

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 359**

51 Int. Cl.:

A01N 65/36 (2009.01)

A01G 7/06 (2006.01)

A01G 17/00 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2010 E 10830010 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2502496**

54 Título: **Inductor de floración**

30 Prioridad:

16.11.2009 JP 2009260847

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

21.04.2015

73 Titular/es:

SAGA UNIVERSITY (100.0%)

1 Honjo-machi

Saga-shi, Saga 840-8502, JP

72 Inventor/es:

MATSUMOTO RYOJI y

NAGANO YUKIO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 534 359 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

Inductor de floración

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un inductor de floración y similares

10 **Antecedentes de la técnica**

10 Los árboles frutales tales como cítricos no producen flores después de un cierto número de años desde la germinación. Aunque las hojas y tallos se denominan órganos vegetativos a diferencia de órganos reproductores tales como flores, los árboles frutales durante el periodo sin floración continúan su crecimiento vegetativo cuando solamente surgen órganos vegetativos. El periodo durante el que dura este crecimiento vegetativo se denomina el estadio juvenil. Para plántulas híbridas de cítricos, el estadio juvenil dura 8-12 años. El estadio juvenil se sigue del estadio maduro. Durante este estadio maduro, los árboles frutales experimentan crecimiento reproductivo (un término que contrasta con el crecimiento vegetativo; el proceso de crecimiento relacionado con la reproducción tal como floración y fructificación se denomina crecimiento reproductivo), durante el que surge la floración.

20 Para el cultivo de árboles frutales, se llevan a cabo con frecuencia injertos. Una de las razones para realizar injertos es resolver el problema del largo periodo del estadio juvenil de los árboles frutales (Documento No de patente 1: Nobuhito Mitani, Ryoji Matsumoto, Terutaka Yoshioka, y Takeshi Kuniga (2008) "Citrus hybrid seedlings reduce initial time to flower when grafted onto shiikuwasha rootstock" *Scientia Horticulturae* 116, 452-455). En el caso de *Citrus unshiu*, una variedad de cítrico, se injerta con frecuencia un vástago de *Citrus unshiu* en el estadio maduro en un portainjerto de naranja trifoliada. En este caso, el vástago está en el estadio maduro. En consecuencia, el vástago tiene inherentemente una capacidad formadora de capullo floral. El vástago, sin embargo, solamente experimenta crecimiento vegetativo durante un tiempo después del injerto y no forma un capullo floral. Esta fase de crecimiento vegetativo de esta parte del vástago (la parte de la plántula injertada) se denomina el estadio maduro nutricional. El estadio maduro nutricional generalmente dura aproximadamente cuatro años. Si embargo, a la vista de la reducción en el coste del cultivo, la recuperación de la inversión temprana y la eficacia en la mejora de la diversidad, se ha buscado el desarrollo de un método para acortar el periodo del estadio maduro nutricional.

30 Ahora, como un gen implicado en la floración, se conoce al gen de "Locus de Floración T" (en lo sucesivo en el presente documento denominado "gen FT"). Una proteína codificada por este gen FT se denomina proteína FT. Como se muestra en la Figura 1, ya se sabe que la proteína FT se sintetiza en las hojas y se transloca al brote de acuerdo con cambios ambientales tales como la longitud del día, donde induce formación de capullos florales (Documento No de patente 2: Laurent Corbesier, Coral Vincent, Seonghoe Jang, Fabio Fornara, Qingzhi Fan, Iain Searle, Antonis Giakountis, Sara Farrona, Lionel Gissot, Colin Turnbull, y George Coupland (2007) "FT Protein Movement Contributes to Long-Distance Signaling in Floral Induction of Arabidopsis" *Science* 316, 1030-1033). Por lo tanto, aunque una sustancia que se sintetiza en las hojas y después se trasloca al brote para inducir la formación de capullos florales se denomina hormona de floración, se considera que la proteína FT es el cuerpo principal de esta hormona de floración.

45 Se han realizado estudios para acelerar el comienzo del periodo de floración de *Arabidopsis* usando el gen FT de *Arabidopsis*. Por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en el Documento de Patente 1 (Publicación de Solicitud de Patente No examinada Japonesa (Traducción de Solicitud de PCT) N° 2002-511270), para expresar la proteína FT a un alto nivel en un cuerpo vegetal, se introduce un fragmento de ADN que contiene el gen FT unido detrás del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor en *Arabidopsis* para producir *Arabidopsis* recombinante. Como resultado, se obtiene *Arabidopsis* recombinante con periodo de floración más temprano.

50 También se han realizado estudios similares para cítricos (Documento No de patente 3: Tomoko Endo, Takehiko Shimada, Hiroshi Fujii, Yasushi Kobayashi, Takashi Araki, y Mitsuo Omura (2005) "Ectopic expression of an FT homolog from citrus confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf)". *Transgenic Research* 14, 703-712.). En este estudio, se usa el gen CiFT derivado de *Citrus unshiu* Marc. Que es altamente homólogo con el gen FT de *Arabidopsis*. De acuerdo con este método, se introduce un fragmento de ADN que contiene el gen CiFT unido detrás del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor en naranja trifoliada (*Poncirus trifoliata*) para generar una naranja trifoliada recombinante. Como resultado, se acelera el comienzo del periodo de floración de la naranja trifoliada. Más específicamente, se observó floración en un mínimo de aproximadamente medio año después de la aparición del epicótilo.

60 En todas estas técnicas anteriores, la proteína FT (una proteína altamente homóloga con proteína FT de *Arabidopsis*, tal como una proteína CiFT anterior, también se denomina simplemente en el presente documento "proteína FT") se expresa en gran medida en un cuerpo vegetal usando una planta recombinante. Sin embargo, hay varias preocupaciones con respecto a métodos que emplean una planta recombinante.

65

Una de las preocupaciones es que la planta resultante con floración temprana es una planta recombinante. Ya que las plantas recombinantes se asocian con muchas restricciones legales, se tardaría bastante tiempo antes de poder cultivar estas plantas recombinantes en un campo de cultivo. Además, existe la situación de que el entendimiento de los consumidores de las plantas recombinantes no se ha mejorado.

5 La otra preocupación es que un capullo floral puede formarse en una planta extremadamente joven (Documento No de patente 3: Tomoko Endo, Takehiko Shimada, Hiroshi Fujii, Yasushi Kobayashi, Takashi Araki, y Mitsuo Omura (2005) "Ectopic expression of an FT homolog from citrus confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.)" *Transgenic Research* 14, 703-712.). Una vez que se ha producido un fruto, el crecimiento de las hojas y por lo tanto el crecimiento de un cuerpo vegetal está alterado. Por lo tanto, ya que la formación de capullo floral demasiado temprano impone una carga pesada en un cuerpo vegetal joven, puede no ser siempre deseable para el crecimiento de la planta así como para el crecimiento del fruto.

15 Se ha indicado que el aumento de la abundancia de CiFT en el tallo se correlaciona con inducción floral por baja temperatura en mandarinas Satsuma (*Citrus unshiu* Marc.) (Documento No de patente 4: Fumie Nishikawa, Tomoko Endo, Takehiko Shimada, Hiroshi Fujii, Tokuro Shimizu, Mitsuo Omura y Yoshinori Ikoma "Increased CiFT abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.)" *J. Experimental Botany* vol. 58, nº 14, 3915-3927, 2007).

20 Documentos de la técnica anterior

[Documento de Patente]

[Documento de Patente 1]

25 Publicación de Solicitud de Patente No examinada Japonesa (Traducción de la Solicitud PCT) Nº 2002-511270

[Documentos No de Patente]

[Documento No de Patente 1]

30 Nobuhito Mitani, Ryoji Matsumoto, Terutaka Yoshioka, y Takeshi Kuniga (2008) "Citrus hybrid seedlings reduce initial time to flower when grafted onto shiikuwasha rootstock" *Scientia Horticulturae* 116, 452-455.

[Documento No de Patente 2]

35 Laurent Corbesier, Coral Vincent, Seonghoe Jang, Fabio Fornara, Qingzhi Fan, Iain Searle, Antonis Giakountis, Sara Farrona, Lionel Gissot, Colin Turnbull, y George Coupland (2007) "FT Protein Movement Contributes to Long-Distance Signaling in Floral Induction of Arabidopsis" *Science* 316, 1030-1033.

[Documento No de Patente 3]

40 Tomoko Endo, Takehiko Shimada, Hiroshi Fujii, Yasushi Kobayashi, Takashi Araki, y Mitsuo Omura (2005) "Ectopic expression of an FT homolog from citrus confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.)" *Transgenic Research* 14, 703-712.

[Documento No de Patente 4]

Fumie Nishikawa, Tomoko Endo, Takehiko Shimada, Hiroshi Fujii, Tokuro Shimizu, Mitsuo Omura y Yoshinori Ikoma "Increased CiFT abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.)" *J. Experimental Botany* vol. 58, nº 14, 3915-3927, 2007).

45 Sumario de la invención

Problemas para resolver por la invención

50 En dichas circunstancias, se ha esperado una técnica para inducir la floración sin depender de la recombinación génica, concretamente, un inductor de floración que puede administrarse a un cuerpo vegetal desde fuera.

Medios para resolver los problemas

55 Para resolver los problemas anteriormente descritos, los presentes inventores han realizado una investigación intensa, y, como resultado de ella, han descubierto que la administración de una proteína FT predeterminada a un cuerpo vegetal desde fuera puede acelerar el comienzo del periodo de floración del cuerpo vegetal administrado y el cuerpo vegetal adyacente al mismo sin la necesidad de generar una planta recombinante, consiguiendo de este modo la presente invención.

60 Por lo tanto, la presente invención proporciona:

[1] Un método para inducir la floración que comprende la etapa de inyectar en un cuerpo vegetal

(i) una cualquiera de las proteínas (A)-(C) a continuación:

65 (A) una proteína purificada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID Nº: 2;

(B) una proteína purificada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2 y que tiene una actividad inductora de la floración; y

5 (C) una proteína purificada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 60 % o más con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2 y que tiene una actividad inductora de floración; o

(ii) una proteína purificada codificada por un gen que comprende uno cualquiera de los ADN (a)-(c) a continuación:

10 (a) ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1;

(b) ADN que hibrida con ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene una actividad inductora de floración; y

15 (c) ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad del 60 % o más con la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1 y que codifica una proteína que tiene una actividad inductora de floración.

20 [2] El método de acuerdo con [1], en el que dicha proteína purificada (C) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene dicha identidad de secuencia del 95 % o más.

[3] El método de acuerdo con [1], en el que dicha proteína purificada (ii) se codifica por un gen que comprende dicho ADN (c) que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene dicha identidad de secuencia del 95 % o más.

25 [4] El método de acuerdo con [1], en el que la proteína inyectada en el cuerpo vegetal es la proteína purificada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 4.

[5] El método de acuerdo con [1], en el que la proteína inyectada en el cuerpo vegetal es la proteína purificada codificada por un gen que comprende ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 3.

30 [6] El método de acuerdo con una cualquiera de [1] a [5], en el que la planta es un árbol frutal.

[7] El método de acuerdo con [6], en el que el árbol frutal es cítrico.

[8] El método de acuerdo con [7], en el que el cítrico es *Citrus unshiu*.

[9] El método de acuerdo con una cualquiera de [1] a [8], en el que la planta es una planta obtenida por injerto de un vástago en el estadio maduro a un portainjerto.

35 [10] El método de acuerdo con una cualquiera de [1] a [9], en el que la planta tratada con la proteína se coloca junto a una planta a la que se dirige inducción de floración que no se ha tratado con la proteína.

[11] Uso de una proteína purificada como se define en una cualquiera de [1] a [5] para inducir la floración de una planta inyectando dicha proteína purificada en el cuerpo vegetal.

[12] El uso de acuerdo con [11], en el que la planta es como se ha definido en una cualquiera de [6] a [8].

40 [13] El uso de acuerdo con [1] o [12], en el que la planta es una planta obtenida por injerto de un vástago en el estadio maduro a un portainjerto.

[14] El uso de acuerdo con una cualquiera de [11] a [13], en el que la planta tratada con la proteína se sitúa junto a una planta a la que se dirige la inducción de floración que no se ha tratado con la proteína.

45 **Efecto de la invención**

La presente invención proporciona un método para inducir la floración inyectando un inductor de floración en un cuerpo vegetal. Puede administrarse un inductor de floración en un árbol frutal para acortar el tiempo antes de la floración.

50 **Breve descripción de los dibujos**

[Figura 1] Una figura para ilustrar un proceso de proteína FT para inducir la formación de capullos florales.

[Figura 2] Una figura para ilustrar un proceso para clonar un producto de PCR en el plásmido pET-28b(+).

55 [Figura 3] Una figura que muestra los resultados de la comparación entre secuencias de aminoácidos de proteínas FT de diversas plantas.

[Figura 4] Una figura que muestra que se ha purificado una proteína para su uso en la presente invención.

[Figura 5] Una fotografía que muestra una plántula de un año de edad (fotografía tomada en abril de 2009).

[Figura 6] Una fotografía que muestra un método ejemplar para inyectar un inductor de floración de acuerdo con la presente invención.

60 [Figura 7] Una fotografía que muestra otro método ejemplar para inyectar un inductor de floración de acuerdo con la presente invención.

[Figura 8] Una fotografía que muestra la Planta N° 3 en la Tabla 1 que produce flores.

[Figura 9] Una fotografía que muestra la Planta N° 21 en la Tabla 2 que produce flores.

[Figura 10] Una fotografía que muestra la Planta N° 24 en la Tabla 3 que produce flores.

65 [Figura 11] Una fotografía que muestra que una planta que está a 2,9 m de la planta tratada por el Método de Inyección 2 no parece producir flores.

[Figura 12] Una figura para ilustrar una hipótesis de que la floración se induce por una feromona de floración.

[Figura 13] Un gráfico que muestra el efecto del injerto superior de una plántula nucelar en la floración. Cont-1 a cont-3 son resultados de las que estaban a 2,9 m de distancia de la sección de tratamiento con FT, que corresponden a las plantas N° 37, 36 y 35 en la Tabla 4, respectivamente. En la Figura, "Sep", "Oct" y "Nov" después de NS (plántula nucelar) representa los meses de tratamiento con FT. Los valores numéricos entre paréntesis representan los diámetros del tallo de las plántulas nucleares. "Flor foliar", "flor sin hojas" y "brote vegetativo" se refieren a una flor foliar (brote de floración), una flor sin hojas y un brote vegetativo (brote sin floración), respectivamente.

[Figura 14] Un gráfico que muestra la relación entre el diámetro del tallo y el número de flores producidos por las plántulas nucleares ($r = -0,659$ ($n = 10$)).

[Figura 15] Un gráfico que muestra la relación entre la altura y el número de flores producidas por las plántulas nucleares ($r = -0,3407$ ($n = 10$)).

Realizaciones para llevar a cabo la invención

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá la presente invención en detalle.

(1) Sumario de la invención

La presente invención usa un inductor de floración que contiene proteína FT (en lo sucesivo en el presente documento también denominada la proteína de la presente invención) como un componente activo. El inductor de floración se administra a un cuerpo vegetal desde fuera. Hasta la fecha, no ha habido ningún informe de que la administración de la proteína FT en un cuerpo vegetal desde fuera acelere el comienzo del periodo de floración de un cuerpo vegetal.

Los presentes inventores han aislado ADNc del gen CiFT2 que tiene alta homología con el gen FT de *Arabidopsis* usando ARN extraído de una hoja de *Citrus unshiu* como un molde. Se clonó ADNc del gen CiFT2 en el plásmido pET-28b(+) para construir un plásmido con el gen CiFT2 insertado. El plásmido se usó para transformar *E. coli*, obteniendo de este modo un transformante. El transformante resultante se usó para producir proteína CiFT2.

La proteína CiFT2 producida se administró a una plántula de un año de edad. Esta plántula de un año de edad tenía la naranja trifoliada como el portainjerto en el que se injertó *Citrus unshiu* como un vástago y se cultivó durante 12 meses. La proteína CiFT2 se administró a la parte superior del sitio injertado en el tallo principal de esta plántula de un año de edad. Como resultado, para el grupo al que se administró proteína CiFT2, se observó producción de muchas flores foliares de abril a mayo, es decir, 5-13 meses después de la administración. Además, la producción de muchas flores foliares también se observó para el grupo al que no se administró proteína CiFT2 y se colocó junto al grupo al que se administró proteína CiFT2. Las flores foliares son flores con hojas, que, en comparación con las flores sin hojas, es decir, capullos florales solamente con flores, tienen una mayor tasa de producción y la calidad de los frutos producidos a partir de ellas es con frecuencia buena.

(2) Proteína de la presente invención

La proteína de la presente invención, por ejemplo, comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2. Una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2 es, por ejemplo, una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2.

Además, la proteína de la presente invención no se limita a las proteínas anteriormente descritas, y comprende una proteína que contiene toda o una parte de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2 y que tiene una actividad inductora de floración.

En el presente documento, una "actividad inductora de floración" se refiere a una actividad de aceleración del comienzo del periodo de floración de una planta que modo que comience antes del periodo de floración habitual, una actividad para promover la floración de una planta o similares.

La proteína de la presente invención también comprende una proteína que contiene secuencias de aminoácidos que tienen homología (identidad) de aproximadamente el 60 % o más, preferentemente aproximadamente el 70 % o más, más preferentemente aproximadamente el 80 % o más, aún más preferentemente aproximadamente el 90 % o más, particularmente preferentemente aproximadamente el 95 % o más, aún más preferentemente aproximadamente el 98 % o más con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2 y que tiene una actividad inductora de floración.

El valor de la identidad anteriormente mencionada es generalmente mejor cuanto mayor. La identidad de una secuencia de aminoácidos puede determinarse usando un programa de análisis tal como BLAST (véase, por ejemplo, Altschul S. F. *et al.*, J. Mol. Biol. 215, 403 (1990)). Cuando se usa BLAST, se usan los parámetros por defecto para cada programa.

Además, la proteína de la presente invención también comprende una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2, y que tiene una actividad inductora de floración.

- 5 Una secuencia de aminoácidos que tiene una mutación de delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2 puede ser, por ejemplo: (i) una
 10 secuencia de aminoácidos que tiene 1-20 (preferentemente 1-10, más preferentemente 1-5 y aún más preferentemente 1-2) aminoácidos suprimidos de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2; (ii)
 una secuencia de aminoácidos que tiene 1-20 (preferentemente 1-10, más preferentemente 1-5 y aún más preferentemente 1-2) aminoácidos sustituidos con otros aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada
 por SEC ID N°: 2; (iii) una secuencia de aminoácidos que tiene 1-20 (preferentemente 1-10, más preferentemente 1-5 y aún más preferentemente 1-2) aminoácidos añadidos a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID
 N°: 2; (iv) una secuencia de aminoácidos que tiene 1-20 (preferentemente 1-10, más preferentemente 1-5 y más preferentemente 1-2) aminoácidos insertados en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2; y (v)
 15 una secuencia de aminoácidos que tiene cualquier combinación de (i)-(iv) anterior.

La proteína de la presente invención también comprende una proteína codificada por un gen de la presente invención que se describirá posteriormente.

- 20 La proteína de la presente invención puede contener además una secuencia peptídica para purificación y/o un péptido señal secretor. Como la secuencia peptídica para purificación, puede usarse una secuencia peptídica que se
 usa en la técnica. Los ejemplos de la secuencia peptídica para purificación incluyen una secuencia marcadora de histidina que tiene una secuencia de aminoácidos con cuatro o más, preferentemente seis o más restos de histidina
 consecutivos, una secuencia marcadora T7, una secuencia de aminoácidos de un dominio de unión para glutatión
 25 de glutatión S-transferasa, y una secuencia de aminoácidos de Proteína A. Un péptido señal secretor se refiere a una región peptídica que desempeña un papel para permitir la permeabilidad de la membrana celular de una
 proteína unida con este péptido señal secretor. Una secuencia de aminoácidos de dicho péptido señal secretor y una
 secuencia de nucleótidos que lo codifica se conocen bien en la técnica y se han indicado (véase, por ejemplo von
 Heijine G (1988) Biochim. Biohys. Acra 947: 307-333, von Heijine G (1990) J. Membr. Biol. 115: 195-201, etc.). Más
 30 específicamente, los ejemplos del péptido señal secretor incluyen un péptido señal secretor derivado de la proteína
 de membrana externa A de *E. coli* (ompA) (Ghrayeb, J. *et al.* (1984) EMBO J. 3: 2437-2442), y un péptido señal
 secretor derivado de la toxina del cólera de *vibrio cholera*.

- La proteína de la presente invención puede contener además una secuencia peptídica para escisión. Una secuencia
 35 peptídica para escisión es una secuencia para escindir una secuencia peptídica para purificación y/o un péptido
 señal secretor de la proteína de interés, siendo un ejemplo una secuencia de reconocimiento de trombina.

- Una secuencia de aminoácidos de una proteína de una realización de la presente invención se representa en SEC
 40 ID N°: 4. Esta proteína es una proteína que tiene un sitio de reconocimiento de trombina, un marcador T7 y un
 marcador de histidina fusionados en este orden detrás de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°:
 2.

- Un método para adquirir una proteína de la presente invención no está particularmente limitado. Una proteína de la
 45 presente invención puede ser un polipéptido sintetizado químicamente o una proteína recombinante producida por
 una técnica recombinante genética. En el caso en el que una proteína de la presente invención se sintetice
 químicamente, puede sintetizarse, por ejemplo, por el método de Fmoc (método de fluorenilmetiloxicarbonilo),
 método de tBoc (método de t-butiloxicarbonilo) o similares. Además, puede emplearse un sintetizador peptídico
 proporcionado por Advanced Chemtech, Perkin-Elmer, Pharmacia, Protein Technology Instrument, Synthecell-
 50 Vega, PerSeptive, Shimadzu o similares para síntesis química. En caso de que se produzca una proteína de la
 presente invención por una técnica recombinante genética, esta puede producirse por una técnica recombinante
 genética general. Más específicamente, puede introducirse un gen que codifica la proteína de la presente invención
 en un sistema de expresión apropiado para producir la proteína de la presente invención. Se describirá
 posteriormente la expresión de un gen que codifique la proteína de la presente invención en un sistema de
 expresión.

- 55 (3) Gen de la invención

- Un gen de la presente invención es un gen que codifica una proteína de la presente invención. La proteína de la
 60 presente invención es como ya se ha descrito anteriormente. Un ejemplo del gen de la presente invención incluye,
 pero sin limitación, ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1.

- El gen de la presente invención incluye ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene homología
 (identidad) de aproximadamente 60 % o más, preferentemente aproximadamente 70 % o más, más preferentemente
 aproximadamente 80 % o más, aún más preferentemente aproximadamente 90 % o más, particularmente
 65 preferentemente aproximadamente 95 % o más, más particularmente preferentemente aproximadamente 98 % o
 más con la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1 y que codifica una proteína que tiene una

actividad inductora de floración.

El valor de la identidad anteriormente mencionada es generalmente mejor cuanto mayor. La identidad de una secuencia de aminoácidos puede determinarse usando un programa de análisis tal como BLAST (véase, por ejemplo, Altshul S. F. *et al.*, J. Mol. Biol. 215, 403 (1990)). Cuando se usa BLAST, se usan los parámetros por defecto para cada programa.

Además, el gen de la presente invención comprende, además del ADN anteriormente mencionado, ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una mutación de delección, sustitución y/o adición de uno o varios nucleótidos en la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1 y que codifica una proteína que tiene una actividad inductora de floración.

Además, el gen de la presente invención también comprende ADN que hibrida con ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene una actividad inductora de floración. El gen de la presente invención comprende dichos genes.

Un ejemplo de condiciones rigurosas incluye, pero sin limitación, condiciones en las que se realiza hibridación manteniendo una membrana de nylon con ADN fijado caliente junto con una sonda a 65 °C durante 20 horas en una solución que contiene SSC 6 x (SSC 1 x es 8,76 g de cloruro sódico y 4,41 g de citrato sódico disueltos en un litro de agua), SDS 1 %, ADN de esperma de salmón 100 µg/ml, albúmina de suero bovino 0,1 %, polivinilpirrolidona 0,1 % y ficoll 0,1 %. Las condiciones de hibridación pueden determinarse apropiadamente por los expertos en la materia teniendo en cuenta, además de las condiciones tales como la concentración salina del tampón y temperatura, otras condiciones tales como concentración de la sonda, longitud de la sonda y tiempo de reacción.

Para un procedimiento detallado del método de hibridación, véase Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) y similares.

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá un ejemplo de un método para obtener un gen de la presente invención por hibridación, aunque la presente invención no se limita al mismo.

En primer lugar, se une ADN obtenido de una fuente génica apropiada a un vector plasmídico o de fago de acuerdo con un método rutinario para preparar una biblioteca de ADN. Un transformante obtenido introduciendo esta biblioteca en un hospedador adecuado se cultiva en una placa. La colonia cultivada o placa se transfiere a una membrana de nitrocelulosa o nylon, que se somete a desnaturalización seguido de fijación de ADN en la membrana. Esta membrana se mantiene caliente en las condiciones rigurosas anteriormente descritas para hibridación en una solución que tiene la composición anteriormente descrita que contiene una sonda marcada con ³²P o similares. La sonda usada puede ser cualquier sonda siempre que contenga un polinucleótido que codifique la secuencia de aminoácidos completa o una parte de ella representada por SEC ID N°: 2. Por ejemplo, puede usarse un polinucleótido que consiste en o contiene toda o una parte de la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1.

Al final de la hibridación, la sonda adsorbida de forma no específica se retira por lavado, y se identifica un clon que forma un híbrido con la sonda por autorradiografía o similares. Este proceso se repite hasta que se aísla un clon formador de híbrido.

Los clones resultantes conservan un gen que codifica una proteína de interés que tiene la actividad inductora de floración. Para obtener un gen de interés de los clones, se usa un método de extracción de polinucleótidos conocido tal como un método de álcali-SDS.

Además, los ejemplos de una secuencia de nucleótidos que tiene una mutación de delección, sustitución y/o adición de uno o varios nucleótidos en la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1 incluyen: (i) una secuencia de nucleótidos que tiene 1-20 (preferentemente 1-10, más preferentemente 1-5 y aún más preferentemente 1-2) nucleótidos suprimidos de la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1; (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene 1-20 (preferentemente 1-10, más preferentemente 1-5 y aún más preferentemente 1-2) nucleótidos sustituidos con otros nucleótidos en la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1; (iii) una secuencia de nucleótidos que tiene 1-20 (preferentemente 1-10, más preferentemente 1-5 y aún más preferentemente 1-2) nucleótidos añadidos a la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1; (iv) una secuencia de nucleótidos que tiene 1-20 (preferentemente 1-10, más preferentemente 1-5 y aún más preferentemente 1-2) nucleótidos insertados en la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1; y (v) una secuencia de nucleótidos que tiene cualquier combinación de (i)-(iv) anteriores.

Dichos diversos ADN están comprendidos en el gen de la presente invención por las siguientes razones. Específicamente, se sabe que existe un codón (una combinación de tres nucleótidos) que designa un aminoácido en un gen en de uno a seis tipos para un único tipo de aminoácido. Por lo tanto, puede existir una pluralidad de genes que codifiquen una cierta secuencia de aminoácidos.

Los genes no siempre están presentes de forma estable en la naturaleza, y la aparición de mutación en esa secuencia de nucleótidos no es poco habitual. Dependiendo de la mutación en el gen, esta mutación puede no cambiar la secuencia de aminoácidos codificada (que se denomina mutación silenciosa), en cuyo caso, hay diferentes genes que codifican la misma secuencia de aminoácidos. En consecuencia, incluso cuando se aísla un gen que codifica una cierta secuencia de aminoácidos, no puede descartarse la posibilidad de que múltiples tipos de genes que codifiquen la misma secuencia de aminoácidos puedan surgir durante el pase del organismo.

Además, para preparar artificialmente múltiples tipos de genes que codifican la misma secuencia de aminoácidos no es difícil usar diversas técnicas de ingeniería genética.

Por ejemplo, tras producir una proteína modificada por ingeniería genética, cuando el codón usado originalmente en el gen que codifica la proteína de interés no se usa frecuentemente en el hospedador, el nivel de expresión de la proteína puede ser bajo, en este caso, puede pretenderse obtener mayor expresión de la proteína de interés convirtiendo artificialmente el codón en un codón usado frecuentemente en el hospedador sin cambiar la secuencia de aminoácidos codificada.

Por lo tanto, múltiples tipos de genes que codifican una cierta secuencia de aminoácidos pueden no solamente producirse de forma artificial, sino que también pueden generarse en la naturaleza. Por lo tanto, incluso si un gen no es idéntico al gen que tiene la secuencia de nucleótidos desvelada por la presente invención, puede estar comprendido por el gen de la presente invención siempre que sea ADN que codifica una proteína que muestre una actividad inductora de floración.

Además, la introducción de mutaciones en un gen puede introducir una mutación tal como delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos. Pueden introducirse mutaciones en una secuencia de aminoácidos o un gen de acuerdo con un procedimiento conocido tal como el método de Kunkel o método de doble cadena con Huecos con un kit inductor de mutación que utilice mutagénesis dirigida, por ejemplo, Kit de Mutagénesis Dirigida QuikChange™ (Stratagene), Sistema de Mutagénesis Dirigida GeneTailor™ (Invitrogen), Sistema de Mutagénesis Dirigida TaKaRa (Mutan-K, Mutan-Super Express Km, etc.: Takara Bio) o similares.

Una secuencia de nucleótidos de ADN puede confirmarse por un método de secuenciación habitual. Por ejemplo, puede llevarse a cabo por el método de terminación de cadena de didesoxinucleótidos (Sanger *et al.* (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463) o similares. También puede analizarse una secuencia usando un secuenciador de ADN adecuado.

Para un transformante preparado con un vector plasmídico, la secuencia de nucleótidos se determina cultivándolo, por ejemplo en un tubo de ensayo si el hospedador es *E. coli* (*Escherichia coli*), o similares para preparar un plásmido de acuerdo con un método rutinario. El plásmido resultante puede usarse directamente como un molde o el fragmento de inserto puede retirarse y subclonarse en un vector de fago M13 o similares para determinar la secuencia de nucleótidos por un método de dideoxi o similares. En el caso de un transformante preparado con un vector de fago, la secuencia de nucleótidos puede determinarse esencialmente por la misma operación. Se describen técnicas experimentales básicas para el cultivo anteriormente descrito para la determinación de secuencia de nucleótidos, por ejemplo, en T. Maniatis *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual o similares. Como alternativa, una secuencia puede determinarse automáticamente con un secuenciador disponible en el mercado (analizador Genético de Applied Biosystems 3130 (Life Technologies), analizador de ADN de ABI PRISM 3100 (Life Technologies), etc.).

Pueden confirmarse si el gen resultante codifica o no la proteína de interés comparando la secuencia de nucleótidos determinada con la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1. Como alternativa, una secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos determinada puede compararse con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2.

El gen de la presente invención puede contener un polinucleótido (por ejemplo, ADN) que codifique una secuencia peptídica para purificación y/o un polinucleótido (por ejemplo ADN) que codifique un péptido señal secretor. Como el polinucleótido que codifique una secuencia peptídica para purificación, puede usarse un polinucleótido que contenga una secuencia de nucleótidos que codifique una secuencia peptídica para purificación usada en la técnica. Los ejemplos de la secuencia peptídica para purificación incluyen los mencionados anteriormente. Como un polinucleótido que codifique un péptido señal secretor, puede usarse un polinucleótido que contenga una secuencia de nucleótidos que codifique un péptido señal secretor conocido en la técnica. Los ejemplos de los péptidos señal secretores incluyen los mencionados anteriormente.

El gen de la presente invención puede contener además un polinucleótido (por ejemplo, ADN) que codifique una secuencia peptídica para escisión. Como el polinucleótido que codifique una secuencia peptídica para escisión, puede usarse un polinucleótido que contenga una secuencia de nucleótidos que codifique una secuencia peptídica para escisión usado en la técnica. Los ejemplos de la secuencia peptídica para escisión incluyen los mencionados anteriormente.

Una secuencia de nucleótidos de ADN contenida en un gen de una realización de la presente invención se representa por SEC ID N°: 3. Este ADN tiene ADN que codifica un sitio de reconocimiento de trombina, ADN que codifica un marcador de T7 y ADN que codifica un marcador de histidina fusionado en este orden detrás del ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1.

5

(4) Método para producir proteína de la invención

Para producir una proteína de la presente invención, en primer lugar, se prepara un vector recombinante integrando un gen que codifica la proteína de la presente invención. Después, se cultiva un transformante producido por transformación con este vector recombinante para recoger una proteína que tenga una actividad inductora de floración del cultivo, produciendo de este modo la proteína de la presente invención.

10

Un vector recombinante puede prepararse insertando un promotor de transcripción cadena arriba de, o en algunos casos un terminador cadena abajo de, un gen que codifica una proteína de la presente invención para construir un casete de expresión, que se inserta en un vector de expresión. Como alternativa, cuando un promotor de transcripción y/o un terminador ya está presente en el vector de expresión, el promotor y/o terminador en el vector puede utilizarse para insertar un gen que codifica esta proteína entre ellos sin la necesidad de construir un casete de expresión. Aquí, puede no ser siempre necesario un terminador.

15

En el presente documento, los ejemplos del promotor incluyen, pero sin limitación, un promotor de trc, un promotor de lac y un promotor de T7.

20

En el presente documento, los ejemplos de terminador incluyen, pero sin limitación, un terminador del operón trp y un terminador de T7.

25

Para insertar un gen de la presente invención en un vector, puede emplearse un método que usa una enzima de restricción, un método que usa topoisomerasa, un método que usa recombinación homóloga o similares. Si es necesario para una inserción, puede añadirse un enlazador apropiado. Además, como una secuencia de nucleótidos crítica para la traducción a aminoácido, se conoce una secuencia de unión a ribosoma tal como secuencia SD o secuencia de Kozak, que puede insertarse cadena arriba del gen. Tras la inserción, puede sustituirse una parte de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen.

30

El vector no está particularmente limitado siempre que conserve el gen de la presente invención, y puede usarse un vector adecuado para cada hospedador. Los ejemplos del vector incluyen ADN plasmídico, ADN de bacteriófago, ADN de retrotransposón y ADN de cromosoma artificial. Por ejemplo, cuando se usa *E. coli* como un hospedador, los ejemplos de un vector incluyen pET-28 b (+) (Merck), pTrc99A (GE Healthcare Bioscience), pACYC184 (Nippon Gene), pMW118 (Nippon Gene) y similares. Además, también pueden usarse versiones modificadas de estos vectores según sea necesario.

35

Puede prepararse un transformante integrando el vector recombinante en un hospedador.

40

El hospedador no está particularmente limitado siempre que sea capaz de expresar una proteína de interés después de integración del vector recombinante anteriormente descrito. Los ejemplos del hospedador incluyen bacterias tales como *E. coli* (*Escherichia coli*), *Bacillus subtilis*, *Rhodococcus* y *Actinomyces*, levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), hongos, células animales, células vegetales y células de insecto. El hospedador es preferentemente *E. coli*.

45

Los ejemplos de *E. coli* incluyen cepas de *E. coli* K12 y B así como cepas derivadas de cepas de tipo silvestre de estas cepas, concretamente, cepa JM109, cepa XL1-Blue (por ejemplo., XL1-Blue MRF⁺), cepa K802, cepa C600 y cepa Origami B(DE3).

50

Una técnica para introducir un vector recombinante en un hospedador no está particularmente limitada siempre que sea adecuada para el hospedador, que puede seleccionarse de forma apropiada de técnicas conocidas por los expertos en la materia. Los ejemplos de dicho método incluyen técnicas de electroporación, técnicas que utilizan iones de calcio, técnicas de esferoplastos, técnicas de acetato de litio, técnicas de fosfato cálcico y técnicas de lipofección.

55

Una proteína de la presente invención puede producirse cultivando el transformante, y recogiendo una proteína que tenga una actividad inductora de floración del cultivo resultante.

60

Un "cultivo" se refiere a los que pueden obtenerse cultivando, por ejemplo, una célula bacteriana, una solución de cultivo, un extracto sin células, una membrana celular o similares. Puede obtenerse un extracto sin células, por ejemplo, rompiendo físicamente las células bacterianas cultivadas con un homogeneizador o similares después de la adición de, por ejemplo, un tampón de fosfato sódico, centrifugando el resultante y recogiendo el sobrenadante de modo que ya no existan células bacterianas enteras (células). Puede obtenerse una membrana celular como un sedimento resultante de la centrifugación anteriormente descrita, u obtenerse suspendiendo el sedimento en un

65

tampón de disolución.

Una proteína de la presente invención puede purificarse a partir del cultivo empleando un método conocido tal como diálisis o precipitación con sulfato de amonio o diversas cromatografías tales como filtración en gel, intercambio iónico y afinidad, solas o en una combinación apropiada. En este caso, puede llevarse a cabo concentración y purificación usando un peso molecular, punto isoelectrico como un índice (por ejemplo, SDS-PAGE).

Dependiendo del sistema de expresión usados, la proteína de la presente invención expresada en el transformante podría acumularse como una materia insoluble (cuerpo de inclusión). En este caso, esta materia insoluble (cuerpo de inclusión). En este caso, esta materia insoluble se recoge, y se solubiliza en condiciones de desnaturalización suaves, por ejemplo, en presencia de un agente desnaturalizante tal como urea, seguido de la retirada del agente desnaturalizante, obteniendo de este modo una proteína de tipo activo. Además, puede realizarse una operación de cromatografía para amplificar una proteína de interés que tenga una actividad inductora de floración.

Además, el gen anteriormente obtenido se usa como una sonda para realizar hibridación en condiciones rigurosas para obtener un gen que codifique una proteína que tenga actividad inductora de floración similar cuya secuencia es ligeramente diferente de la del gen resultante (por ejemplo, un gen que contiene ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1).

Cuando el gen resultante no contiene la región completa que codifica la proteína de interés, los cebadores se sintetizan basándose en la secuencia de nucleótidos del gen resultante, para amplificar la región que falta por PCR usando la misma, o el fragmento génico resultante se usa como una sonda para repetir la exploración de la biblioteca de ADN, obteniendo de este modo la región codificante completa.

Por lo tanto, un transformante que contiene el gen de la presente invención se prepara para expresar la proteína de la presente invención codificada por el gen. La proteína expresada se purifica. La preparación del transformante, y la expresión y purificación de la proteína pueden llevarse a cabo todos de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

Una proteína de la presente invención también puede producirse a partir de un gen de la presente invención o un vector anteriormente descrito. Específicamente, puede emplearse un sistema de síntesis de proteínas llamado sin células para producir una proteína de la presente invención.

Un sistema de síntesis de proteínas sin células es un sistema que sintetiza una proteína usando un extracto celular en un recipiente artificial tal como un tubo de ensayo. Aquí, un sistema de síntesis de proteínas sin células también comprende un sistema de transcripción sin células que sintetiza ARN usando ADN como un molde.

Aquí, el extracto celular anteriormente descrito usado puede ser un extracto derivado de una célula eucariota o procariota, por ejemplo, un extracto de germen de trigo, *E. coli* o similares. Estos extractos celulares pueden concentrarse o no.

El extracto celular puede obtenerse, por ejemplo, por ultrafiltración, diálisis, precipitación con polietilenglicol (PEG) o similares. Además, también puede llevarse a cabo síntesis proteica sin células usando un kit disponible en el mercado. Los ejemplos de dicho kit incluyen kit de reactivos PROTEIOS™ (Toyobo) y Sistema TNT™ (Promega) así como sintetizadores PG-Mate™ (Toyobo) y RTS (Roche Diagnostics).

La proteína de la presente invención obtenida por síntesis de proteínas sin células descrita anteriormente puede concentrarse y purificarse seleccionando apropiadamente la cromatografía anteriormente mencionada.

(5) Inductor de floración y método que usa inductor de floración

Un inductor de floración contiene una proteína de la presente invención como un componente activo. Administrando el inductor de floración en un cuerpo vegetal, puede inducirse la floración del cuerpo vegetal. Además, para producir el inductor de floración anteriormente descrito, puede usarse la proteína de la presente invención.

Una planta a la que se dirige la administración del inductor de floración no está particularmente limitada siempre que la planta pueda producir una flor, siendo ejemplos árboles frutales, árboles tales como pino, cedro y ciprés Japonés, árboles con flores (árboles ornamentales) tales como azalea, camelia y sasanqua, verduras tales como zanahoria, pepino, rábano *daikon*, calabaza, berenjena, tomate, col, patata, col china, ojo de buey, espinaca japonesa, pimiento dulce, cebollino inglés, cebolla, lechuga, jengibre, ajo y fresa, granos tales como arroz, trigo y maíz, flores tales como crisantemo, tulipán y rosa, legumbres tales como soja y guisante y la planta modelo *Arabidopsis*. Las plantas a las que se dirige la administración son preferentemente plantas cuyo estadio juvenil, el periodo desde la germinación hasta la aparición de flores, es relativamente largo (10 años o más, 9 años o más, 8 años o más, 7 años o más, 6 años o más, 5 años o más, 4 años o más o 3 años o más), por ejemplo, árboles frutales. Ya que los árboles frutales son leñosos y el número de las plantas cultivadas es menor en comparación con otras plantas agrícolas, la administración del inductor de floración de la presente invención puede ser relativamente fácil. Los ejemplos de

árboles frutales incluyen cítricos, kumquat, manzana, ciruela japonesa, melocotón, uva, pera, níspero del Japón, caqui e higo.

Más preferentemente, la planta a la que se dirige la administración es un cítrico. Los ejemplos de cítricos incluyen mandarinas (por ejemplo, *Citrus unshiu*, *Citrus tangerina*, *Citrus tachibana*, *Citrus kinokuni*, naranja verde, clementina, mandarina Kara, etc.), naranjas (por ejemplo, naranja Valencia, naranja de Ombligo, sanguina, naranja hamlin, etc.), pomelos (por ejemplo, pomelo, Sweetie, oroblanco, etc.), cítricos ácidos (por ejemplo, *yuzu*, naranja amarga, *Citrus sphaerocarpa*, *Citrus sudachi*, limón, *Citrus depressa*, lima, cidra, *Citrus junos Tanaka Silbes*, *Citrus yuko*, etc.), cítricos híbridos naturales (por ejemplo, *Citrus natsudaikai*, *Citrus natsudaikai Hayata f. Kawanonatsudaikai (Amanatsu)*, *Citrus hassaku*, *Citrus tamurana*, *Citrus jabara*, *Citrus grandis*, *Citrus sulcata*, naranja *Naruto*, *Citrus obovoidea*, etc.), tangores (*Citrus iyo*, *Citrus unshiu x sinensis*, *Harumi*, *Citrus tankan Hayata*, tangor Murcott, ortanique, etc.), tangelos (por ejemplo, Seminola, Yalaha, Minneola, Orlando, etc.), pomelos (por ejemplo, pomelo Kao Phuang, pomelo Banpeiyu, pomelo Egami-buntan, pomelo Hirado-buntan, pomelo Mato-buntan, etc.), naranjas trifoliadas (naranja trifoliada, Flying Dragon, Rubidoux, etc.) y kumquats (kumquat Meiwa, kumquat redondo, kumquat oval, etc.). Más preferentemente, la planta a la que se dirige la administración es *Citrus unshiu*.

En algunas realizaciones preferibles de la presente invención, la planta a la que se dirige la administración es una planta obtenida injertando un vástago en el estadio maduro de un portainjerto. Los ejemplos del vástago incluyen las plantas anteriormente mencionadas a las que se dirige la administración del inductor de floración, y es preferentemente los árboles frutales anteriormente mencionados, más preferentemente los cítricos anteriormente mencionados y aún más preferentemente *Citrus unshiu*. Como el portainjerto, se puede usar un portainjerto conocido, incluyendo los ejemplos las plantas anteriormente mencionadas a las que se dirige la administración del inductor de floración, y es preferentemente los árboles frutales anteriormente mencionados, más preferentemente los cítricos anteriormente mencionados y aún más preferentemente naranja trifoliada.

Por ejemplo, el estadio juvenil de una plántula híbrida de cítrico dura 8-12 años. Un cítrico al que se ha injertado un vástago en el estadio maduro puede tratarse con un inductor de floración de una realización preferible de modo que el periodo antes de la floración pueda reducirse a menos de 2 años, consiguiendo de este modo una recolección más temprana de la fruta cítrica.

Un inductor de floración contiene la proteína de la presente invención como un componente activo. Además de la proteína de la presente invención, también puede contener agentes adyuvantes tales como vehículo, emulsionante, dispersante, agente de propagación, agente humectante, agente de fijación, disgregante y similares habitualmente usados.

Los ejemplos de vehículo incluyen agua; alcoholes tales como etanol, metanol, isopropanol, butanol, etilenglicol y propilenglicol, cetonas tales como acetona, metiletilcetona y ciclohexano; ésteres tales como etil acetato; y vehículos sólidos, por ejemplo, talco, bentonita, arcilla, caolín, diatomita, carbono blanco, vermiculita, hidróxido de calcio, arena de sílice, sulfato de amonio y urea.

Como un emulsionante o un dispersante, se usa habitualmente un tensioactivo. Los ejemplos incluyen tensioactivos aniónicos tales como sulfato sódico de alcohol superior, tensioactivos catiónicos tales como cloruro de estearil trimetilamonio, y tensioactivos no iónicos tales como polioxietileno alquil fenil éter.

La forma de dosificación del inductor de floración no está particularmente limitada, y los ejemplos incluyen una emulsión, una suspensión, un polvo, un agente hidratante, un agente soluble en agua, gránulos, pasta y aerosol.

Aunque el tiempo usado y el método de uso de un inductor de floración puede seleccionarse apropiadamente de acuerdo con el tipo de la planta, el inductor de floración se inyecta en una planta, por ejemplo, una planta obtenida por injerto de un vástago en el estadio maduro en un portainjerto. De acuerdo con un "método de inyección", puede usarse un goteo, algodón absorbente impregnado con un inductor de la floración o similares para inyectar el inductor en un cuerpo vegetal de un tallo, una hoja, una raíz o similares del cuerpo vegetal.

El contenido de la proteína de la presente invención en el inductor de floración y la dosificación del inductor de floración difieren dependiendo del tipo de planta, forma de dosificación, método de uso, tiempo para usar y similares. Por ejemplo, cuando el inductor de floración se inyecta como un agente soluble en agua en un cítrico, la proteína de la presente invención se ajusta de modo que su concentración quede en un intervalo de 20-10000 ppm, preferentemente 50-10000 ppm, más preferentemente 100-10000 ppm, y se inyecta en el cítrico en una cantidad de 0,1-5,0 ml, preferentemente 0,2-2,0 ml y más preferentemente 0,5-1,0 ml durante el periodo de diferenciación del capullo floral fisiológico del cítrico.

La presente invención también proporciona un método para inducir la floración, que comprende, por ejemplo, inyectar la proteína de la presente invención en una planta de interés, y colocar una planta a la que se ha inyectado la proteína de la presente invención junto a una planta de interés. La expresión "colocar junto a" comprende una disposición de modo que la distancia entre el tallo principal (el tallo principal permanece casi en el centro del cuerpo

vegetal) de una planta a la que se ha administrado la proteína de la presente invención y el tallo principal de una planta dispuesta junto a ella sea, por ejemplo, una distancia de 2 m, una distancia de 1,9 m, una distancia de 1,8 m, una distancia de 1,7 m, una distancia de 1,6 m, una distancia de 1,5 m, una distancia de 1,4 m, una distancia de 1,3 m, una distancia de 1,2 m, una distancia de 1,1 m, una distancia de 1 m, una distancia de 0,9 m o una distancia de 0,8 m. De acuerdo con un método para inducir la floración de la presente invención, una planta a la que se dirige la administración, un agente adyuvante, el tiempo de uso, el método de uso, un contenido de la proteína de la presente invención, una dosificación de un inductor de floración y similares son los mismos que los descritos para el inductor de floración anteriormente descrito.

Un inductor de floración o un método para inducir la floración de acuerdo con una realización preferible tiene al menos un efecto seleccionado del grupo que consiste en los siguientes: (a) el corte gastado en el cultivo hasta la fructificación puede reducirse ya que el tiempo de fructificación puede hacerse más temprano; (b) la inversión tras la apertura de una granja puede recuperarse más temprano ya que el tiempo de fructificación puede hacerse más temprano; y (c) la floración temprana puede dar como resultado una mejora de la variedad eficaz.

Un inductor de la floración o un método para inducir la floración de acuerdo con una realización más preferible puede evitar la fructificación en años alternos de un cítrico, en particular *Citrus unshiu*.

Además, un inductor de la floración o un método para inducir la floración de acuerdo con algunas realizaciones no usa una planta recombinante, como un método alternativo para inducir la floración.

Aquí, los mejores modos y ejemplos específicos para llevar a cabo la presente invención son realizaciones preferibles de la presente invención, que se proporcionan para ilustración o explicación y la presente invención no se limita a los mismos.

Ejemplo 1

1. PCR del gen CiFT2

Se obtuvo ADN complementario que tenía alta homología con ADN complementario de FT por el método de RT-PCR usando ARN extraído de hoja de *Citrus unshiu* como un molde. Específicamente, el método se llevó a cabo de la siguiente manera. Se diseñaron cebadores usados para el método de RT-PCR basándose en la secuencia de ADNc de CiFT de *Citrus unshiu* (Nº de Referencia AB027456, SEC ID Nº: 5) y secuencia de ADNc de CiFT2 de *Citrus unshiu* cuya secuencia de ADN es 99 % idéntica a la de CiFT (Nº de Referencia AB301934, SEC ID Nº: 7) (Fumie Nishikawa, Tomoko Endo, Takehiko Shimada, Hiroshi Fujii, Tokuro Shimizu, Mitsuo Omura, y Yoshinori Ikoma (2007) "Increased CiFT abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.)". J. Exp. Bot. 58, 3915-3927). Las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID Nº: 5 y 7 se representan por SEC ID Nº: 6 y 8, respectivamente.

Se usó TRIZOL (Invitrogen) para extraer ARN de la hoja de *Citrus unshiu* de acuerdo con las instrucciones adjuntas. Se llevó a cabo reacción de transcripción inversa con enzima SuperScript II (Invitrogen) usando el ARN extraído como un molde y un cebador que tenía secuencia de ADN de CAAATTAAGCATGTATGG (SEC ID Nº: 9) en las condiciones descritas en Piero Carninci, Yoko Nishiyama, Arthur Westover, Masayoshi Itoh, Sumiharu Nagaoka, Nobuya Sasaki, Yasushi Okazaki, Masami Muramatsu, y Yoshihide Hayashizaki (1998) "Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA" Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 520-524, obteniendo de este modo ADN complementario.

Entonces, se usó este ADN complementario como un molde para analizar PCR anidada. Se usaron cebadores que tenían las siguientes secuencias de ADN en la primera reacción de PCR.

Cebador: CAAATTAAGCATGTATGG (SEC ID Nº: 10)

Cebador: GTGCTTAGTGTGTTGAG (SEC ID Nº: 11)

A continuación, la reacción de PCR se realizó usando los cebadores anteriormente mencionados así como ADN Polimerasa PrimeSTAR GXL (Takara Bio) de acuerdo con las instrucciones adjuntas. La reacción tuvo lugar repitiendo 20 ciclos de: 98 °C durante 10 segundos; 55 °C durante 15 segundos; y 68 °C durante 1 minuto.

Se usaron cebadores que tenían las siguientes secuencias de ADN en la segunda reacción de PCR.

Cebador: AGGAGATATACCATGTCTAGCAGGGAGAGAGA (SEC ID Nº: 12)

Cebador: CACCAGGCCGCTGCTTCGTCTGACAGGCCTTCCGC (SEC ID Nº: 13)

Después, se realizó la reacción de PCR usando los cebadores anteriormente mencionados así como ADN Polimerasa PrimeSTAR GXL de acuerdo con las instrucciones adjuntas. La reacción tuvo lugar repitiendo 20 ciclos de: 98 °C durante 10 segundos; 55 °C durante 15 segundos; y 68 °C durante 1 minuto.

Se usaron cebadores que tenían las siguientes secuencias de ADN en la tercera reacción de PCR.

Cebador: AATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATG (SEC ID N°: 14)

Cebador: GCCATATGGCTGCCGCGCGGCACCAGGCCGCTGCT (SEC ID N°: 15)

5 Posteriormente, se realizó reacción de PCR usando los cebadores anteriormente mencionados así como ADN Polimerasa PrimeSTAR GXL de acuerdo con las instrucciones adjuntas. La reacción tuvo lugar repitiendo 40 ciclos de: 98 °C durante 10 segundos; 55 °C durante 15 segundos; y 68 °C durante 1 minuto.

10 Aquí, las secuencias de cebadores usadas para las segunda y tercera reacciones de PCR anteriormente descritas contienen una secuencia para añadir una secuencia homóloga del plásmido pET-28b(+) (Merck) a un producto de PCR.

15 2. Clonación de producto de PCR en el plásmido pET-28b(+)

El producto de PCR se clonó en el plásmido de acuerdo con una técnica de recombinación homóloga de levadura (Ei'ichi Iizasa y Yukio Nagano (2006) "Highly efficient yeast-based in vivo DNA cloning of multiple DNA fragments and the simultaneous construction of yeast/ Escherichia coli shuttle vectors" BioTechniques 40, 79-83). Como se muestra en la Figura 2, el plásmido pET-28b(+) se escindió con las enzimas de restricción NcoI y ClaI, el plásmido pYES2/CT (Invitrogen) se escindió con las enzimas de restricción HindIII y XhoI, y el producto de PCR anteriormente descrito se usó simultáneamente para transformar una levadura. Como resultado, debido a la reacción de recombinación homóloga dentro de la célula de levadura, pET-28b(+) obtendrá el origen de replicación y marcador selectivo URA3 de la levadura mientras que el producto de PCR se clona en pET-28b(+). Este experimento se realizó de acuerdo con Ei'ichi Iizasa y Yukio Nagano (2006) BioTechniques 40, 79-83. El plásmido resultante permite la expresión de una proteína que tiene un sitio de reconocimiento de trombina, un marcador T7 como un marcador epitópico, y un marcador de His para purificación fusionado en este orden detrás de la proteína FT. Se recogió una población de las colonias de levadura transformadas, de las que se purificó ADN plasmídico. A continuación, el ADN plasmídico purificado se usó para transformar *E. coli*. Se purificó ADN plasmídico de una de las colonias de *E. coli* resultantes para determinar la secuencia de ADN que tiene el producto de PCR insertado.

30 La secuencia de ADN resultante se representa por SEC ID N°: 1. Además, una secuencia de aminoácidos deducida a partir de esta secuencia de ADN se representa por SEC ID N°: 2. Esta secuencia de ADN fue igual que la de CiFT2 de *Citrus unshiu*. Este CiFT2 codifica la proteína CiFT2.

35 3. Comparación de secuencia de aminoácidos de proteína CiFT2

La Figura 3 muestra los resultados de la comparación con secuencias de aminoácidos de proteínas FT de algunas plantas. La proteína CiFT2 muestra 99 % y 95 % de identidad con proteína CiFT derivada de *Citrus unshiu* y proteína CiFT3 derivada de *Citrus unshiu*, respectivamente. Además, la proteína CiFT2 también muestra 99 %, 84 %, 83 %, 82 % y 81 % de identidad con las secuencias de aminoácidos de proteínas FT derivadas de naranja trifoliada, manzana, ciruela japonesa, melocotón y uva, respectivamente. Al mismo tiempo, la proteína CiFT2 muestra 75 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de proteína FT derivada de *Arabidopsis*. En consecuencia, la secuencia de aminoácidos de la proteína CiFT2 es relativamente similar con proteínas FT derivadas de árbol frutal que con proteínas FT derivadas de *Arabidopsis*.

45 4. Producción de proteína CiFT2 con transformante de *E. coli*

A continuación, se produjo proteína CiFT2 con *E. coli*. El plásmido construido se usó para transformar *E. coli* Origami B (DE3) (Merck). Esta *E. coli* se cultivó en 250 ml de medio Terrific (24 g de extracto de levadura, 12 g de peptona, 9,4 g de hidrógeno fosfato dipotásico, 2,2 g de dihidrógeno fosfato potásico y 4 ml de glicerol por litro de agua) que contenía ampicilina 100 µg/ml en las condiciones de 37 °C hasta que la absorbancia a 600 nm llegó a aproximadamente 0,7. Después, se añadió IPTG a 1 mM y se cultivó a 15 °C durante dos días.

55 La *E. coli* cultivada se recogió y se suspendió en 40 ml de solución salina tamponada con fosfato (un tampón obtenido disolviendo 8 g de cloruro sódico, 0,2 g de cloruro potásico, 1,44 g de hidrógeno fosfato disódico y 0,24 g de dihidrógeno fosfato potásico en 800 ml de agua, cuyo pH se ajustó a 7,4 y después se llevó a 1 litro con agua). A esta suspensión, se añadió fenilmetilsulfonil fluoruro (inhibidor de proteinasa), desoxirribonucleasa (ADN hidrolasa) y lisozima (enzima que lisa paredes de células bacterianas) a 1 mM, 10 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente, para reacción a 30 °C durante 15 minutos.

60 Posteriormente, se usó una prensa francesa para romper esta solución de reacción en las condiciones de presión de aproximadamente 150 MPa. Para retirar la fracción insoluble de la solución de fractura celular, se realizó centrifugación a 20.000 g durante 10 minutos dos veces. El sobrenadante se pasó a través de 10 ml de Fast Flow de Sepharose Quelante (GE Healthcare Bioscience) cargada con ión de níquel. Después, se lavó el resultante con 100 ml de tampón de lavado 1 (tampón fosfato 50 mM (pH 7,0), cloruro sódico 0,5 M, Triton X-100 1 %), seguido de 20 ml de tampón de lavado 2 (tampón de fosfato 50 mM (pH 7,0), cloruro sódico 0,5 M) y finalmente con 20 ml de

tampón de lavado 3 (tampón de fosfato 50 mM (pH 7,0), cloruro sódico 0,5 M, imidazol 100 mM).

A continuación, la proteína recombinante se eluyó un total de seis veces con 5 ml de tampón de elución (tampón de fosfato 50 mM (pH 7,0), cloruro sódico 0,5 M, imidazol 200 mM) (total 30 ml). Ya que estaban contenidas mayores cantidades de la proteína recombinante en la tercera a sexta soluciones de elución, estas fracciones se sometieron a diálisis para retirar el imidazol. La diálisis tuvo lugar un total de cinco veces con solución salina tamponada con fosfato 25 veces. La concentración de la proteína resultante se determinó con el ensayo de proteínas de BIO-RAD (ensayo de Bradford) de acuerdo con las instrucciones adjuntas.

La Figura 4 muestra tinción con Azul Brillante de Coomassie después de someter a electroforesis una parte de las proteínas purificadas con gel de poliacrilamida SDS al 14 %. Muestra que la purificación fue relativamente alta. El peso molecular relativo de la proteína recombinante fue casi igual que el valor predicho. Aquí, se fusionan un sitio de reconocimiento de trombina, un marcador de T7 como un marcador epitópico y un marcador de histidina para purificación en este orden detrás de la proteína CiFT2, pero estas secuencias extra se dejaron y se usaron en los ejemplos posteriores.

Una secuencia de nucleótidos del ADN que codifica la proteína recombinante obtenida se representa por SEC ID N°: 3. Además, una secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos se representa por SEC ID N°: 4.

5. Administración del inductor de floración y resultados del mismo (N° 1)

5. 1. Administración del inductor de floración

Después, se inyectó un inductor de floración que contenía la proteína CiFT2 recombinante anteriormente obtenida en *Citrus unshiu*. La planta usada fue una plántula de un año de edad, que puede obtenerse 12 meses (Abril de 2008) después de injertar *Citrus unshiu* (variedad: *Aoshima unshiu*) como un vástago en naranja trifoliada como un portainjerto. Se llevó a cabo inyección del inductor de floración en *Citrus unshiu* de acuerdo con los siguientes dos métodos. Por referencia, se muestra en la Figura 5 una fotografía de una plántula de un año de edad tomada en abril de 2009.

Método de inyección 1)

Se inyectó un inductor de floración en septiembre, octubre y noviembre de 2008. Se realizó inyección en la parte superior del sitio injertado en el tallo principal. La proteína CiFT2 recombinante anteriormente obtenida se diluyó en una solución salina tamponada con fosfato para preparar un inductor de floración 500 ppm. Se extrajo un ml de inductor de floración 500 ppm (0,5 mg/ml) en un goteo de plástico. Después se cortó la epidermis hasta el xilema, en el que se insertó la punta del goteo de plástico donde se cubrió la región insertada por un adhesivo (Aron Alpha™ (Toagosei)) para evitar la fuga del líquido del inductor de floración (Figura 6). El goteo se fijó al tallo usando una cinta. Obsérvese que el líquido no se inyectó presionando el goteo sino por absorción natural.

Obsérvese que durante esta época del año (septiembre, octubre y noviembre), *Citrus unshiu* está en el periodo de diferenciación de capullos florales fisiológico. Como se ha descrito anteriormente, aunque se sintetizara una sustancia para inducir la floración en las hojas, se ha descubierto que esta sustancia inductora de la floración se sintetiza durante el periodo de diferenciación de capullos florales fisiológico basándose en los experimentos en los que se retiraron hojas de un cuerpo vegetal en diversos periodos. No hay ningún cambio en la morfología que pueda observarse con un microscopio durante el periodo de diferenciación de capullos florales fisiológico. La floración en sí misma tiene lugar al siguiente abril.

Método de inyección 2)

El inductor de floración se inyectó en la parte superior del sitio injertado en el tallo principal en abril de 2008. Después de cortar en la epidermis hasta el xilema con un cuchillo, se colocó un algodón absorbente impregnado con aproximadamente 0,2 ml del inductor de floración en el corte y se envolvió con una cinta (cinta usada para injertos) para inyectar el inductor de floración (Figura 7). La concentración del inductor de floración que impregna el algodón absorbente fue de 10.000 ppm, 1.000 ppm o 100 ppm. Los inductores de floración a estas concentraciones se prepararon diluyendo la proteína CiFT2 recombinante anteriormente obtenida en una solución salina tamponada con fosfato.

5. 2. Resultados de la administración de inductor de floración

Se observó formación aparente de capullos en la mayoría de las plantas tratadas al comienzo de abril de 2009. Florecieron desde el final de abril hasta el comienzo de mayo.

La siguiente Tabla 1 muestra los resultados del experimento llevado a cabo de acuerdo con el método de inyección 1. En esta tabla, un brote vegetativo (brote sin floración) se refiere literalmente a un brote que se desarrolla sin aparición de flores (crecimiento vegetativo). Hay dos tipos de capullos florales, concretamente, flor foliar asociada

con hojas y flor sin hojas, es decir, un capullo floral solamente con flor. En general, aproximadamente el 90 % de la flor sin hojas se asocia con abscisión floral o abscisión frutal y por lo tanto incluso aunque produzca fruto, este es con frecuencia de poca calidad. Por otro lado, una flor foliar tiene una mayor tasa de fructificación, y su fruto es con frecuencia de buena calidad.

- 5 Como puede apreciarse a partir de la Tabla 1, se produjo un número significativo de floraciones en algún nivel en la mayoría de las plantas, y el número de flores foliares era mayor que el de flores sin hojas. Los resultados obtenidos con la planta de control (planta no tratada) se describirá más adelante, pero en general, una plántula de *Aoshima unshiu*, una variedad de *Citrus unshiu*, está habitualmente aún en la mitad del crecimiento vegetativo después de un
- 10 año de la plantación y en pocas ocasiones produce flor. No hubo diferencias aparentes entre los meses del tratamiento. La razón para la menor floración en el N° 4 que se trató en octubre no está clara.

[Tabla 1]

Nº	Mes de tratamiento	Brote vegetativo (brote sin floración)	Flor foliar (Brote con floración)	Flor sin hojas
1	Septiembre	46	65	6
2	Septiembre	9	52	10
3	Septiembre	4	108	66
4	Octubre	48	4	3
5	Octubre	0	91	55
6	Noviembre	18	56	22
7	Noviembre	51	57	0
8	Noviembre	39	31	2

- 15 La fotografía de la planta N° 3 en la Tabla 1 anterior se muestra en la Figura 8. En la Figura 8, aparecen varias flores foliares blancas.

- Los resultados del experimento de acuerdo con el método de inyección 2 se muestran en la Tabla 2 a continuación. Se produjo un número significativo de floraciones en algún nivel en la mayoría de las plantas, y el número de flores foliares fue mayor que el de flores sin hojas. No hubo diferencias aparentes entre las concentraciones del
- 20 tratamiento.

[Tabla 2]

Nº	Concentración (ppm)	brote vegetativo (brote sin floración)	Flor foliar (brote con floración)	Flor sin hojas
9	10.000	8	56	24
10	10.000	29	29	4
11	10.000	7	119	100
12	10.000	27	46	11
13	10.000	1	82	74
14	10.000	0	39	83
15	1.000	55	17	0
16	1.000	29	36	0
17	1.000	16	91	33
18	100	26	74	7
19	100	27	51	2
20	100	12	75	6
21	100	3	89	101
22	100	23	42	2
23	100	11	32	6

La fotografía de la planta N° 21 en la Tabla 2 anterior se muestra en la Figura 9. En la Figura 9, aparecen varias flores foliares blancas.

- 5 Se muestran los resultados obtenidos en una sección de terreno adyacente (a 80 cm de distancia) a las plantas tratadas de acuerdo con el método de inyección 2 en la Tabla 3 a continuación. De forma similar a la Tabla 2, se produjo un número significativo de floraciones en algún nivel en la mayoría de las plantas, y el número de flores foliares era mayor que el de flores sin hojas. La razón por la que se produjo floración en esta sección de terreno, es decir, sección de terreno de control no tratado, se analizará posteriormente.
- 10 Aquí, la distancia de la sección de terreno adyacente a la planta tratada de acuerdo con el método de Inyección 2 se refiere a una distancia del tallo principal de la planta tratada al tallo principal de la planta dispuesta en la sección de terreno adyacente.

[Tabla 3]

N°	Brote vegetativo (brote sin floración)	Flor foliar (Brote con floración)	Flor sin hojas
24	16	73	35
25	10	70	7
26	15	64	16
27	7	78	45
28	2	84	37
29	2	115	12

- 15 Una fotografía de la planta N° 24 en la Tabla 3 se muestra en la Figura 10. La Figura 10 muestra la aparición de varias flores foliares blancas.

- 20 Se muestran los resultados del experimento en una sección de terreno que estaba más lejos que la sección de terreno adyacente (a una distancia de 80 cm) a la planta tratada de acuerdo con el método de inyección 2 en la Tabla 4 a continuación. Aquí, la "distancia" se refiere a una distancia de la sección de terreno adyacente a la planta tratada de acuerdo con el método de inyección 2. En la Tabla 4, se muestran las distancias de la sección de terreno adyacente a la planta tratada de acuerdo con el método de inyección 2. El número de floraciones tendió a reducirse dependiendo de la distancia. Como se ha mencionado anteriormente, en general, una plántula de *Aoshima unshiu*, una variedad de *Citrus unshiu*, está habitualmente aún en mitad del crecimiento vegetativo después de un año de plantación y en pocas ocasiones produce flor. En particular, esta tendencia fue significativa para el cultivo en exterior donde las plantas se plantan directamente en un campo de cultivo en lugar de plantarse en macetas como en los casos anteriores. En consecuencia, el estado del N° 37 probablemente es el estado más habitual.

- 30 [Tabla 4]

N°	Distancia (m)	Brote vegetativo (brote sin floración)	Flor foliar (Brote con floración)	Flor sin hojas
30	1	43	30	5
31	1	44	20	0
32	1,6	1	42	28
33	1,9	22	55	3
34	2,6	52	14	0
35	2,9	27	20	4
36	2,9	40	26	10
37	2,9	55	0	0

La Figura 11 es una fotografía de una planta que se colocó a 2,9 m de distancia. Algunas partes del cuerpo vegetal (por ejemplo, la superficie de las hojas) parecían blancas por el reflejo de la luz pero no se pudo observar floración.

- 35 En el mismo momento de la floración, se observó también otro fenómeno. *Citrus unshiu* tiene de forma inherente esterilidad masculina y puede desarrollar polen calentándose en cultivo en invernadero, pero en pocas ocasiones desarrolla polen por cultivo en exterior. A partir de esta serie de experimentos, sin embargo, se descubrió que muchas de las flores producidas en el presente experimento desarrollaban polen mediante dehiscencia de la pared

de la antera. El valioso polen de *Citrus unshiu* puede usarse para cruzamiento. Debido al desarrollo de este polen, un cítrico que tiene esterilidad masculina y por lo tanto ha sido imposible de usar como un parental de polen puede usarse como un parental de polen. Esto puede conducir a eficacia en la mejora de la variedad del cítrico.

5 Ahora, en esta serie de experimentos, también se ha observado floración para un árbol que no se trató con el inductor de floración, pero se colocó cerca de un árbol tratado con inductor de floración. Además, el número de floraciones del árbol no tratado con el inductor de floración se redujo a medida que se alejaba del árbol tratado con el inductor de floración. Habitualmente, una plántula de *Aoshima unshiu*, una variedad de *Citrus unshiu*, pocas veces produce flor después de un año de plantado. Una posibilidad del mecanismo de la floración de una planta no tratada
10 con el inductor de floración pero colocado cerca de la planta inyectada con el inductor de floración es que posiblemente pueda liberarse una sustancia inductora de floración desconocida que puede llamarse una “feromona de floración” de la planta a la que se ha inyectado el inductor de floración (Figura 12). En lo sucesivo en el presente documento, se explicará esta hipótesis, pero la presente invención no se limita al caso en el que la inducción de floración surja debido al mecanismo de la siguiente hipótesis.

15 Una feromona es una sustancia fisiológicamente activa generada en un individuo y secretada fuera del individuo para desencadenar un cambio en cierto comportamiento o desarrollo de otro individuo de la misma especie. La comunicación entre individuos mediante una feromona es un fenómeno ampliamente encontrado en la naturaleza. Un fenómeno hallado por los presentes inventores puede explicarse por esta comunicación entre individuos
20 mediante una feromona.

En muchos árboles frutales incluyendo el mandarino, se sabe que se produce un fenómeno llamado fructificación de años alternos (“fructificación” en el presente documento significa “producir un fruto”), que es un fenómeno que repite recolecciones ricas y pobres cada dos años en el huerto frutal completo. La razón para esta fructificación en años alternos, sin embargo, no está clara. La fructificación en años alternos es un fenómeno en el que la floración es sincrónica en el huerto frutal completo. Este fenómeno denominado fructificación de años alternos posiblemente pueda explicarse por comunicación entre individuos mediante una feromona.

25 Además, aunque se llevó a cabo el tratamiento cambiando el momento de administración o concentración en este experimento, no hubo ninguna diferencia obvia en el número de floraciones. La ausencia de diferencia obvia en el número de floraciones puede explicarse por comunicación entre individuos mediante una feromona.

30 En 1937, Mikhail Chailakhyan de la antigua Unión Soviética propuso la existencia de una sustancia que se sintetiza en la hoja y posteriormente se transloca al brote para inducir la formación del capullo floral. Esta sustancia se denomina una hormona de floración. Aunque esta sustancia no puede identificarse durante muchos años, en la actualidad, se considera que la proteína FT es el principal cuerpo de esta hormona de floración a partir de diversos estudios. Esta hipótesis, sin embargo, solamente es una suposición a partir de los resultados obtenidos en diversos estudios. Para demostrar con el tiempo que la proteína FT es una hormona de floración, es necesario inyectar la proteína FT en un cuerpo vegetal para inducir floración. Por este experimento, los presentes inventores demostraron
40 con el tiempo que la proteína FT es una hormona de floración. Además, los presentes inventores aplicaron la proteína FT a la agricultura por primera vez. Además, han propuesto la existencia de una feromona de floración.

45 En los ejemplos anteriormente descritos, la administración de un inductor de floración de la presente invención en *Citrus unshiu* se ha descrito como un caso ejemplar. Como se describirá posteriormente, un inductor de floración de la presente invención también es aplicable a otras plantas.

50 En primer lugar, se describirá la aplicación de un inductor de floración de la presente invención a otros cítricos. Ya que la secuencia de aminoácidos de la proteína CiFT2 tiene 99 % de identidad con la de proteína FT de naranja trifoliada, se supone que la secuencia de aminoácidos de la proteína FT está bastante bien conservada entre cítricos. Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferible de la presente invención, en lugar de usar proteína FT derivada de una cierta especie de cítrico, se puede usar proteína CiFT2 derivada de *Citrus unshiu* para inducir la floración de esa especie de cítricos específica.

55 A continuación, se describirá la aplicación de un inductor de floración de la presente invención a otros árboles frutales. La proteína CiFT2 muestra una identidad del 80 % o más con una proteína FT derivada de árboles frutales conocida a un nivel de secuencia de aminoácidos. De acuerdo con una realización preferible de la presente invención, ya que la proteína CiFT2 derivada de *Citrus unshiu* muestra dicha homología alta, esta proteína puede administrarse a otro árbol frutal para inducir la floración. De acuerdo con otra realización preferible de la presente invención, también puede usarse proteína FT recombinante derivada de un árbol frutal para administrar. De acuerdo
60 con otra realización preferible de la presente invención, también puede usarse proteína FT derivada de otra planta tal como proteína CiFT2 para inducir floración. Esto se basa en un informe que dice que la floración se aceleró en *Arabidopsis* recombinante génica que expresaba en gran medida el gen CiFT derivado de *Citrus unshiu* (Yasushi Kobayashi, Hidetaka Kaya, Koji Goto, Masaki Iwabuchi, y Takashi Araki (1999) “A Pair of Related Genes with Antagonistic Roles in Mediating Flowering Signals” Science 286, 1960-1962.), y por lo tanto la función inductora de floración de la proteína FT parece ser menos específica de especie.

Ejemplo 2

6. Administración del inductor de floración y resultados de la misma (Nº 2)5 6.1. Administración del inductor de floración

Se injertó una plántula nucelar de *Citrus unshiu* en dos estadios en la punta de una plántula de un año de edad (obtenida injertando un vástago de *Citrus unshiu* en el estadio maduro en un portainjerto de naranja trifoliada), para usar el resultante para llevar a cabo un experimento de inyección de proteína FT. Específicamente, se usó una naranja trifoliada como portainjerto, se usó *Citrus unshiu* en el estadio maduro como un portainjerto intermedio, y se usó plántula nucelar de *Citrus unshiu* como un vástago. Una plántula nucelar se refiere a un brote que surgió de un embrión nucelar y no un brote que surgió de un embrión fertilizado. Una plántula nucelar es un tipo de producto resultante de reproducción asexual y es un clon parental. Incidentalmente, una plántula se refiere a un crecimiento que desarrolla un brote a partir de una semilla (independientemente del injerto/corte). Dicha plántula se produce en el estadio juvenil.

Para explicar el concepto aquí, no es importante si una parte del vástago deriva o no de un embrión nucelar, sino que es importante que la parte del vástago sea una plántula, en otras palabras, que la parte del vástago esté en el estadio juvenil.

Se realizó la inyección de un inductor de floración en septiembre, octubre y noviembre de 2008. Se realizó inyección en *Citrus unshiu* en el estadio maduro como el portainjerto intermedio, pero no en la plántula nucelar de *Citrus unshiu* como el vástago. Específicamente, se realizó inyección en la parte superior del sitio en el tallo principal donde el vástago de *Citrus unshiu* en el estadio maduro se injertó en el portainjerto de naranja trifoliada. La proteína CiFT2 recombinante obtenida en el Ejemplo 1 se diluyó en una solución salina tamponada con fosfato para preparar un inductor de floración 500 ppm. Se extrajo un ml de inductor de floración 500 ppm (0,5 mg/ml) en un goteo de plástico. Después la epidermis se cortó hasta el xilema, en el que se insertó la punta del goteo de plástico donde la región insertada se cubrió con un adhesivo (Aron Alpha™ (Toagosei)) para prevenir la fuga del líquido del inductor de floración. El goteo se fijó al tallo usando una cinta. Obsérvese que el líquido no se inyectó presionando el goteo sino por absorción natural.

Como control, se usó una planta que no se había tratado con el inductor de floración y que se colocó en una sección de terreno (sección de control) a 2,9 m de distancia de la sección de terreno de la planta tratada con el inductor de floración (sección tratada con FT).

35 6.2. Resultados de la administración del inductor de floración

Los resultados del experimento anteriormente descrito de administrar un inductor de floración se muestran en la Figura 13. Los datos numéricos en la Figura 13 se resumen en la Tabla 5. Como puede apreciarse a partir de la Figura 13 y la Tabla 5, no hay diferencias en el número de floraciones en el grupo al que se administró el inductor de floración (NS-Sep-1-NS-Nov-3) del grupo colocado en la sección de control (Cont-1-3).

[Tabla 5]

	Flor foliar	Flor sin hojas	Brote vegetativo
	(Brote de floración)		(Brote sin floración)
cont-3	0	0	55
cont-2	26	10	40
cont-1	20	4	27
NS-Nov-3	16	7	29
NS-Nov-2	31	5	42
NS-Nov-1	0	0	35
NS-Oct-4	26	9	31
NS-Oct-3	21	11	19
NS-Oct-2	37	23	18
NS-Oct-1	17	0	35
NS-Sep-3	40	23	12

	Flor foliar	Flor sin hojas	Brote vegetativo
	(Brote de floración)		(Brote sin floración)
NS-Sep-2	0	0	43
NS-Sep-1	0	0	32

Además, para el grupo al que se administró el inductor de floración (NS-Sep-1-NS-Nov-3), se examinó la presencia de correlación entre el diámetro del tallo de la plántula nucelar y el número de floraciones, y se descubrió que había una correlación negativa entre el diámetro del tallo de la plántula nucelar y el número de floraciones (Figura 14). Al mismo tiempo, no hubo correlación entre la altura de la plántula nucelar y el número de floraciones (Figura 15).

Por lo tanto, puede implicarse lo siguiente por los resultados anteriores.

- 1) Una sustancia que suprime la acción de la proteína FT se libera de la plántula nucelar.
- 2) Esta sustancia se transloca de la plántula nucelar al portainjerto intermedio y de este modo suprime la acción de la proteína FT.
- 3) Cuanto mayor sea el diámetro del tallo (como una indicación del crecimiento) de la plántula nucelar, mayor será la cantidad de esta sustancia.

Además, también se realizaron otros experimentos. Se cultivó una plántula nucelar de *Citrus natsudaoidai* Hayata f. *Kawanonatsudaoidai* o una plántula híbrida polinizada de forma natural de *Kawachi bankan* (*Citrus grandis*) para obtener una plántula tres meses después de la germinación. Se inyectó proteína FT en ellas pero no dieron como resultado floración incluso después de un año. A partir de estos resultados, se sugiere que la plántula tiene una sustancia que suprime la acción de la proteína FT.

En consecuencia, ya que *Citrus unshiu* en el estadio maduro nutricional difiere de los del estadio juvenil tales como plántulas y se espera que tenga menor cantidad de la sustancia que suprime la proteína FT, el efecto inductor de floración resultante del inductor de floración puede ser más fuerte para los que estén en el estadio maduro nutricional.

Lista de secuencias

- [SEC ID N°: 1] Una secuencia de nucleótidos de ADN obtenido en el ejemplo.
- [SEC ID N°: 2] Una secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1.
- [SEC ID N°: 3] Secuencia de ADN que tiene ADN que codifica un sitio de reconocimiento de trombina, ADN que codifica un marcador T7 y ADN que codifica un marcado de histidina fusionado en este orden detrás del ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1.
- [SEC ID N°: 4] Una secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 3.
- [SEC ID N°: 5] Secuencia de ADNc de CiFT de *Citrus unshiu* (N° de Referencia AB027456).
- [SEC ID N°: 6] Una secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 5.
- [SEC ID N°: 7] Secuencia de ADNc de CiFT2 de *Citrus unshiu* (N° de Referencia AB301934).
- [SEC ID N°: 8] Una secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 7.
- [SEC ID N°: 9] Cebador
- [SEC ID N°: 10] Cebador
- [SEC ID N°: 11] Cebador
- [SEC ID N°: 12] Cebador
- [SEC ID N°: 13] Cebador
- [SEC ID N°: 14] Cebador
- [SEC ID N°: 15] Cebador

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Saga

<120> Inductor de floración

<130> PCT10-0049

<150> JP 2009-260847

<151> 16-11-2009

ES 2 534 359 T3

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.4

5

<210> 1

<211> 531

<212> ADN

<213> *Citrus unshiu*

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(531)

15

<400> 1

```

atg tct agc agg gag aga gac cct ctt att gtt ggc cgc gtt gtt ggt      48
Met Ser Ser Arg Glu Arg Asp Pro Leu Ile Val Gly Arg Val Val Gly
1                               5                               10          15

gat gtt ctt gac aat ttt aca aga aca att cca atg agg att acc tat      96
Asp Val Leu Asp Asn Phe Thr Arg Thr Ile Pro Met Arg Ile Thr Tyr
                20                               25                               30

tca aac aag gat gtt aat aat ggc cgt gag ctc aaa cct tct gaa gtt      144
Ser Asn Lys Asp Val Asn Asn Gly Arg Glu Leu Lys Pro Ser Glu Val
                35                               40                               45

ctg aac cag cct agg gtt gaa att ggt ggt gat gat ctt agg aca ttt      192
Leu Asn Gln Pro Arg Val Glu Ile Gly Gly Asp Asp Leu Arg Thr Phe
                50                               55                               60

tat act ttg gta atg gtt gat cct gat gca cca agc cca agt gac ccc      240
Tyr Thr Leu Val Met Val Asp Pro Asp Ala Pro Ser Pro Ser Asp Pro
65                               70                               75                               80

agc ctt agg gag tat ttg cat tgg ttg gtg act gat att oca gca acc      288
Ser Leu Arg Glu Tyr Leu His Trp Leu Val Thr Asp Ile Pro Ala Thr
                85                               90                               95

aca ggg gcc agc ttt ggc caa gag att gtg aac tat gaa agc cct agt      336
Thr Gly Ala Ser Phe Gly Gln Glu Ile Val Asn Tyr Glu Ser Pro Ser
                100                              105                              110

cca acg atg ggg att cac agg ttt gtc ttt gtg ttg ttc cgg caa ctt      384
Pro Thr Met Gly Ile His Arg Phe Val Phe Val Leu Phe Arg Gln Leu
                115                              120                              125

ggg agg cag act gtt tat gca cca ggg tgg cgt cag aac ttc agc acg      432
Gly Arg Gln Thr Val Tyr Ala Pro Gly Trp Arg Gln Asn Phe Ser Thr
                130                              135                              140

agg gat ttt gct gag ctt tac aat ctg gga cct ccg gtg gcc gct gtc      480
Arg Asp Phe Ala Glu Leu Tyr Asn Leu Gly Pro Pro Val Ala Ala Val
145                               150                               155                               160

tac ttc aac tgc cag agg gag agc gga tcc ggc gga agg cct gtc aga      528
Tyr Phe Asn Cys Gln Arg Glu Ser Gly Ser Gly Gly Arg Pro Val Arg
                165                               170                               175

cga
Arg
                                                    531

```

<210> 2

<211> 177

20

ES 2 534 359 T3

<212> PRT
 <213> *Citrus unshiu*

<400> 2

5

```

Met Ser Ser Arg Glu Arg Asp Pro Leu Ile Val Gly Arg Val Val Gly
1           5           10           15

Asp Val Leu Asp Asn Phe Thr Arg Thr Ile Pro Met Arg Ile Thr Tyr
20           25           30

Ser Asn Lys Asp Val Asn Asn Gly Arg Glu Leu Lys Pro Ser Glu Val
35           40           45

Leu Asn Gln Pro Arg Val Glu Ile Gly Gly Asp Asp Leu Arg Thr Phe
50           55           60

Tyr Thr Leu Val Met Val Asp Pro Asp Ala Pro Ser Pro Ser Asp Pro
65           70           75           80

Ser Leu Arg Glu Tyr Leu His Trp Leu Val Thr Asp Ile Pro Ala Thr
85           90           95

Thr Gly Ala Ser Phe Gly Gln Glu Ile Val Asn Tyr Glu Ser Pro Ser
100          105          110

Pro Thr Met Gly Ile His Arg Phe Val Phe Val Leu Phe Arg Gln Leu
115          120          125

Gly Arg Gln Thr Val Tyr Ala Pro Gly Trp Arg Gln Asn Phe Ser Thr
130          135          140

Arg Asp Phe Ala Glu Leu Tyr Asn Leu Gly Pro Pro Val Ala Ala Val
145          150          155          160

Tyr Phe Asn Cys Gln Arg Glu Ser Gly Ser Gly Gly Arg Pro Val Arg
165          170          175
    
```

Arg

<210> 3
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> ADN sintético

15

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(660)

<400> 3

```

atg tct agc agg gag aga gac cct ctt att gtt ggc cgc gtt gtt ggt      48
Met Ser Ser Arg Glu Arg Asp Pro Leu Ile Val Gly Arg Val Val Gly
1          5          10          15

gat gtt ctt gac aat ttt aca aga aca att cca atg agg att acc tat      96
Asp Val Leu Asp Asn Phe Thr Arg Thr Ile Pro Met Arg Ile Thr Tyr
          20          25          30

tca aac aag gat gtt aat aat ggc cgt gag ctc aaa cct tct gaa gtt      144
Ser Asn Lys Asp Val Asn Asn Gly Arg Glu Leu Lys Pro Ser Glu Val
          35          40          45

ctg aac cag cct agg gtt gaa att ggt ggt gat gat ctt agg aca ttt      192
Leu Asn Gln Pro Arg Val Glu Ile Gly Gly Asp Asp Leu Arg Thr Phe
          50          55          60

tat act ttg gta atg gtt gat cct gat gca cca agc cca agt gac ccc      240
Tyr Thr Leu Val Met Val Asp Pro Asp Ala Pro Ser Pro Ser Asp Pro
65          70          75          80

agc ctt agg gag tat ttg cat tgg ttg gtg act gat att cca gca acc      288
Ser Leu Arg Glu Tyr Leu His Trp Leu Val Thr Asp Ile Pro Ala Thr
          85          90          95

aca ggg gcc agc ttt ggc caa gag att gtg aac tat gaa agc cct agt      336
Thr Gly Ala Ser Phe Gly Gln Glu Ile Val Asn Tyr Glu Ser Pro Ser
          100          105          110

cca acg atg ggg att cac agg ttt gtc ttt gtg ttg ttc cgg caa ctt      384
Pro Thr Met Gly Ile His Arg Phe Val Phe Val Leu Phe Arg Gln Leu
          115          120          125

ggg agg cag act gtt tat gca cca ggg tgg cgt cag aac ttc agc acg      432
Gly Arg Gln Thr Val Tyr Ala Pro Gly Trp Arg Gln Asn Phe Ser Thr
          130          135          140

agg gat ttt gct gag ctt tac aat ctg gga cct ccg gtg gcc gct gtc      480
Arg Asp Phe Ala Glu Leu Tyr Asn Leu Gly Pro Pro Val Ala Ala Val
145          150          155          160

tac ttc aac tgc cag agg gag agc gga tcc ggc gga agg cct gtc aga      528
Tyr Phe Asn Cys Gln Arg Glu Ser Gly Ser Gly Gly Arg Pro Val Arg
          165          170          175

cga agc agc ggc ctg gtg ccg cgc ggc agc cat atg gct agc atg act      576
Arg Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr
          180          185          190

ggt gga cag caa atg ggt cgg gat ccg aat tcg agc tcc gtc gac aag      624
Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Pro Asn Ser Ser Ser Val Asp Lys
          195          200          205

ctt gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac      660
Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
          210          215          220

```

5

<210> 4
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 534 359 T3

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 4

5

```

Met Ser Ser Arg Glu Arg Asp Pro Leu Ile Val Gly Arg Val Val Gly
1          5          10          15

Asp Val Leu Asp Asn Phe Thr Arg Thr Ile Pro Met Arg Ile Thr Tyr
20          25          30

Ser Asn Lys Asp Val Asn Asn Gly Arg Glu Leu Lys Pro Ser Glu Val
35          40          45

Leu Asn Gln Pro Arg Val Glu Ile Gly Gly Asp Asp Leu Arg Thr Phe
50          55          60

Tyr Thr Leu Val Met Val Asp Pro Asp Ala Pro Ser Pro Ser Asp Pro
65          70          75          80

Ser Leu Arg Glu Tyr Leu His Trp Leu Val Thr Asp Ile Pro Ala Thr
85          90          95

Thr Gly Ala Ser Phe Gly Gln Glu Ile Val Asn Tyr Glu Ser Pro Ser
100         105         110

Pro Thr Met Gly Ile His Arg Phe Val Phe Val Leu Phe Arg Gln Leu
115         120         125

Gly Arg Gln Thr Val Tyr Ala Pro Gly Trp Arg Gln Asn Phe Ser Thr
130         135         140

Arg Asp Phe Ala Glu Leu Tyr Asn Leu Gly Pro Pro Val Ala Ala Val
145         150         155         160

Tyr Phe Asn Cys Gln Arg Glu Ser Gly Ser Gly Gly Arg Pro Val Arg
165         170         175

Arg Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr
180         185         190

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Pro Asn Ser Ser Ser Val Asp Lys
195         200         205

Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
210         215         220

```

<210> 5
 <211> 745
 <212> ADN
 <213> *Citrus unshiu*
 5
 <220>
 <221> CDS
 <222> (96).. (629)
 10 <400> 5

```

ggcacgagga atagtcttac tacttttgta ggctgtgtgt gtatttgttt gtgcttagtg      60
ttgttgagtg tttgtttggtg ttttagtggtg ttgat atg tct agc agg gag aga      113
                               Met Ser Ser Arg Glu Arg
                               1                               5

gat cct ctt att gtt ggc cgc gtt gtt ggt gat gtt ctt gac aat ttt      161
Asp Pro Leu Ile Val Gly Arg Val Val Gly Asp Val Leu Asp Asn Phe
                               10                               15                               20

aca aga aca att cca atg agg att acc tat tca aac aag gat gtt aat      209
Thr Arg Thr Ile Pro Met Arg Ile Thr Tyr Ser Asn Lys Asp Val Asn
                               25                               30                               35

aat ggc cgt gag ctc aaa cct tct gaa gtt ctg aac cag cct agg gct      257
Asn Gly Arg Glu Leu Lys Pro Ser Glu Val Leu Asn Gln Pro Arg Ala
                               40                               45                               50

gaa att ggt ggt gat gat ctt agg aca ttt tat act ttg gta atg gtt      305
Glu Ile Gly Gly Asp Asp Leu Arg Thr Phe Tyr Thr Leu Val Met Val
                               55                               60                               65                               70

gat cct gat gca cca agc cca agt gac ccc agc ctt agg gag tat ttg      353
Asp Pro Asp Ala Pro Ser Pro Ser Asp Pro Ser Leu Arg Glu Tyr Leu
                               75                               80                               85

cat tgg ttg gtg act gat att cca gca acc aca ggg gcc agc ttt ggc      401
His Trp Leu Val Thr Asp Ile Pro Ala Thr Thr Gly Ala Ser Phe Gly
                               90                               95                               100

caa gag att gtg aac tat gaa agc oct agg cca acg atg ggg att cac      449
Gln Glu Ile Val Asn Tyr Glu Ser Pro Arg Pro Thr Met Gly Ile His
                               105                               110                               115

agg ttt gtc ttt gtg ttg ttc cgg caa ctt ggg agg cag act gtt tat      497
Arg Phe Val Phe Val Leu Phe Arg Gln Leu Gly Arg Gln Thr Val Tyr
                               120                               125                               130

gca cca ggg tgg cgt cag aac ttc agc acg agg gat ttt gct gag ctt      545
Ala Pro Gly Trp Arg Gln Asn Phe Ser Thr Arg Asp Phe Ala Glu Leu
                               135                               140                               145                               150

tac aat ctg gga oct ccg gtg gcc gct gtc tac ttc aac tgc cag agg      593
Tyr Asn Leu Gly Pro Pro Val Ala Ala Val Tyr Phe Asn Cys Gln Arg
                               155                               160                               165

gag agc gga tcc ggc gga agg cct gtc aga cga tga tccatacatg      639
    
```


ES 2 534 359 T3

Glu Ser Gly Ser Gly Gly Arg Pro Val Arg Arg
 170 175

cttaatttga tatcaaatta cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 699

cacacacaca cactattttat atatatatat atatatatat atatat 745

<210> 6
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> *Citrus unshiu*

5

<400> 6

Met Ser Ser Arg Glu Arg Asp Pro Leu Ile Val Gly Arg Val Val Gly
 1 5 10 15

Asp Val Leu Asp Asn Phe Thr Arg Thr Ile Pro Met Arg Ile Thr Tyr
 20 25 30

Ser Asn Lys Asp Val Asn Asn Gly Arg Glu Leu Lys Pro Ser Glu Val
 35 40 45

Leu Asn Gln Pro Arg Ala Glu Ile Gly Gly Asp Asp Leu Arg Thr Phe
 50 55 60

Tyr Thr Leu Val Met Val Asp Pro Asp Ala Pro Ser Pro Ser Asp Pro
 65 70 75 80

Ser Leu Arg Glu Tyr Leu His Trp Leu Val Thr Asp Ile Pro Ala Thr
 85 90 95

Thr Gly Ala Ser Phe Gly Gln Glu Ile Val Asn Tyr Glu Ser Pro Arg
 100 105 110

Pro Thr Met Gly Ile His Arg Phe Val Phe Val Leu Phe Arg Gln Leu
 115 120 125

Gly Arg Gln Thr Val Tyr Ala Pro Gly Trp Arg Gln Asn Phe Ser Thr
 130 135 140

Arg Asp Phe Ala Glu Leu Tyr Asn Leu Gly Pro Pro Val Ala Ala Val
 145 150 155 160

Tyr Phe Asn Cys Gln Arg Glu Ser Gly Ser Gly Gly Arg Pro Val Arg
 165 170 175

Arg

10

ES 2 534 359 T3

<210> 7
<211> 946
<212> ADN
<213> *Citrus unshiu*

5

<220>
<221> CDS
<222> (117)..(650)

10 <400> 7

ES 2 534 359 T3

tccaacctac caacaaaatt tcatcacttg aatagttctta ctacttttgt aggttgttg	60
tgtatattgtt tgtgcttagt gttggtgagt gtttgtttgt gtttagtggt gttgat atg	119
	Met 1
tct agc agg gag aga gac cct ctt att gtt ggc cgc gtt gtt ggt gat	167
Ser Ser Arg Glu Arg Asp Pro Leu Ile Val Gly Arg Val Val Gly Asp	
	5 10 15
gtt ctt gac aat ttt aca aga aca att cca atg agg att acc tat tca	215
Val Leu Asp Asn Phe Thr Arg Thr Ile Pro Met Arg Ile Thr Tyr Ser	
	20 25 30
aac aag gat gtt aat aat ggc cgt gag ctc aaa cct tct gaa gtt ctg	263
Asn Lys Asp Val Asn Asn Gly Arg Glu Leu Lys Pro Ser Glu Val Leu	
	35 40 45
aac cag cct agg gtt gaa att ggt ggt gat gat ctt agg aca ttt tat	311
Asn Gln Pro Arg Val Glu Ile Gly Gly Asp Asp Leu Arg Thr Phe Tyr	
	50 55 60 65
act ttg gta atg gtt gat cct gat gca cca agc cca agt gac ccc agc	359
Thr Leu Val Met Val Asp Pro Asp Ala Pro Ser Pro Ser Asp Pro Ser	
	70 75 80
ctt agg gag tat ttg cat tgg ttg gtg act gat att cca gca acc aca	407
Leu Arg Glu Tyr Leu His Trp Leu Val Thr Asp Ile Pro Ala Thr Thr	
	85 90 95
ggg gcc agc ttt ggc caa gag att gtg aac tat gaa agc cct agt cca	455
Gly Ala Ser Phe Gly Gln Glu Ile Val Asn Tyr Glu Ser Pro Ser Pro	
	100 105 110
acg atg ggg att cac agg ttt gtc ttt gtg ttg ttc cgg caa ctt ggg	503
Thr Met Gly Ile His Arg Phe Val Phe Val Leu Phe Arg Gln Leu Gly	
	115 120 125
agg cag act gtt tat gca cca ggg tgg cgt cag aac ttc agc acg agg	551
Arg Gln Thr Val Tyr Ala Pro Gly Trp Arg Gln Asn Phe Ser Thr Arg	
	130 135 140 145
gat ttt gct gag ctt tac aat ctg gga cct cgg gtg gcc gct gtc tac	599
Asp Phe Ala Glu Leu Tyr Asn Leu Gly Pro Pro Val Ala Ala Val Tyr	
	150 155 160
ttc aac tgc cag agg gag agc gga tcc ggc gga agg cct gtc aga cga	647
Phe Asn Cys Gln Arg Glu Ser Gly Ser Gly Gly Arg Pro Val Arg Arg	
	165 170 175
tga tccatacatg ctttaattga tatcaaatta cacacaaaca cacacacaca	700
cacacactat atatatatat atccaaaatt aagagctagc tagtggttaac ataattatgt	760
catggttaat cttcctctct ggctttotca cattttattg taacgtactc tgaagatgaa	820
gttaaatact tcaaacagtg agaaaggaag attggtgtac tgtgtataca attaattaga	880
ttgtaataaaa aagagatgga attttttttt taaaaagcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	940
aaaaaa	946

<210> 8
<211> 177

ES 2 534 359 T3

<212> PRT
 <213> *Citrus unshiu*

<400> 8

5

```

Met Ser Ser Arg Glu Arg Asp Pro Leu Ile Val Gly Arg Val Val Gly
 1          5          10          15

Asp Val Leu Asp Asn Phe Thr Arg Thr Ile Pro Met Arg Ile Thr Tyr
 20          25          30

Ser Asn Lys Asp Val Asn Asn Gly Arg Glu Leu Lys Pro Ser Glu Val
 35          40          45

Leu Asn Gln Pro Arg Val Glu Ile Gly Gly Asp Asp Leu Arg Thr Phe
 50          55          60

Tyr Thr Leu Val Met Val Asp Pro Asp Ala Pro Ser Pro Ser Asp Pro
 65          70          75          80

Ser Leu Arg Glu Tyr Leu His Trp Leu Val Thr Asp Ile Pro Ala Thr
 85          90          95

Thr Gly Ala Ser Phe Gly Gln Glu Ile Val Asn Tyr Glu Ser Pro Ser
 100          105          110

Pro Thr Met Gly Ile His Arg Phe Val Phe Val Leu Phe Arg Gln Leu
 115          120          125

Gly Arg Gln Thr Val Tyr Ala Pro Gly Trp Arg Gln Asn Phe Ser Thr
 130          135          140

Arg Asp Phe Ala Glu Leu Tyr Asn Leu Gly Pro Pro Val Ala Ala Val
 145          150          155          160

Tyr Phe Asn Cys Gln Arg Glu Ser Gly Ser Gly Gly Arg Pro Val Arg
 165          170          175
    
```

Arg

<210> 9
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> ADN sintético

15

<400> 9
 caaattaagc atgtatgg 18

<210> 10
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> ADN sintético
 <400> 10
 10 caaattaagc atgtatgg 18
 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN sintético
 20 <400> 11
 gtgcttagtg ttgtgag 18
 <210> 12
 <211> 32
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN sintético
 30 <400> 12
 aggagatata ccatgtctag caggagaga ga 32
 <210> 13
 <211> 35
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN sintético
 40 <400> 13
 caccaggccg ctgctcgtc tgacaggcct tccgc 35
 45 <210> 14
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> ADN sintético
 <400> 14
 55 aatttgttt aacttaaga aggagatata ccatg 35
 <210> 15
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> ADN sintético
 <400> 15
 65 gccataggc tgccgcgcg caccaggccg ctgct 35

REIVINDICACIONES

1. Un método para inducir la floración que comprende la etapa de inyectar en un cuerpo vegetal

5 (i) una cualquiera de las proteínas (A)-(C) a continuación:

(A) una proteína purificada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2;

10 (B) una proteína purificada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2 y que tiene una actividad inductora de la floración; y

(C) una proteína purificada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 60 % o más con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2 y que tiene una actividad inductora de floración; o

15 (ii) una proteína purificada codificada por un gen que comprende uno cualquiera de los ADN (a)-(c) a continuación:

(a) ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1;

20 (b) ADN que hibrida con ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1 en condiciones rigurosas y codifica una proteína que tiene una actividad inductora de floración; y

(c) ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad del 60 % o más con la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 1 y que codifica una proteína que tiene una actividad inductora de floración.

25 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha proteína purificada (C) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene dicha identidad de secuencia del 95 % o más.

30 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha proteína purificada (ii) está codificada por un gen que comprende dicho ADN (c) que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene dicha identidad de secuencia del 95 % o más.

35 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la proteína inyectada en el cuerpo vegetal es la proteína purificada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 4.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la proteína inyectada en el cuerpo vegetal es la proteína purificada codificada por un gen que comprende ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 3.

40 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la planta es un árbol frutal.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde el árbol frutal es un cítrico.

45 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde el cítrico es *Citrus unshiu*.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la planta es una planta obtenida por injerto de un vástago en el estadio maduro en un portainjerto.

50 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la planta tratada con la proteína se sitúa junto a una planta a la que se dirige inducción de floración que no se ha tratado con la proteína.

11. Uso de una proteína purificada como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para inducir la floración de una planta inyectando dicha proteína purificada en el cuerpo vegetal.

55 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, donde la planta es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.

13. El uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, donde la planta es una planta obtenida por injerto de un vástago en el estadio maduro en un portainjerto.

60 14. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde la planta tratada con la proteína se sitúa junto a una planta a la que se dirige la inducción de floración que no se ha tratado con la proteína.

Fig. 1

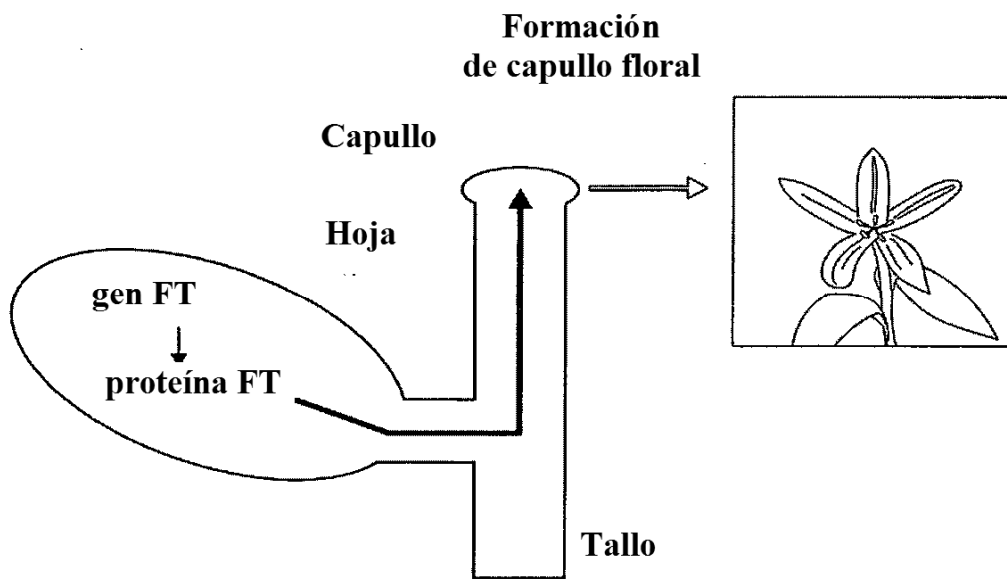


Fig. 2

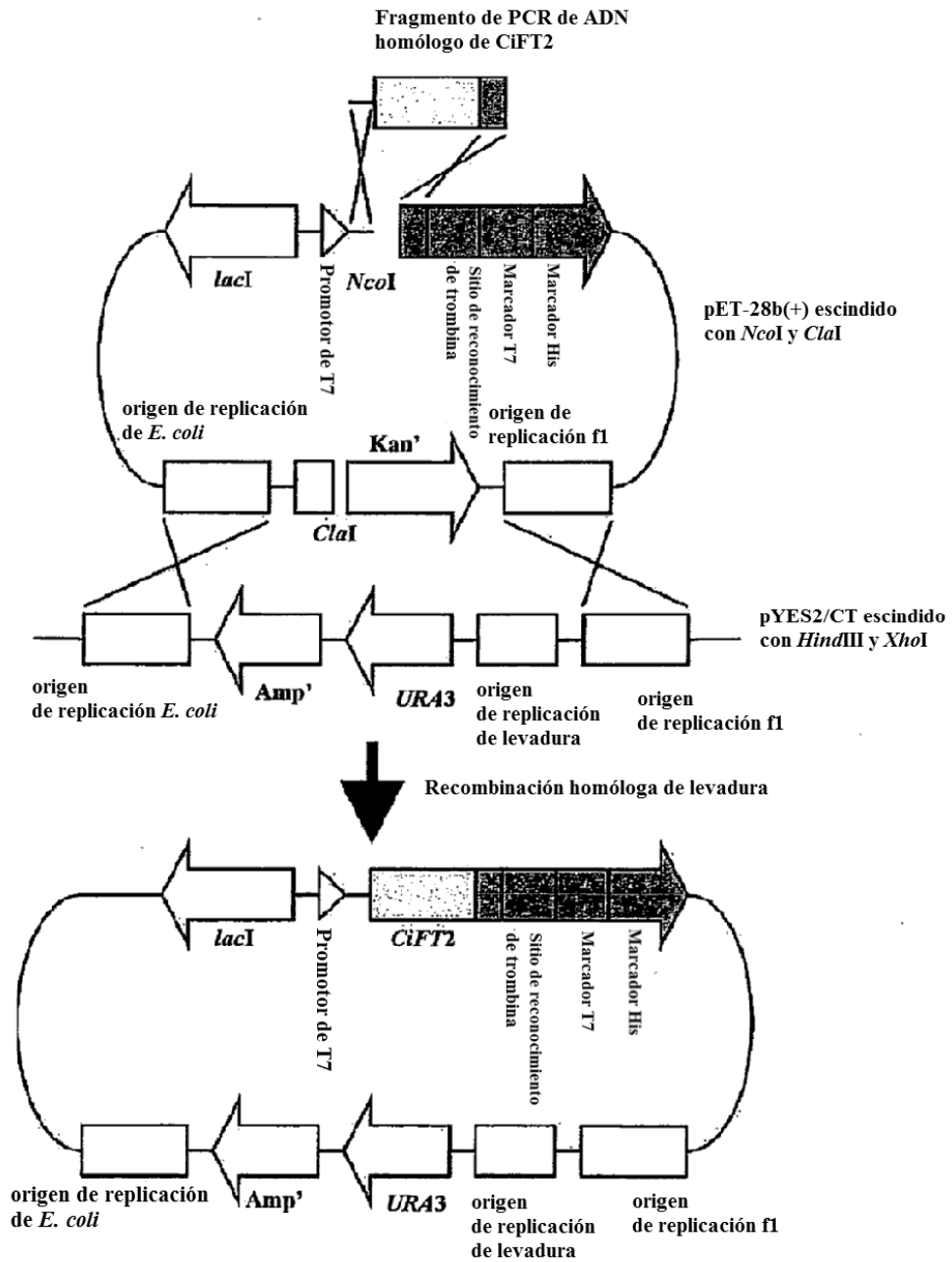


Fig. 3

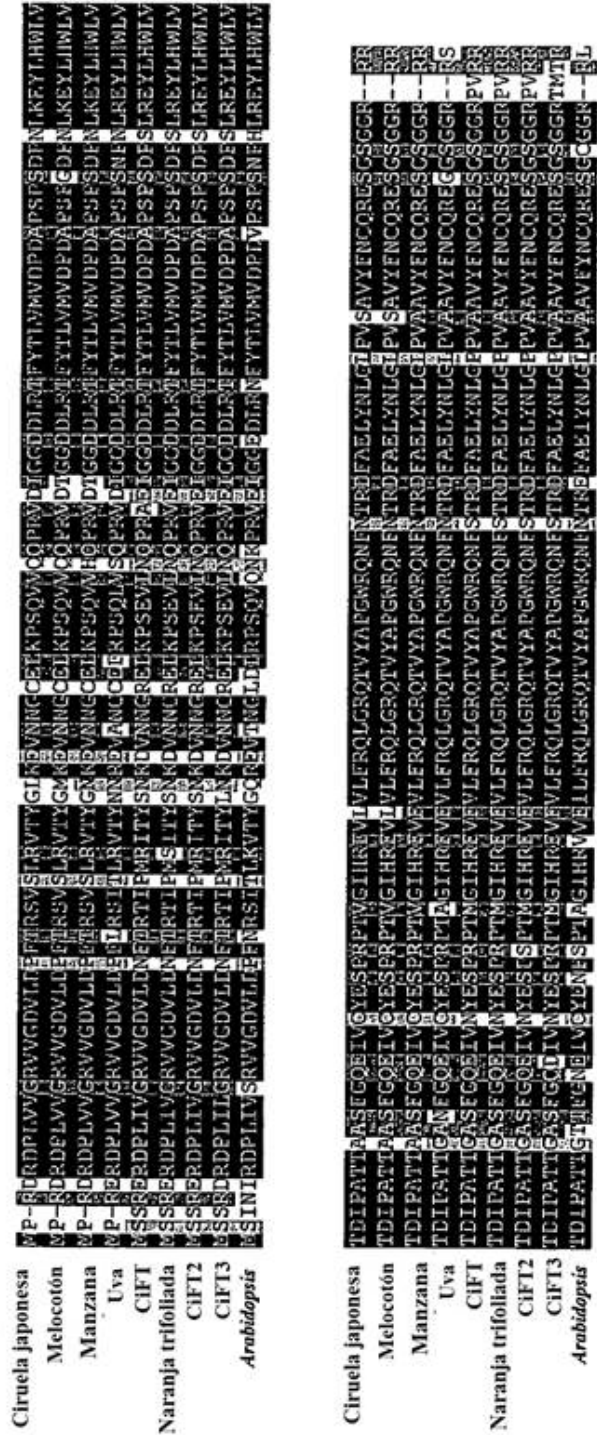


Fig. 4

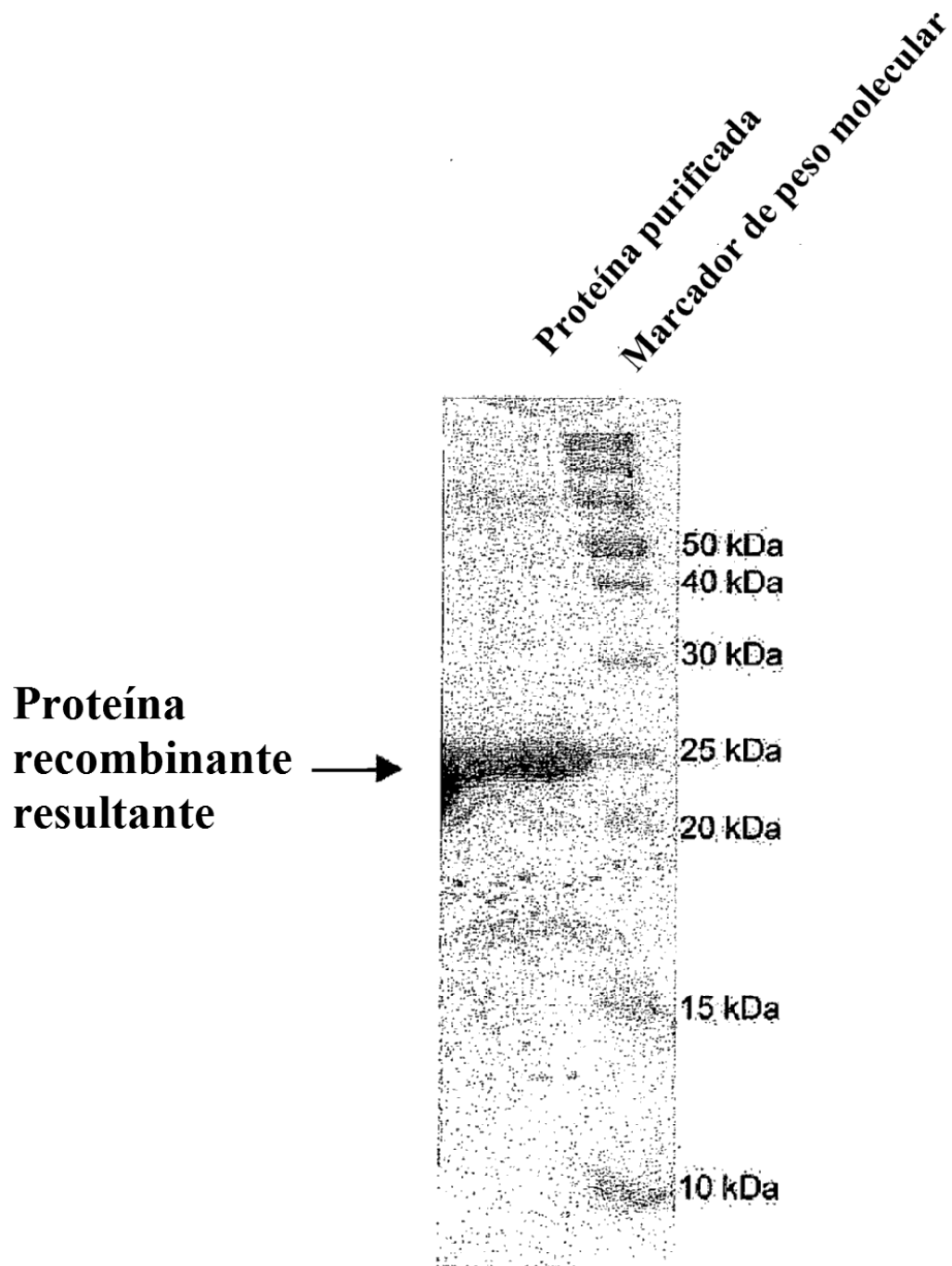


Fig. 5



Fig. 6



Fig. 7

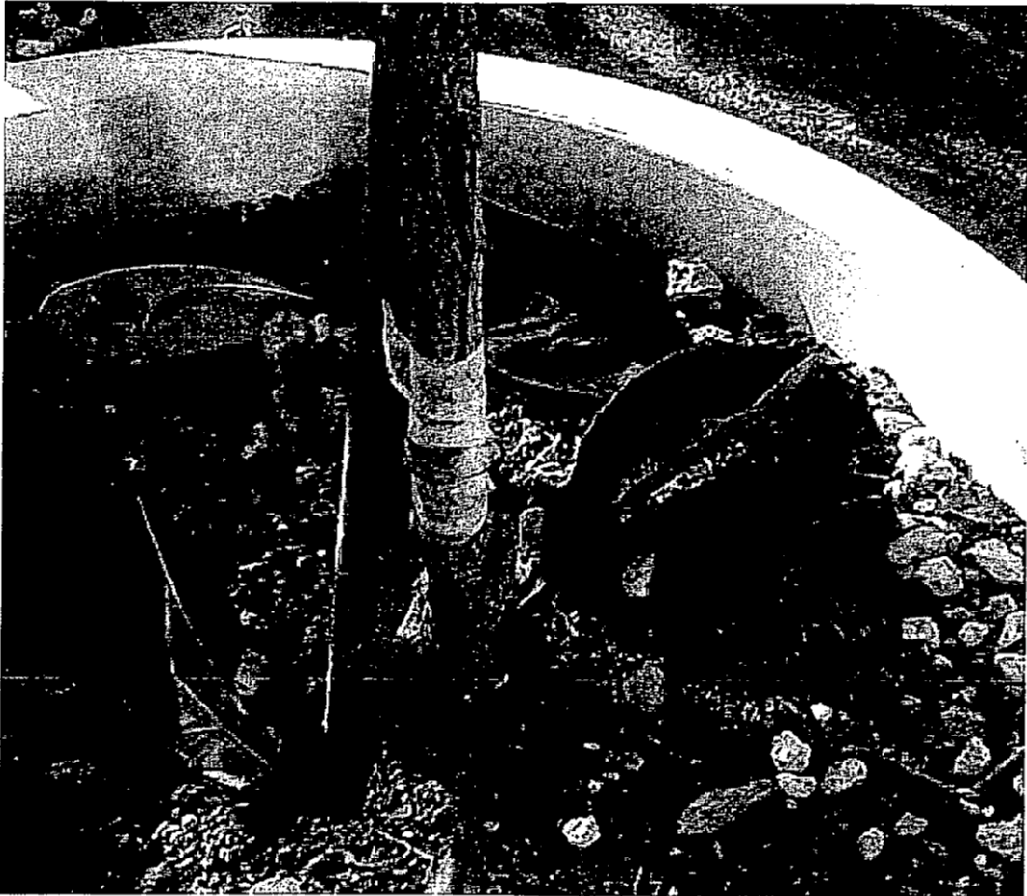


Fig. 8



Fig. 9



Fig. 10



Fig. 11



Fig. 12

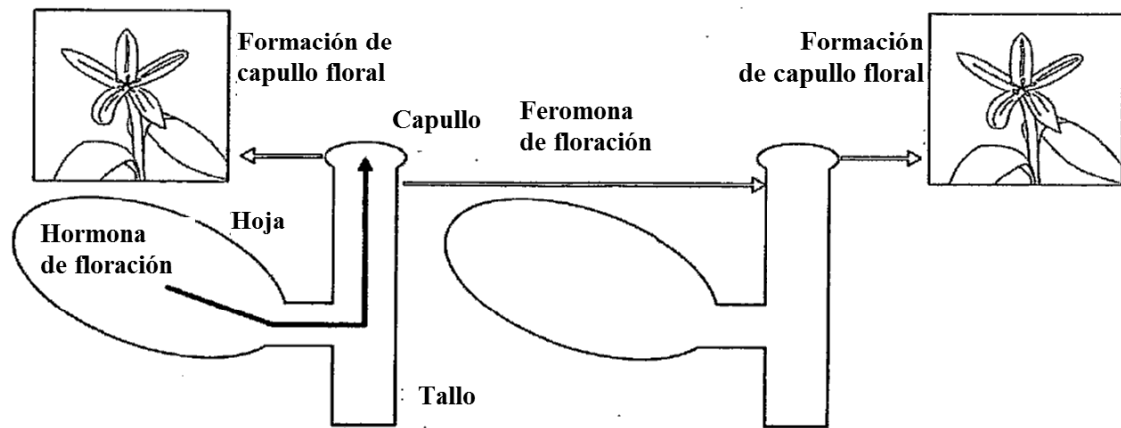


Fig. 13

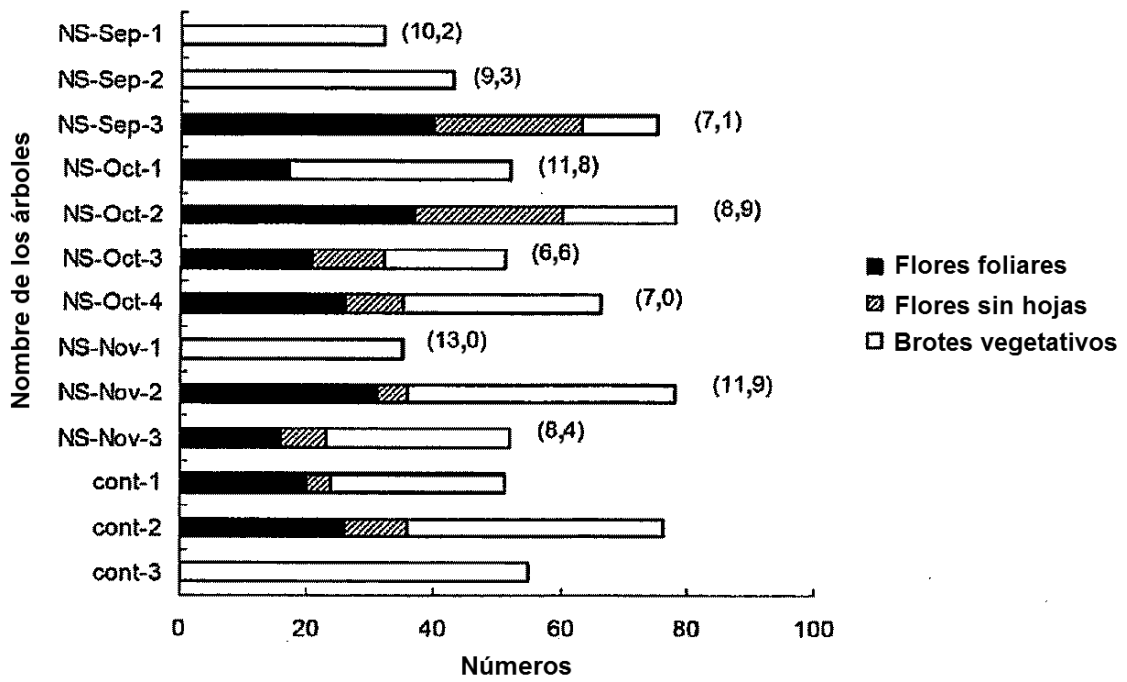


Fig. 14

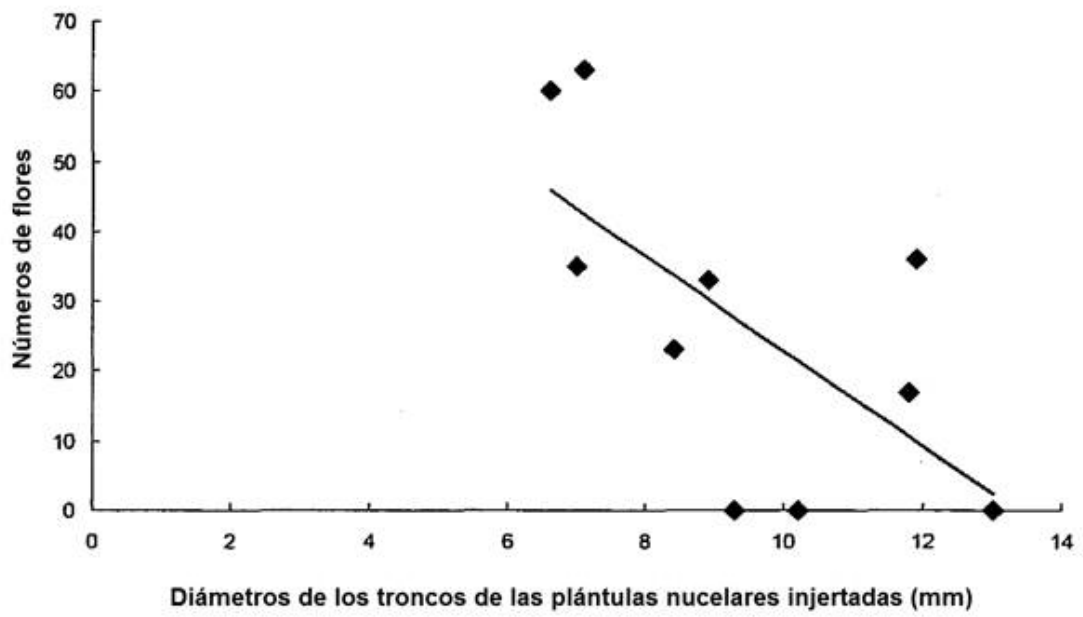


Fig. 15

