Cys	Met	Glu	Ala	Asn	Val	Arg	Glu	Lys	Asp
				725					730					735	
Asp	Ser	Glu	Gln	Asp	Val	Glu	Asn	Val	Glu	Phe	Phe	Ser	Gly	Ile	Leu
			740					745					750		
Ser	Glu	His	Asn	Thr	Gly	Lys	Pro	Val	Leu	Ser	Thr	Pro	Gly	Gln	Ser
		755					760					765			
Val	Thr	Lys	Ala	Glu	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Arg	Asn	Gln	Leu
	770					775					780				
Gln	Arg	Thr	Leu	Met	Ala	Thr	Ser	Asn	Lys	Glu	His	His	Ser	Pro	Ser
785					790					795					800
Ser	Val	Cys	Leu	Val	Ile	Asn	Ser	Pro	Ser	Arg	Ala	Arg	Asn	Lys	Glu
				805					810					815	
Gly	His	Leu	Val	Asp	Asn	Gly	Thr	Ser	Asn	Glu	Asn	Phe	Ser	Ile	Phe
			820					825					830		
Cys	Gly	Thr	Pro	Phe	Arg	Arg	Gly	Leu	Glu	Ser	Pro	Ser	Ala	Trp	Lys
		835					840					845			
Ser	Pro	Phe	Tyr	Ile	Asn	Ser	Leu	Leu	Pro	Ser	Pro	Arg	Phe	Asp	Thr
	850					855					860				
Asp	Leu	Thr	Ile	Glu	Asp	Met	Gly	Tyr	Ile	Phe	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg
865					870					875					880

Ser Tyr Glu Ser Ile Gly Val Met Thr Gln Ile Asn Glu His Thr Ser
 885 890 895

Ala Phe Ala Ala Phe Ala Asp Ala Met Glu Val Ser Ile Ser Pro Thr
 900 905 910

Asn Asp Asp Ala Arg Gln Lys Lys Glu Leu Asp Lys Glu Asn Asn Asp
 915 920 925

Pro Leu Leu Ala Glu Arg Arg Val Leu Asp Phe Asn Asp Cys Glu Ser
 930 935 940

Pro Ile Lys Ala Thr Glu Glu Val Ser Ser Tyr Leu Leu Lys Gly Cys
 945 950 955 960

Arg

<210> 77
 <211> 505
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 77

Met Ser Ser Thr Phe Asn Pro Ala Ala Ser Ser Pro Asp Glu Glu Gly
 1 5 10 15

Thr Gly Glu Val Lys Ile Glu Asp Gln Cys Val Glu Asn Lys Gln Ser
 20 25 30

Thr Pro Ala Ser Cys Ser Ser Val Ser Glu Gly Ser Ala Gly Ser Ser
 35 40 45

His Lys Ser Pro Thr Ile Ala Ser Pro Ala Thr Val Ser Pro Thr His
 50 55 60

Arg Tyr Leu Gly Arg Thr Ser Gly Pro Ile Arg Arg Ala Lys Gly Gly
 65 70 75 80

Trp Thr Pro Glu Glu Asp Glu Thr Leu Arg Gln Ala Val Asp Thr Phe
 85 90 95

Lys Gly Lys Ser Trp Lys Asn Ile Ala Lys Ser Phe Pro Asp Arg Thr
 100 105 110

10

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

Tyr Tyr Thr Pro Gln Ile Asp Tyr Tyr Arg Ala Ser Glu Val Asp Thr
 340 345 350
 Gln Arg Met Tyr Gly Asn Glu Cys Gly Cys Ser Pro Ser Ala Ser Pro
 355 360 365
 Val Ser Phe Phe Thr Pro Pro Pro Cys Arg Asn Val His Ser Asn Gly
 370 375 380
 Ser Thr Pro Arg Ser Pro Glu Ser Tyr Leu Arg Glu Ala Gly Arg Thr
 385 390 395 400
 Tyr Pro Asn Thr Pro Ser Ile Phe Arg Lys Arg Arg Pro Arg Val Val
 405 410 415
 Val Gln Asp Asn Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asp Glu Ala Lys Glu Val
 420 425 430
 Asp Gln Lys Val Asn Asp Gly Lys Asp Ser Ser Glu Ile Gln Asn Asn
 435 440 445
 Gly Ser Asn Ala Tyr Asn Leu Ser Pro Pro Tyr Arg Ile Arg Ser Lys
 450 455 460
 Arg Thr Ala Val Phe Lys Ser Arg Gln Leu Glu Phe Ile Ser Arg Glu
 465 470 475 480
 Glu Glu Lys Ala Asp Asp Glu Thr Lys Ser Ser Glu Lys Asp Met Leu
 485 490 495
 Ile Asp Gly Asp Ser Gln Leu Leu Gly
 500 505

<210> 78
 <211> 548
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 78

Met Ser Leu Ser Ser Asn Pro Pro Val Cys Ser Pro Glu Lys Glu Glu
 1 5 10 15
 Arg Ser Glu Met Lys Ile Glu Ile Gln Cys Met Glu Asn Lys Gln Pro
 20 25 30

5

10

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

Arg Leu Arg Ala Lys Arg Thr Ala Val Ile Lys Ser Arg Gln Leu Glu
 500 505 510

Phe Thr Ser Glu Lys Glu Lys Gln Pro Asp Asn Glu Ile Glu Phe Thr
 515 520 525

Ser Ala Lys Glu Lys Gln Pro Asp Asn Glu Ile Lys Thr Ser Glu Glu
 530 535 540

Asp Lys Pro Val
 545

<210> 79
 <211> 599
 <212> PRT
 <213> *Physcomitrella patens*

5

<400> 79

Met Ser Asp Thr Val Glu Phe Tyr Leu Ile Thr Arg Ser Ile Ile Lys
 1 5 10 15

Val Lys Asn Phe Arg Arg Thr Gly Gly Pro Thr Arg Arg Ser Ser Lys
 20 25 30

Gly Gly Trp Thr Pro Glu Glu Asp Glu Thr Leu Arg Arg Ala Val Gln
 35 40 45

Cys Phe Asn Gly Lys Asn Trp Lys Lys Ile Ala Glu Phe Phe Thr Asp
 50 55 60

Arg Thr Asp Val Gln Cys Leu His Arg Trp Gln Lys Val Leu Asn Pro
 65 70 75 80

Asp Leu Val Lys Gly Ala Trp Thr Lys Glu Glu Asp Asp Arg Ile Met
 85 90 95

Glu Leu Val Asn Lys Tyr Gly Ala Lys Lys Trp Ser Val Ile Ala Gln
 100 105 110

Asn Leu Pro Gly Arg Ile Gly Lys Gln Cys Arg Glu Arg Trp His Asn
 115 120 125

His Leu Asn Pro Ser Ile Lys Arg Glu Ala Trp Thr Gln Gln Glu Asp
 130 135 140

10

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

Ile Pro Ala Pro Glu Ser Ser Ser Gln Ala Tyr Arg Ser Ser Ser Met
 370 375 380

Ser Val Pro Leu Pro Asp Leu Gly Ser Leu Phe Ala Ser Ser His Met
 385 390 395 400

Pro Met Ala Ala His Asn Asp Thr Gln Pro Leu Ser Ser Phe Asn Gly
 405 410 415

Thr Gly Val Pro Pro Gly Glu Glu Thr Leu Ala Met Met Gly Ser Lys
 420 425 430

Gln Asn Tyr Glu Pro Leu Arg Arg Cys Asn Leu Pro Pro Ser Gln Pro
 435 440 445

Ser Glu Gly Asp Ala Ala Phe Glu Asp Ser Gly Ala Ser Val Arg Cys
 450 455 460

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

Ser Glu Phe Pro Ser Asp Asn Leu Leu Arg Asp Ser Ser Glu Ala Val
 485 490 495

Asn Glu Tyr Gln Ser Gln Ser Pro Met Leu Thr Glu Glu Asp Leu Glu
 500 505 510

Asp Lys Gly Asp Ser Ser Arg Val Gln Asp Arg Asp Gly Leu Phe Tyr
 515 520 525

Glu Pro Pro Arg Ile Val Asp Pro Pro Phe Met Asn Tyr Asp Leu Val
 530 535 540

Ser Ser Leu Asn Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Val Arg Gln Met Ile Met
 545 550 555 560

Pro Ala Gly Asn Cys Ile Thr Pro Pro Asn Tyr Leu Gln Ser Pro Phe
 565 570 575

Gln Gly Lys Ser Pro Gln Ser Lys Leu Arg Ser Ala Ala Lys Ser Phe
 580 585 590

Ser Gly Ser Pro Ser Ile Leu
 595

<210> 80
 <211> 254
 <212> PRT

<213> *Adiantum raddianum*

<400> 80

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

Glu His His Ala His Phe Ser Ser Ser Pro Ala Ile Thr Gln Gln Asn
 145 150 155 160

Ser Glu Asp Ser Glu Ser Asn Ala Val Arg Glu Val Glu Asp Ser Ser
 165 170 175

Gly Cys Ser Gln Ser Ser Leu Gly Ile Val Ser Ser Arg Lys Cys Arg
 180 185 190

His Ala Ser Leu Gly
 195

5 <210> 82
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Secale cereale*
 <400> 82

Pro Glu Leu Val Lys Gly Pro Trp Ser Lys Glu Glu Asp Asp Val Ile
 1 5 10 15

Ile Gln Met Val Lys Lys Tyr Gly Pro Thr Lys Trp Ser Thr Ile Ala
 20 25 30

Gln Ala Leu Pro Gly Arg Ile Gly Lys Gln Cys Arg Glu Arg Trp His
 35 40 45

Asn His Leu Asn Pro Gly Ile Asn Lys Asp Ala Trp Thr Gln Glu Glu
 50 55 60

Glu Ile Arg Leu Ile Gln Ala His Arg Ile Tyr Gly Asn Lys Trp Ala
 65 70 75 80

Glu Leu Ser Lys Phe Leu Pro Gly Arg Thr Asp Asn Ala Ile Lys Asn
 85 90 95

10 His Trp
 <210> 83
 <211> 566
 <212> PRT
 15 <213> *Papaver rhoeas*
 <400> 83

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

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

ES 2 531 479 T3

Ser Leu Glu Arg Glu Lys Ile Glu Asp Cys Lys Glu Thr Pro Gly Ser
465 470 475 480

Met Glu Ser Asn Ser Ser Thr Gly Arg Val Asn Ser Thr Ile Arg Leu
485 490 495

Phe Tyr Thr Arg Lys Lys His Arg Pro Cys Arg Ser Arg Val Glu Arg
500 505 510

Pro Asp Ala Cys Lys Ser Leu Glu Lys Gln Leu Glu Ser Thr Leu Asp
515 520 525

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

Asp Gln Gln Gly Lys Ser Thr Thr Lys Glu Asp Gly His Asp Pro Leu
545 550 555 560

Gln Asn Ser Val Ala Ser
565

- 5 <210> 84
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

<400> 84
cccaagctta aattcggaca aatagagcgt agtcaac 37
- 15 <210> 85
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

<400> 85
gccatcttct ctcctccgta taagag 26
- 25 <210> 86
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

<400> 86
cccaagcttc tcgtaagaa ccctgatc 29
- 35 <210> 87
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

5

<400> 87

gccatcttct acacacaaaa tcgaaacc 28

<210> 88

<211> 640

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Met Ala Arg Arg Pro Arg His Ser Ile Tyr Ser Ser Asp Glu Asp Asp
1 5 10 15

Glu Asp Phe Glu Met Cys Asp His Asp Tyr Asp Gly Leu Leu Pro Lys
20 25 30

Ser Gly Lys Arg His Leu Gly Lys Thr Arg Trp Thr Arg Glu Glu Asp
35 40 45

Glu Lys Leu Lys Lys Leu Val Glu Gln Asn Gly Thr Asp Asp Trp Lys
50 55 60

Val Ile Ala Asn Tyr Leu Pro Asn Arg Thr Asp Val Gln Cys Gln His
65 70 75 80

Arg Trp Gln Lys Val Leu Asn Pro Glu Leu Ile Lys Gly Pro Trp Thr
85 90 95

Lys Glu Glu Asp Gln Arg Val Ile Glu Leu Val Gln Lys Tyr Gly Pro
100 105 110

Lys Arg Trp Ser Val Ile Ala Lys His Leu Lys Gly Arg Ile Gly Lys
115 120 125

Gln Cys Arg Glu Arg Trp His Asn His Leu Asn Pro Glu Val Lys Lys

15

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

Ala Ser Pro Ala Arg Cys Met Ile Val His Gln Gly Thr Ile Leu Asp
 370 375 380

Asn Val Lys Asn Leu Leu Glu Phe Ala Glu Thr Leu Gln Phe Ile Asp
 385 390 395 400

Ser Phe Leu Asn Thr Ser Ser Asn His Glu Asn Ser Asp Leu Glu Met
 405 410 415

Pro Ser Leu Thr Ser Thr Pro Leu Ile Gly His Lys Leu Thr Val Thr
 420 425 430

Thr Pro Phe His Arg Asp Gln Thr Val Lys Thr Gln Lys Glu Asn Thr
 435 440 445

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

Arg Thr Pro Thr Pro Phe Lys His Ala Leu Ala Ala Gln Glu Ile Lys
 465 470 475 480

Tyr Gly Pro Leu Lys Met Leu Pro Gln Thr Pro Ser His Leu Val Glu
 485 490 495

Asp Leu Gln Asp Val Ile Lys Gln Glu Ser Asp Glu Ser Gly Ile Val
 500 505 510

Ala Glu Phe Gln Glu Asn Gly Pro Pro Leu Leu Lys Lys Ile Lys Gln
 515 520 525

Glu Val Glu Ser Pro Thr Asp Lys Ser Gly Asn Phe Phe Cys Ser His
 530 535 540

His Trp Glu Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gln Leu Phe Thr Gln Thr Ser
 545 550 555 560

Pro Val Ala Asp Ala Pro Asn Ile Leu Thr Ser Ser Val Leu Met Ala
 565 570 575

Pro Ala Ser Glu Asp Glu Asp Asn Val Leu Lys Ala Phe Thr Val Pro
 580 585 590

Lys Asn Arg Ser Leu Ala Ser Pro Leu Gln Pro Cys Ser Ser Thr Trp

595

600

605

Glu Pro Ala Ser Cys Gly Lys Met Glu Glu Gln Met Thr Ser Ser Ser
 610 615 620

Gln Ala Arg Lys Tyr Val Asn Ala Phe Ser Ala Arg Thr Leu Val Met
 625 630 635 640

5 <210> 89
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos diseñada
 <400> 89

Thr Pro Ser Ile Leu Lys Lys Arg His Arg
 1 5 10

15 <210> 90
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos diseñada, X significa cualquier resto de aminoácido

25 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X significa cualquier resto de aminoácido

30 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X significa cualquier resto de aminoácido

35 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> X significa cualquier resto de aminoácido

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> X significa cualquier resto de aminoácido

<400> 90

Asn Xaa Xaa Thr Pro Xaa Arg Leu Trp Xaa
 1 5 10

45 <210> 91
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

Trp Xaa Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

- 5 <210> 93
- <211> 150
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos diseñada, X significa H, W, Y o F en 16 y 93, K, H o R en 19, 67, 102, 123, 129, 134 y 150, S, T, G, C o A en 32, 54, 77, 135, 138 y 146, D o E en 33 y 110, L, I o V en 34, 49, 61, 65, 76 y 127, y cualquier resto en otros

- 15 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (3)..(3)
- <223> X significa cualquier resto de aminoácido

- 20 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (7)..(8)
- <223> X significa cualquier resto de aminoácido

- 25 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (10)..(12)
- <223> X significa cualquier resto de aminoácido

- 30 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (14)..(15)
- <223> X significa cualquier resto de aminoácido

- 35 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (17)..(17)
- <223> X significa cualquier resto de aminoácido

- 40 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (20)..(20)
- <223> X significa cualquier resto de aminoácido

- 45 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (23)..(23)
- <223> X significa cualquier resto de aminoácido

- 50 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (26)..(30)
- <223> X significa cualquier resto de aminoácido

- 55 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (45)..(45)
- <223> X significa cualquier resto de aminoácido

- 60 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (47)..(47)
- <223> X significa cualquier resto de aminoácido

- <220>

- <221> MISC_FEATURE
<222> (52)..(52)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (55)..(55)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (59)..(60)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (62)..(64)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (66)..(66)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (68)..(68)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (70)..(71)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (75)..(75)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (78)..(81)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (97)..(97) cualquier resto de aminoácido
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(99)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (101)..(101)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (103)..(104)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 65 <220>
<221> MISC_FEATURE

- <222> (107)..(108)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (111)..(112)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (114)..(116)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (118)..(120)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (128)..(128)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (130)..(130)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (132)..(132)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (142)..(142)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (144)..(144)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (147)..(147)
<223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X significa H o W o Y o F
- 55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (93)..(93)
<223> X significa H o W o Y o F
- 60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> X significa K o H o R
- 65 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (123)..(123)

<223> X significa K o H o R

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (102)..(102)
 <223> X significa K o H o R

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (67)..(67)
 <223> X significa K o H o R

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (129)..(129)
 <223> X significa K o H o R

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (134)..(134)
 <223> X significa K o H o R

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (150)..(150)
 <223> X significa K o H o R

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (32)..(32)
 <223> X significa S o T o G o C o A

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <222> (135)..(135)
 <223> X significa S o T o G o C o A

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (138)..(138)
 <223> X significa S o T o G o C o A

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <222> (146)..(146)
 <223> X significa S o T o G o C o A

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (33)..(33)
 <223> X significa D o E

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <222> (110)..(110)
 <223> X significa D o E

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 60 <222> (34)..(34)
 <223> X significa L o I o V

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 65 <222> (49)..(49)
 <223> X significa L o I o V

5
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (76)..(76)
<223> X significa L o l o V

10
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (127)..(127)
<223> X significa L o l o V

15
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (54)..(54) S o T o G o C o A
<223> X significa S o T o G o C o A

20
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (77)..(77)
<223> X significa S o T o G o C o A

25
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (61)..(61)
<223> X significa L o l o V

30
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (65)..(65)
<223> X significa L o l o V

<400> 93

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

- 5 <210> 94
- <211> 22
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos diseñada, X significa K o R en 4, L o V en 11, S o T en 12, L, I o V en 14, D o E en 16 y 20, y cualquier resto de aminoácido en otros
- 15 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (7)..(7)
- <223> X significa cualquier resto de aminoácido
- 20 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (9)..(9)
- <223> X significa cualquier resto de aminoácido
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (15)..(15) cualquier resto de aminoácido

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X significa K o R o D o E o H

5

<400> 95

Ser Cys Ser Ser Xaa Ser Xaa
 1 5

10

<210> 96
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

20

<400> 96
 aactgcagcg gataaaccaa tttcaaag ata 33

25

<210> 97
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR

35

<400> 97
 cgggatccct ttgatcctct ccgatctctc tat 33

40

<210> 98
 <211> 1700
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

45

<400> 98

cggataaacc aatthtcaaa tgataatatt tgtatataat gtttctgtat acaggggagg 60
 acccaghta gicttgggtg gggcatgtgc ccgatactca attctataaa tcttatataa 120
 gtttgatta tgtaattaaa aatgtattta gtttagtggt ttttactta atgggtcccc 180
 acattaacc aagtttaaac ctgctgatg tctttttatt gattttttat aactgtacct 240
 atataagatt atthcctgga ttagccatct gtatattaat aaatcgtttc ctgtggttgt 300
 gcgatgcata accgtccaag aaagtcgtat atthttaata catgtgtaa aataggtttt 360
 aagtgagaat ttttttaact tgtggagtgt ggagtgtaga gtgtagatgt acattaccta 420
 tatatttate caattctgtg taataaagat gttggggagg cgcttctgc cacatacaca 480

ttggattaga agggcaaaag aagtictaat aaggagcaaa ctaatagcca tgaaaattat 540
 gaatttacca tactgaaaac aaaggaatta aggttttgaa ttcaatactt gttttgttat 600
 atatgatgtt gatgtgacgt atttgtgogt ttctcatagt gactttgaaa ggaaggctaa 660
 acgaatttgc agtaaaagta acagaagaaa cacttcaaaa ttgaattaaa atgaagaaaa 720
 aaaagaatga gaaaaagtga gaagtgggtg ttgtctggta ttaagggtac tcacttctct 780
 ccttttcaac acagcccgcac acacatgtct cttttttttt ttttcataca cacatttcta 840
 ttatttagtt tctaaaata aaaattataa aacaaaaagc acaccacccc ataaactaaa 900
 gcttttctct ctcatccac tacaatctt atatacaagt ttgcgcaaatc ttgactcttc 960
 acgttggga tctatctaga gagataagta agagagagga agagtaagga agaaagtgg 1020
 tgaactgtag cagagtctga ggttgaaac ttgtagtcc cattgaagca tgcttcaccg 1080
 tttttccga aggaagttac tcatccactg agagagaaaag agggatttgg agatagagaa 1140
 agaaatttct cagatgggtt tgtgagaatt cacagcaaga gcaagaaact cctatatctt 1200
 cctttgettc cagagaccag cgtgatcaaa aacaaatatt tttacggtat ctataagaat 1260
 cctcccctct tttctttttt ccttaaagag aatttttttg catctttctt aggttccaat 1320
 aaatatgcag aagaaagtta aaatttttgt accgtcgttg aaccttttaa agacctaatt 1380
 aagagacaag atcactactaa gctcataaat cactttctat ttacacatat ataggttatt 1440
 aatcttaaac aagatctata ttttatcttt gagattttc aagatttcat caagtgctac 1500
 gttcattcat tgattacatt tcaaatttca ctaagaaagt taaaacacgg atctttttga 1560
 gaatatcaag aaagttcttt gaaatatacc aaaagaaatc agtactttca agaatacata 1620
 actttttagg ttgtgttaaa taatatttgc ttttgaata aaggaacaaa attaaataga 1680
 gagatoggag aggatcaag 1700

- 5 <210> 99
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
- <400> 99
 cgggatccat gaaagtgat agaataagca c 31
- 15 <210> 100
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Oligonucleótido para actuar como un cebador para PCR
- <400> 100
 ttttctttt gcggccgctt aacagcctaa atggagtaag acag 44

REIVINDICACIONES

1. Una planta transgénica que comprende o alberga una célula vegetal transformada con un vector que comprende los siguientes (i) a (iii):

- 5
- (i) un promotor transcribible en una célula vegetal,
 - (ii) un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 53 unida a dicha secuencia promotora en una dirección con sentido, y
 - (iii) una señal para terminación de la transcripción y poliadenilación de una molécula de ARN,

10 en la que la cantidad de ADN expresado que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 53 aumenta y su crecimiento celular se suprime en comparación con la planta de tipo silvestre correspondiente que no comprende el vector.

BAB78687 1: -MTSDNGKAPDKGEPSPGPPSAPQEGEISNEPKRRRPLNGRTTGPTRRSTKGNWTPPEEDA 59
 Os3Rmyba1 1: MMTSDNGKAPDKGEPSPGPPSAPQEGEISNEPKRRRPLNGRTTGPTRRSTKGNWTPPEEDA 60

BAB78687 60: ILSRAVQTYNGKNWKKIAECFPDRDQVCLHRWQKVLNPELVKGPWSKEEDEIIVQMVNK 119
 Os3Rmyba1 61: ILSRAVQTYNGKNWKKIAECFPDRDQVCLHRWQKVLNPELVKGPWSKEEDEIIVQMVNK 120

BAB78687 120: LGPKKWSTIAQALPGRIGKQCRERWYNHLNPGINKEAWTQEEEEITLIHAHRMYGNKWAEL 179
 Os3Rmyba1 121: LGPKKWSTIAQALPGRIGKQCRERWYNHLNPGINKEAWTQEEEEITLIHAHRTYGNKWAEL 180

BAB78687 180: TKFLPGRTDNSIKNHWNSVKKKVNYSMSSGLLTQVSCPLPLNEYSANCNSSPAMTQONSE 239
 Os3Rmyba1 181: TKFLPGRTDNSIKNHWNSVKKKVNYSMSSGLLTQVSCPLPLNEYSANCNSSPAMTQONSE 240

BAB78687 240: DSGCFAVREVENSSGCSQSSLAKVCSQVHDTTVPLGCDLQVNFKNKNEAHDSSQSSMGP 299
 Os3Rmyba1 241: DSGCFAVREVENSSGCSQSSLAKVCSQVHDTTVPLGCDLQVNFKNKNEAHDSSQSSMGP 300

BAB78687 300: QACYTSAEAVASALPAVHCHVSSNLDPPDQHLQEDFAOGLNLDMTIDEMPTVPSFADNQT 359
 Os3Rmyba1 301: QACYTSAEAVASALPAVHCHVSSNLDPPDQHLQEDFAOGLNLDMTIDEMPTVPSFADNQT 360

Fig. 1

BAB78687 360: VCS IENHERSLEPYDVAMEVPLSMLSSDSGAEQKLFHFMSEADFNPNCLKSELWQDISLQ 419
Os3Rmyba1 361: VCS IENHERSLEPYDVAMEVPLSMLSSDSGAEQKLFHFMSEADFNPNCLKSELWQDISLQ 420

BAB78687 420: GLLSGPDAVEADSI SRSNHQSDVYSSEADTHFLAPPYMPQTSNSSVMGLADDQSPQMSV 479
Os3Rmyba1 421: GLLSGPDAVEADSI SRSNHQSDVYSSEADTHFLAPPYMPQTSNSSVMGLADDQSPQMSV 480

BAB78687 480: PPSLICSNAMTDDAPFDNRPRGRKEMPLSQAEVVTSQSSSSGDAEMFANPGCSNDRHVPSS 539
Os3Rmyba1 481: PPSLICSNAMTDDAPFDNRPRGRKEMPLSQAEVVTSQSSSSGDAEMFANPGCSNDRHVPSS 540

BAB78687 540: TMESIPCEGDQQVTNAEEPEASLEKEPSLTQSVTAPDEQDKGALFYEPFRPFLDVPFVS 599
Os3Rmyba1 541: TMESIPCEGDQQVTNAEEPEASLEKEPSLTQSVTAPDEQDKGALFYEPFRPFLDVPFVS 600

BAB78687 600: CDLVTSGLDQEFSPGLGIRQLMHSTMNVCTPMRLWGSPTHDESTGVLLKSAKSFICTPSI 659
Os3Rmyba1 601: CDLVTSGLDQEFSPGLGIRQLMHSTMNVCTPMRLWGSPTHDESTGVLLKSAKSFICTPSI 660

BAB78687 660: LKKRHRDLLSPIPKRIEKKYGTEKDRGVSDTSSTGIQTSCINATKDDALITVLIERS 719
Os3Rmyba1 661: LKKRHRDLLSPIPKRIEKKYGTEKDRGVSDTSSTGIQTSCINATKDDALITVLIERS 720

Fig. 2

BAB78687 720:ASSKSLEKKLVFSDENKENLGYTTEQTKDGQSAGNDEHMDEQTTGERSSATNVATNDDLS 779
 Os3Rmyba1 721:ASSKSLEKKLVFSDENKENLGYTTEQTKDGQSAGNDEHMDEQTTGERSSATNVATNDDLS 780

BAB78687 780:GNLVSTSF----- 788
 Os3Rmyba1 781:GNLQAPAGILIEHSGDDPISPDYGNVTMNOKLNINVKLSVCKEGVCARSKPTELIVEKSS 840

BAB78687 789:----- 788
 Os3Rmyba1 841:PCINVDYEYVNIADTPGIRKRGLESPSAWKSPWFVDMHFQGSYFTSPADSYDALGLMKQI 900

BAB78687 789:----- 788
 Os3Rmyba1 901:NVQTAAALVEAREVLASGGQCDNISDKENTGNPDAKKEPGTKLQTKIMAEGRVLD FEC 960

BAB78687 789:----- 788
 Os3Rmyba1 961:TTPERSSDKNAGSNLGRYLSSPIPSSHLLKSFR 993

Fig. 3

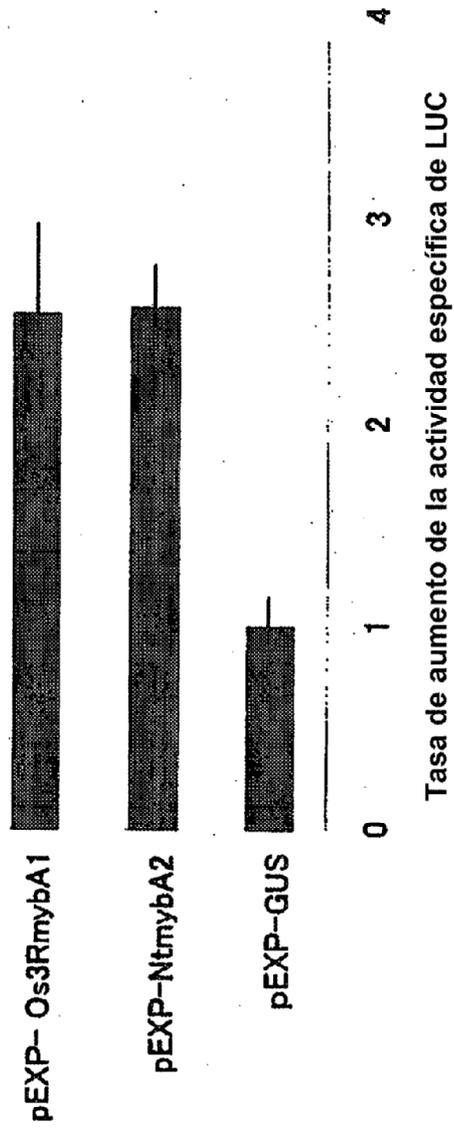


Fig. 4

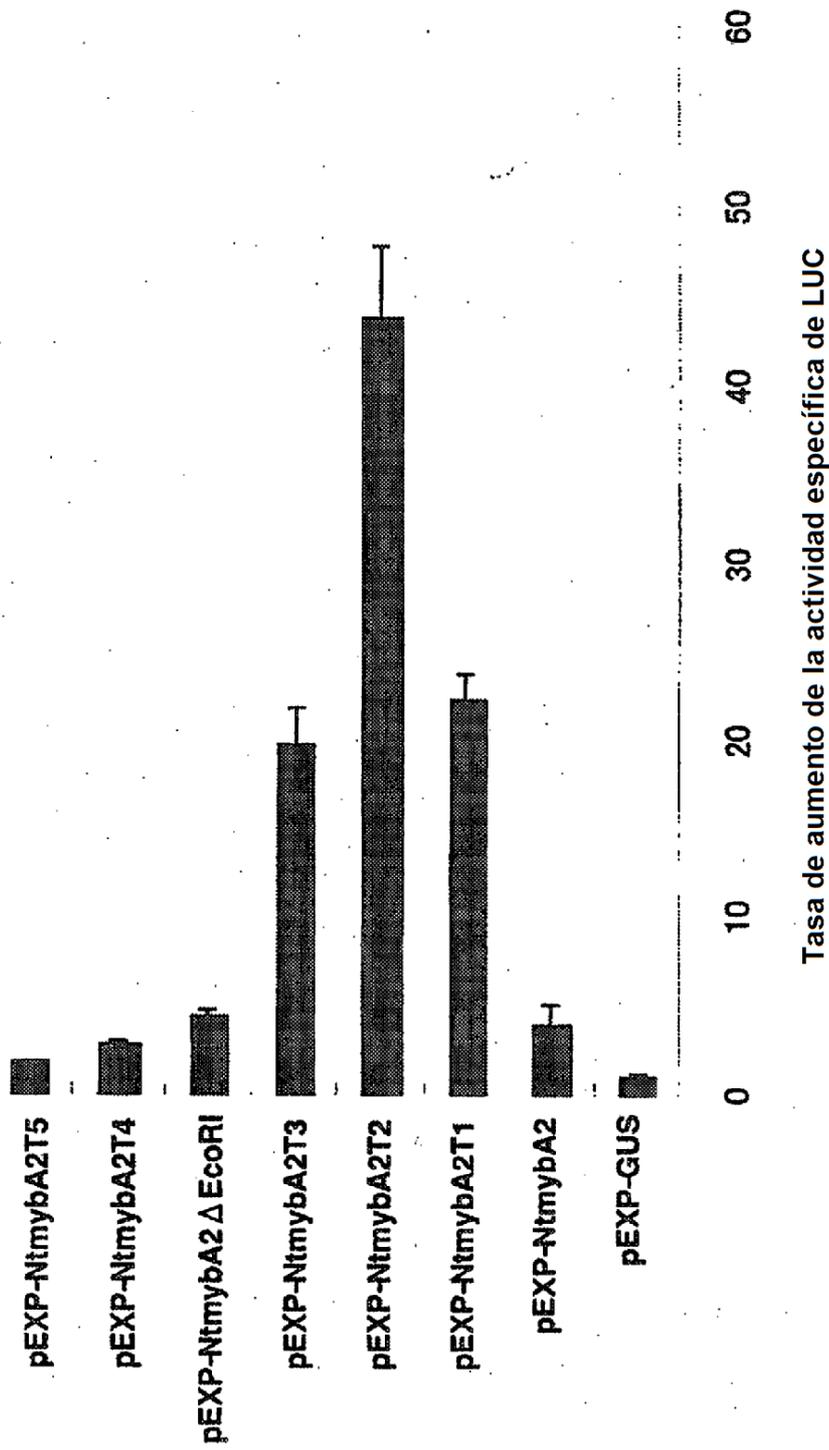


Fig. 5

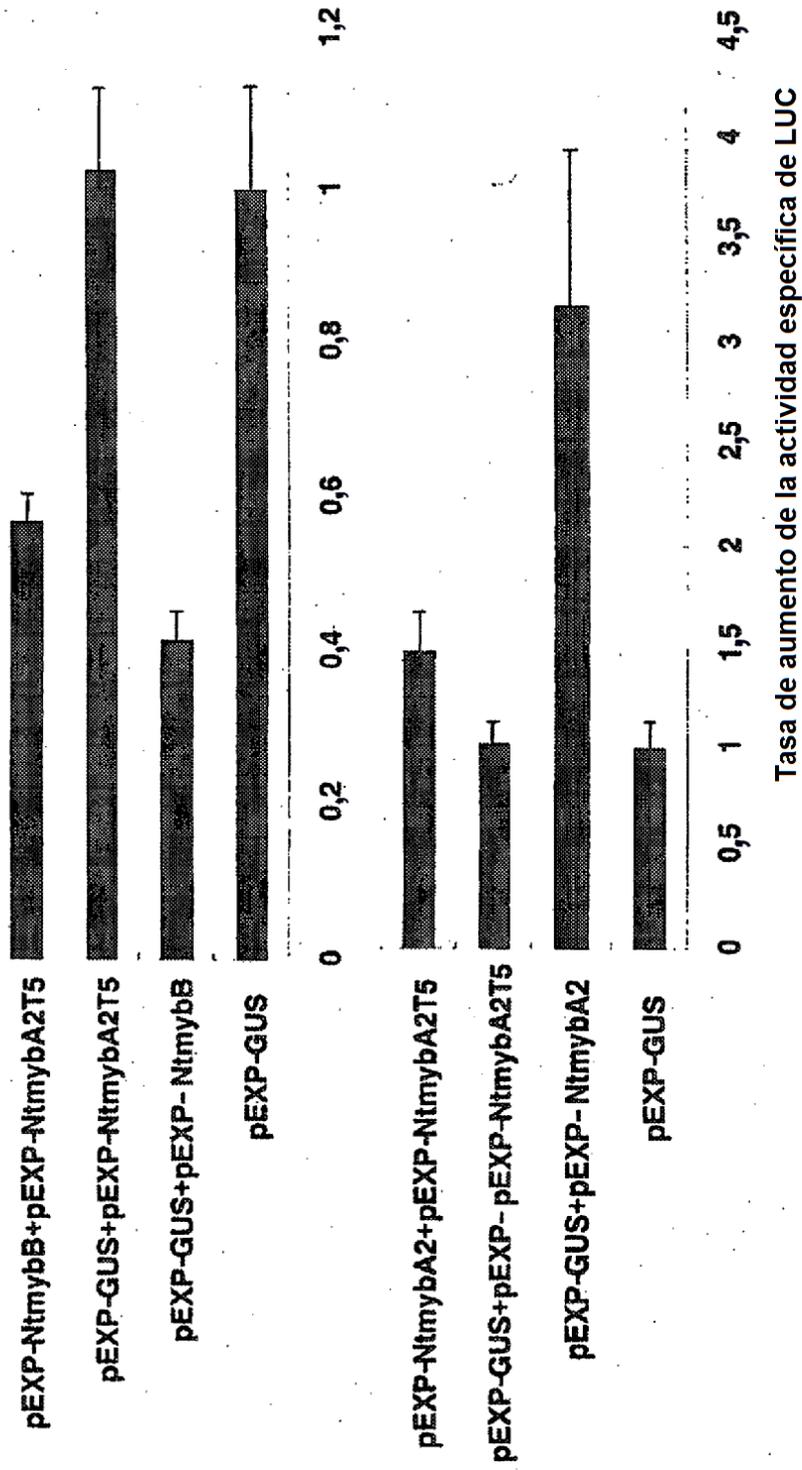
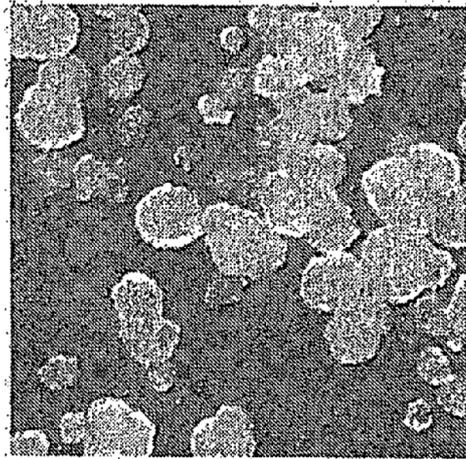
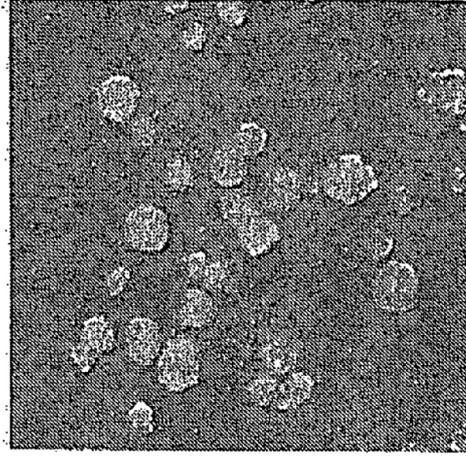


Fig. 6

Fig. 7



vector



A2 ARNi

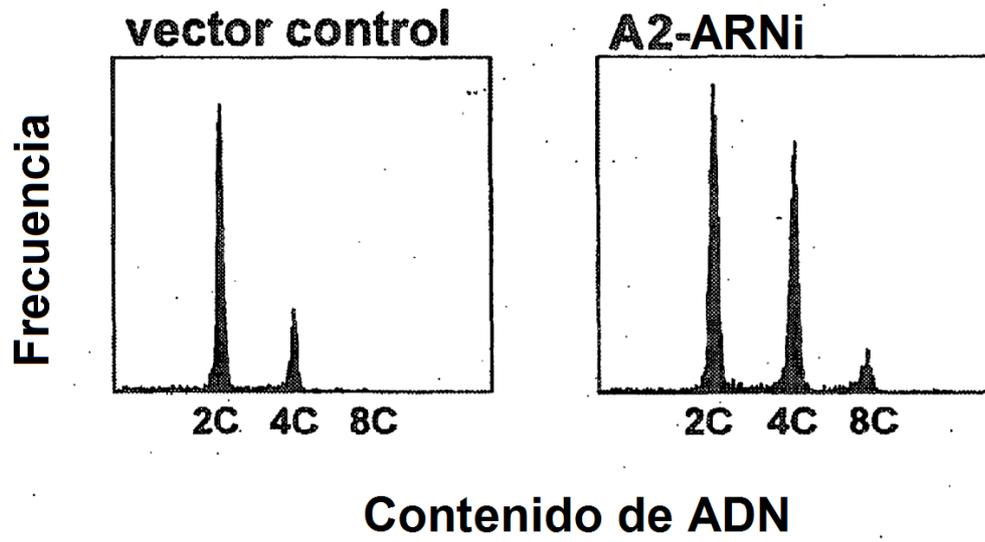
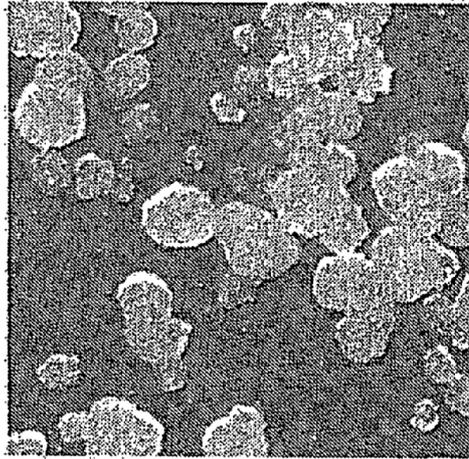
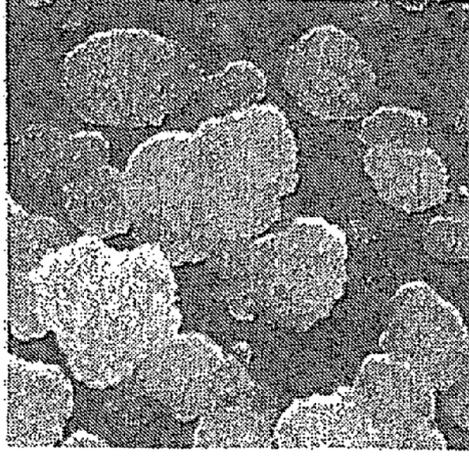


Fig. 8

Fig. 9



vector



B ARNi

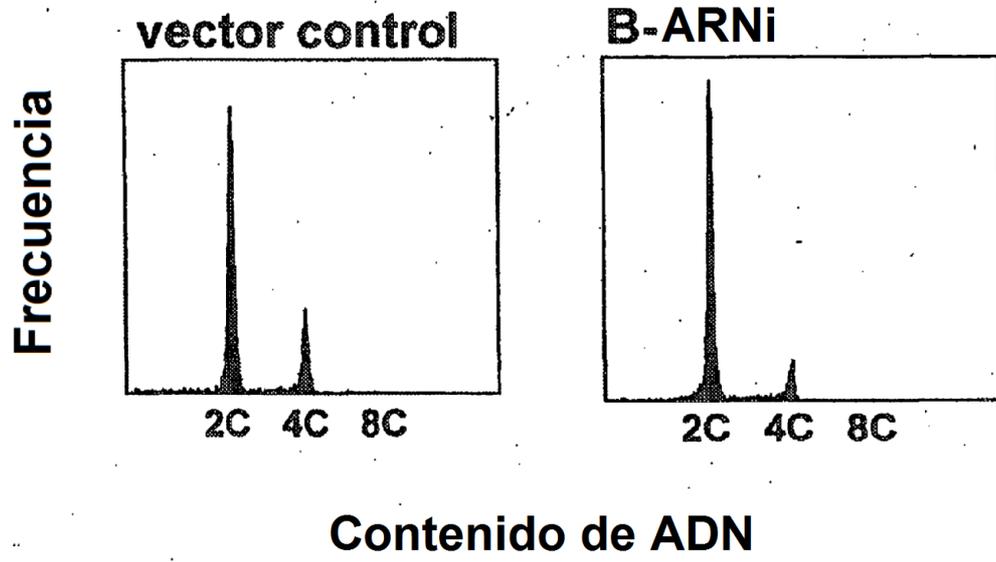
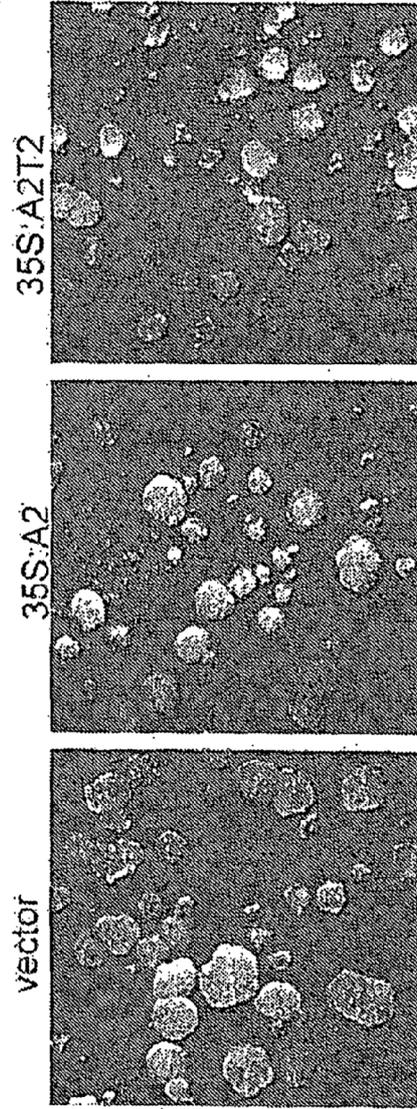


Fig. 10

Fig. 11



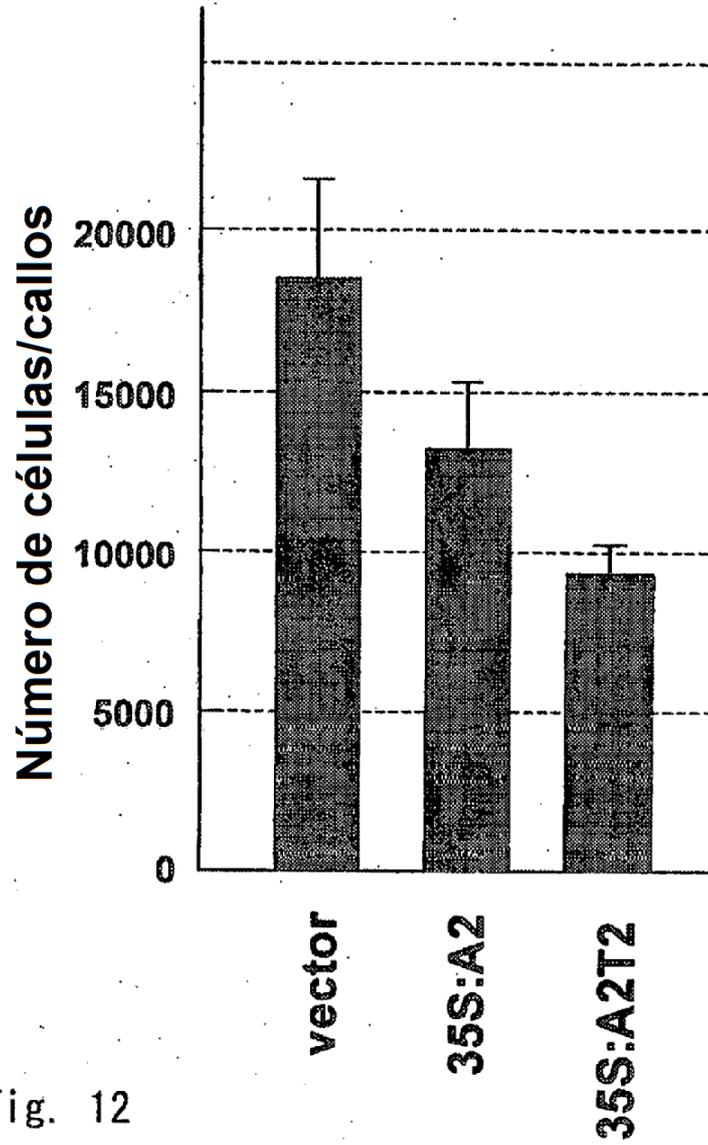


Fig. 12

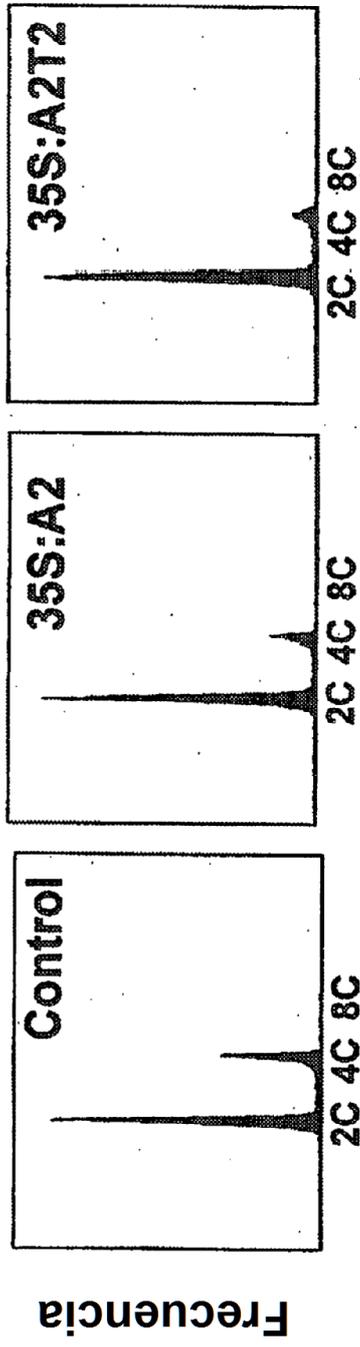
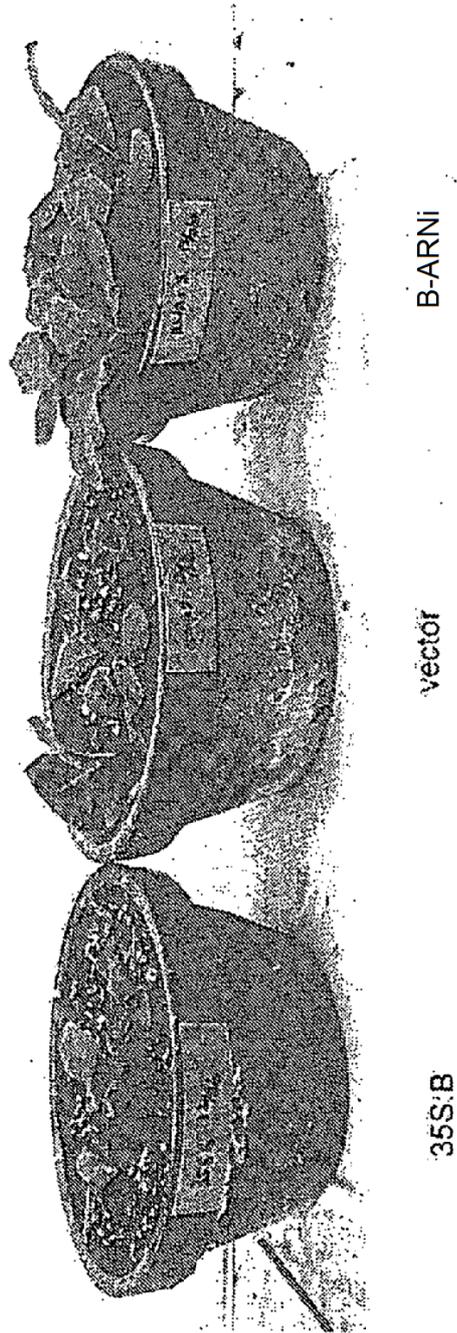


Fig. 13

Fig.14



Ntmyba1	CCRNYSPVFQDVSCSMLKVPSELADSKFLEHNLSHDWGNSMEEDWQFNRDD PN SPPEF
Ntmyba2	CSEYTPAFEDITFSMAEVPSELDESKLLEHTFSDWAAS GKEWQFNPD PN SPLEL
AtMYB3R-1	HAEPYPSFKDVKI VVPEI SCETECCKKFNLN-----CSHELRTTTATEDQLPGVSNDAK
AtMYB3R-4	SEQFYPELEDI SVS SEVSYDMEDCSQFPDHN-----VSTSPSQDYQDFQELSDI SLEMR
Os3Rmyba1	GPQACYTSAEAVASALPAVHCHVSSSNLDPDQH-LQEDFAQGLNLDMTI DEMPTVPSFAD

Ntmyba1	IQESSG SVHCLTGNDNHDMVATAN-----VGNVVEDPYKPNEMFVSDGSMVMVY
Ntmyba2	MQDSSGLFMQCLTGNGNHDMVTFPQQNAVKFEFTTNVGSVMVGFDKPNEMFTSVEGCRMVY
AtMYB3R-1	QDRGLELLTHNMDNGGKNQALQQDFQSSVRLSDQPFLSNSDTPDAQTL TDEECCRVL F
AtMYB3R-4	HNIMSEI PMPYTKESKESTLGAPNSTLN----- DVATY TNSANVL TPETECRVL F
Os3Rmyba1	NQTVCS IENHERSLEPYDVAMEVPLSMLS-----SDSGAEQKLFHFMSEADFN SPNCKLSEL

Ntmyba1	PEEGIPQCSPS-----ETGVNGCGQPS--YSLFYQSSNYQ PEAGDMVPQNCNALNFDD
Ntmyba2	PEAGIPQYIPS-----EAGTNGADETA--DSL CQSSNYQ SEGGNMS IENCNPLCSDV
AtMYB3R-1	PDNMKDSSTSSG-----EQGRNMVD PQNGKGLCSQAETHAETHGKVPAL PWHPPSSSEG
AtMYB3R-4	PDQESEGHSVSRSLTQEPNEFNQVDRRD--P ILYSSASDRQ SEATKSP TQSSSSSRFTAT
Os3Rmyba1	WQD SLQGLLSGP----DAVEADS SRSNHQSDVYSSEADTHFLAPPYMPQT SNSSSVMGL

Fig. 21

SILX₁KRXRLUOPJXX₅X₁RXX₅KK

NtmybA1
NtmybA2
AtMYB3R-1
AtMYB3R-4
Os3RmybA1

DDSPDAILKSAAKFTGTSPILKRRHRHLLSPLSEKRCEKKLESNLNQUESFYNMSTNFSR
DGSTDAVLRSAAKFTSTPSILKRRHRDLVSPSEKRCEKKLGSDFRQESFDLSKDFSR
DRSPDVMLNDTAKSFSGAPSIKRRHRDLLSPVLDKRRDKKLR---AATSSLANDFSR
---KKTLYGAQSI LRKRTRDLLTPLSEKRSDDKLEID---IAASLAKDFSR
DESTGVLLKSAAKSFICTPSILKRRHRDLLSPIPKRIEKKYGTEKDRGVSDTSSSTGIQT
*:.: : ***:** *:*:* :.* :** :.*

NtmybA1
NtmybA2
AtMYB3R-1
AtMYB3R-4
Os3RmybA1

PDDMFDESANEKASME---DKENLHPSEDGRKE---
LDVMFDEAANEKATKSSLTTDQTTLEASSEDKENINPTEDGSKKEEDKVRNGLSNERQLD
LDVMILDEGDDCMTSRP
LDVMFDETENRQSNFGNSTG---VIHGDRENHFHILNGDGEE---WS
SCINATKDDALITTVLR---IERSASSKSLEKKLVFS

NtmybA1
NtmybA2
AtMYB3R-1
AtMYB3R-4
Os3RmybA1

---EGEISGANDATGMVKQHPGVLVELSSNDLFFSPDRFLIKCDRATSLSN
GGEVHYKEKGTREGTKGGANSAIGKIKOPSGVLVELNASDLFFSPDRFGAKSGRATYLS
---GKPSSLFSHRMPEETMHIRKSLEKVDQICMEANVREKDDSEQDVENVEFFSGILSEHNT
---DENKENLGYTTEQTKDGSAGNDEHMDEOTTGERSSATNVA TNDLDSG

Fig. 23

NtmybA1	KALGRYARRLEAASNQVTVSSSFETSCLSVVCSPI CGKHRGSVVIATS-----TA
NtmybA2	KALGNQYARRLEAASNQGSVSSSFETSFCFSV CSPRIRGKKDGGSSFI TTSMQSAAPATA
AtMYB3R-1	-----
AtMYB3R-4	GKPVLPSTPGQSVTKAEKAQVSTPRNQLQRTLMA TSNKEHHSVCLVINSPS-----RA
Os3RmybA1	N---LQPAGILIEHSGDDP SPDYGKNTMNGKLN TNVKSLSVCKEGVCAKSKP-----TE
NtmybA1	LENTAEDSENGGAETLSIFGETP-FKRSFESPAWKSPWFMSFPSTRYDTELEFEDF
NtmybA2	LDNSAETSGNGVGAETVSI SGETP-YKRSIESPAWKSPWFINSLLSSPRLDNELNFEDL
AtMYB3R-1	-----S-----
AtMYB3R-4	RNKEGHLVDNGTSNENFSIFCGTP-FRRGLESPA WKSPFYINSLLSPRFDTDLTIEDM
Os3RmybA1	LIVEKSSPCINVDYEYVNI LADTPGIKRGLESPA WKSPWFVDMHFQG-----
NtmybA1	ALFMSPGDRSYDA IGLMKQLSEQTAPSI ADAHQILGSETPETNL-----SKRNSKKPKADE
NtmybA2	ALFMSPGDRSYDA IGLMKQLSEQTAGAFADAQEVLGGETPESIL-----RGRNSKNQKADE
AtMYB3R-1	-----ESPEDKNICASPSI ARDNRCASARLYGEMIPIDEEPKETL-----ESGGVTSMQNEN
AtMYB3R-4	GYIFSPGERSYESIGVMTQINEHTSAFAAFADAMEVSI SP-----TND DARGKKE
Os3RmybA1	-SYFTSPADSYDALGLMKQIN VQTAALVEAREVLASGGGCDNISSDKENTGNPDAKKEP

Fig. 24

NtmybA1	NCTLLASNATSERRTLDFNECGIPGKGGKETTKEGS--NNNSFSSPSSYLLKYCR-
NtmybA2	NHSLLSANVMSERRTLDFSECGSPGKGGKETEENFCT--SNNSFSSPSSYLLKGCGR-
AtMYB3R-1	GCNDGGASAKNVSPSLSLHI I WYQL-----
AtMYB3R-4	LDKENNDPLLAERRVLDNFDCESP I KATEEVS-----SYLLKGCGR-
Os3RmybA1	GTTKLQTK I MAEGRVLDFFECTTPERSDDKNAGSNLGRYLS S P I PSSHLLKSFRL

* . :

Fig. 25

AtMYB3R-3	VVQDNNNAKKTDEAKEVDQKVDGKDSSEIQNINGSNAYNLSPPYRIRSKRT-----
AtMYB3R-5	VKEVDRKEESKDMRKSLLETTDNCSDDEELGLNGNAFNLSPPYRLRAKRT-----
NtmybB	LIRQQNGHPFCSTPPSLKLTVSANGSSPESVLRNSAMSYTRTPSIRKKNRFFPEAATHS
	: . : * * : * * :
AtMYB3R-3	-----AVFKSRQLEFISREEEKADDETKSSEKMDLIDGDSQLLG-----
AtMYB3R-5	-----AVIKSRQLEFTSEKEKQPDNELEFTSAKEKQPDNEIKTSEEDKPV-----
NtmybB	RCTGTTSPTHIFPRASDREDTSNLKDORFSGCKSSASGKSLGRRLEYAFDMEWDASRCCTP
	: : : * * . : : :
AtMYB3R-3	-----
AtMYB3R-5	-----
NtmybB	VSAASPCALRLGGNTMLTP

Fig. 28

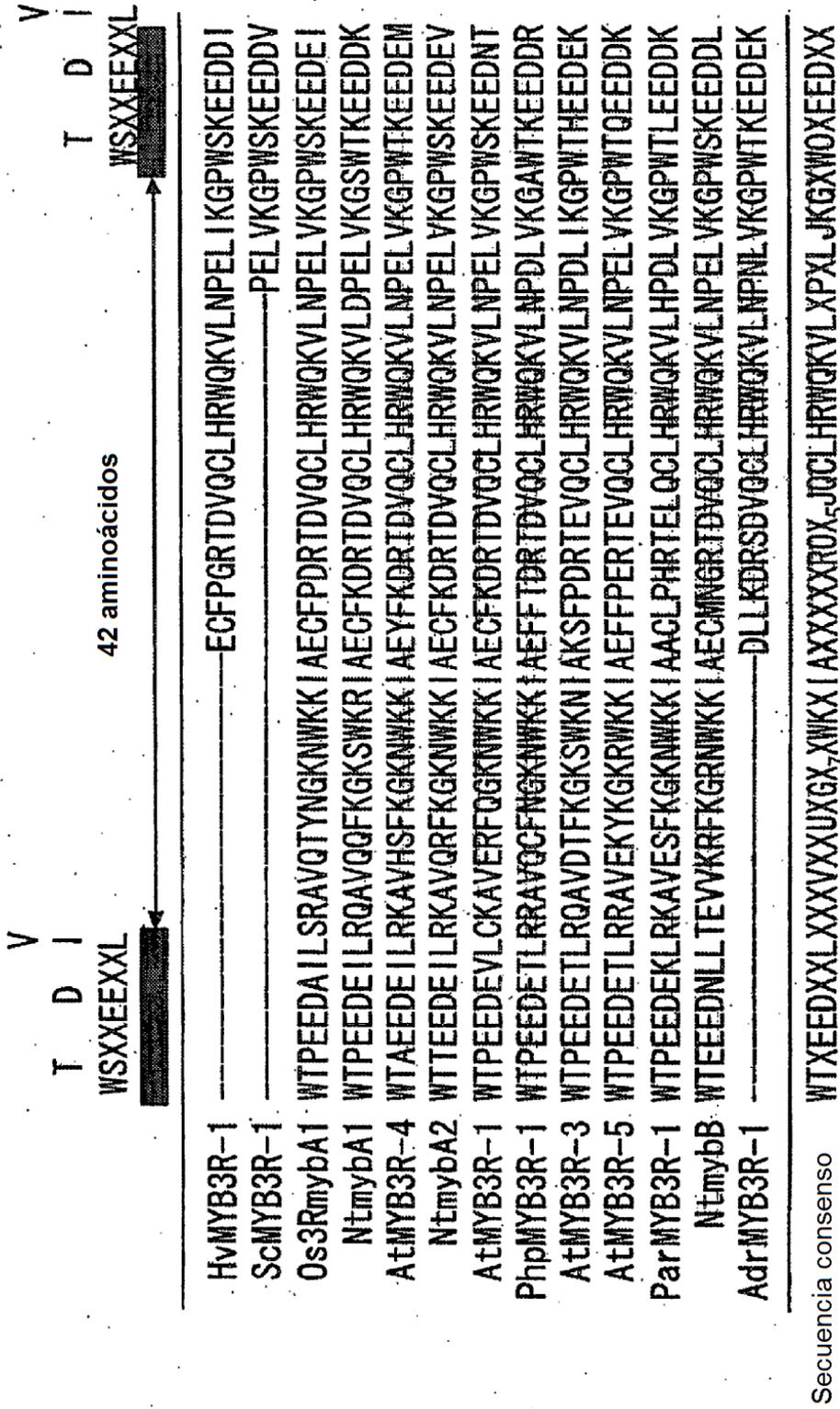


Fig. 29

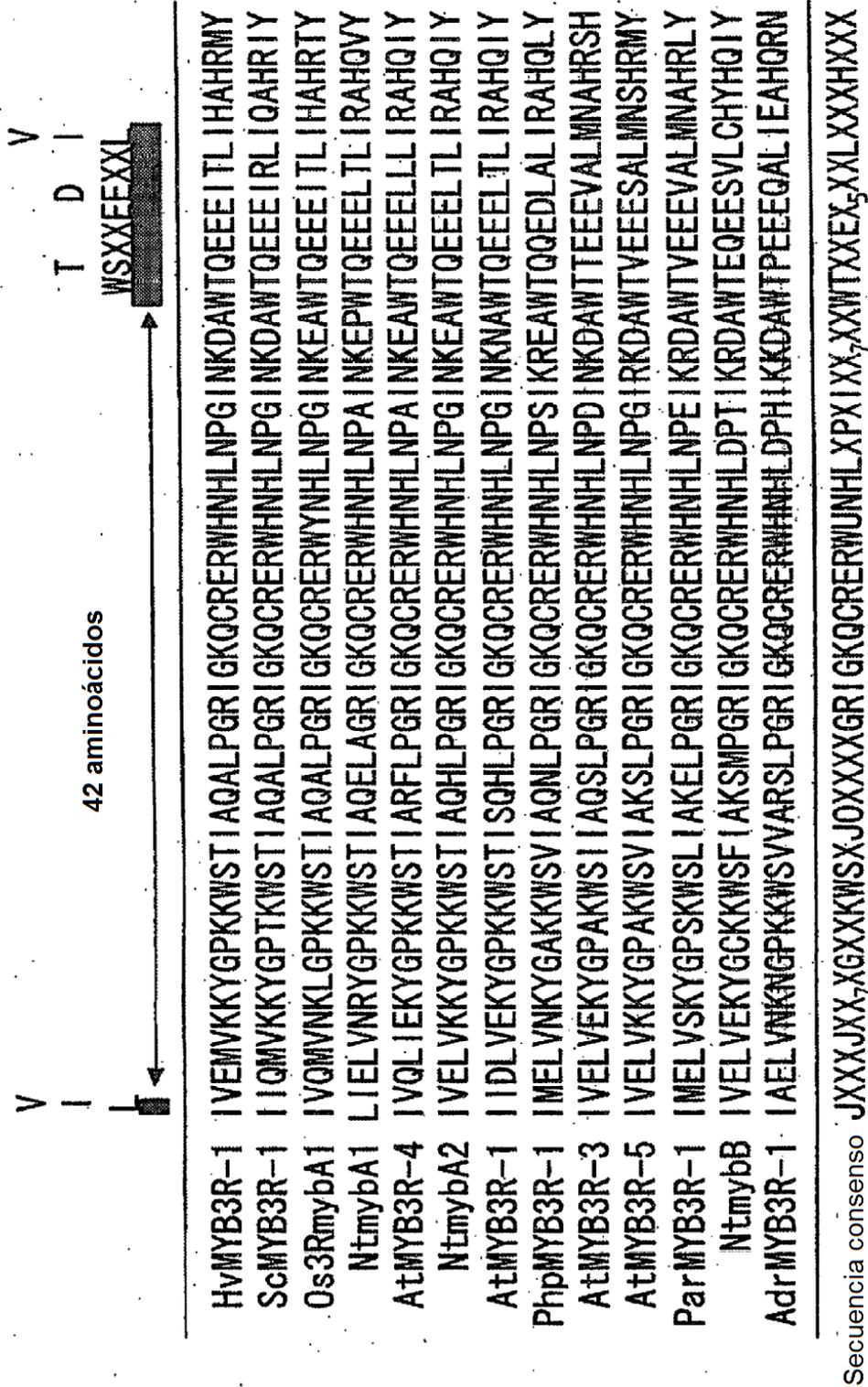


Fig. 30

HvMYB3R-1 GNKWAEL TKFLPGKTDNS IKNHWNSSVKKK
 ScMYB3R-1 GNKWAELSKFLPGRTDNA IKNHW-----
 Os3RmybA1 GNKWAEL TKFLPGRTDNS IKNHWNSSVKKK
 NtmybA1 GNKWAELAKVLHGRSDNA IKNHWHSSVKKK
 AtMYB3R-4 GNRWAEL TKFLPGRSDNG IKNHWHSSVKKK
 NtmybA2 GNKWAEL TKYLPGRTDNA IKNHWNSSVKKK
 AtMYB3R-1 GNKWAELMKFLPGRSDNS IKNHWNSSVKKK
 PhpMYB3R-1 GNKWAELAKFLPGRTDNS IKNHWNSTMKKK
 AtMYB3R-3 GNKWAELAKVLPGRTDNA IKNHWNSSLKKK
 AtMYB3R-5 GNKWAELAKVLPGRTDNA IKNHWNSSLKKK
 ParMYB3R-1 GNKWAELAKVLPGRTDNA IKNLWNSSLKKK
 NtmybB GNKWAELARFLPGRTDNA IKNHWNSSVKKR
 AdrMYB3R-1 GNKWAELAKSLPGRTDNA IKNHWNSSLKKK

Secuencia consenso GNX₇WAEJXX₇XLXGX₇ODNO IKNXWXSOXKKX₇

Fig. 31

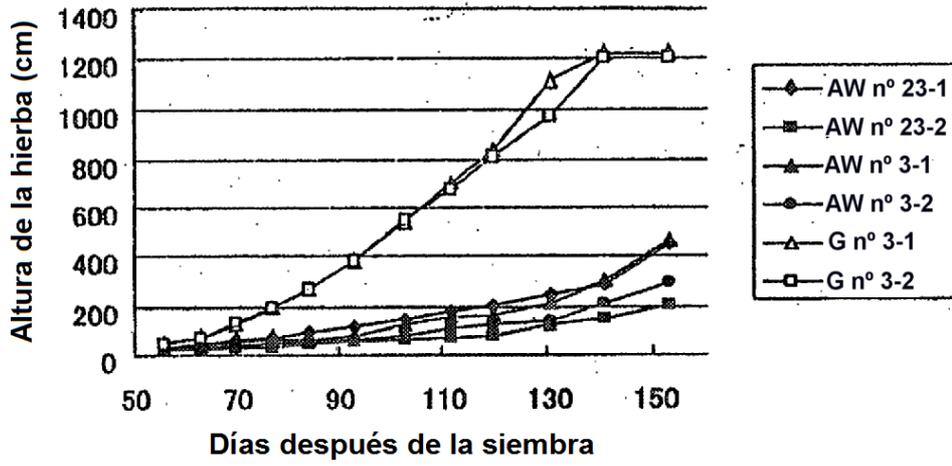


Fig. 32

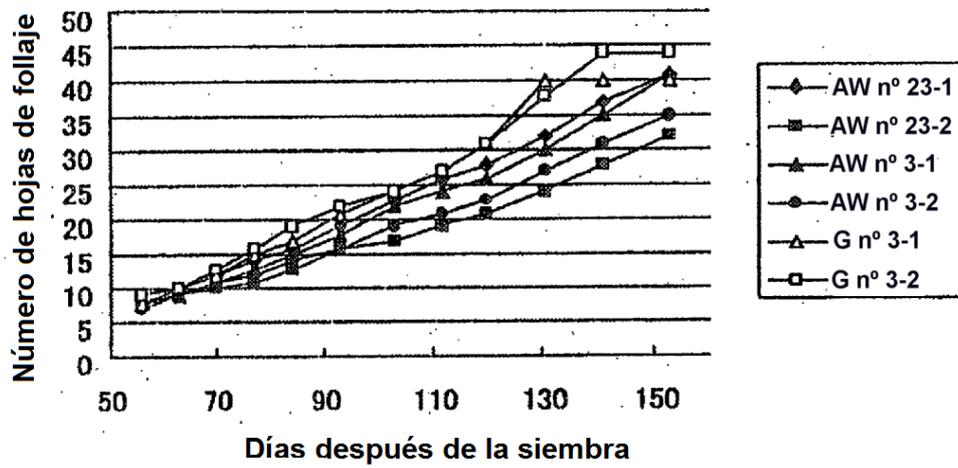


Fig. 33