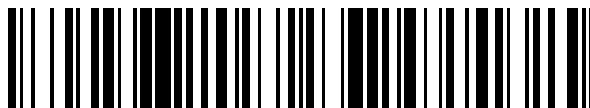


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 693**

21 Número de solicitud: 201431459

51 Int. Cl.:

C12N 15/00

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

02.10.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.05.2016

Fecha de la concesión:

06.02.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

13.02.2017

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070722

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
(50.0%)**

**Ctro. Apoyo a la Innovación, la Investigación y la
Transferencia de Tecnología CTT, Edf. 6G,
Camino de Vera, s/n
46022 Valencia (Valencia) ES y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ABBAS, Mohamad;
ALABADÍ DIEGO, David y
BLAZQUEZ RODRÍGUEZ, Miguel Ángel**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MÉTODO PARA INCREMENTAR LA FERTILIDAD DE LAS PLANTAS**

57 Resumen:

Método para incrementar la fertilidad de las plantas.
La presente invención se relaciona con un método para incrementar la fertilidad de una planta que comprende inhibir, disminuir o bloquear la expresión del gen que codifica la proteína IAMT1 con respecto a un control o la actividad de la proteína IAMT1, y la planta derivada de la aplicación de dicho método, así como el uso de gen que codifica la proteína IAMT1 para incrementar de fertilidad de la planta.

ES 2 568 693 B1

Método para incrementar la fertilidad de las plantas

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a un método para incrementar la fertilidad de las plantas y a las plantas obtenidas mediante dicho método. Por lo tanto, la presente invención pertenece al campo de la agricultura.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10

El calentamiento global tiene un impacto negativo sobre la agricultura, por ejemplo contrarrestando los efectos positivos que el aumento de CO₂ podría tener sobre la fisiología de las plantas. Por ejemplo, la producción de granos de arroz desciende un 10% por cada 1°C que aumenta la temperatura nocturna, y se estima que cada
15 aumento de 1°C por encima de los 15°C reduce la producción de trigo en un 3-4%, mientras que cada día que el maíz pasa por encima de 30°C reduce el rendimiento un 1%. Uno de los problemas más graves que provocan las altas temperaturas sobre los cultivos es el descenso de la fertilidad del polen, documentado ya en varias especies como el tomate, el algodón, la cebada o el arroz. El efecto dañino sobre el polen
20 parece deberse a la combinación de una menor dehiscencia de las anteras, menor producción de granos de polen, esterilidad del polen, y reducida germinación del polen *in vivo*. Por este motivo, la investigación de tratamientos o variedades que permitan a las plantas seguir siendo fértiles en altas temperaturas es muy activa.

25

Varios compuestos han sido probados con éxito en el laboratorio para mejorar la fertilidad del polen, como el etileno, los brasinosteroides o las auxinas, mientras que la obtención de nuevas variedades se realiza tanto con abordajes de mejora tradicional como mediante aplicaciones biotecnológicas basadas en la genética molecular.

30

La solicitud de patente EP2394513A1 describe un método para restaurar la esterilidad masculina en plantas gramíneas que comprende la administración de auxinas a las plantas.

35

La solicitud de patente EP2054516B1 describe plantas modificadas genéticamente que presentan características fenotípicas mejoradas, como un incremento en la producción de semillas y la tolerancia al estrés abiótico. Este documento describe

plantas que tienen una expresión modulada de un ácido nucleico que codifica un polipéptido PRC (Proteínas Relacionada con el Crecimiento) y el procedimiento para obtener dichas plantas.

5 La patente ES2334539B1 describe el uso del gen que codifica la enzima PPAT (fosfopanteteína adeniltransferasa) para la obtención de plantas transgénicas que presentan una mayor crecimiento vegetativo y reproductivo, mayor producción de semillas, disminución del tiempo de floración, mayor resistencia al estrés osmótico y salino, aumento del contenido de ácidos grasos en semillas y composición
10 aminoacídica modificada.

Liao, P. y col. 2014 (PLoS One, 9(5):e98264) describen un mutante de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintetasa (HMGS), la segunda enzima de la vía del mevalonato (MVA), que mejora el rendimiento en la producción de semillas cuando se
15 sobreexpresa en una planta.

No obstante, todavía existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar plantas cuya fertilidad esté incrementada o no se vea mermada en condiciones de
20 estrés.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han descubierto que la inhibición o el bloqueo de la metilación del ácido indol acético (AIA) en las plantas provoca un mayor
25 crecimiento de los tubos polínicos en comparación con plantas en las que dicha metilación no está inhibida o bloqueada. Como consecuencia de este crecimiento, la fertilidad de las plantas se ve incrementada, llegando incluso a ser restaurada en aquellas plantas en las que debido a condiciones de estrés, como las altas temperaturas o la escasez de agua, su fertilidad se ve mermada. Los inventores
30 llegaron a esta conclusión tras truncar en *Arabidopsis thaliana* el gen que codifica la proteína ácido indolacético-carboximetiltransferasa 1 (IAMT1), enzima encargada de metilar el AIA para dar lugar al AIA-metilado (Me-AIA), y observar que la pérdida de la función de esta enzima origina acelera el crecimiento de los tubos polínicos en comparación con plantas control (ver Ejemplo 1 y Figuras 5 y 6). Por lo tanto, se
35 puede concluir que la inhibición de la metilación del AIA da lugar a un incremento en la

fertilidad de las plantas, lo que se traduce en un mayor rendimiento de los cultivos al obtener plantas que generan más semillas y con ello, más frutos.

Así, en el contexto de la presente invención, se contempla una planta que comprende la ruta de metilación del AIA bloqueada o inhibida. Como entiende el experto en la materia, el bloqueo o la inhibición de una ruta metabólica puede llevarse a cabo a diferentes niveles: puede inhibirse o bloquearse la expresión del gen que codifica la enzima IAMT1, por ejemplo, mediante el empleo de moléculas que impidan la unión de la ANR polimerasa, mutando el promotor para que no sea reconocido por los factores de transcripción, empleando inhibidores de la transcripción como ARNs de interferencia, mutando la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína para que se exprese una enzima no funcional, etc., puede inhibirse o bloquearse la propia enzima IAMT1 mediante el empleo de compuestos agentes inhibidores que se unan a la enzima e impidan que realice su función (también denominados agentes inhibidores), etc. Independientemente del procedimiento empleado, la consecuencia es que no se produce la metilación del AIA y con ello, se incrementa la fertilidad de la plantas.

A la vista de este descubrimiento, se han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán descritos en detalle a continuación.

Planta de la invención

En vista de lo anteriormente expuesto, en un aspecto la presente invención se relaciona con una planta, de aquí en adelante “planta de la invención”, que comprende el gen que codifica la proteína IAMT1, caracterizada porque dicha proteína IAMT1:

- (i) está ausente o en unos niveles no detectables por técnicas conocidas, o
- (ii) no es funcional, es decir, no es capaz de metilar el AIA, o
- (iii) se presenta en la planta en unos niveles inferiores con respecto a la planta control, siendo dicha diferencia estadísticamente significativa, de forma que se observa el fenotipo descrito en la planta de la presente invención, y
- (iv) dicha la planta no pertenece a la especie *Arabidopsis thaliana*.

Particularmente, la planta de la invención se caracteriza porque la

- (i) la expresión de dicho gen está disminuida, bloqueada o inhibida con respecto a un control, o da lugar a una proteína no funcional, y
- (ii) dicha la planta no pertenece a la especie *Arabidopsis thaliana*.

Excepto *A. thaliana*, cualquier planta puede ser objeto de la presente invención, tanto mono- como dicotiledónea. En la presente invención, dentro del término planta se incluyen plantas completas, antecesores y progenies de las plantas y partes de las plantas incluyendo semillas, brotes, tallos, hojas, raíces (incluyendo tubérculos), flores y tejidos y órganos, donde cada uno de los elementos mencionados comprende disminuida, bloqueada o inhibida la expresión del gen que codifica la proteína IAMT1, o una proteína IAMT1 no funcional.

Las plantas incluidas en la presente invención pertenecen a la superfamilia Viridiplantae, seleccionadas de la lista que comprende *Acer spp.*, *Actinidia spp.*, *Abelmoschus spp.*, *Agave sisalana*, *Agropyron spp.*, *Agrostis stolonifera*, *Allium spp.*, *Amaranthus spp.*, *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona spp.*, *Apium graveolens*, *Arachis spp.*, *Artocarpus spp.*, *Asparagus officinalis*, *Avena spp.* (e.g. *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa spp.*, *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsa*, *Beta vulgaris*, *Brassica spp.* (e.g. *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [*canola*, *oilseed rape*, *turnip rape*]), *Cadaba ferruginea*, *Camelia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum spp.*, *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya spp.*, *Carthamus tinctorius*, *Castanea spp.*, *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum spp.*, *Citrullus lanatus*, *Citrus spp.*, *Cocos spp.*, *Coffea spp.*, *Colocasia esculenta*, *Cola spp.*, *Corchorus spp.*, *Coriandrum sativum*, *Corylus spp.*, *Crataegus spp.*, *Crocus sativus*, *Cucurbita spp.*, *Cucumis spp.*, *Cynara spp.*, *Daucus carota*, *Desmodium spp.*, *Dioscorea longan*, *Dioscorea spp.*, *Diospyros spp.*, *Echinochloa spp.*, *Elaeis* (e.g. *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus spp.*, *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus spp.*, *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum spp.*, *Fagus spp.*, *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella spp.*, *Fragaria spp.*, *Ginkgo biloba*, *Glycine spp.* (e.g. *Glycine max*, *Soja hispida* or *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus spp.* (e.g. *Helianthus annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus spp.*, *Hordeum spp.* (e.g. *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans spp.*, *Lactuca sativa*, *Lathyrus spp.*, *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus spp.*, *Luffa acutangula*, *Lupinus spp.*, *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon spp.* (e.g. *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Macrotyloma spp.*, *Malus spp.*, *Malpighia emarginata*, *Manihot americana*, *Mangifera indica*, *Manihot spp.*, *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus spp.*, *Mentha spp.*, *Miscanthus sinensis*, *Momordica spp.*, *Morus nigra*, *Musa spp.*, *Nicotiana spp.*, *Olea spp.*, *Opuntia spp.*, *Ornithopus spp.*, *Oryza spp.* (e.g. *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum*

miliaceum, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus* spp., *Phleum* pratense, *Phoenix* spp., *Phragmites australis*, *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp. (e.g. *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium* or *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tagetes* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Tripsac[upsilon]m dactyloides*, *Triticosecale rimpau*, *Triticum* spp. (e.g. *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* or *Triticum vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp., entre otras.

Ejemplos de plantas objeto de la presente invención incluyen, sin limitarse, plantas de interés agronómico, tales como plantas de cereales (trigo, centeno, cebada, etc), árboles frutales, plantas forrajeras (por ejemplo, las leguminosas, berenjenas, pimientos, melones, sandías, pepinos, calabacines, judías, guisantes, habas, cebollas, col china, perejil, rabanito, etc.), y plantas ornamentales.

No obstante, en una realización particular, la planta de la presente invención pertenece al género *Solanum* sp., en particular es una tomatera. La tomatera de la presente invención puede seleccionarse, por ejemplo, de entre *Solanum lycopersicum*, *Solanum peruvianum*, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum lycopersicoides*, *Solanum sitiens*, *Solanum juglandifolium*, *Solanum ochranthum*, *Solanum cheesmaniae* o *Solanum galapagense*. Preferiblemente la tomatera es de la especie *Solanum lycopersicum*, o sus sinónimos *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon esculentum* Mill., *Lycopersicon esculentum* var. *esculentum*, *Solanum esculentum*, *Solanum esculentum* Dunal. Más preferiblemente, la variedad de tomatera puede ser seleccionada de la lista de Anna russian, Applause, Aussie, Baladre, Bella rosa, Black cherry, Black russian, Blondkopfchen, Brandywine, Carbon, Ceylan, Cherokee purple, Cherry, Cherry Redondo, Tomate Cherry Pera Amarillo, Comanche, Costoluto genovese, Ditmarcher, Eros, Gallician, Glacier, Gartenperle, Green sausage, Grushovka, Harzfeuer, Hugh, Japanesse black, Jersey devil, Kosovo, Krim black, Kumato, Liguria, Limachino, Lime green salad, Manitoba, Marvel stripe,

Money maker, Muchamiel, Estrella, Opalka, RAF, Black Pear, Piña Hawaiana, Rio grande, San marzano, Siberian, Sprite, Sugary, Sun sugar, Tigerella, White Queen, Raf Claudia, Roma, Valenciano, Pera de Girona, Montserrat, Corazón de Buey, Angela, Colgar en Rama, Ciruela Negro, Optima, Pata Negra, Copia, Velasco,
5 Montenegro, Vertyco, Ventero, Ramyle, Pitenza, Paladium, Mayoral, Razymo, Motto, Caniles, Byelsa, Royalty, Trujillo, Delizia, Dumas Duratom, Larguero, Torry, Tovistar, Pintón, Grueso, Larga Vida, Marenza o Window box Roma.

10 La planta de la presente invención se puede obtener mediante múltiples procesos, entre los cuales están las técnicas de mejora genética clásica de cruce y selección o los procedimientos microbiológicos como la obtención de cíbridos o la fusión de células somáticas.

15 La planta de la invención comprende el gen que codifica la proteína IAMT1. La proteína IAMT1 es la ácido indolacético-carboximetiltransferasa 1, enzima encargada de metilar el AIA para dar lugar al AIA-metilado (Me-AIA). En una realización particular, la proteína IAMT1 comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, una identidad de secuencia del 50% con la SEQ ID NO: 1. La secuencia SEQ ID NO: 1 corresponde la proteína IAMT1 procedente de *A. thaliana* cuyo número
20 de acceso al NCBI es NP_200336.1, versión es NP_200336.1 GI: 15240487.

25 Las secuencias con al menos un 50% de identidad con SEQ ID NO: 1 son secuencias homólogas de la proteína IAMT1. Las secuencias homólogas se refieren a secuencias de especies distintas con expresiones fenotípicas similares que proceden de una secuencia ancestral común. Dentro de la homología de secuencia se distinguen dos tipos de homología: la ortología y la paralogía. Las secuencias ortólogas pertenecen a especies que tienen un antepasado común. Las secuencias parálogas son aquellas que se encuentran en el mismo organismo y una procede de la duplicación de la otra.

30 SEQ ID NO: 1

mgskgdnvav cnmklerlls mkggkgqdsy annsqaqamh arsmhlhlee tlenvhlnss
aspppftavd lgcsggantv hiidfivkhi skrfdagid ppeftaffsd lpsndfntlf
qllpplvsnt cmeecclaadg nrsyfvgavp gsfyrrlfpa rtidffhsaf slhwlsqvpe
svtdrrsaay nrgrvfihga gektttaykr qfqadlaefl raraaevkrg gamflvclgr
35 tsvdptdggg agllfgthfq dawddlvreg lvaaekrdgf nipvyapslq dfkevvdang
sfaidklvvy kggspplvne pddasevgra fasscrsvag vlveahigee lsnklfsrve

sratshakdv lvnlqffhiv aslsft

En la presente invención se entiende por “identidad” o “identidad de secuencia” al grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos obtenido mediante el alineamiento de las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado de identidad expresado en tanto por ciento. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA. GAP utiliza el algoritmo Needleman y Wunsch (1970, J Mol Bio 48: 443-453) para encontrar el alineamiento de las dos secuencias que maximizan el número de emparejamientos y minimiza el número de espacios. El algoritmo BLAST [Altschul S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10] calcula el porcentaje de identidad de secuencias y desarrolla un análisis estadístico de similitud entre las dos secuencias. Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, and TBLASTX, BLASTP and TBLASTN, son de dominio público en la página web de The National Center for Biotechnology Information (NCBI).

En una realización particular, la proteína IAMT1 comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, una identidad de secuencia del 60%, 70%, 80%, 90% o 100% con la SEQ ID NO: 1. En otra realización todavía más particular, la proteína IAMT1 comprende un 72% con la SEQ ID NO: 1 que, en otra realización aún más particular, comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 correspondiente a la proteína IAMT1 de tomate (Nº de acceso NCBI: XP_004251920.1 versión XP_004251920.1 GI:460413073).

SEQ ID NO: 2

matlgdnkdn vvvsnlkler mlsmkggkge asyvnnsqag gqharsmlhl lketldgvql
irssndnddip fvivdlgcsc gsntvyiidv ivehmrkrfe kadqqipefs affcdlpsnd
fntlfqllpp lanngmeecl asnshrsyfa agvpgsfyrr lfparsidvf ysafslhwls
qvpdvldkq nvaynkgriy ihganesttk aykkqfqsdl anflcarske mkrpgsmflv
clgrtsmdpi dqggagllfg thfqdawddl vqeglitsek rdnfnipvya psiqdfkevv
eangsftinn lqvfrggspl vvnhpddaae vgralaiscr svsgvlvdah igeqlgdelf
trverraarh akelieklqf fhivaslslv

Ejemplos de proteínas IAMT1 de otras especies incluyen, pero no se limitan a (la identidad de secuencia (BLAST) con la SEQ ID NO: 1 se muestra entre corchetes), la secuencia SEQ ID NO: 3 procedente de *Brassica napus* (nº acceso a NCBI: CDY19899.1) [95%], la secuencia SEQ ID NO: 4 de *Cucumis melo* (nº de acceso NCBI: XP_008447710.1) [77%], la secuencia SEQ ID NO: 5 de *Cucumis sativus* (nº de acceso NCBI: XP_004151408.1) [78%], la secuencia SEQ ID NO: 6 de *Fragaria vesca* (nº de acceso a NCBI: XP_004294422.1) [76%], la secuencia SEQ ID NO: 7 de *Glycine max* (nº de acceso a NCBI: XP_003551758.1) [76%], la secuencia SEQ ID NO: 8 de *Solanum tuberosum* (nº de acceso a NCBI: XP_006344874.1) [72%], la secuencia SEQ ID NO: 9 de *Malus domestica* (nº de acceso NCBI: XP_008364459.1) [74%], la secuencia SEQ ID NO: 10 de *Jatropha curcas* (nº de acceso NCBI: KDP39201.1) [75%], la secuencia SEQ ID NO: 11 de *Prunus persica* (nº de acceso NCBI: XP_007211413.1) [74%], la secuencia SEQ ID NO: 12 de *Theobroma cacao* (nº de acceso NCBI: XP_007020694.1) [74%], la secuencia SEQ ID NO: 13 de *Citrus sinensis* (nº acceso NCBI: XP_006474991.1) [71%], la secuencia SEQ ID NO: 14 de *Vitis vinífera* (nº de acceso a NCBI: XP_002277167.1) [72%] y la secuencia SEQ ID NO: 15 de *Oryza sativa* (nº de acceso NCBI: NP_001054175.1) [63%].

La planta de la invención se caracteriza por tener inhibida la ruta de metilación del AIA, es decir, la cantidad de Me-AIA que la planta es capaz de producir está disminuida respecto a una planta control que no presenta inhibida dicha ruta metabólica. Tal como se ha explicado anteriormente, la metilación del AIA se lleva a cabo, principalmente, por la enzima IAMT1. Por lo tanto, inhibiendo la expresión o la función de dicha enzima, se inhibe o inactiva la metilación del AIA. Por otro lado, como entiende el experto en la materia, también cabe la posibilidad de eliminar o delecionar el gen completo (o parte) que codifica la proteína IAMT1, de forma que dicha proteína está ausente en la planta (o en unos niveles no detectables por técnicas conocidas).

En una realización particular, la planta de la invención se caracteriza porque la expresión del gen que codifica la IAMT1 está disminuida, bloqueada o inhibida con respecto a un control, o da lugar a una proteína no funcional.

En la presente invención se entiende que la expresión de un gen está disminuida/reducida, bloqueada o inhibida/eliminada respecto a un control, cuando los niveles de la proteína codificada por el gen y/o la actividad de la proteína son menores en comparación una planta control (planta silvestre o *wild type*). Así, en el contexto de

la presente invención se entiende por “control” a una planta silvestre o *wild type*. La reducción o eliminación de la expresión o la actividad de la proteína está en orden aumentado de preferencia por lo menos de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. Un ensayo sobre cómo se puede
5 determinar la actividad de la proteína IAMT1 se describe en el ejemplo 1 de la presente solicitud (e.g. midiendo la cantidad de AIA-Me).

Las distintas técnicas que pueden emplearse para disminuir, bloquear o inhibir la expresión de un gen son ampliamente conocidas en el estado de la técnica y su uso
10 es práctica de rutina para el experto en la materia.

Para la disminución/reducción, bloqueo o inhibición/eliminación de la expresión de un gen endógeno en una planta, se requiere una longitud suficiente de nucleótidos sustancialmente contiguos. Para realizar el silenciamiento génico, este puede ser tan
15 pequeño como 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10 o menos 50 nucleótidos, como alternativa éste puede ser tanto como el gen completo (incluyendo la UTR 5' y/o 3', ya sea en parte o en su totalidad). El tramo de los nucleótidos sustancialmente contiguos puede derivar del gen que codifica la proteína de interés (gen diana que, en la presente invención es el gen que codifica la proteína IAMT1), o de cualquier gen
20 que codifique una proteína con una identidad de secuencia del 50% con la SEQ ID NO: 1.

Un procedimiento para la disminución/reducción, bloqueo o inhibición/eliminación de la expresión del gen endógeno es introducir y expresar en una planta una construcción
25 genética en la que el ácido nucleico se clona como una repetición invertida (en parte o completamente), separado por un espaciador (ADN no codificante). En dicho procedimiento, la expresión del gen endógeno se reduce o se elimina sustancialmente a través del silenciamiento mediado por ARN utilizando una repetición invertida de un ácido nucleico o una parte del mismo, preferentemente capaz de formar una
30 estructura en horquilla. La repetición invertida se clona en un vector de expresión que comprende las secuencias de control. Una secuencia de ADN no codificante (un espaciador, por ejemplo un fragmento de la región de unión de matriz (MAR), un intrón, un poliengarce, etc.) se localiza entre los dos ácidos nucleicos invertidos que forman la repetición invertida. Después de la transcripción de la repetición invertida, se
35 forma un ARN quimérico con una estructura auto-complementaria (parcial o completa). Esta estructura de ARN bicatenario se denomina ARN en horquilla

(ARNhp). El ARNhp se procesa en la planta en los ARNip que se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, *RNA*). El RISC escinde adicionalmente los transcritos de ARNm, reduciendo por lo tanto sustancialmente el número de transcritos de ARNm que van a traducirse en los polipéptidos. Para
5 detalles generales adicionales véase, por ejemplo, Grierson y col. (1998) WO 98/53083; Waterhouse y col. (1999) WO 99/53050).

La realización de los procedimientos como se describe en el presente documento no se basa en introducir y expresar en una planta una construcción genética en la que el
10 ácido nucleico se clona como una repetición invertida, sino que pueden utilizarse cualquiera de uno o más de los diversos procedimientos de "silenciamiento génico" bien conocidos para lograr los mismos efectos.

Un procedimiento de este tipo para la reducción de la expresión del gen endógeno es
15 el silenciamiento mediado por ARN de la expresión del gen (regulación por disminución). El silenciamiento en este caso se activa en una planta mediante una secuencia de ARN bicatenario (ARNbc) que es sustancialmente similar al gen endógeno diana. Este ARNbc se procesa adicionalmente por la planta de aproximadamente 20 a aproximadamente 26 nucleótidos, denominado ARN de
20 interferencia pequeño (ARNip). Los ARNip se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) que escinde el transcrito de ARNm del gen endógeno diana, reduciendo por tanto sustancialmente el número de transcritos de ARNm que se traducen en un polipéptido. Preferentemente, la secuencia de ARN bicatenario corresponde a un gen diana.

25 Otro ejemplo de un procedimiento de silenciamiento de ARN implica la introducción de secuencias de ácidos nucleicos o partes de las mismas (en este caso un tramo de nucleótidos sustancialmente contiguos derivados del gen de interés) en una orientación en sentido en una planta. "Orientación en sentido" se refiere a una
30 secuencia de ADN que es homóloga a un transcrito de ARNm de la misma. Por lo tanto, en una planta se introduciría al menos una copia de la secuencia de ácidos nucleicos. La secuencia de ácidos nucleicos adicional reduciría la expresión del gen endógeno, dando lugar a un fenómeno conocido como co-supresión. La reducción de la expresión del gen sería más pronunciada si en una planta se introducen diversas
35 copias adicionales de una secuencia de ácidos nucleicos, cuando hay una correlación positiva entre altos niveles de transcrito y la activación de la co-supresión.

Otro ejemplo de un procedimiento de silenciamiento de ARN implica el uso de las secuencias de ácidos nucleicos antisentido. Una secuencia de "ácidos nucleicos antisentido" comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de ácidos nucleicos "en sentido" que codifica una proteína, es decir, complementaria a la cadena codificante de una molécula de ADNc bicatenario o complementario a una secuencia de transcripto de ARNm. La secuencia de ácidos nucleicos antisentido es preferentemente complementaria al gen endógeno a silenciar. La complementariedad puede localizarse en la "región codificante" y/o en la "región no codificante" de un gen. La expresión "región codificante" se refiere a una región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que se traducen en restos de aminoácido. La expresión "región no codificante" se refiere a las secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante que se transcriben pero no se traducen en aminoácidos (denominado también regiones no traducidas 5' y 3').

Las secuencias de ácidos nucleicos antisentido pueden diseñarse de acuerdo con las normas de emparejamiento de bases de Watson y Crick. La secuencia de ácidos nucleicos antisentido puede ser complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos completa, pero también puede ser un oligonucleótido que es antisentido para solo a una parte de la secuencia de ácidos nucleicos (incluyendo la UTR 5' y 3' del ARNm). Por ejemplo, la secuencia de oligonucleótidos antisentido puede ser complementaria a la región que rodea el sitio de inicio de traducción de un transcripto de ARNm que codifica un polipéptido. La longitud de una secuencia de oligonucleótidos antisentido adecuada se conoce en la técnica y puede iniciar de aproximadamente 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 o 10 nucleótidos de longitud o menos. Una secuencia de ácidos nucleicos antisentido como se describe en el presente documento puede construirse usando síntesis química y las reacciones de ligamiento enzimático utilizando los procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos antisentido (por ejemplo, una secuencia de oligonucleótidos antisentido) puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos de origen natural o varios nucleótidos modificados diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para el aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre las secuencias de ácidos nucleicos antisentido y sentido, por ejemplo, pueden utilizarse derivados fosforotioato y nucleótidos sustituidos por acridina. En la técnica se conocen bien ejemplos de nucleótidos modificados que pueden utilizarse para generar las secuencias de ácidos nucleicos antisentido.

La secuencia de ácidos nucleicos antisentido puede producirse biológicamente utilizando un vector de expresión en el que se ha subclonado una secuencia de ácidos nucleicos en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito del ácido nucleico insertado tendrá una orientación antisentido con respecto a un ácido nucleico diana de interés). Preferentemente, la producción de las secuencias de ácidos nucleicos antisentido en plantas se produce mediante una construcción de ácido nucleico establemente integrada que comprende un promotor, un oligonucleótido antisentido unido operativamente y un terminador. Las moléculas de ácido nucleico utilizadas para el silenciamiento en los procedimientos descritos en el presente documento (tanto si se introduce en una planta como se genera *in situ*) se hibridan con o se unen a los transcritos de ARNm y/o ADN genómico que codifica un polipéptido para inhibir así la expresión de la proteína, por ejemplo, al inhibir la transcripción y/o traducción. La hibridación puede ser cualquier complementariedad convencional de nucleótidos para formar un dúplex estable o, por ejemplo, en el caso de una secuencia de ácidos nucleicos antisentido que se une a los dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco principal de la doble hélice. Las secuencias de ácidos nucleicos antisentido pueden introducirse en una planta mediante transformación o inyección directa en un sitio de tejido específico. Como alternativa, las secuencias de ácidos nucleicos antisentido pueden modificarse para dirigir las células seleccionadas y después administrarse por vía sistémica. Por ejemplo, para administración sistémica, las secuencias de ácidos nucleicos antisentido pueden modificarse de tal manera que se unan específicamente a los receptores o antígenos expresados sobre una superficie celular seleccionada, por ejemplo, al ligar la secuencia de ácidos nucleicos antisentido a los péptidos o anticuerpos que se unen a los receptores o antígenos de superficie celular. Las secuencias de ácidos nucleicos antisentido también pueden administrarse a células usando los vectores descritos en el presente documento.

La disminución/reducción, bloqueo o inhibición/eliminación de la expresión del gen endógeno también puede realizarse usando ribozimas. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad de ribonucleasa que pueden escindir una secuencia de ácidos nucleicos monocatenaria, tal como un ARNm, en el que tienen una región complementaria. Por tanto, las ribozimas (por ejemplo, ribozimas cabeza de martillo (descritas en Haselhoff y Gerlach (1988) Nature 334, 585-591) pueden utilizarse para escindir catalíticamente los transcritos de ARNm que codifican un polipéptido, reduciendo sustancialmente por tanto el número de transcritos de ARNm que van a

traducirse en un polipéptido. Se puede diseñar una ribozima que tenga especificidad para una secuencia de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo: Cech y col. Patente de Estados Unidos N° 4.987.071; Y Cech y col. Patente de Estados Unidos N° 5.116.742). Como alternativa, los transcritos de ARNm correspondientes a una
5 secuencia de ácidos nucleicos pueden utilizarse para seleccionar un ARN catalítico que tenga una actividad específica de ribonucleasa de un conjunto de moléculas de ARN (Bartel y Szostak (1993) Science 261, 1411-1418). El uso de ribozimas para el silenciamiento génico en plantas es ampliamente conocido en el estado de la técnica.

10 El silenciamiento génico también puede producirse por mutagénesis de inserción (por ejemplo, inserción de ADN-T o inserción de transposón) o mediante estrategias como describen, entre otros, Angell y Baulcombe ((1999) Plant J 20(3): 357-62), (Amplicon VIGS WO 98/36083) o Baulcombe (documento WO 99/15682).

15 El silenciamiento génico también puede producirse si hay una mutación en un gen endógeno y/o una mutación en un gen aislado/ácido nucleico posteriormente introducido en una planta. La reducción o eliminación sustancial puede estar provocada por una proteína no funcional. Por ejemplo, la proteína puede unirse a
20 diversas proteínas que interaccionan; por lo tanto pueden proporcionarse una o más mutaciones y/o truncamientos para un polipéptido que es aún capaz de unir las proteínas que interaccionan (tal como proteínas receptoras) pero que no pueden exhibir su función normal (tal como ligando de señalización).

Una estrategia adicional para el silenciamiento génico es dirigir la secuencia de ácidos
25 nucleicos complementaria a la región reguladora del gen (por ejemplo, el promotor y/o los potenciadores) para formar estructuras helicoidales triples que impiden la transcripción del gen en células diana. Véase Helene, C., Anticancer Drug Res. 6, 569-84, 1991; Helene y col., Ann. N.Y. Acad. Sci. 660, 27-36 1992; Y Maher, L.J. Bioassays 14, 807-15, 1992. Las expresiones "elemento regulador", "secuencia de
30 control" y "promotor" se utilizan todas indistintamente en el presente documento y se toman en un contexto amplio para referirse a una secuencia de ácidos nucleicos reguladora capaz de efectuar la expresión de las secuencias a las que se unen. El término "promotor" típicamente se refiere a una secuencia de control de ácidos nucleicos localizada en dirección 5' del inicio transcripcional de un gen y que está
35 implicado en el reconocimiento y unión de la ARN polimerasa y otras proteínas, dirigiendo de este modo la transcripción de un ácido nucleico unido operativamente.

Incluidas en los términos anteriormente mencionados se encuentran las secuencias reguladoras transcripcionales derivadas de un gen genómico eucariota clásico (que incluye la caja TATA que es necesaria para el inicio de transcripción adecuado, con o sin secuencia de caja CCAAT) y elementos reguladores adicionales (es decir, secuencias activadoras en dirección 5', potenciadores y silenciadores) que alteran la expresión génica en respuesta al desarrollo y/o estímulo externo, o en una forma específica de tejido. También se incluye dentro del término una secuencia reguladora transcripcional de un gen procariota clásico, en cuyo caso puede incluir una secuencia de caja -35 y/o secuencias reguladoras transcripcionales de caja -10. La expresión "elemento regulador" también incluye una molécula de fusión sintética o un derivado que confiere, activa o potencia la expresión de una molécula de ácido nucleico en una célula, tejido u órgano. Los promotores en la dirección 5' de la secuencia de nucleótidos útiles en los procedimientos de la presente invención pueden modificarse mediante una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de nucleótido sin interferir con la funcionalidad o actividad de cualquiera de los promotores, la fase de lectura abierta (ORF, *Open Reading Frame*) o la región reguladora e 3' tal como terminadores u otras regiones reguladores 3' que se ubican lejos de la ORF. Para la expresión en plantas, la molécula de ácido nucleico debe, como se ha descrito anteriormente, estar unida operativamente a o comprender un promotor adecuado que exprese el gen de manera adecuada en tiempo y con el patrón de expresión espacial requerido. La expresión "unido operativamente" como se usa en el presente documento se refiere a un enlace funcional entre la secuencia promotora y el gen de interés, de tal manera que la secuencia promotora es capaz de iniciar la transcripción del gen de interés.

Un experto conocerá otros procedimientos, tales como el uso de anticuerpos dirigidos a un polipéptido endógeno para inhibir su función en la planta, o la interferencia en la ruta de señalización en la que un polipéptido está implicado. En particular, se puede prever que las moléculas fabricadas por el hombre pueden ser útiles para inhibir la función biológica de un polipéptido diana o para interferir con la ruta de señalización en la que está implicado el polipéptido diana. Como alternativa, puede establecerse un programa de detección hasta identificar en una población de plantas las variantes naturales de un gen, cuyas variantes codifican los polipéptidos con actividad reducida. Dichas variantes naturales también pueden utilizarse, por ejemplo, para realizar recombinación homóloga. Para desactivar la expresión génica y/o traducción de ARNm pueden utilizarse microARN (miARN) artificiales y/o naturales. Los miARN

endógenos son ARN pequeños monocatenarios típicamente con una longitud de 19-24 nucleótidos. Principalmente funcionan para regular la expresión génica y/o la traducción de ARNm. La mayor parte de los microARN (miARN) de planta tienen complementariedad perfecta o casi perfecta con sus secuencias diana.

5

Sin embargo, hay dianas naturales con hasta cinco emparejamiento erróneos. Se procesan a partir de ARN no codificantes más largos con estructuras de plegamiento características mediante RNasas específicas bicatenarias de la familia Dicer. Después del procesamiento, se incorporan en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) al unirse a su componente principal, una proteína Argonauta. Los miARN sirven como componentes de especificidad del RISC, debido al emparejamiento de bases con ácidos nucleicos diana, principalmente ARNm, en el citoplasma. Los acontecimientos reguladores posteriores incluyen la escisión de ARNm diana y la destrucción y/o inhibición traduccional. Por tanto, los efectos de la sobreexpresión de miARN se reflejan frecuentemente en niveles de ARNm reducidos de los genes diana. Los microARN artificiales (amiARN), que típicamente tienen 21 nucleótidos de longitud, pueden modificarse por ingeniería genética específicamente para regular negativamente la expresión génica de un solo gen o de múltiples genes de interés. En la técnica se conocen bien los determinantes de la selección diana de microARN de planta. Se han definido los parámetros empíricos para el reconocimiento diana y pueden utilizarse para ayudar en el diseño de los amiARN específicos (Schwab y col., Dev. Cell 8, 517-527, 2005). Están disponibles para el público las herramientas convenientes para el diseño y la generación de los amiARN y sus precursores (Schwab y col., Plant Cell 18, 1121-1133, 2006).

10

15

20

25

Para un rendimiento óptimo, las técnicas de silenciamiento génico utilizadas para reducir la expresión en una planta de un gen endógeno requieren el uso de secuencias de ácidos nucleicos de plantas monocotiledóneas para la transformación de plantas monocotiledóneas, y de plantas dicotiledóneas para la transformación de plantas dicotiledóneas. Preferentemente, una secuencia de ácidos nucleicos de cualquier especie de planta dada se introduce dentro de esta misma especie. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos de arroz se transforma en una planta de arroz. Sin embargo, no es un requisito absoluto que la secuencia de ácidos nucleicos que se introduce se origine de la misma especie de planta como la planta en la que se introducirá. Basta con que exista una homología sustancial entre el gen diana endógeno y el ácido nucleico a introducir.

30

35

Anteriormente se han descrito ejemplos de diversos procedimientos para la disminución/reducción, bloqueo o inhibición/eliminación de la expresión en una planta de un gen endógeno. Un experto en la técnica será capaz de adaptar fácilmente los procedimientos anteriormente mencionados para el silenciamiento para conseguir la
5 reducción de la expresión de un gen endógeno en una planta completa o en partes de la misma a través del uso de un promotor apropiado.

Por otro lado, también se contempla la posibilidad de llevar modificaciones post-traduccionales para inactivar la proteína IAMT1 y que ésta no pueda llevar a cabo la
10 metilación del AIA. La modificación postraducciona de una proteína es un cambio químico ocurrido en ésta después de su síntesis. Las modificaciones postraduccionales ocurren mediante cambios químicos de los aminoácidos que constituyen las proteínas y pueden ser de muchos tipos. Ejemplos de modificación postraduccionales incluyen, sin limitar a, acilación, fosforilación, metilación,
15 hidroxilación, glicosilación, glicación, sulfonilación, prenilación, nitrosilación y nitración.

En resumen, la planta puede ser manipulada genéticamente para obtener plantas en la que el promotor que regula la transcripción del gen en cuestión esté inactivo (por ejemplo, mediante la introducción de mutaciones en el genoma), administrar
20 compuestos que impidan la transcripción del gen y/o la traducción del ARNm, tales como ARN de interferencia (siARN, miARN o piARN), etc. Por otro lado, la planta de la invención también puede caracterizarse por que la expresión del gen que codifica la IAMT1 da lugar a una proteína no funcional (en la presente invención, la proteína IAMT1 no puede llevar a cabo la metilación del AIA). Como en el caso anterior, técnicas de ingeniería genética pueden emplearse para expresar proteínas no
25 funcionales, por ejemplo, introducción de truncaciones, mutaciones, delecciones, inserciones, etc. que originan que la proteína IAMT1 no pueda desempeñar su función, es decir, no puedan reconocer al sustrato (AIA) y metitarlo. Adicionalmente, técnicas para obtener las plantas de la invención incluyen, pero no se limitan a, la
30 técnica de *Tilling* y la técnica de CRISPR/CAR.

La técnica de *Tilling* (del inglés *Targeting Induced Local Lesions in Genomes*) es una técnica de genética molecular emplea una mutagénesis química inducida, por ejemplo mediante etilmetanosulfonato o naranja de acridina, sobre un grupo de individuos y
35 tras este protocolo, se detecta mediante la técnica adecuada la presencia de mutaciones en el gen deseado. El *TILLING* combina mutagénesis de alta densidad

con procedimientos de detección de alto rendimientos. La técnica de TILLING es ampliamente conocida en el estado de la técnica (McCallum y col. 2000, Nat Biotechnol 18: 455-457; revisado por Stemple 2004, Nat Rev Genet 5(2): 145-50).

5 La técnica de CRISPR (del inglés de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) puede usarse para introducir mutaciones genéticas en localizaciones específicas del ADN genómico, tal como se describe en la solicitud de patente US2014273235A1.

10 En una realización particular, el gen que codifica la proteína IAMT1 presenta una delección que origina la pérdida en la proteína del aminoácido Gly en la posición correspondiente al aminoácido 226 con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1. Sin querer estar vinculados a ninguna teoría, se cree que debido a esta delección, la proteína IAMT1 no es capaz de unirse al AIA (el sustrato) y llevar a cabo su
15 metilación.

Adicionalmente, en el contexto de la presente invención, también se contemplan agentes inhibidores, inactivadores o bloqueadores de la propia proteína IAMT1 (tal como se ha mencionado previamente), y su uso para el incremento o la restauración
20 de la fertilidad de las plantas, consiguiendo con ello una mayor producción de semillas y frutos.

Como se ha explicado previamente, una característica de la planta de la invención es que ésta presenta una fertilidad incrementada con respecto a una planta control, es
25 decir, puede producir más semillas y más frutos que una planta control, tanto en condiciones óptimas como en condiciones de estrés abiótico, tanto por sequía como por altas temperaturas. Así, en una realización particular, la planta presenta un incremento de la fertilidad en condiciones de estrés hídrico (escasez de agua) o térmico (altas temperaturas), más en particular, el incremento de la fertilidad se
30 produce a una temperatura de entre 15°C y 37°C, preferiblemente, de entre 20°C y 29°C, más preferiblemente, en días largos, es decir, en presencia de más de 12 horas de luz.

Como entiende el experto en la materia, la planta de la invención comprende en su
35 genoma el gen que codifica la proteína IAMT1, en donde la expresión de dicho gen está disminuida, bloqueada o inhibida con respecto a un control o da lugar a una

proteína no funcional. Como se ha explicado anteriormente, dicha expresión disminuida, bloqueada o inhibida o de lugar a una proteína no funcional puede conseguirse mediante técnicas de silenciamiento genético que conlleven la introducción de modificaciones genéticas en el gen que codifica dicha la proteína

5 IAMT1. Por este motivo, dentro de la presente invención, también se contempla el germoplasma derivado de la planta de la invención que lleva incorporado en su genoma la modificación genética que origina que su expresión este disminuida, bloqueada o inhibida con respecto a un control o da lugar a una proteína no funcional.

10 Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un germoplasma procedente de la planta de la invención en donde dicho germoplasma (i) se selecciona del grupo que consiste en una célula, una célula germinal (polen) y una semilla procedente de dicha planta, y (ii) comprende una modificación genética en el gen que codifica la proteína IAMT1 que origina que su expresión esté disminuida, bloqueada o

15 inhibida o de lugar a una proteína no funcional. En la presente invención se entiende por “germoplasma” el material biológico que contiene la variabilidad genética intraespecífica o a los materiales genéticos que pueden perpetuar una especie o una población de un organismo.

20 El término “célula” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una célula vegetal. Así pues, el término célula comprende, al menos, una célula del parénquima, célula meristemática o de cualquier tipo, diferenciada o indiferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición un protoplasto (célula de una planta que carece de pared celular).

25 En una realización particular, el gen que codifica la proteína IAMT1 presenta una delección que origina la pérdida en la proteína del aminoácido Gly en la posición correspondiente al aminoácido 226 con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.

30 Método de la invención

Tal como se ha explicado anteriormente, los inventores han descubierto que la inhibición de la metilación del AIA da lugar a un incremento en la fertilidad de las plantas. Así, en el contexto de la presente invención, se contempla un método para

35 incrementar o restaurar la fertilidad de una planta que comprende inhibir, disminuir o bloquear la ruta de metilación del AIA. Los métodos y técnicas para inhibir, disminuir

o bloquear la ruta de metilación del AIA han sido descritos previamente y son aplicables al presente aspecto inventivo. Entre dichas técnicas, se encuentra la inhibición, la disminución o el bloqueo de la enzima encargada de metilar el AIA, es decir, la proteína IAMT1.

5

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona se relaciona con un método para incrementar la fertilidad de una planta, de aquí en adelante método de la invención, que comprende inhibir, disminuir o bloquear

(i) la expresión del gen que codifica la proteína IAMT1 con respecto a un control o

10

(ii) la actividad de la proteína IAMT1.

Los términos “inhibir”, “disminuir” y “bloquear” han sido definidos y explicados previamente en la presente descripción, así como los métodos que existen en el estado de la técnica para inhibir, disminuir o bloquear la expresión de genes o la actividad de las enzimas. Dichas definiciones y explicaciones son aplicables al presente aspecto inventivo.

15

Así, en una realización particular, la planta pertenece al género *Solanum* sp., en particular, a la especie *Solanum lycopersicum* (tomate).

20

En otra realización particular, la proteína IAMT1 comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, una identidad de secuencia del 50% con la SEQ ID NO: 1.

25

En otra realización particular, el gen que codifica la proteína IAMT presenta una deleción que origina la pérdida en la proteína del aminoácido Gly en la posición correspondiente al aminoácido 226 con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.

30

En otra realización particular, la inhibición, la disminución o el bloqueo de la expresión del gen o de la actividad de la proteína se lleva a cabo mediante la técnica CRISPR o TILLING.

En otra realización particular, se produce un incremento de fertilidad en condiciones de estrés hídrico o estrés térmico.

35

Todas estas realizaciones particulares han sido descritas en detalle previamente en el presente documento y son aplicables al presente aspecto inventivo.

Uso del gen que codifica la proteína IAMT1

5

Tal como se ha explicado al inicio de la presente descripción, la pérdida de la función de la enzima IAMT1 acelera el crecimiento de los tubos polínicos en comparación con plantas control (ver Ejemplo 1 y Figuras 5 y 6) y con ello, se incrementa la fertilidad de las plantas, lo que se traduce en un mayor rendimiento de los cultivos al obtener plantas que generan más semillas y con ello, más frutos.

10

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del gen que codifica la proteína IAMT1 para incrementar de fertilidad de la planta.

15

En la presente invención, se entiende por "incrementar la fertilidad" a la mayor producción de semillas con respecto a una planta control, tanto en condiciones óptimas como en condiciones de estrés abiótico, tanto por sequía como por altas temperaturas. En una realización particular, dicho incremento de fertilidad se produce por inhibición, bloqueo o disminución de la expresión del gen que codifica la proteína IAMT1, o por la expresión de dicho gen de una proteína IAMT1 no funcional.

20

En otra realización particular, la proteína IAMT1 comprende una secuencia de aminoácidos con, al menos, un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 1.

25

En otra realización particular, el gen que codifica la proteína IAMT presenta una delección que origina la pérdida en la proteína del aminoácido Gly en la posición correspondiente al aminoácido 226 con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.

30

Todas estas realizaciones particulares así como los términos empleados han sido definidos y/o explicados en los aspectos inventivos anteriores.

35

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la

invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Figura 1. Descripción molecular de los alelos mutantes de *IAMT1* en *Arabidopsis thaliana*. (A) Esquema de las inserciones de T-DNA que dan lugar a los alelos *iamt1-1* (línea SALK_072125) e *iamt1-2* (línea GT_5_41946). (B) Productos de PCR obtenidos por la combinación de oligonucleótidos indicada en cada caso. (C) Nivel de expresión, medido por RT-qPCR, del alelo silvestre del gen *IAMT1* en plantas de *A. thaliana* de 10 días de edad cultivadas en luz continua.

10

Figura 2. Cuantificación de los niveles de Me-AIA en plántulas silvestres (Col-0) y del mutante *iamt1-1* cultivadas durante diez días en luz continua. La diferencia entre ambos es estadísticamente significativa ($p < 0,01$) [t-student].

15

Figura 3. Aspecto general de las plantas silvestres (Col-0) y del mutante *iamt1-1* cultivadas durante 35 días en días largos (16 horas de luz, 8 horas de oscuridad).

20

Figura 4. Actividad DR5::GUS en ovarios de plantas silvestres (Col-0) y del mutante *iamt1-1*. Las flechas indican las regiones más activas, que corresponden a las que muestran mayor actividad de auxinas (AIA).

25

Figura 5. Tubos polínicos en ovarios de plantas silvestres (Col-0) y del mutante *iamt1-1* polinizados manualmente con polen silvestre. Los tubos se visualizan mediante la tinción de la calosa que se acumula a su paso. Las flechas indican hasta donde alcanzan los tubos polínicos en cada ovario, 2 horas después de la polinización.

30

Figura 6. Producción de silicuas (frutos) en plantas silvestres (Col-0) y del mutante *iamt1-1*, cuando éstas son cultivadas constantemente a la temperatura óptima de crecimiento (20°C), a una temperatura alta que provoca estrés (29°C), o cuando se cultivan a 20°C pero se transfieren a 29°C en el momento de la floración. Los resultados son la media de frutos producidos por planta, después de analizar 36 plantas de cada genotipo en cada condición de crecimiento. La diferencia entre ambos genotipos es estadísticamente significativa ($p < 0,001$) [t-student].

35

Figura 7. Producción de semillas en plantas silvestres (Col-0) y del mutante *iamt1-1*, cuando éstas son cultivadas constantemente a la temperatura óptima de crecimiento (20°C), a una temperatura alta que provoca estrés (29°C), o cuando se cultivan a 20°C pero se transfieren a 29°C en el momento de la floración. Los resultados son la media de frutos producidos por planta, después de analizar 36 plantas de cada genotipo en cada condición de crecimiento. La diferencia entre ambos genotipos es estadísticamente significativa ($p < 0,001$) [t-student].

Figura 8. Producción de frutos de tomate en plantas sometidas a estrés por sequía y altas temperatura tratadas con auxinas. Las plantas se cultivaron a 25°C en invernadero hasta el momento de comenzar la floración, cuando se transfirieron a una cabina a 37°C y se cesó el riego. La mitad de las plantas fueron rociadas con AIA 100 µM y produjeron frutos, mientras que la otra mitad sin AIA no produjeron frutos.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1

Con el fin de analizar el efecto de la mutación del gen *IAMT1* en *Arabidopsis thaliana*, se obtuvieron del centro de germoplasma de Nottingham (NASC) semillas portadoras de inserciones de T-DNA en la región codificante de dicho gen (Fig. 1A). Éstas correspondían a los códigos SALK_072125 (que se renombró *iamt1-1*) y GT_5_41946 (que se renombró *iamt1-2*). Se seleccionaron plantas homocigotas para cada una de las inserciones (Fig. 1B) mediante PCR (ver Técnica 1) utilizando como cebadores los oligonucleótidos indicados en la Tabla 1. En las plantas homocigotas se determinó mediante RT-qPCR (ver Técnica 2 y Tabla 1) el nivel de expresión de un ARNm completo correspondiente a *IAMT1* en plantas silvestres (accesión Col-0) y del mutante *iamt1-1* en el mismo fondo genético (Fig. 1C). Teniendo en cuenta la sensibilidad de la técnica, y que se detectan una expresión más de 1000 veces menor en el mutante *iamt1-1*, el resultado indica que dicho mutante no puede sintetizar una proteína IAMT1 completa en ningún caso. De hecho la mutación *iamt1-1* se predice que provocaría en cualquier caso la aparición de una proteína truncada en la que no estaría presente el posible centro activo de la proteína, al faltar varios aminoácidos clave, como la Gly-226.

La determinación, mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (ver Técnica 3), del Me-AIA producido en plántulas cultivadas en luz continua durante diez días indicó que el mutante *iamt1-1* no ha perdido completamente la actividad carboximetil transferasa a pesar de no expresar el alelo silvestre del gen *IAMT1* (Fig. 2). A pesar del defecto en *IAMT1*, el aspecto general de las plantas mutantes *iamt1-1* era indistinguible del de plantas control (Col-0) (Fig. 3). Sin embargo, en ovarios del mutante sí que fue posible encontrar una mayor acumulación de AIA libre asociada a la falta de metilación del AIA, como indica de forma indirecta la tinción de β -glucuronidasa (GUS) en plantas expresando el gen *GUS* bajo el control del promotor DR5, que es inducible por auxinas (AIA) (Fig. 4) (ver Técnica 4).

Para estudiar el efecto de la mutación de *IAMT1* sobre la capacidad reproductiva de las plantas, se analizó mediante tinción con azul de anilina (Técnica 5) la deposición de calosa en ovarios polinizados manualmente con polen silvestre. Esta tinción permite visualizar los tubos polínicos mientras atraviesan el ovario hasta alcanzar los óvulos. Dos horas después de la polinización, los tubos polínicos apenas habían atravesado el estilo de ovarios de plantas silvestres (Col-0), mientras que en los ovarios del mutante *iamt1-1* los tubos polínicos habían alcanzado ya la posición de los primeros óvulos (Fig. 5).

El crecimiento más rápido de los tubos polínicos en el mutante *iamt1-1* sugería que esta característica podría conferir una ventaja al mutante en condiciones ambientales en las que la viabilidad del polen está comprometida, como en casos de sequía o de elevadas temperaturas. Para comprobar esta hipótesis, se cultivaron plantas del mutante *iamt1-1* y de su parental silvestre (Col-0) hasta completar su ciclo vital en varios regímenes de temperatura (conseguidos en fitotrones regulados a 20°C, o a 29°C). Al finalizar la floración se determinó el número de frutos y de semillas totales por planta. El mutante *iamt1-1* produjo siempre más frutos (Fig. 6) y más semillas (Fig. 7) que el control de plantas silvestres en todas las condiciones: (1) cuando las plantas eran cultivadas en días largos a 20°C; (2) cuando las plantas se cultivaron en días largos a 29°C desde la germinación; y (3) cuando las plantas se cultivaron en días largos a 20°C y fueron transferidas, justo en el momento de comenzar la floración, a una cámara con igual luminosidad pero a 29°C. Estos resultados indican que las plantas con una capacidad reducida de metilar el AIA muestran una mayor capacidad

reproductiva que las silvestres incluso en condiciones de estrés térmico, posiblemente por el crecimiento acelerado de los tubos polínicos en sus ovarios.

Ejemplo 2

5 Para comprobar que el enriquecimiento en AIA observado en los ovarios del mutante *iamt1-1* de *A. thaliana* es responsable de su mayor capacidad reproductiva en condiciones de estrés, y para averiguar si este efecto podría extenderse a otras especies vegetales, se realizó un análisis de fertilidad en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv Moneymaker) en condiciones de estrés.

10

Se cultivaron 16 plantas de tomate a 26°C en invernadero, y en el momento de florecer se transfirieron todas a una cabina a 37°C y se cesó el riego, al tiempo que se rociaban 8 de las plantas con una solución de AIA 100 µM, y las 8 restantes sólo con agua. El tratamiento se mantuvo durante dos semanas cada 2 días, y al cabo de ese tiempo se comprobó que ninguna de las plantas tratadas con agua habían producido frutos, mientras que todas las plantas tratadas con AIA habían producido frutos de tamaños variables (Fig. 8). Este resultado está de acuerdo con informes públicos previos utilizando plantas de arroz, y también apoya la idea de que el mayor nivel de AIA en ovarios del mutante *iamt1* es la causa probable del mantenimiento de la capacidad reproductiva en condiciones de estrés térmico y de sequía.

15

20

MÉTODOS

TÉCNICA 1. Genotipado por PCR de las inserciones de T-DNA.

25 Se extrajo el ADN de las plantas empleando el método descrito en Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991), Nucleic Acids Res 19: 1349, usando los cebadores indicados en la Tabla 1 en las combinaciones indicadas en la figura 1, se realizó la reacción estándar de PCR empleando la enzima ExTaq (Takara) y un programa de 30 ciclos (30 segundos a 95°C, 1 minuto a 56°C, 1 minuto a 68°C)

30

Tabla 1. Oligonucleótidos usados como cebadores en reacciones de PCR

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:	Aplicación
F1	TGCCGGAGAGAAGACAACAAC	16	Genotipado alelos <i>iamt1</i>
R1	TTAAAGAGAGGTGGGGCCATG	17	Genotipado alelos <i>iamt1</i>
F2	CGCCAACGGCTCATTTG	18	Genotipado alelos <i>iamt1</i>

R2	CATCAGAAGTTGGTCGTGCCT	19	Genotipado alelos <i>iamt1</i>
F3	TGTTCTCACGAGTTGAAAGCCGAGC	20	Genotipado alelos <i>iamt1</i>
R3	AAACTAAAATAGATAAAGTCTTTGTACC	21	Genotipado alelos <i>iamt1</i>
LP	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	22	Genotipado alelos <i>iamt1</i>
SP	TACGAATAAGAGCGTCCATTTTAGAGT	23	Genotipado alelos <i>iamt1</i>
qRT1	TTAAAGAGAGAAGGAGAGATCCATAGAGA	24	Análisis expresión <i>IAMT1</i>
qRT2	GCCACCTTTTCATGCTGAGAAG	25	Análisis expresión <i>IAMT1</i>
EF-F	ATTGGAAACGGATATGCTCCA	26	Expresión del gen control EF1a
EF-R	CCTTACCTGAACGCCTGTCA	27	Expresión del gen control EF1a

TÉCNICA 2. RT-qPCR de *IAMT1* en el mutante *iamt1-1*.

Se extrajo el ARN de las plantas empleando el Mini kit RNAeasy (QIAGEN) siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. La síntesis del cDNA se realizó a partir de 1 µg de ARN mediante el kit Superscript III (Life Technologies), siguiendo las instrucciones de la casa comercial, y la qPCR de *IAMT1* y del gen control EF1a se efectuó con los cebadores indicados en la Tabla 1 y el kit SYBR Green Quantitative (Sigma).

TÉCNICA 3. Cuantificación del Me-AIA.

Se recogieron plántulas de *Arabidopsis thaliana* de diez días cultivadas en luz continua y se congelaron en nitrógeno líquido. La extracción se realizó a partir de 100 mg de tejido, con tres réplicas biológicas en paralelo para cada genotipo. Se añadieron 1 mL de metanol y 50 pmol de 2H-Me-AIA, se calentó la mezcla durante 2 minutos a 60°C y después se mantuvo durante al menos 1 hora a temperatura ambiente hasta que todo el metanol se evaporó. El sedimento se disolvió en 2 mL de tampón fosfato sódico (50 mM, pH 7.0) conteniendo 5% de metanol, y se sometió a 10 minutos de tratamiento de ultrasonidos (Branson B5510DTH, Branson Ultrasonics, Dunbury, EEUU). A continuación se ajustó el pH a 2,5 con ácido clorhídrico 1M, y se purificó la muestra mediante extracción en fase sólida usando columnas Oasis HLB 1 mL / 30 mg (Waters Corporation, Milford, EEUU) acondicionadas con 1 mL de metanol y 1 mL de agua, y equilibradas con 0,5 mL de tampón fosfato sódico (50 mM, pH 2,5). Tras la aplicación de la muestra, la columna se lavó dos veces con 1 mL de metanol 5%, y se eluyó con 2 mL de metanol 80%. El eluido se secó completamente usando un concentrador a vacío (Vacufuge plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). A cada extracto se le añadió entonces 20 µl de N,O-bis (trimetilsilil trifluoroacetamida con 1%

de trimetilclorosilano (BSTFA+TMCS, 99:1 (v/v), Supelco, Bellefonte, EEUU). Se transfirieron los extractos a viales de 400 µl de GC-MS, y se incubaron durante 70 minutos a 60°C.

- 5 Para analizar el Me-AIA, se inyectó 1 µl de cada muestra mediante un autoinyector CombiPAL (CTC Analytics, Zwingen, Suiza) a un cromatógrafo de gases Bruker Scion-455 (BRUKER Daltonics, Bremen, Alemania) equipado con una columna de 30 m x 0,25 mm con una fase estacionaria de 0,25 mm ZB35 (Phenomenex, Torrance, EEUU). Como fase móvil se usó helio a un flujo de 1 mL/minuto. La temperatura del
- 10 inyector era de 250°C, y la temperatura de la columna se mantuvo a 50°C durante 1,20 minutos. A partir de ahí, la temperatura de la columna fue aumentando a 30°C/minuto hasta alcanzar 120°C, y después a 10°C/minuto hasta los 325°C, manteniéndola a esa temperatura durante 5 minutos más. El efluente de la columna se introdujo en la fuente iónica de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo
- 15 Bruker Scion-TQ, usándolo en modo EI-MRM. La temperatura de transferencia se fijó a 250°C, y la temperatura de la fuente iónica a 200°C. Los iones se generaron con -70 eV en una corriente de emisión de 80 µA. El tiempo de permanencia fue de 100 ms, y se registraron las reacciones m/z 261 a 202 (Me-AIA endógeno) y m/z 266 a 207 (2H-Me-AIA estándar). Como gas de colisión se usó argón a 1,5 mTorr. La cantidad del
- 20 compuesto endógeno se calculó a partir del cociente entre la señal del compuesto no marcado y el fragmento conteniendo el isótopo estable.

TÉCNICA 4. Evaluación de la señalización de auxinas mediante DR5::GUS

- Se introdujo mediante cruces genéticos el marcador DR5::GUS en el fondo *iamt1-1* y
- 25 en las flores de plantas adultas de este mutante y de su parental en Col-0 se examinó la expresión de este marcador mediante el protocolo estándar de tinción de GUS descrito en Blázquez MA, Soowal L, Lee I, Weigel D (1997), Development 124: 3835-3844.

TÉCNICA 5. Visualización de los tubos polínicos

Se siguió al pie de la letra lo especificado en la publicación Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T, Kuroiwa T (2006), Nat. Cell Biol. 8: 64-71.

REIVINDICACIONES

1. Una planta que comprende el gen que codifica la proteína IAMT1, caracterizada porque dicha proteína IAMT1:
 - (i) está ausente o en unos niveles no detectables por técnicas conocidas, o
 - (ii) no es funcional o
 - (iii) se presenta en la planta en unos niveles inferiores con respecto a la planta control, siendo dicha diferencia estadísticamente significativa, de forma que se observa el fenotipo descrito en la planta de la presente invención, y
 - (iv) dicha la planta no pertenece a la especie *Arabidopsis thaliana*.
2. Planta según la reivindicación 1, en la que
 - (i) la expresión de dicho gen está disminuida, bloqueada o inhibida con respecto a un control o da lugar a una proteína no funcional.
3. Planta según la reivindicación 1 ó 2, en la que la proteína IAMT1 comprende una secuencia de aminoácidos con, al menos, un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 1.
4. Planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el gen que codifica la proteína IAMT1 presenta una delección que origina la pérdida en la proteína del aminoácido Gly en la posición correspondiente al aminoácido 226 con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
5. Planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la planta pertenece al género *Solanum* sp., en particular, a la especie *Solanum lycopersicum*.
6. Un germoplasma procedente de una planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho germoplasma:
 - (i) se selecciona del grupo que consiste en una célula, una célula germinal y una semilla procedente de dicha planta, y
 - (ii) comprende una modificación genética en el gen que codifica la proteína IAMT1 que origina que su expresión esté disminuida, bloqueada o inhibida o de lugar a una proteína no funcional.

7. Método para incrementar la fertilidad de una planta que comprende inhibir, disminuir o bloquear

- (i) la expresión del gen que codifica la proteína IAMT1 con respecto a un control o
- (ii) la actividad de la proteína IAMT1.

5

8. Método según la reivindicación 7, en el que la proteína IAMT1 comprende una secuencia de aminoácidos con, al menos, un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 1.

10

9. Método según la reivindicación 7 u 8, en la que el gen que codifica la proteína IAMT1 presenta una delección que origina la pérdida en la proteína del aminoácido Gly en la posición correspondiente al aminoácido 226 con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.

15

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la planta pertenece al género *Solanum* sp., en particular, a la especie *Solanum lycopersicum*.

20

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que se produce un incremento de fertilidad en condiciones de estrés hídrico o estrés térmico.

25

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que la inhibición, la disminución o el bloqueo de la expresión del gen o de la actividad de la proteína se lleva a cabo mediante la técnica CRISPR o TILLING.

30

13. Uso del gen que codifica la proteína IAMT1 para incrementar de fertilidad de la planta.

14. Uso según la reivindicación 13, en la que dicho incremento de fertilidad se produce por inhibición, bloqueo o disminución de la expresión del gen que codifica la proteína IAMT1, o por la expresión de dicho gen de una proteína IAMT1 no funcional.

35

15. Uso según la reivindicación 13 o 14, en la que la proteína IAMT1 comprende una secuencia de aminoácidos con, al menos, un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 1.

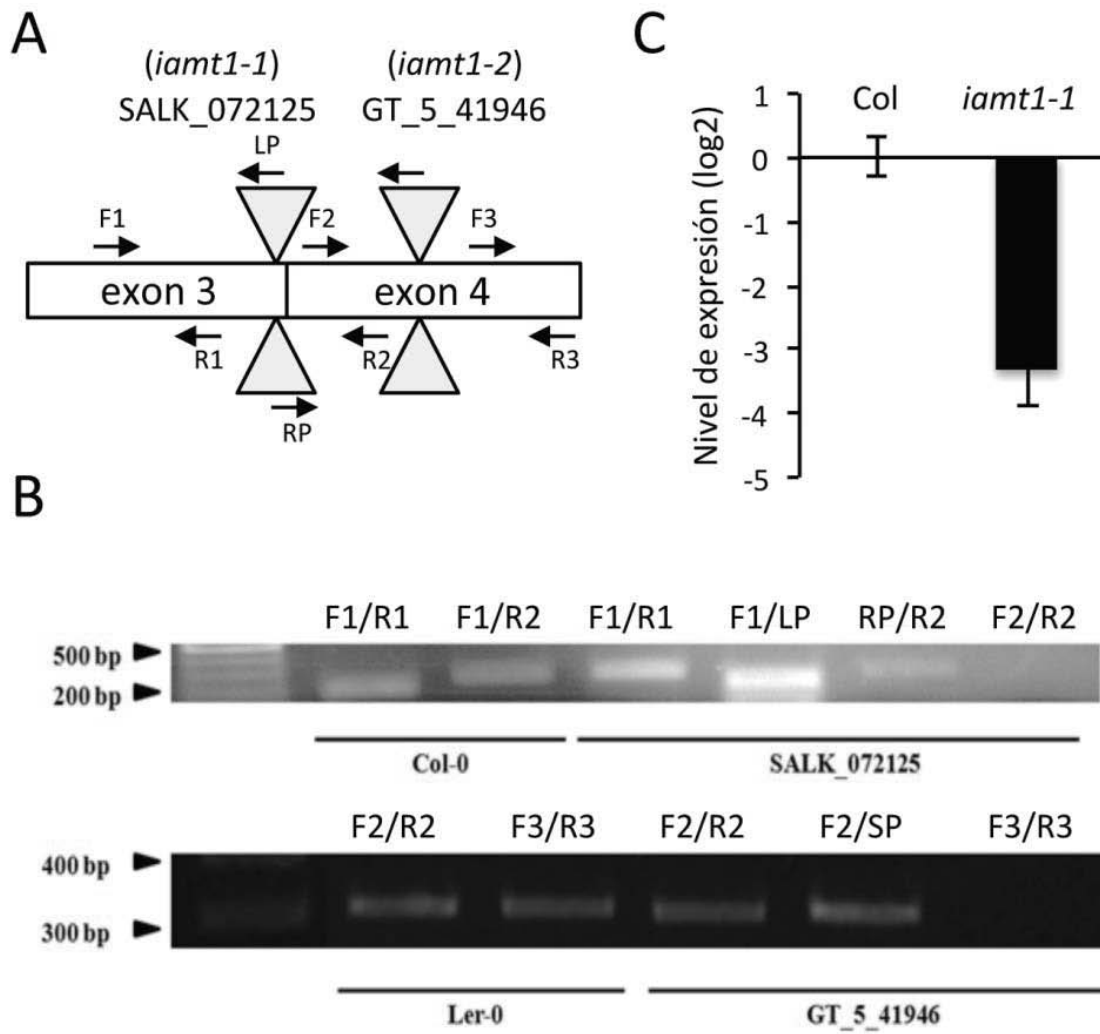


FIG. 1

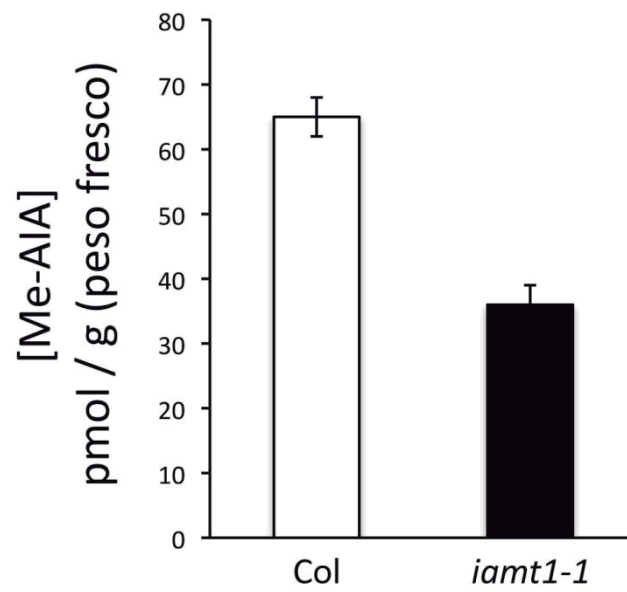


FIG. 2

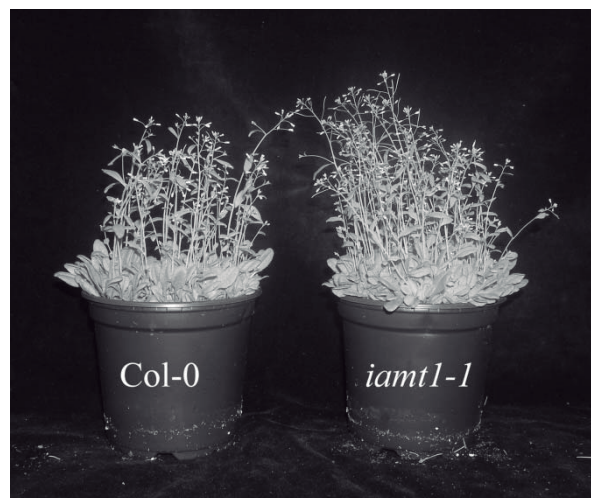


FIG. 3

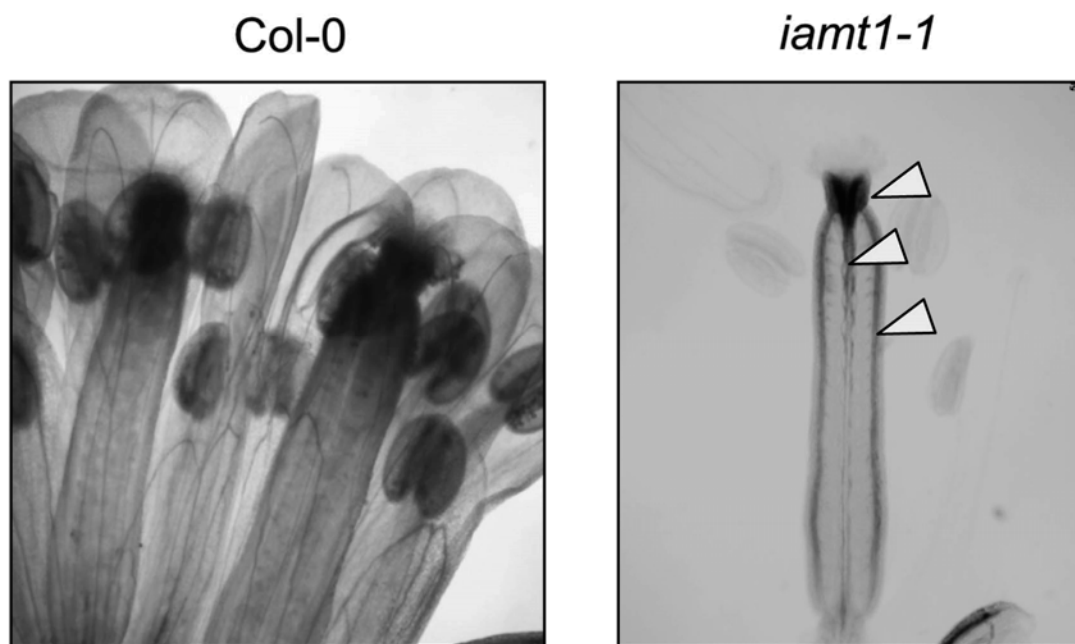


FIG. 4

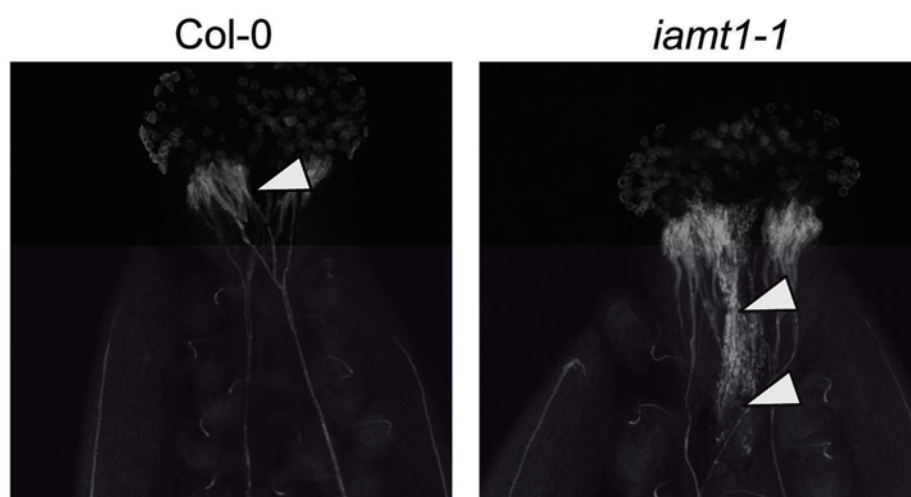


FIG. 5

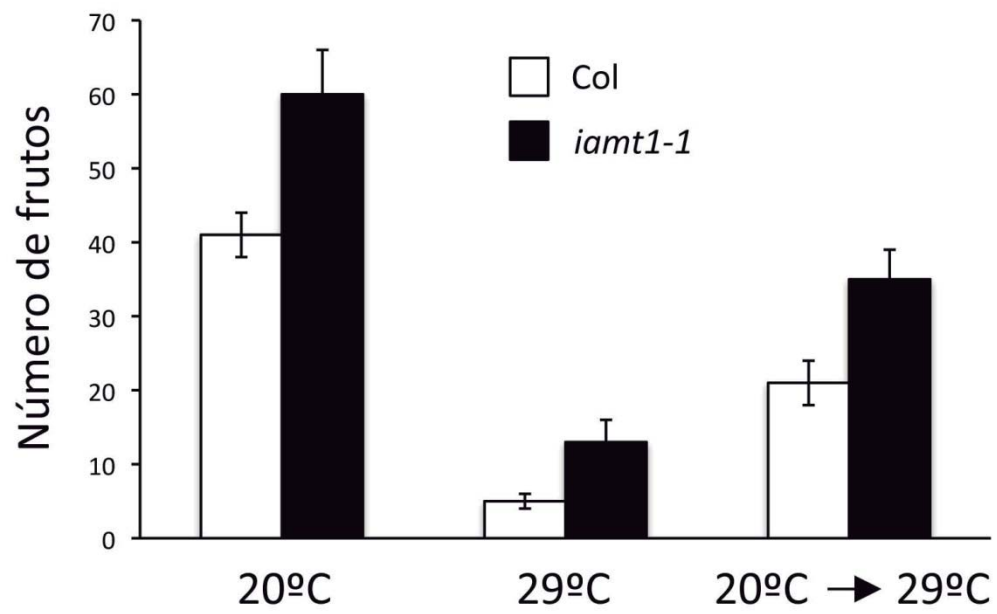


FIG. 6

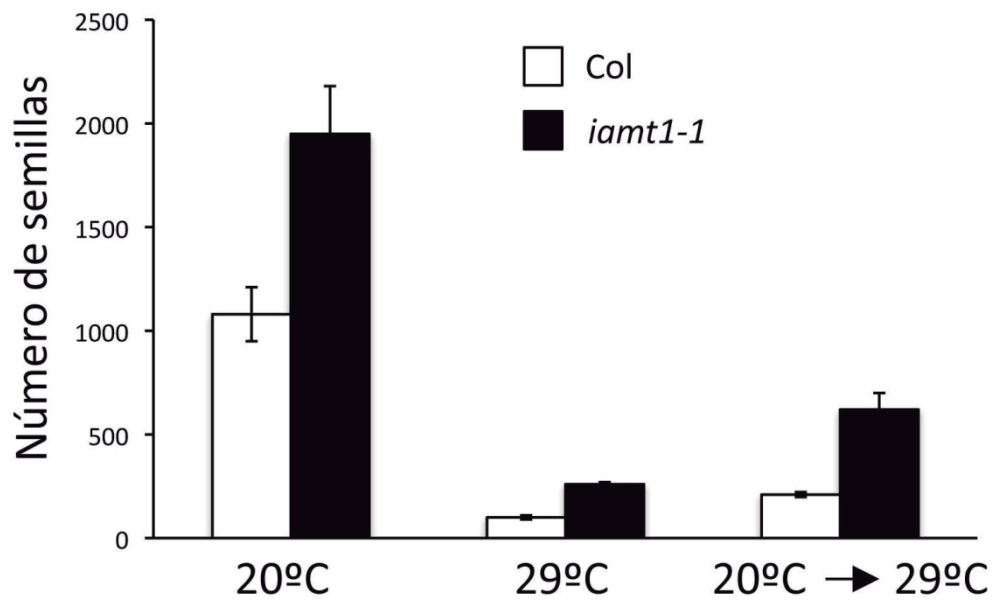


FIG. 7

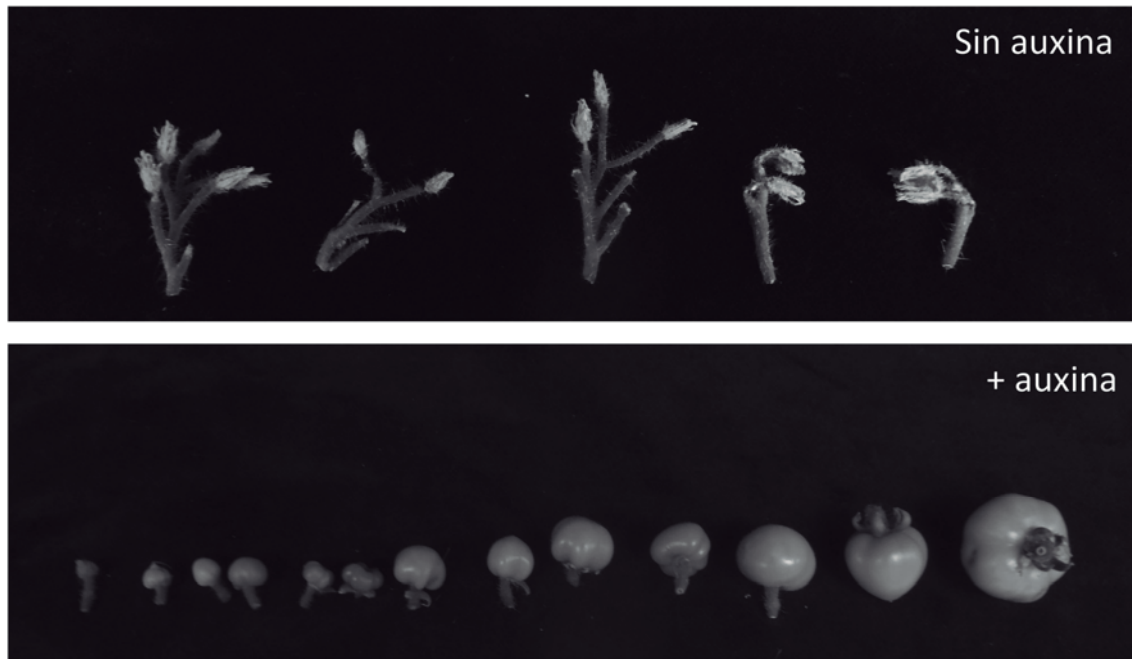


FIG. 8

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universitat Politècnica de València
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

<120> Método para incrementar la fertilidad de las plantas

<130> ES1598.56

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 386
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Gly Ser Lys Gly Asp Asn Val Ala Val Cys Asn Met Lys Leu Glu
1 5 10 15

Arg Leu Leu Ser Met Lys Gly Gly Lys Gly Gln Asp Ser Tyr Ala Asn
20 25 30

Asn Ser Gln Ala Gln Ala Met His Ala Arg Ser Met Leu His Leu Leu
35 40 45

Glu Glu Thr Leu Glu Asn Val His Leu Asn Ser Ser Ala Ser Pro Pro
50 55 60

Pro Phe Thr Ala Val Asp Leu Gly Cys Ser Ser Gly Ala Asn Thr Val
65 70 75 80

His Ile Ile Asp Phe Ile Val Lys His Ile Ser Lys Arg Phe Asp Ala
85 90 95

Ala Gly Ile Asp Pro Pro Glu Phe Thr Ala Phe Phe Ser Asp Leu Pro
100 105 110

Ser Asn Asp Phe Asn Thr Leu Phe Gln Leu Leu Pro Pro Leu Val Ser
115 120 125

Asn Thr Cys Met Glu Glu Cys Leu Ala Ala Asp Gly Asn Arg Ser Tyr
130 135 140

Phe Val Ala Gly Val Pro Gly Ser Phe Tyr Arg Arg Leu Phe Pro Ala
145 150 155 160

Arg Thr Ile Asp Phe Phe His Ser Ala Phe Ser Leu His Trp Leu Ser
165 170 175

Gln Val Pro Glu Ser Val Thr Asp Arg Arg Ser Ala Ala Tyr Asn Arg
180 185 190

Gly Arg Val Phe Ile His Gly Ala Gly Glu Lys Thr Thr Thr Ala Tyr

ES 2 568 693 B1

195

200

205

Lys Arg Gln Phe Gln Ala Asp Leu Ala Glu Phe Leu Arg Ala Arg Ala
210 215 220

Ala Glu Val Lys Arg Gly Gly Ala Met Phe Leu Val Cys Leu Gly Arg
225 230 235 240

Thr Ser Val Asp Pro Thr Asp Gln Gly Gly Ala Gly Leu Leu Phe Gly
245 250 255

Thr His Phe Gln Asp Ala Trp Asp Asp Leu Val Arg Glu Gly Leu Val
260 265 270

Ala Ala Glu Lys Arg Asp Gly Phe Asn Ile Pro Val Tyr Ala Pro Ser
275 280 285

Leu Gln Asp Phe Lys Glu Val Val Asp Ala Asn Gly Ser Phe Ala Ile
290 295 300

Asp Lys Leu Val Val Tyr Lys Gly Gly Ser Pro Leu Val Val Asn Glu
305 310 315 320

Pro Asp Asp Ala Ser Glu Val Gly Arg Ala Phe Ala Ser Ser Cys Arg
325 330 335

Ser Val Ala Gly Val Leu Val Glu Ala His Ile Gly Glu Glu Leu Ser
340 345 350

Asn Lys Leu Phe Ser Arg Val Glu Ser Arg Ala Thr Ser His Ala Lys
355 360 365

Asp Val Leu Val Asn Leu Gln Phe Phe His Ile Val Ala Ser Leu Ser
370 375 380

Phe Thr
385

<210> 2
<211> 390
<212> PRT
<213> Solanum lycopersicum

<400> 2

Met Ala Thr Leu Gly Asp Asn Lys Asp Asn Val Val Val Ser Asn Leu
1 5 10 15

Lys Leu Glu Arg Met Leu Ser Met Lys Gly Gly Lys Gly Glu Ala Ser
20 25 30

Tyr Val Asn Asn Ser Gln Ala Gln Gly Gln His Ala Arg Ser Met Leu
35 40 45

ES 2 568 693 B1

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

ES 2 568 693 B1

Val Val Asn His Pro Asp Asp Ala Ala Glu Val Gly Arg Ala Leu Ala
325 330 335

Ile Ser Cys Arg Ser Val Ser Gly Val Leu Val Asp Ala His Ile Gly
340 345 350

Glu Gln Leu Gly Asp Glu Leu Phe Thr Arg Val Glu Arg Arg Ala Ala
355 360 365

Arg His Ala Lys Glu Leu Ile Glu Lys Leu Gln Phe Phe His Ile Val
370 375 380

Ala Ser Leu Ser Leu Val
385 390

<210> 3
<211> 386
<212> PRT
<213> Brassica napus

<400> 3

Met Gly Ser Lys Gly Asp Asn Val Ala Val Cys Asn Met Lys Leu Glu
1 5 10 15

Arg Leu Leu Ser Met Lys Gly Gly Lys Gly Gln Asp Ser Tyr Ala Asn
20 25 30

Asn Ser Gln Ala Gln Ala Met His Ala Arg Ser Met Leu His Leu Leu
35 40 45

Glu Glu Thr Leu Asp Asn Val His Leu Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ser
50 55 60

Pro Phe Thr Ala Val Asp Leu Gly Cys Ser Ser Gly Ala Asn Thr Ile
65 70 75 80

His Ile Ile Asp Phe Ile Val Lys His Ile Ser Lys Arg Phe Asp Thr
85 90 95

Ala Gly Ile Asp Pro Pro Glu Phe Thr Ala Phe Phe Ser Asp Leu Pro
100 105 110

Asn Asn Asp Phe Asn Thr Leu Phe Gln Leu Leu Pro Pro Leu Val Ser
115 120 125

Asn Ser Cys Met Glu Glu Cys Leu Ala Ala Asp Gly Asn Arg Ser Tyr
130 135 140

Phe Val Ala Gly Val Pro Gly Ser Phe Tyr Arg Arg Leu Phe Pro Ala
145 150 155 160

Arg Thr Ile Asp Ile Phe His Ser Ala Phe Ser Leu His Trp Leu Ser
165 170 175

ES 2 568 693 B1

Gln Val Pro Glu Ser Val Thr Asp Arg Arg Ser Ala Ala Tyr Asn Arg
180 185 190

Gly Arg Val Phe Ile His Gly Ala Gly Glu Lys Ile Ala Thr Ala Tyr
195 200 205

Lys Arg Gln Phe Gln Ala Asp Leu Ala Glu Phe Leu Arg Ala Arg Ala
210 215 220

Ala Glu Val Lys Arg Gly Gly Ala Met Phe Leu Val Cys Leu Gly Arg
225 230 235 240

Thr Ser Val Asp Pro Thr Asp Gln Gly Gly Ala Gly Leu Leu Phe Gly
245 250 255

Thr His Phe Gln Asp Ala Trp Asp Asp Leu Val Ser Glu Gly Leu Val
260 265 270

Ala Ala Glu Lys Arg Asp Gly Phe Asn Ile Pro Val Tyr Ala Pro Ser
275 280 285

Leu Gln Asp Phe Lys Glu Val Val Glu Ala Asp Gly Ser Phe Thr Ile
290 295 300

Glu Lys Leu Val Val Tyr Lys Gly Gly Ser Pro Leu Val Val Ser Glu
305 310 315 320

Pro Asp Asp Ala Ser Glu Val Gly Arg Ala Phe Ala Ser Ser Cys Arg
325 330 335

Ser Val Ala Gly Val Leu Val Glu Ala His Ile Gly Glu Glu Leu Ser
340 345 350

Asn Glu Leu Phe Ser Arg Val Glu Arg Arg Ala Thr Ser His Ala Lys
355 360 365

Asp Val Leu Val Asn Leu Gln Phe Phe His Ile Val Ala Ser Leu Ser
370 375 380

Phe Thr
385

<210> 4
<211> 385
<212> PRT
<213> Cucumis melo

<400> 4

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

ES 2 568 693 B1

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

ES 2 568 693 B1

290

295

300

Lys Leu Glu Val Phe Lys Gly Gly Ser Pro Leu Val Val Asn Gln Pro
305 310 315 320

Asp Asp Ala Ala Glu Val Gly Arg Ala Leu Ala Asn Ser Cys Arg Ser
325 330 335

Val Ser Gly Val Leu Val Asp Ala His Ile Gly Asp Arg Leu Ser Glu
340 345 350

Glu Leu Phe Tyr Arg Val Glu Arg Arg Ala Thr Asn His Ala Lys Asp
355 360 365

Leu Leu Glu Lys Leu Gln Phe Phe His Ile Val Ala Ser Leu Ser Leu
370 375 380

Ala
385

<210> 5
<211> 385
<212> PRT
<213> Cucumis sativus

<400> 5

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

Arg Met Leu Ser Met Lys Gly Gly Lys Gly Glu Thr Ser Tyr Ala Asn
20 25 30

Asn Ser Gln Ala Gln Ala Gln His Ala Arg Ser Met Leu His Leu Leu
35 40 45

Lys Glu Thr Leu Asp Gly Val His Leu Asn Ser Pro Glu Glu Pro Phe
50 55 60

Val Val Val Asp Leu Gly Cys Ser Cys Gly Ser Asn Thr Ile Tyr Ile
65 70 75 80

Ile Asp Val Ile Ile Lys His Ile Ile Lys Arg Phe Glu Ala Leu Ala
85 90 95

Val Asp Pro Pro Glu Phe Thr Ala Phe Phe Ser Asp Leu Pro Gly Asn
100 105 110

Asp Phe Asn Thr Leu Phe Gln Leu Leu Pro Pro Leu Ala Thr Tyr Gly
115 120 125

Gly Ser Met Glu Glu Cys Leu Ala Ala Asp Asn His Arg Ser Tyr Phe
130 135 140

ES 2 568 693 B1

Ala Ala Gly Val Pro Gly Ser Phe Tyr Arg Arg Leu Phe Pro Ala Arg
145 150 155 160

Ser Ile Asp Leu Phe His Ser Ala Phe Ser Leu His Trp Leu Ser Gln
165 170 175

Val Pro Glu Thr Val Val Asp Gly Arg Ser Met Ala Tyr Asn Arg Gly
180 185 190

Arg Val Phe Ile His Gly Ala Asn Glu Ala Ala Ala Glu Ala Tyr Arg
195 200 205

Lys Gln Phe Gln Thr Asp Leu Ala Gly Phe Leu Trp Ala Arg Ala Gln
210 215 220

Glu Leu Lys Arg Gly Gly Ser Met Phe Leu Val Cys Leu Gly Arg Thr
225 230 235 240

Ser Leu Asp Pro Thr Asp Gln Gly Gly Ala Gly Leu Leu Phe Gly Thr
245 250 255

His Phe Gln Asp Ala Trp Asp Asp Leu Val Gln Glu Gly Leu Ile Ser
260 265 270

Asn Glu Lys Arg Asp Ser Phe Asn Ile Pro Val Tyr Ala Pro Ser Leu
275 280 285

Gln Asp Phe Lys Glu Val Val Glu Ala Asp Gly Ser Phe Ser Ile Asn
290 295 300

Lys Leu Glu Val Phe Lys Gly Gly Ser Pro Leu Val Val Asn Gln Pro
305 310 315 320

Asp Asp Ala Ala Glu Val Gly Arg Ala Leu Ala Asn Ser Cys Arg Ser
325 330 335

Val Ser Gly Val Leu Val Asp Ala His Ile Gly Asp Arg Leu Ser Glu
340 345 350

Glu Leu Phe Tyr Arg Val Glu Arg Arg Ala Thr Asn His Ala Lys Asp
355 360 365

Leu Leu Glu Lys Leu Gln Phe Phe His Ile Val Ala Ser Leu Ser Leu
370 375 380

Ala
385

<210> 6
<211> 386
<212> PRT
<213> Fragaria vesca

ES 2 568 693 B1

<400> 6

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

Arg Ile Phe Ser Met Lys Gly Gly Lys Gly Glu Ala Ser Tyr Ala Asn
20 25 30

Asn Ser Gln Ala Gln Ala Ile His Ala Arg Ser Met Leu His Leu Leu
35 40 45

Lys Glu Thr Leu Asp Ser Val Gln Leu Ser Ser Pro Asp Val Pro Phe
50 55 60

Val Val Val Asp Leu Gly Cys Ser Ser Gly Ser Asn Thr Ile Tyr Ile
65 70 75 80

Val Asp Val Ile Ile Lys His Ile Thr Lys Arg Tyr Glu Ala Ser Gly
85 90 95

Ile Asp Pro Pro Glu Phe Ser Ala Phe Phe Ser Asp Leu Pro Ser Asn
100 105 110

Asp Phe Asn Thr Leu Phe Gln Leu Leu Pro Pro Leu Ala Asn Tyr Gly
115 120 125

Ala Gly Ser Met Glu Glu Cys Leu Ala Ala Asp Asn His Arg Ser Tyr
130 135 140

Phe Ala Ala Gly Val Pro Gly Ser Phe Tyr Arg Arg Leu Phe Pro Ser
145 150 155 160

Arg Ser Ile Asp Leu Phe His Ser Ala Phe Ser Leu His Trp Leu Ser
165 170 175

Gln Val Pro Glu Ser Val Val Asp Lys Arg Ser Ala Ala Tyr Asn Lys
180 185 190

Gly Arg Val Phe Ile His Gly Ala Glu Glu Cys Thr Ala Lys Ala Tyr
195 200 205

Lys Lys Gln Tyr Gln Thr Asp Leu Ala Ser Phe Leu Leu Ala Arg Ser
210 215 220

Lys Glu Met Lys Lys Gly Gly Ser Met Phe Leu Val Cys Leu Gly Arg
225 230 235 240

Thr Ser Val Asp Pro Thr Asp Gln Gly Gly Pro Gly Ile Leu Phe Gly
245 250 255

Thr His Phe Gln Asp Ala Trp Asp Asp Leu Leu Gln Glu Gly Leu Ile
260 270

ES 2 568 693 B1

Thr Ser Glu Lys Arg Asp Thr Phe Asn Ile Pro Val Tyr Ala Ser Ser
275 280 285

Leu Gln Asp Phe Lys Glu Val Val Glu Ala Asp Gly Ser Phe Thr Ile
290 295 300

Asn Lys Leu Glu Ile Phe Lys Gly Gly Ser Pro Leu Val Val Asn Gln
305 310 315 320

Pro Asp Asp Ala Ala Glu Val Gly Arg Ala Leu Ala Asn Ser Cys Arg
325 330 335

Ser Val Ala Gly Val Leu Val Asp Ala His Ile Gly Glu Lys Leu Ser
340 345 350

Asn Glu Leu Phe Leu Arg Val Glu Lys Arg Gly Ala Ser His Ala Lys
355 360 365

Glu Leu Leu Glu Lys Leu Gln Phe Ser His Ile Val Ala Ser Leu Ser
370 375 380

Phe Leu
385

<210> 7
<211> 383
<212> PRT
<213> Glycine max
<400> 7

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

Ser Met Lys Gly Gly Lys Gly Glu Gly Ser Tyr Ala Asn Asn Ser Gln
20 25 30

Ala Gln Ala Ile His Ala Lys Ser Met His His Leu Leu Lys Glu Ala
35 40 45

Leu Asp Gly Val Gln Leu Gln Ala Pro Asn Met Pro Phe Val Val Val
50 55 60

Asp Leu Gly Cys Ser Cys Gly Ser Asn Thr Ile Asn Val Val Asp Leu
65 70 75 80

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

Pro Glu Phe Ser Ala Phe Phe Ser Asp Leu Pro Ser Asn Asp Phe Asn
100 105 110

ES 2 568 693 B1

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

<210> 8

ES 2 568 693 B1

<211> 389
 <212> PRT
 <213> Solanum tuberosum
 <400> 8

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

ES 2 568 693 B1

Leu Phe Gly Thr His Phe Gln Asp Ala Trp Asp Asp Leu Val Gln Glu
260 265 270

Gly Leu Ile Thr Ser Glu Lys Arg Asp Asn Phe Asn Ile Pro Val Tyr
275 280 285

Ala Pro Ser Ile Gln Asp Phe Lys Glu Val Val Glu Ala Asn Gly Ser
290 295 300

Phe Thr Ile Asn Asn Leu Gln Val Phe Arg Gly Gly Ser Pro Leu Val
305 310 315 320

Val Asn His Pro Asp Asp Thr Ala Glu Val Gly Arg Ala Leu Ala Ile
325 330 335

Ser Cys Arg Ser Val Ser Gly Val Leu Val Asp Ala His Ile Gly Glu
340 345 350

Gln Leu Gly Asp Glu Leu Phe Thr Arg Val Glu Arg Arg Ala Ser Arg
355 360 365

His Ala Lys Glu Leu Ile Glu Lys Leu Gln Phe Phe His Ile Val Ala
370 375 380

Ser Leu Ser Leu Val
385

<210> 9
<211> 385
<212> PRT
<213> Malus domestica

<400> 9

Met Ala Pro Lys Gly Asp Asn Leu Val Val Ser Ser Ile Lys Leu Glu
1 5 10 15

Lys Ile Phe Ser Met Lys Gly Gly Lys Gly Glu Ser Ser Tyr Ala Asn
20 25 30

Asn Ser Gln Ala Gln Ala Ile His Ala Arg Ser Met Leu His Leu Leu
35 40 45

Lys Glu Thr Leu Asp Ser Val Gln Leu Ser Ser Pro Glu Val Pro Phe
50 55 60

Val Val Val Asp Leu Gly Cys Ser Ser Gly Ser Asn Thr Ile Tyr Ile
65 70 75 80

Ile Asp Val Ile Ile Lys His Met Thr Lys Arg Tyr Glu Asp Leu Gly
85 90 95

Gly Asp Pro Pro Glu Phe Ser Ala Phe Phe Ser Asp Leu Pro Ser Asn

ES 2 568 693 B1

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

Ala
385

<210> 10
<211> 385
<212> PRT
<213> Jatropha curcas

<400> 10

Met Ala Ser Asn Gly Asp Asn Val Val Val Ser Asp Met Lys Leu Glu
1 5 10 15

Lys Leu Leu Cys Met Lys Gly Gly Lys Gly Glu Ala Ser Tyr Ala Asn
20 25 30

Asn Ser Gln Ala Gln Ala Ile His Ala Arg Ser Met Leu His Leu Leu
35 40 45

Glu Glu Thr Leu Asp Lys Val Gln Leu Asn Ser Ala Glu Val Pro Phe
50 55 60

Gln Val Val Asp Leu Gly Cys Ser Ser Gly Asn Asn Thr Ile Tyr Ile
65 70 75 80

Ile Glu Val Ile Ile Lys His Met Ile Lys Arg Tyr Glu Ser Ala Gly
85 90 95

Leu Glu Pro Pro Glu Phe Ser Ala Cys Phe Ser Asp Leu Pro Ser Asn
100 105 110

Asp Phe Asn Thr Leu Phe Gln Leu Leu Pro Pro Leu Ala Asn Tyr Gly
115 120 125

Gly Ser Met Glu Glu Cys Leu Ala Ala Ser Gly His Arg Asn Tyr Phe
130 135 140

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

Thr Ile Asp Val Phe His Ser Ala Phe Ser Leu His Trp Leu Ser Gln
165 170 175

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

Arg Val Phe Ile His Gly Ala Ser Glu Ser Thr Ser Asn Ala Tyr Lys
195 200 205

Lys Gln Phe Gln Thr Asp Leu Ala Gly Phe Leu Arg Ala Arg Ser Gln
210 215 220

ES 2 568 693 B1

Glu Met Lys Arg Gly Gly Ser Met Phe Leu Val Cys Leu Gly Arg Thr
225 230 235 240

Ser Val Asp Pro Thr Asp Gln Gly Gly Ala Gly Leu Leu Phe Gly Thr
245 250 255

His Phe Gln Asp Ala Trp Asp Asp Leu Val Gln Glu Gly Leu Ile Thr
260 265 270

Ser Glu Glu Arg Asp Asn Phe Asn Ile Pro Val Tyr Ala Pro Ser Leu
275 280 285

Gln Asp Phe Lys Glu Val Val Glu Ala Asp Gly Ser Phe Val Ile Asn
290 295 300

Lys Leu Glu Val Phe Lys Gly Gly Ser Pro Leu Val Val Asp Arg Pro
305 310 315 320

Asp Asn Ala Ala Glu Val Gly Arg Ala Leu Ala Asn Ser Cys Arg Ser
325 330 335

Val Ser Gly Val Leu Val Asp Ala His Ile Gly Glu Arg Leu Ser Gly
340 345 350

Glu Leu Phe Leu Arg Val Glu Cys Arg Gly Ala Arg His Ala Lys Glu
355 360 365

Leu Leu Glu Lys Leu Gln Phe Phe His Ile Val Ala Ser Leu Ser Ile
370 375 380

Ala
385

<210> 11
<211> 385
<212> PRT
<213> Prunus persica

<400> 11

Met Ala Pro Lys Gly Asp Asn Val Val Val Ser Ser Ile Lys Leu Glu
1 5 10 15

Lys Ile Phe Ser Met Lys Gly Gly Lys Gly Glu Ser Ser Tyr Ala Asn
20 25 30

Asn Ser Gln Ala Gln Ala Ile His Ala Arg Ser Met Leu His Leu Leu
35 40 45

Lys Glu Thr Leu Asp Asn Val Gln Leu Ser Ser Pro Gln Val Pro Phe
50 55 60

Val Val Val Asp Leu Gly Cys Ser Ser Gly Ser Asn Thr Ile Tyr Ile
65 70 75 80

ES 2 568 693 B1

Ile Asp Val Ile Ile Lys His Met Ala Lys Arg Tyr Glu Ala Leu Gly
85 90 95

Cys Glu Pro Pro Glu Phe Ser Ala Phe Phe Ser Asp Leu Pro Ser Asn
100 105 110

Asp Phe Asn Thr Leu Phe Gln Leu Leu Pro Pro Met Ala Asn His Gly
115 120 125

Gly Ser Met Glu Glu Thr Leu Ala Ala Asp Ser His Arg Ser Tyr Phe
130 135 140

Ala Ala Gly Val Pro Gly Ser Phe Tyr Arg Arg Leu Phe Pro Ser Arg
145 150 155 160

Ser Ile Asp Leu Phe His Ser Ala Phe Ser Leu His Trp Leu Ser Gln
165 170 175

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

Arg Val Phe Ile His Gly Ala Asn Glu Ser Thr Ala Ile Ala Tyr Lys
195 200 205

Lys Gln Phe Gln Thr Asp Leu Ala Ser Phe Leu Arg Ser Arg Ala Lys
210 215 220

Glu Leu Lys Lys Gly Gly Ser Met Phe Leu Val Cys Leu Gly Arg Thr
225 230 235 240

Ser Val Asp Pro Thr Asp Gln Ser Gly Pro Gly Leu Leu Phe Gly Thr
245 250 255

His Phe Gln Asp Ala Trp Asp Asp Leu Val Gln Glu Gly Leu Ile Thr
260 265 270

Asn Glu Lys Arg Asp Ser Phe Asn Ile Pro Val Tyr Ala Ser Ser Leu
275 280 285

Gln Asp Phe Lys Glu Val Val Glu Asp Val Gly Ser Phe Thr Ile Asn
290 295 300

Lys Leu Glu Ile Phe Lys Gly Gly Ser Pro Leu Val Val Asn Gln Pro
305 310 315 320

Asp Asp Ala Ala Glu Val Gly Arg Ala Leu Ala Asn Ser Cys Arg Ser
325 330 335

Val Ala Gly Val Leu Val Asp Ala His Ile Gly Asp His Leu Gly Asn
340 345 350

ES 2 568 693 B1

Glu Leu Phe Ala Arg Val Glu Gln Arg Gly Thr Gly Gln Ser Lys Glu
355 360 365

Leu Leu Glu Gln Leu Gln Phe Leu His Ile Val Ala Ser Leu Ser Leu
370 375 380

Ala
385

<210> 12
<211> 424
<212> PRT
<213> Theobroma cacao

<400> 12

Met Ala Pro Met Gly Asp Asn Val Val Val Ser Asn Val Asn Leu Glu
1 5 10 15

Lys Leu Leu Ser Met Lys Gly Gly Lys Gly Glu Gly Ser Tyr Ala Asn
20 25 30

Asn Ser Gln Ala Gln Leu Trp Gly Phe Gly Leu Ser Pro Met Gln Ala
35 40 45

Leu His Ala Arg Ser Met Leu His Leu Leu Glu Glu Ser Leu Asp Gly
50 55 60

Val His Leu Asn Ser Pro Glu Val Pro Phe Val Val Val Asp Leu Gly
65 70 75 80

Cys Ser Cys Ser Asn Asn Ser Ile Tyr Ile Val Asp Val Ile Ile Lys
85 90 95

His Met Ile Lys Arg Tyr Glu Ser Ser Asp Arg Trp Asp Gln Pro Pro
100 105 110

Glu Phe Thr Ala Phe Phe Ser Asp Leu Pro Ser Asn Asp Phe Asn Thr
115 120 125

Leu Phe Gln Leu Leu Pro Pro Leu Ala Asn Tyr Asn Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Met Glu Glu Cys Leu Ala Ser Asn Gly His Arg Ser Tyr Phe Ala Ala
145 150 155 160

Gly Val Pro Gly Ser Phe Tyr Arg Arg Leu Phe Pro Ala Arg Ser Ile
165 170 175

Asp Val Phe His Ser Ala Phe Ser Leu His Trp Leu Ser Gln Met Pro
180 185 190

Glu Thr Val Leu Asp Arg Arg Ser Thr Ala Tyr Asn Lys Gly Arg Val

ES 2 568 693 B1

195	200	205
Phe Ile His Gly Ala Ser Glu Ser Thr Ala Ser Ala Tyr Arg Lys Gln		
210	215	220
Phe Gln Thr Asp Leu Ala Ala Phe Leu Arg Ala Arg Ser Ile Glu Met		
225	230	235
Lys Arg Gly Gly Ser Met Phe Leu Val Cys Leu Gly Arg Thr Ser Val		
245	250	255
Asp Pro Ser Asp Gln Gly Gly Ala Gly Leu Leu Phe Gly Thr His Phe		
260	265	270
Gln Asp Ala Trp Asp Asp Leu Val Gln Glu Gly Leu Ile Ser Ser Glu		
275	280	285
Lys Arg Asp Asn Phe Asn Ile Pro Val Tyr Ala Pro Ser Leu Gln Asp		
290	295	300
Phe Lys Glu Val Val Glu Ala Asp Gly Ser Phe Thr Ile Asn Lys Leu		
305	310	315
Glu Val Phe Lys Gly Gly Ser Pro Leu Val Val Ser Arg Pro Asp Asp		
325	330	335
Ala Thr Glu Val Gly Arg Ala Leu Ala Asn Ser Cys Arg Ser Ile Ser		
340	345	350
Gly Val Leu Val Asp Ala His Ile Gly Asp Lys Leu Ser Glu Glu Leu		
355	360	365
Phe Leu Arg Val Glu Arg Arg Ala Thr Ser His Ala Lys Glu Leu Leu		
370	375	380
Glu Gln Leu Gln Phe Phe His Ile Val Ala Ser Leu Cys Leu Ser Leu		
385	390	395
Glu Lys Phe Ser Leu Gly Leu Glu Glu Val Cys Ala Phe Ser Pro Thr		
405	410	415
Lys Asp Gly Lys Thr Leu Leu Glu		
420		
<210> 13		
<211> 385		
<212> PRT		
<213> Citrus sinensis		
<400> 13		
Met Ala Pro Lys Gly Asn Asp Val Ile Val Ser Asp Arg Lys Leu Glu		
1	5	10
		15

ES 2 568 693 B1

Met Ile Leu Ser₂₀ Met Lys Gly Gly Asn₂₅ Gly Glu Ala Ser Tyr₃₀ Ala Asn
 Asn Ser Gln₃₅ Ala Gln Ala Ile His₄₀ Ala Gln Ser Met₄₅ Leu His Leu Leu
 Arg Glu₅₀ Thr Leu Asp Asn₅₅ Ile Gln Leu Met Glu₆₀ Pro Pro Ser Glu Thr
 Ile₆₅ Pro Phe Ala Leu Ala₇₀ Asp Leu Gly Cys₇₅ Cys Gly Asn Asn₈₀ Thr
 Leu Tyr Ile Val₈₅ Asp Val Ile Ile Lys His₉₀ Ile Ser Lys Arg Tyr₉₅ Glu
 Ala Ser Gly Tyr₁₀₀ Glu Pro Pro Glu Phe₁₀₅ Ser Ala Phe Phe₁₁₀ Ser Asp Leu
 Pro Ser Asn₁₁₅ Asp Phe Asn Thr₁₂₀ Leu Phe Gln Leu Leu₁₂₅ Pro Pro Ile Gly
 Ser₁₃₀ Ser Met Glu Glu Cys₁₃₅ Leu Ala Ser Asp Thr₁₄₀ His Arg Ser Tyr Phe
 Ala₁₄₅ Ala Gly Val Pro Gly₁₅₀ Ser Phe Tyr Arg₁₅₅ Leu Phe Pro Thr Arg₁₆₀
 Ser Ile Asp Phe₁₆₅ Phe His Ser Ala Phe₁₇₀ Ser Leu His Trp Leu₁₇₅ Ser Gln
 Val Pro Glu₁₈₀ Ser Ala Leu Asp Lys₁₈₅ Arg Ser Met Ala Tyr₁₉₀ Asn Lys Gly
 Lys Val Tyr₁₉₅ Ile His Gly Ala Asn₂₀₀ Glu His Thr Ala₂₀₅ Asn Ala Tyr Lys
 Lys Gln₂₁₀ Phe Gln Thr Asp Leu₂₁₅ Ala Ala Phe Leu Gly₂₂₀ Ala Arg Ser Lys
 Glu₂₂₅ Met Lys Arg Cys Gly₂₃₀ Ser Met Phe Leu Val₂₃₅ Cys Leu Gly Arg Thr₂₄₀
 Ser Ala Asp Pro Thr₂₄₅ Asp Gln Gly Gly₂₅₀ Pro Gly Ile Leu Phe Gly₂₅₅ Thr
 His Phe Gln₂₆₀ Asp Ala Trp Asn Asp₂₆₅ Leu Val Gln Glu Gly₂₇₀ Leu Ile Thr
 Gly Glu Lys₂₇₅ Arg Asp Ser Phe Asn₂₈₀ Ile Pro Val Tyr₂₈₅ Ala Ser Ser Leu

ES 2 568 693 B1

Gln Glu Phe Lys Glu Val Val Glu Ala Asn Gly Ser Phe Val Ile Asn
290 295 300

Lys Leu Glu Val Phe Lys Gly Gly Ser Pro Leu Val Val Lys Gln Pro
305 310 315 320

Asp Asp Ala Ala Glu Val Gly Gln Ala Leu Ala Asn Ser Cys Arg Ser
325 330 335

Val Ala Gly Val Leu Val Asp Ala His Ile Gly Asp Gln Leu Ser Glu
340 345 350

Glu Leu Phe Lys Arg Val Glu Arg Arg Gly Ser Cys Tyr Ala Lys Glu
355 360 365

Leu Ile Glu Gln Leu Gln Phe Phe His Ile Val Ala Ser Leu Ser Phe
370 375 380

Ala
385

<210> 14
<211> 387
<212> PRT
<213> Vitis vinifera

<400> 14

Met Ala Pro Arg Gly Glu Asn Asn Ile Val Val Val Pro Asn Met Lys
1 5 10 15

Leu Glu Lys Val Phe Cys Met Lys Gly Gly Asn Gly Glu Gly Ser Tyr
20 25 30

Ala Asn Asn Ser Gln Ala Gln Ala Arg His Ala Arg Ser Met Leu His
35 40 45

Leu Leu Arg Glu Thr Leu Asp Gly Val Gln Leu Thr Ser Pro Glu Val
50 55 60

Pro Phe Thr Val Val Asp Leu Gly Cys Ser Ser Gly Ser Asn Thr Ile
65 70 75 80

Phe Thr Ile Glu Thr Ile Ile Lys His Met Ser Lys Arg Tyr Glu Glu
85 90 95

Ala Gly Phe Lys Pro Pro Glu Phe Ser Ala Phe Phe Ser Asp Leu Pro
100 105 110

Ser Asn Asp Phe Asn Thr Leu Phe Gln Leu Leu Pro Pro Ile Ala Asp
115 120 125

Pro Gly Val Ser Met Glu Glu Tyr Leu Ala Ala Lys Gly His Arg Ser
130 135 140

ES 2 568 693 B1

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

<210> 15
 <211> 404
 <212> PRT

ES 2 568 693 B1

<213> Oryza sativa

<400> 15

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

Ala Ala Ala Ala Pro Arg Met Lys Lys Leu Ala Ser Met Leu Cys Met
20 25 30

Lys Gly Gly Asn Gly Asp Gly Ser Tyr Leu Asn Asn Ser Gln Ala Gln
35 40 45

Ala Leu His Ala Arg Arg Met Leu His Phe Leu Glu Glu Thr Leu Asp
50 55 60

Ala Met Met Glu Arg Ser Ser Ser Asp Lys Leu Phe Thr Ala Ala Asp
65 70 75 80

Leu Gly Cys Ser Cys Gly Ser Asn Ser Leu Phe Ile Val Asp Val Ile
85 90 95

Val Arg Arg Val Ser Glu Ala Tyr Glu Ser Arg Gly Arg Asp Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Gln Val Phe Phe Ser Asp Leu Pro Ser Asn Asp Phe Asn Thr
115 120 125

Leu Phe Gln Leu Leu Pro Pro Leu Leu Ala Pro Val Ala Gly Ser Leu
130 135 140

Glu Glu Cys Leu Ala Ala Gly Glu Gly Ala Ala Thr Ala Thr Arg Pro
145 150 155 160

Tyr His Ala Ala Gly Val Pro Gly Thr Phe Tyr Gly Arg Leu Phe Pro
165 170 175

Gly Glu Ser Ile Asp Val Phe Thr Ser Thr Phe Ser Leu His Trp Leu
180 185 190

Ser Gln Val Pro Glu Glu Val Gly Asp Ser Ala Ser Pro Ala Tyr Asn
195 200 205

Gly Gly Arg Val Phe Val His Arg Ala Thr Glu Ala Val Ala Ala Ala
210 215 220

Tyr Lys Arg Gln Phe Gln Ala Asp Leu Ala Arg Phe Leu Arg Ser Arg
225 230 235 240

Ala Arg Glu Met Lys Arg Gly Gly Ala Met Phe Leu Ala Cys Leu Gly
245 250 255

Arg Ser Ser Gly Asp Pro Ala Asp Gln Gly Gly Ala Gly Leu Leu Phe

ES 2 568 693 B1

260

265

270

Gly Thr His Phe Gln Asp Ala Trp Asp Asp Leu Val Gln Glu Gly Val
275 280 285

Val Glu Gly Glu Lys Arg Asp Ser Phe Asn Ile Pro Val Tyr Ala Pro
290 295 300

Ser Leu Gln Glu Phe Arg Asp Val Val Arg Ala Asp Gly Ala Phe Ala
305 310 315 320

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Val Arg Gly Gly Ser Pro Leu Val Val Asp
325 330 335

Arg Pro Asp Asp Ala Ala Glu Val Gly Arg Ala Met Ala Asn Ser Cys
340 345 350

Lys Ala Val Ala Gly Val Leu Val Asp Ala His Ile Gly Glu Arg Arg
355 360 365

Gly Ala Gln Leu Phe Glu Arg Leu Glu Arg Arg Ala Ala Arg His Ala
370 375 380

Arg Glu Leu Val Glu Lys Met His Phe Phe His Val Val Cys Ser Leu
385 390 395 400

Ser Leu Ala Pro

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador F1 para el Genotipado de alelos iamt1

<400> 16
tgccggagag aagacaaca c

21

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador R1 para el genotipado de alelos iamt1

<400> 17
ttaagagag gtggggccat g

21

<210> 18
<211> 17
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223>	Cebador F2 para el genotipado de alelos iamt1	
<400>	18	
	cgccaacggc tcatttg	17
<210>	19	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador R2 para el genotipado de iamt1	
<400>	19	
	catcagaagt tggctcgtgcc t	21
<210>	20	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador F3 para el genotipado de alelos iamt1	
<400>	20	
	tgttctcacg agttgaaagc cgagc	25
<210>	21	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador R3 para el genotipado de alelos iamt1	
<400>	21	
	aaactaaaat agataaagtc tttgtacc	28
<210>	22	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador LP para el genotipado de alelos imat1	
<400>	22	
	attttgccga tttcggaac	19
<210>	23	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador SP para el genotipado de alelos iamt1	
<400>	23	
	tacgaataag agcgtccatt ttagagt	27
<210>	24	
<211>	29	
<212>	DNA	

<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador qRT1 para el análisis de la expresión de IAMT1	
<400>	24	
	ttaaagagag aaggagagat ccatagaga	29
<210>	25	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador qRT2 para el análisis de la expresión de IAMT1	
<400>	25	
	gccacctttc atgctgagaa g	21
<210>	26	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador EF-F para el análisis de la expresión del gen control EF1a	
<400>	26	
	attggaaacg gatatgctcc a	21
<210>	27	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador EF-R para el análisis de la expresión del gen control EF1a	
<400>	27	
	ccttacctga acgcctgtca	20