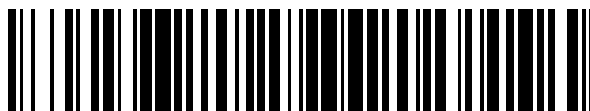


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 992**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2010 PCT/EP2010/059880**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO11004003**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2010 E 10737815 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2451959**

54 Título: **La disrupción de la CKX3 y al menos otro gen de CKX en una planta o célula vegetal produce mejoras en los rasgos genéticos**

30 Prioridad:

**10.07.2009 EP 09165164**

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

**05.07.2017**

73 Titular/es:

**SCHMÜLLING, THOMAS (33.3%)  
Preussenallee 30  
14052 Berlin, DE;  
BARTRINA Y MANNS, ISABEL (33.3%) y  
WERNER, TOMAS (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SCHMÜLLING, THOMAS;  
BARTRINA Y MANNS, ISABEL y  
WERNER, TOMAS**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 621 992 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## La interrupción de la CKX3 y al menos otro gen de CKX en una planta o célula vegetal produce mejoras en los rasgos genéticos

### Descripción

- 5
- [0001] Para poder proveer a una población en continuo crecimiento con alimentos y otros productos derivados de las plantas, las personas siempre han estado interesadas en mejorar la productividad de la agricultura.
- 10
- [0002] La productividad de una planta puede verse influida de diversas formas; por ejemplo, mejorando las características de crecimiento de la planta o retrasando la senescencia de las hojas. Existen muchos mecanismos y medios relacionados con el crecimiento y el desarrollo de las plantas.
- 15
- [0003] La citoquinina es una hormona vegetal que desempeña funciones de regulación positivas y negativas en muchos aspectos del crecimiento y el desarrollo de las plantas. Estimula la formación y la actividad de meristemos apicales, puede establecer tejidos demanda ('sink tissues', en inglés) y retrasar la senescencia de las hojas, inhibe el crecimiento de las raíces y la formación de ramas, y desempeña un papel en la germinación de las semillas y en las respuestas al estrés (Mok, D. W. S. & Mok, M. C. (2001) Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Bio. 52, 89-118). El análisis de las plantas con deficiencias de citoquinina ha mostrado que la citoquinina desempeña papeles opuestos en los meristemos apicales y radiculares y sugiere que la hormona tiene una función esencial en el control cuantitativo del crecimiento de los órganos (Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmulling T, 'Plant Cell' 2003,15(11):2532-50; Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T, Proc Natl Acad Sci U S A 2001, 98(18):10487-92).
- 20
- [0004] Las citoquininas oxidasa/deshidrogenasa (CKX, por sus siglas en inglés) son un factor importante para regular la homeostasis de la hormona vegetal citoquinina. El genoma de *Arabidopsis* codifica siete genes de CKX que tienen diferentes dominios de expresión (Werner et al., 2001; Werner et al., 2003). Las proteínas de CKX difieren en su localización subcelular y en sus características bioquímicas (Werner et al., 2003). La sobreexpresión de genes individuales de CKX determinó las plantas con deficiencias de citoquinina y reveló que la citoquinina es un regulador positivo de la actividad de los meristemos apicales y un regulador negativo de la actividad de los meristemos radiculares.
- 25
- [0005] Recientemente, se ha demostrado que la inhibición de una función de un gen de CKX particular de una planta de arroz, el ortólogo del arroz para la CKX3 de *Arabidopsis thaliana*, provoca un aumento del número de partículas fértiles de dicha planta de arroz (ver US 2006/0123507 A1). A pesar de que estos resultados son prometedores, sigue existiendo una necesidad de mejorar aún más la productividad de las plantas.
- 30
- [0006] Es objeto de la presente invención proporcionar los medios y métodos adecuados para producir plantas transgénicas con una productividad y/o características mejoradas.
- 35
- [0007] La presente invención alcanzará este objetivo del modo que se expone en las reivindicaciones y que se explicará con detalle a continuación.
- 40
- [0008] La presente invención proporciona plantas transgénicas y células vegetales aisladas tal y como se explica en las reivindicaciones, de manera que la expresión y/o actividad de al menos dos genes de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa diferentes se inhibe mediante una interrupción (también llamada 'interrupción' o 'alteración') en comparación con una célula vegetal de control o una planta de control que carecen de dichas interrupciones, y de manera que el primer gen de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa es un gen endógeno que codifica la CKX3 o un ortólogo suyo, y el segundo gen de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa y es diferente a la CKX3 o el ortólogo suyo.
- 45
- [0009] De forma sorprendente, se ha descubierto que en una planta la interrupción simultánea del gen de CKX3 y un segundo gen de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que codifica una de entre CKX2, CKX4, CKX5 o CKX6 da como resultado plantas transgénicas con un rendimiento o producción de semillas que es superior al de una planta que carece de dichas interrupciones o al de plantas transgénicas en las que solo se interrumpe un gen de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa. Mientras que la interrupción única o simple de CKX3 produjo un ligero (pero no significativo) aumento del rendimiento de semillas, tal y como se explica en US 2006/0123507 A1, la interrupción única de CKX5 no tuvo ningún efecto apreciable en el rendimiento de semillas.
- 50
- [0010] De forma sorprendente, la interrupción simultánea de CKX3 y una entre CKX2, CKX4, CKX5 o CKX6, pero no la interrupción simultánea de CKX2 y CKX4, o CKX2 y CKX4 y CKX5, o CKX4 y CKX6, o CKX5 y CKX6, provocó un aumento significativo del rendimiento de semillas en comparación con las interrupciones simples y de tipo natural de CKX3 y CKX5. El aumento más significativo del rendimiento de semillas se observó en el caso de la interrupción simultánea de CKX3 y CKX5. De forma incluso más sorprendente, se descubrió que la interrupción simultánea de CKX3 y una entre CKX2, CKX4, CKX5 o CKX6, y en particular CKX3 y CKX5, producía plantas transgénicas con una altura de planta significativamente mejorada en comparación con las plantas de tipo natural y las plantas transgénicas que contenían interrupciones simples de CKX3 o CKX5. Así, la interrupción simultánea de al menos CKX3
- 55
- 60
- 65

y un gen endógeno adicional que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa, preferiblemente CKX1, CKX2, CKX4, CKX5, CKX6 o CKX7, produce plantas transgénicas con una productividad y/o características de crecimiento mejoradas.

5 **[0011]** En un primer aspecto, la presente invención está relacionada con una célula vegetal aislada -tal y como se determina en las reivindicaciones- que comprende una disrupción en al menos:

10 i) un gen de CKX3 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con 'SEQ ID No. 1' ('Identificador de secuencia nº 1') o un ortólogo suyo; y

ii) un gen endógeno adicional que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa y que es diferente al gen especificado en i);

15 de manera que las citadas disrupciones inhiben la expresión y/o actividad de un producto de los -al menos- dos genes de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa interrumpidos ('disrupted', en inglés) en comparación con la correspondiente célula vegetal de control que carece de dichas disrupciones.

20 **[0012]** En un segundo aspecto, la presente invención está dirigida a una planta transgénica -tal y como se determina en las reivindicaciones- que comprende una disrupción en al menos:

i) un gen de CKX3 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 1 ó un ortólogo suyo; y

25 ii) un gen endógeno adicional que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa y que es diferente al gen especificado en i);

30 de manera que las citadas disrupciones inhiben la expresión y/o actividad de un producto de -al menos- los dos genes de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa interrumpidos en comparación con la correspondiente planta de control que carece de dichas disrupciones. Debe entenderse que, para los propósitos de la presente invención, el término 'planta transgénica' no solo comprende una planta que contiene las disrupciones de la invención como tales, sino que también hace referencia a cualquier progenie de esta, independientemente del número de generación; esto es, el término 'planta transgénica' abarca la progenie de la primera generación, así como la progenie de la generación nº X, siempre y cuando dicha progenie aún contenga las disrupciones de la invención que contiene la planta transgénica madre.

35 **[0013]** En un tercer aspecto, la invención está relacionada con un método -tal y como se explica en las reivindicaciones- para aumentar el rendimiento de semillas de una planta y/o aumentar la altura de la planta y/o aumentar el grosor del tallo con respecto a la correspondiente planta de control, de manera que el método conlleva introducir en una planta una disrupción en al menos:

40 i) un gen de CKX3 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 1 ó un ortólogo suyo; y

45 ii) un gen endógeno adicional que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa y que es diferente al gen especificado en i);

50 de manera que las citadas disrupciones inhiben la expresión y/o actividad de un producto de los -al menos- dos genes de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa interrumpidos en comparación con la correspondiente planta de control que carece de dichas disrupciones.

**[0014]** En un cuarto aspecto, la presente invención está dirigida a un método -tal y como se explica en las reivindicaciones- para producir una planta con un rendimiento de semillas y/o una altura mayores con respecto a la correspondiente planta de control, y que incluye interrumpir en una planta al menos:

55 i) un gen de CKX3 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 1 ó un ortólogo suyo; y

60 ii) un gen endógeno adicional que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa y que es diferente al gen especificado en i);

de manera que las citadas disrupciones inhiben la expresión y/o actividad de un producto de los -al menos- dos genes de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa interrumpidos en comparación con la correspondiente planta de control que carece de dichas disrupciones.

65 **[0015]** La presente invención también está relacionada con una célula vegetal aislada -tal y como se explica en las reivindicaciones- que comprende una disrupción en al menos:

i) un gen de CKX3 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 1 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 1 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 1; y

ii) en al menos un gen endógeno adicional:

a) un gen de CKX2 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 2 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 2 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 2;

b) un gen de CKX4 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 3 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 3 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 3;

c) un gen de CKX5 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 4 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 4 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 4; o

d) un gen de CKX6 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 5 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 5 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 5;

de manera que las citadas disrupciones inhiben la expresión y/o actividad de un producto de los -al menos- dos genes de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa interrumpidos en comparación con la correspondiente célula vegetal de control que carece de dichas disrupciones.

**[0016]** La presente invención también hace referencia a una planta transgénica que comprende una disrupción en al menos:

i) un gen de CKX3 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 1 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 1 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 1; y

ii) en al menos un gen endógeno adicional:

a) un gen de CKX2 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 2 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 2 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 2;

b) un gen de CKX4 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 3 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 3 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 3;

c) un gen de CKX5 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 4 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 4 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 4; o

d) un gen de CKX6 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 5 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 5 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 5;

de manera que las citadas disrupciones inhiben la expresión y/o actividad de un producto de los -al menos- dos

genes de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa interrumpidos en comparación con la correspondiente planta de control que carece de dichas disrupciones.

**[0017]** La célula vegetal aislada de la invención y/o la planta transgénica de la invención pueden comprender una disrupción en al menos:

i) un gen de CKX3 endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 7 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 7 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 7; y

ii) en al menos un gen endógeno adicional:

a) un gen de CKX2 que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 8 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 8 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 8;

b) un gen de CKX4 que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 9 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 9 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 9;

c) un gen de CKX5 que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 10 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 10 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 10; o

d) un gen de CKX6 que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 11 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 11 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 11;

de manera que las citadas disrupciones inhiben la expresión y/o actividad de un producto de los -al menos- dos genes de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa interrumpidos en comparación con la correspondiente planta de control o célula vegetal de control que carecen de dichas disrupciones.

**[0018]** Preferiblemente, la célula vegetal aislada de la invención y/o la planta transgénica de la invención comprenden una disrupción en

i) al menos un gen de CKX3 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 1 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 1 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 1; y

ii) en un gen de CKX5 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 4 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 4 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 4.

**[0019]** Preferiblemente, la célula vegetal aislada de la invención y/o la planta transgénica de la invención comprenden una disrupción en

i) un gen de CKX3 endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 7 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 7 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 7; y

ii) un gen de CKX5 endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 10 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 10 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 10.

**[0020]** En la célula vegetal aislada de la invención y/o la planta transgénica de la invención, una, más de una o todas las disrupciones de la invención pueden verse favorecidas por la disrupción estructural, la supresión antisentido de genes polinucleotídicos, el silenciamiento génico inducido por ARN bicatenario, las técnicas con ribozimas, el 'Tilling' y/o la recombinación homóloga.

**[0021]** En la célula vegetal aislada de la invención y/o la planta transgénica de la invención, una, más de una o todas

las disrupciones de la invención pueden ser disrupciones homocigóticas (o disrupciones homocigotas).

**[0022]** Preferiblemente, la planta transgénica de la invención se selecciona de la familia *Brassicaceae* y, más preferiblemente, de los géneros *Brassica* o *Arabidopsis*.

**[0023]** La presente invención también está dirigida al material celular, orgánico, tisular o de propagación transgénica derivado de una planta transgénica de la invención. El material de propagación transgénica incluye partes de una planta transgénica de la invención como semillas, tubérculos, raíces típicas -hinchadas o de remolacha- o frutos/frutas derivados de una planta transgénica de la invención.

**[0024]** La presente invención también está dirigida a un método para aumentar el rendimiento de semillas de una planta y/o aumentar la altura de una planta con respecto a la correspondiente planta de control, de manera que el método comprende introducir en una planta una disrupción en al menos:

i) un gen de CKX3 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 1 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 1 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 1; y

ii) en al menos un gen endógeno adicional:

a) un gen de CKX2 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 2 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 2 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 2;

b) un gen de CKX4 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 3 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 3 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 3;

c) un gen de CKX5 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 4 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 4 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 4; o

d) un gen de CKX6 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 5 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 5 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 5;

de manera que las citadas disrupciones inhiben la expresión y/o actividad de un producto de los -al menos- dos genes de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa interrumpidos en comparación con la correspondiente planta de control que carece de dichas disrupciones.

**[0025]** En un aspecto adicional, la presente invención está dirigida a un método para producir una planta, preferiblemente una planta transgénica, con un rendimiento de semillas y /o altura mayores con respecto a la correspondiente planta de control, y que comprende interrumpir en una planta al menos:

i) un gen de CKX3 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 1 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 1 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 1; y

ii) en al menos un gen endógeno adicional:

a) un gen de CKX2 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 2 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 2 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 2;

b) un gen de CKX4 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 3 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que

comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 3 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 3;

c) un gen de CKX5 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 4 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 4 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 4; o

d) un gen de CKX6 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 5 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 5 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 5;

de manera que las citadas disrupciones inhiben la expresión y/o actividad de un producto de los -al menos- dos genes de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa interrumpidos en comparación con la correspondiente planta de control que carece de dichas disrupciones.

**[0026]** En los métodos de la invención, preferiblemente

i) al menos un gen de CKX3 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 1 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 1 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 1; y

ii) en un gen de CKX5 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 4 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 4 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 4;

preferiblemente pueden estar interrumpidos ('disrupted', en inglés).

**[0027]** En el método de la invención, preferiblemente:

i) un gen de CKX3 endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 7 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 7 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 7; y

ii) en al menos un gen endógeno adicional:

a) un gen de CKX2 que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 8 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 8 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 8;

b) un gen de CKX4 que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 9 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 9 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 9;

c) un gen de CKX5 que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 10 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 10 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 10; o

d) un gen de CKX6 que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 11 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 11 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 11;

están interrumpidos.

**[0028]** En otro método preferido de la invención:

i) un gen de CKX3 endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 7 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 7 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 7; y

ii) un gen de CKX5 endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o tiene al

menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 10 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 10 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 10,

5 están interrumpidos.

**[0029]** En los métodos de la invención, preferiblemente una, más de una o todas las interrupciones son interrupciones homocigóticas.

10 **[0030]** La presente divulgación también está dirigida a una célula vegetal aislada o una planta transgénica que se pueden obtener o se han obtenido siguiendo uno de los métodos de la invención.

15 **[0031]** También se desvela el hecho de que al menos una de las interrupciones en la célula vegetal aislada de la invención o en la planta transgénica de la invención se produce introduciendo al menos una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos alrededor del 70%, al menos alrededor del 75%, al menos alrededor del 80%, al menos alrededor del 85%, al menos alrededor del 90%, al menos alrededor del 95%, al menos alrededor del 99%, al menos alrededor del 99,5% o una mayor identidad de secuencia con SEQ ID No. 14 (CKX1), SEQ ID No. 7 (CKX3), SEQ ID No. 8 (CKX2), SEQ ID No. 9 (CKX4), SEQ ID No. 10 (CKX5), SEQ ID No. 11 (CKX6), SEQ ID No. 12 (CKX7) o una subsecuencia de ellas, o un complemento de ellas, en una célula vegetal, de manera que la -al menos una- secuencia de polinucleótidos está unida con un promotor en orientación de sentido o antisentido. En otra realización, la interrupción se introduce en la célula vegetal o la planta transgénica de la invención introduciendo al menos una secuencia de polinucleótidos configurada para el silenciamiento o interferencia por ARN.

25 **[0032]** También se desvela el hecho de que una, más de una o todas las interrupciones en al menos uno de los genes endógenos previamente mencionados comprenden la inserción de uno o más transposones.

30 **[0033]** También se desvela el hecho de que una, más de una o todas las interrupciones pueden comprender una o más mutaciones puntuales en al menos uno de los genes endógenos previamente mencionados.

35 **[0034]** Una, más de una o todas las interrupciones en al menos uno de los genes endógenos previamente mencionados pueden ser interrupciones homocigóticas. De manera alternativa, una, más de una o todas las interrupciones en al menos uno de los genes endógenos previamente mencionados pueden ser interrupciones heterocigóticas (o interrupciones heterocigotas). Las interrupciones en al menos uno de los genes endógenos previamente mencionados pueden incluir interrupciones homocigóticas, interrupciones heterocigóticas o una combinación de interrupciones homocigóticas y interrupciones heterocigóticas.

40 **[0035]** A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente texto tienen el mismo significado que aquel que entiende normalmente una persona con conocimientos y habilidades habituales en el ámbito al que pertenece la invención. Para describir y reivindicar la presente invención, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones que se ofrecen más abajo.

45 **[0036]** Tal y como se usan en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares 'un', 'una', 'el' y 'la' hacen referencia al singular y al plural a menos que el texto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a 'una célula' incluye una célula y la combinación de una o más células, y otros casos similares.

50 **[0037]** El término 'planta' hace referencia, de manera genérica, a cualquiera de estos/as: plantas enteras, órganos o partes de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), estructuras/órganos vegetales apicales (por ejemplo, hojas, tallos y tubérculos), raíces, flores y estructuras/órganos de las flores (por ejemplo, brácteas, sépalos, pétalos, estambres, carpelos, anteras y óvulos), semillas (incluyendo el embrión, el endosperma y la cáscara de la semilla), frutos (el ovario maduro), tejido vegetal (por ejemplo, tejido vascular, tejido basal y similares), callos de cultivo celular y células vegetales (por ejemplo, células de guarda, óvulos, tricomas y similares), y su progenie. Normalmente, el término 'planta' hace referencia a todos los organismos que son capaces de realizar la fotosíntesis. Incluidos como plantas, dentro del alcance de la invención, se encuentran todos los géneros y especies de las plantas superiores e inferiores del reino vegetal. 'Plantas maduras' hace referencia a las plantas que se encuentran en cualquier etapa de desarrollo posterior a la etapa de plántula. 'Plántula' hace referencia a una planta joven e inmadura en una etapa temprana de desarrollo. Se prefieren las plantas anuales, perennes, monocotiledóneas y/o dicotiledóneas. Se dará preferencia a las plantas pertenecientes a esta familia de plantas: *Brassicaceae*, en particular las plantas de los géneros *Brassica* y *Arabidopsis*.

60 **[0038]** Tal y como se usa en el presente texto, 'célula vegetal' incluye además -sin limitaciones- las células obtenidas a partir de o que se encuentran en una planta o una parte de esta: semillas, cultivos, cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, hojas, raíces, brotes, gametófitos, esporófitos, polen y microesporas. También puede entenderse que las células vegetales incluyen células modificadas, como los protoplastos, obtenidas a partir de los tejidos previamente mencionados.



**[0039]** Tal y como se usan en el presente texto, los términos 'disrupción' (o 'interrupción') e 'interrumpido' significan que un gen puede estar estructuralmente interrumpido de manera que comprenda al menos una mutación o alteración estructural y de manera que el gen interrumpido no pueda dirigir eficazmente la expresión de un producto génico completamente funcional y cuya longitud es completa. Los términos 'disrupción' o 'interrumpido' también abarcan el hecho de que el gen interrumpido o uno de sus productos puede ser inhibido o desactivado funcionalmente de manera que el gen no se expresa o no puede expresar eficazmente un producto génico completo ('full-length', en inglés) y/o completamente funcional. La inhibición o desactivación funcional puede ser el resultado de una disrupción estructural y/o una interrupción de la expresión tanto a nivel de transcripción como de traducción. La inhibición o desactivación funcional también puede conseguirse, por ejemplo, siguiendo métodos como la supresión antisentido de genes polinucleotídicos, el silenciamiento génico inducido por ARN bicatenario, las técnicas con ribozimas, y similares. La inhibición de la expresión y/o la actividad puede ser el resultado de, por ejemplo, constructos antisentido, constructos con sentido, constructos de silenciamiento por ARN, interferencias por ARN, disrupciones genómicas (por ejemplo, transposones, 'Tilling', recombinación homóloga, etc.), y/o similares. La disrupción mediante inhibición funcional también incluye la inhibición de un gen o uno de sus productos mediante la interacción con un compuesto químico, preferiblemente un compuesto químico que interactúa específicamente con dicho gen o producto génico. La inhibición de la expresión y/o actividad puede medirse determinando la presencia y/o cantidad de la transcripción (por ejemplo, mediante 'Northern blot' o técnicas de RT-PCR) y/o determinando la presencia y/o cantidad de polipéptidos completos o truncados codificados por el citado gen (por ejemplo, mediante la técnica ELISA o mediante 'Western blot') y/o determinando la presencia y/o cantidad de la actividad de la citoquinina oxidasa/deshidrogenasa del producto del gen de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa interrumpido. Debe entenderse que, tal y como se usan en el presente texto, los términos 'disrupción' o 'interrumpido' implican que una disrupción también incluye la disrupción que solo es efectiva en una parte de la planta, particularmente en un tejido o tipo de célula como, por ejemplo, el meristemo reproductivo o el ápice del brote. Puede obtenerse una disrupción interactuando con o influyendo en una región de codificación, en una región de no codificación y/o en una región de regulación como, por ejemplo, una región promotora de un gen particular.

**[0040]** El término 'transgénico/a' hace referencia a una planta que ha incorporado secuencias de ácido nucleico, incluyendo -pero sin limitarse a- genes, polinucleótidos, ADN, ARN, etc., y/o alteraciones o modificaciones en ellos (por ejemplo, mutaciones, mutaciones puntuales o similares), que se han introducido en una planta, en comparación con una planta en la que no se han introducido, mediante procesos que no son procesos esencialmente biológicos para la producción de plantas. De este modo, el término 'planta transgénica' no solo incluye las plantas que comprenden ácidos nucleicos no endógenos, sino que también hace referencia de forma explícita a las plantas que portan mutaciones en un gen endógeno, por ejemplo, mutaciones puntuales, que han sido introducidas en la citada planta transgénica, en comparación con una planta en la que no se han introducido, mediante procesos que no son procesos esencialmente biológicos para la producción de plantas.

**[0041]** El término 'endógeno' hace referencia a cualquier secuencia genética o de ácido nucleico que ya está presente en una célula u organismo determinado como, por ejemplo, una planta. El término 'exógeno' hace referencia a cualquier secuencia genética o de ácido nucleico que no es endógena.

**[0042]** Un 'elemento transponible' (TE) o 'elemento genético transponible' es una secuencia de ADN que puede moverse de un sitio a otro de una célula. El movimiento de un elemento transponible puede suceder de episoma a episoma, de episoma a cromosoma, de cromosoma a cromosoma, o de cromosoma a episoma. Los elementos transponibles se caracterizan por la presencia de secuencias repetidas inversas en sus extremos. La movilización es regulada enzimáticamente por una 'transposasa'. Estructuralmente, un elemento transponible se clasifica como un 'transposón' (TN) o un 'elemento de secuencia de inserción' (elemento IS) dependiendo de la presencia o ausencia, respectivamente, de secuencias genéticas adicionales a las necesarias para la movilización del elemento. Normalmente, un minitransposón o elemento mini-IS carecen de secuencias que codifican una transposasa.

**[0043]** Normalmente, los términos 'ácido nucleico' o 'polinucleótido' se usan con el significado que tienen en este campo para hacer referencia a un polímero de ácido nucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN), o un análogo de estos, por ejemplo, un polímero de nucleótidos que contiene modificaciones de los nucleótidos, un ácido nucleico peptídico, o similares. En algunas aplicaciones, el ácido nucleico puede ser un polímero que incluye múltiples tipos de monómeros, por ejemplo, subunidades de ARN y ADN. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un cromosoma o un segmento de cromosoma, un vector (por ejemplo, un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero de ADN o ARN desnudo, el producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un oligonucleótido, una sonda, etc. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, monocatenario y/o bicatenario. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico de la invención opcionalmente comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia que se indique de manera explícita.

**[0044]** Los términos 'secuencia de polinucleótidos', 'secuencia de ácido nucleico' o 'secuencia de nucleótidos' hacen referencia a secuencias contiguas de nucleótidos en un único ácido nucleico o a una representación de estas, por ejemplo, una cadena o secuencia de caracteres. Es decir, según el contexto, una 'secuencia de polinucleótidos' es un polímero de nucleótidos (un oligonucleótido, un ADN, un ácido nucleico, etc.) o una cadena de caracteres que representa un polímero de nucleótidos. A partir de cualquier secuencia de polinucleótidos dada, es posible

determinar tanto el ácido nucleico en cuestión como la secuencia de polinucleótidos complementaria (por ejemplo, el ácido nucleico complementario).

**[0045]** El término 'subsecuencia' o 'fragmento' hace referencia a una parte o porción de una secuencia entera.

**[0046]** Un 'casete de expresión' es un constructo de ácido nucleico, por ejemplo, un vector, como un plásmido, un vector vírico, etc., capaz de producir transcritos y, potencialmente, polipéptidos codificados por una secuencia de polinucleótidos. Un vector de expresión es capaz de producir transcritos en una célula exógena, por ejemplo, una célula bacteriana o una célula vegetal, 'in vivo' o 'in vitro', por ejemplo, un protoplasto vegetal cultivado. La expresión de un producto puede ser tanto constitutiva como inducible, dependiendo, por ejemplo, del promotor seleccionado. Las configuraciones antisentido, con sentido o de interferencia o silenciamiento por ARN que no se traducen o no se pueden traducir se incluyen de manera expresa en esta definición. En el contexto de un vector de expresión, un promotor está 'unido operativamente' o 'unido funcionalmente' a una secuencia de polinucleótidos si es capaz de regular la expresión de la secuencia de polinucleótidos asociada. El término también se aplica a los constructos de genes exógenos alternativos, como los transgenes expresados o integrados. De manera similar, los términos 'unido operativamente' o 'unido funcionalmente' se aplican por igual a las secuencias reguladoras transcripcionales - alternativas o tradicionales- como los 'enhancers' o amplificadores, asociados con una secuencia de polinucleótidos.

**[0047]** Se dice que una secuencia de polinucleótidos, una secuencia de ácido nucleico o un gen 'codifican' una molécula de ARN con sentido o antisentido, o una molécula de silenciamiento o interferencia por ARN o un polipéptido, si la secuencia de polinucleótidos puede transcribirse (en una forma empalmada o no empalmada) y/o traducirse en el ARN o polipéptido, o una subsecuencia de estos. Una persona con experiencia en la materia advierte fácilmente la degeneración del código genético, de manera que diversas secuencias de ácidos nucleicos diferentes codifican la misma secuencia de aminoácidos o polipéptido, y no tiene ninguna dificultad para determinar si una secuencia de ácido nucleico dada codifica una determinada secuencia de ácido nucleico o polipéptido.

**[0048]** 'Expresión de un gen' o 'expresión de un ácido nucleico' hacen referencia a la transcripción de ADN en ARN (que incluye opcionalmente la modificación del ARN, por ejemplo, el 'splicing' o 'corte y empalme'), la traducción de ARN en un polipéptido (que incluye, posiblemente, la consiguiente modificación del polipéptido, por ejemplo, modificación postraduccional), o tanto la transcripción como la traducción, dependiendo del contexto.

**[0049]** Los términos 'gen' o 'secuencia genética' se usan de manera amplia para referirse a cualquier ácido nucleico asociado con una función biológica. Normalmente, los genes incluyen secuencias de codificación y/o las secuencias de regulación necesarias para la expresión de las citadas secuencias de codificación. El término 'gen' se aplica a una secuencia genómica específica, así como a un ADNc o un ARNm codificados por dicha secuencia genómica. Los genes también incluyen los segmentos de ácido nucleico no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Las secuencias reguladoras no expresadas incluyen promotores y 'enhancers', a los que se unen proteínas reguladoras como los factores de transcripción, lo que da como resultado la transcripción de las secuencias adyacentes o cercanas.

Un 'polipéptido' es un polímero que comprende dos o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, un péptido o una proteína). Adicionalmente, el polímero puede comprender elementos no aminoácidos como etiquetas, 'quenchers' (o inhibidores de fluorescencia), grupos de bloqueo o similares, y, opcionalmente, puede comprender modificaciones como glicosilación o similares. Los residuos de aminoácido del polipéptido pueden ser naturales o no naturales y pueden estar sin sustituir, sin modificar, sustituidos o modificados.

**[0050]** Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'gen de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa' hace referencia a un gen que codifica un polipéptido con actividad de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa. Una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa es una enzima que cataliza la siguiente reacción química:

N6-dimetilaliladenina + aceptor + H<sub>2</sub>O  $\square$  adenina + 3-metilbut-2-enal + aceptor reducido

**[0051]** Los tres sustratos de esta enzima son N6-dimetilaliladenina, el aceptor y H<sub>2</sub>O, mientras que sus tres productos son adenina, 3-metilbut-2-enal y el aceptor reducido. Preferiblemente, el término 'actividad de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa' incluye la actividad de un determinado polipéptido para catalizar una reacción de oxidorreductasa con al menos una de las citoquininas como sustrato. Una persona con habilidades y conocimientos en este campo conoce perfectamente los medios y métodos para determinar si un polipéptido dado tiene actividad de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa o no, y para determinar el nivel de la actividad de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa de un polipéptido o sonda particular en valores absolutos y/o relativos con respecto a otro polipéptido o sonda. Existe abundante información en la literatura sobre cómo puede analizarse un polipéptido para determinar dicha actividad (ver, por ejemplo, EC 1.5.99.12). Más preferiblemente, el término 'actividad de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa' incluye la actividad de un determinado polipéptido para catalizar una reacción de oxidorreductasa con al menos una de las citoquininas como sustrato, preferiblemente con una actividad que no sea menor que un 30% de la actividad de AtCKX3 (CKX3 con SEQ ID No. 1), y preferiblemente que no sea menor que un 50% de la actividad de AtCKX3.

**[0052]** Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'ortólogo' hace referencia a un gen de una especie,

preferiblemente diferente a *Arabidopsis thaliana*, que muestra la mayor similitud, preferiblemente la mayor identidad de secuencia, con el gen especificado de *Arabidopsis thaliana*, ya que ambos genes se originaron a partir de un antepasado común. Preferiblemente, el término 'ortólogo' denota un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa y comprende una secuencia (polipéptido o ácido nucleico) con al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 99% de identidad de secuencia con una determinada secuencia a la que se refiere el respectivo ortólogo, y preferiblemente a lo largo de una longitud de secuencia particular. Más preferiblemente, el término 'ortólogo' denota un gen endógeno, derivado de una especie diferente de *Arabidopsis thaliana*, que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa y comprende una secuencia con al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 99% de identidad de secuencia con una determinada secuencia de *Arabidopsis thaliana* a la que se refiere el respectivo ortólogo, y preferiblemente a lo largo de una longitud de secuencia particular.

**[0053]** El término 'recombinante' indica que el material (por ejemplo, una célula, un ácido nucleico o una proteína) se ha alterado de manera artificial o sintética (no natural) por medio de la intervención humana. Al material se le puede realizar la alteración o modificación estando en su entorno o estado natural o fuera de él. Por ejemplo, un 'ácido nucleico recombinante' es uno que se ha hecho recombinando ácidos nucleicos, por ejemplo, durante la clonación, el barajado de ADN u otros procedimientos; un 'polipéptido recombinante' o una 'proteína recombinante' es un polipéptido o proteína que se produce mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante. Los ejemplos de células recombinantes incluyen células que contienen ácidos nucleicos recombinantes y/o polipéptidos recombinantes.

**[0054]** El término 'vector' hace referencia a los medios mediante los cuales un ácido nucleico puede propagarse y/o transferirse entre organismos, células o componentes celulares. Los vectores incluyen plásmidos, virus, bacteriófagos, pro-virus, fagémidos, transposones y cromosomas artificiales, y similares, que se reproducen de forma autónoma o pueden integrarse en un cromosoma de una célula huésped. Un vector también puede ser un polinucleótido de ARN desnudo, un polinucleótido de ADN desnudo, un polinucleótido compuesto tanto de ADN como de ARN en la misma cadena, un ADN o ARN conjugado con polilisina, un ADN o ARN conjugado con péptidos, un ADN conjugado con liposomas o similares, que no se reproducen de forma autónoma.

**[0055]** En el contexto de la presente invención, el término 'aislado' hace referencia a un material biológico, como un ácido nucleico o un polipéptido, que está básicamente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con él en su entorno natural. Opcionalmente, el material aislado comprende material que no se halla con el material en su entorno natural, por ejemplo, una célula. Por ejemplo, si el material se encuentra en su entorno natural, como una célula, el material se ha colocado en un lugar de la célula (por ejemplo, el genoma o un elemento genético) que no es nativo respecto a un material que se encuentra en ese entorno. Por ejemplo, un ácido nucleico que existe de forma natural (por ejemplo, una secuencia codificante, un promotor, un 'enhancer', etc.) se aísla si se introduce mediante medios no naturales en un locus del genoma (por ejemplo, un vector, como un plásmido o un vector vírico, o un amplicón) que no es nativo para ese ácido nucleico. Una célula vegetal aislada, por ejemplo, puede estar en un entorno (por ejemplo, un sistema de cultivo celular o purificado a partir de un cultivo celular) diferente al entorno nativo de las células vegetales de tipo natural (por ejemplo, una planta entera).

**[0056]** Tal y como se utiliza en el presente texto, 'promotor' hace referencia a una zona o región de ADN secuencia arriba a partir del comienzo de la transcripción y que está relacionada con el reconocimiento y la unión de la polimerasa de ARN y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un 'promotor vegetal' es un promotor capaz de iniciar la transcripción en células vegetales. Los promotores vegetales ejemplares incluyen -pero no se limitan a- aquellos que se obtienen a partir de plantas, virus vegetales y bacterias que comprenden genes expresados en células vegetales, como *Agrobacterium* o *Rhizobium*. Los ejemplos de promotores bajo control de desarrollo incluyen promotores que, preferiblemente, inician la transcripción en ciertos tejidos, como hojas, raíces o semillas, o en regiones como las regiones del endosperma y el embrión, o las regiones meristemáticas. Estos promotores se denominan 'preferidos para un tejido' o 'específicos para un tejido'. Un promotor regulado temporalmente dirige la expresión en épocas o momentos particulares, como entre 0-25 días después de la polinización. Un promotor 'preferido para un tipo de células' dirige la expresión principalmente en ciertos tipos de células de uno o más órganos, por ejemplo, células vasculares de las raíces o de las hojas. Un promotor 'inducible' es un promotor que se encuentra bajo control ambiental y puede ser inducible o desrepresible. Los ejemplos de las condiciones ambientales que pueden influir en la transcripción mediante promotores inducibles incluyen las condiciones anaeróbicas o la presencia de luz. Los promotores 'específicos para un tejido', 'específicos para un tipo de célula' e inducibles forman la clase de los 'promotores no constitutivos'. Un promotor 'constitutivo' es un promotor que está activo en la mayoría de condiciones ambientales y en todos o casi todos los tejidos, durante todas o casi todas las etapas de desarrollo.

**[0057]** Tal y como se usa en el presente texto, la 'transformación' es el proceso mediante el que se 'transforma' una célula por medio de ADN exógeno cuando dicho ADN exógeno ha sido introducido dentro de la membrana celular. El ADN exógeno puede estar o puede no estar integrado (unido covalentemente) en el ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula. En las procariontas y la levadura, por ejemplo, el ADN exógeno puede mantenerse en un elemento episomal, como un plásmido. Respecto a las células eucariotas, superiores, una célula transformada o transfectada de manera estable es aquella en la que el ADN exógeno se ha integrado en el cromosoma de manera

que es heredado por las células hijas mediante replicación cromosómica. Esta estabilidad se demuestra mediante la capacidad que tiene la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones compuestos de una población de células hijas que contienen el ADN exógeno.

5 **[0058]** Para los propósitos de la presente invención, la 'identidad' de secuencia se determina objetivamente mediante cualquiera de los numerosos métodos que existen. Las personas con conocimientos y experiencia en este campo conocen perfectamente dichos métodos y pueden escoger un método adecuado sin que esto les suponga una carga de trabajo innecesaria. Una variedad de métodos para determinar las relaciones entre dos o más secuencias (por ejemplo, identidad, similitud u homología) están disponibles y son bien conocidos en este campo. 10 Los métodos incluyen el alineamiento manual, el alineamiento de secuencias asistido por ordenador y combinaciones de estos, por ejemplo. Diversos algoritmos (que generalmente se implementan mediante ordenador) para realizar un alineamiento de secuencias están disponibles ampliamente o pueden ser producidos por una persona versada en la materia. Estos métodos incluyen, por ejemplo, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482; el algoritmo de alineamiento homólogo de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443; el método para la búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 2444; y/o las implementaciones por ordenador de estos algoritmos (e.g. GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el 'Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0', Genetics Computer Group, 575 Science Dr. , Madison, WI, EE UU).

20 **[0059]** Por ejemplo, el software para realizar un análisis de identidad de secuencias (y similitud de secuencias) utilizando el algoritmo de BLAST se describe en Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. Este software está disponible públicamente, por ejemplo, a través del National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica de EE UU) accediendo a su página web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Este algoritmo requiere que primero se identifiquen los pares de alta puntuación (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema o secuencia 'query' ('query sequence', en inglés), que se corresponden o cumplen con algunos valores positivos de un puntaje umbral T cuando se alinean con una palabra con la misma longitud de una secuencia de la base de datos. Se denomina T a la puntuación de palabras del umbral local. Estas primeras búsquedas de palabras locales funcionan como semillas para iniciar búsquedas y encontrar HSPs más largos que las contengan. Después, las búsquedas por palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia, tan lejos como pueda aumentar la puntuación de alineamiento acumulada. En el caso de las secuencias de nucleótidos, las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para los residuos no coincidentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión o propagación de las búsquedas por palabras en ambas direcciones se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada baja de una cantidad X desde su valor máximo obtenido; la puntuación acumulada llega a cero o por debajo debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntuaciones negativas; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo de BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como parámetros por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un límite de 100, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP (BLAST Protein) usa como parámetros por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915).

45 **[0060]** Además, el algoritmo de BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787). Una medida de similitud que proporciona el algoritmo de BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ( $p(N)$ ), que proporciona un indicio de la probabilidad de que una coincidencia entre dos nucleótidos o secuencias de aminoácidos pueda ocurrir por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a la secuencia de referencia (y, por lo tanto, en este contexto, homólogo) si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba y el ácido nucleico de referencia es menor que alrededor de 0,1, o menor que alrededor de 0,01, e incluso menor que alrededor de 0,001.

**[0061]** Otro ejemplo de un algoritmo útil de alineación de secuencias es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineaciones progresivas por pares. También puede trazar un árbol que muestra la agrupación de relaciones usada para crear la alineación. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle (1987) *J. Mol. Evol.* 35: 351-360. El método utilizado es similar al método que describen Higgins y Sharp (1989) *CABIOS* 5 : 151-153. El programa puede alinear, por ejemplo, hasta 300 secuencias con una longitud máxima de 5 000 letras. El procedimiento de alineaciones múltiples comienza con la alineación por pares de las dos secuencias más parecidas, lo que produce una agrupación de dos secuencias alineadas. Posteriormente, esta agrupación puede alinearse con la siguiente secuencia o agrupación de secuencias alineadas más parecida. Dos agrupaciones de secuencias pueden alinearse mediante una simple extensión de la alineación por pares de dos secuencias individuales. La alineación final se consigue mediante una serie de alineaciones por pares progresivas. También puede usarse el programa para trazar un dendrograma o representación en forma de árbol de las agrupaciones de relaciones. El programa funciona diseñando secuencias específicas y las coordenadas de sus aminoácidos o nucleótidos para las regiones de comparación de secuencias.

**[0062]** Otro ejemplo de un algoritmo que es adecuado para múltiples alineaciones de secuencias de ADN o aminoácidos es el programa CLUSTALW (Thompson, J. D. et al. (1994) Nucl. Acids. Res. 22: 4673-4680). CLUSTALW realiza múltiples comparaciones por pares entre grupos de secuencias y las junta en una alineación múltiple basándose en la homología. Las penalizaciones de apertura de espacio ('Gap open', en inglés) y de extensión de espacio ('Gap extension', en inglés) pueden ser, por ejemplo, 10 y 0,05, respectivamente. Para las alineaciones de aminoácidos, el algoritmo de BLOSUM puede utilizarse como una matriz de peso proteico. Ver Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE UU 89: 10915-10919.

**[0063]** La célula vegetal aislada o la planta transgénica de la invención pueden producirse por medios convencionales como, por ejemplo, la transformación. Básicamente, la transformación de células vegetales y protoplastos puede llevarse a cabo siguiendo cualquiera de las diversas formas que resultan conocidas para aquellas personas con experiencia y conocimientos en el campo de la biología molecular, incluyendo -pero sin limitarse a- los métodos descritos en el presente texto. Ver, como norma general, 'Methods in Enzymology', Vol. 153 (Recombinant DNA Part D) Wu y Grossman (eds.) 1987, Academic Press. Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'transformación' significa alteración o modificación del genotipo de una planta huésped o célula vegetal mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico 'heterólogo', 'exógeno' o 'foráneo'. La secuencia de ácido nucleico heterólogo no tiene por qué originarse necesariamente a partir de una fuente diferente, pero, en algún momento, será externa a la célula en la que sea introducida. Además de Berger, Ausubel y Sambrook, las referencias generales útiles para la clonación, cultivo y regeneración de células vegetales incluyen a Jones (ed) (1995) 'Plant Gene Transfer and Expression Protocols - Methods in Molecular Biology', Volumen 49,, Humana Press, Towata, NJ, EE UU; Payne et al. (1992) 'Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems', John Wiley & Sons, Inc. New York, NY (Payne), EE UU; y Gamborg y Phillips (eds) (1995) 'Plant Cell, Tissue and Organ Culture'; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg, New York, EE UU) (Gamborg). Diversos medios de cultivo celular se describen en Atlas and Parks (eds), 'The Handbook of Microbiological Media', (1993) CRC Press, Boca Raton, FL (Atlas), EE UU. Se puede encontrar información adicional sobre el cultivo de células vegetales en la literatura comercial como el catálogo 'Life Science Research Cell Culture Catalogue' (1998), de Sigma-Aldrich, Inc (St Louis, MO, EE UU) (Sigma-LSRCCC) y, por ejemplo, el catálogo 'Plant Culture Catalogue and supplement' (1997), también de Sigma-Aldrich, Inc (St Louis, MO, EE UU) (Sigma- PCCS). Se pueden encontrar especificaciones adicionales relacionadas con el cultivo de células vegetales en Croy, (ed.) (1993), 'Plant Molecular Biology', Bios Scientific Publishers, Oxford, Reino Unido.

**[0064]** Una, más de una o todas las interrupciones en al menos uno de los genes endógenos previamente mencionados pueden favorecerse introduciendo y expresando en una célula vegetal o una planta una secuencia de polinucleótidos transgénica, por ejemplo, con configuraciones con sentido o antisentido, o configuraciones de silenciamiento o interferencia por ARN, etc., de manera que la secuencia de polinucleótidos transgénica comprende una secuencia de ácido nucleico, que es la siguiente o es complementaria a:

a) una secuencia o subsecuencia de un gen de CKX3 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 1 o un ortólogo suyo;

b) una secuencia o subsecuencia de un gen de CKX2 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 2 o un ortólogo suyo;

c) una secuencia o subsecuencia de un gen de CKX4 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 3 o un ortólogo suyo;

d) una secuencia o subsecuencia de un gen de CKX5 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 4 o un ortólogo suyo;

e) una secuencia o subsecuencia de un gen de CKX6 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 5 o un ortólogo suyo; o

f) una secuencia o subsecuencia de un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con una entre SEQ ID No. 1, 2, 3, 4 ó 5 a lo largo de toda la longitud;

y comprenden un promotor, inhibiendo así la expresión y/o actividad de -al menos- el gen de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa interrumpido en comparación con la correspondiente célula vegetal de control o planta de control que carecen de dichas interrupciones (por ejemplo, su progenitor no transgénico o una planta no transgénica de la misma especie). La secuencia de polinucleótidos transgénica puede introducirse por medio de técnicas que incluyen -pero no se limitan a-, por ejemplo, electroporación, bombardeo con microproyectiles, transferencia mediada por Agrobacterium, u otros métodos disponibles. En algunos aspectos de la invención, el polinucleótido está unido con el promotor en una orientación con sentido o en una orientación antisentido o está configurado para el silenciamiento o interferencia por ARN.

**[0065]** Entre la literatura destacada que describe la aplicación del silenciamiento de genes dependiente de la

homología se incluye: Jorgensen, Trends Biotechnol. 8 (12): 340-344 (1990); Flavell, Proc. Natl. Acad. Sci. (EE UU) 91: 3490-3496 (1994); Finnegan et al., Bio/Technology 12: 883-888 (1994); Neuhuber et al., Mol. Gen. Genet. 244: 230-241 (1994); Flavell et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., EE UU, 91: 3490-3496; Jorgensen et al. (1996) Plant Mol. Biol. 31: 957-973; Johansen y Carrington (2001) Plant Physiol. 126: 930-938; Broin et al. (2002) Plant Cell 14: 1417-1432; Stoutjesdijk et al. (2002) Plant Physiol. 129: 1723-1731; Yu et al. (2003) Phytochemistry 63: 753-763; y las Patentes de EE UU nºs 5,034,323; 5,283,184 y 5,942,657.

**[0066]** De manera alternativa, otro enfoque para el silenciamiento génico puede ser el uso de tecnología antisentido (Rothstein et al. en 'Plant Mol. Cell. Biol.' 6: 221-246 (1989); Liu et al. (2002) 'Plant Physiol.' 129: 1732-1743 y las Patentes de EE UU Nºs 5,759,829 y 5,942,657. El uso de ácidos nucleicos antisentido es bien conocido en este campo. Un ácido nucleico antisentido tiene una región de complementariedad con un ácido nucleico diana, por ejemplo, una secuencia genética de un gen particular, un ARNm o un ADNc. El ácido nucleico antisentido puede ser un ARN, un ADN, un APN o cualquier otra molécula apropiada. Puede formarse un dúplex (o doblete) entre la secuencia antisentido y su secuencia con sentido complementaria, lo que da como resultado la desactivación del gen. El ácido nucleico antisentido puede inhibir la expresión génica formando un dúplex con un ARN transcrito a partir del gen, formando un tríplex (o triplete) con el ADN dúplex, etc. Un ácido nucleico antisentido puede producirse por medio de diversas técnicas bien establecidas (por ejemplo, la síntesis química de un oligonucleótido o ARN antisentido -opcionalmente, pueden incluir nucleótidos modificados y/o ligamientos que aumentan la resistencia a la degradación o mejoran la absorción celular- o la transcripción 'in vitro'). Los ácidos nucleicos antisentido y el uso de estos se describen, por ejemplo, en la USP (Patente de EE UU) 6,242,258 de Haselton y Alexander (5 de junio, 2001) titulada 'Methods for the selective regulation of DNA and RNA transcription and translation by photoactivation'; USP 6,500, 615; USP 6,498, 035; USP 6,395, 544; USP 5,563, 050; E. Schuch et al (1991) 'Symp Soc. Exp Biol' 45: 117-127; de Lange et al., (1995) 'Curr Top Microbiol Immunol' 197: 57-75; Hamilton et al. (1995) 'Curr Top Microbiol Immunol' 197: 77-89; Finnegan et al., (1996) 'Proc Natl 'Acad Sci, EE UU 93: 8449-8454; Uhlmann y A. Pepan (1990), Chem. Rev. 90: 543; P. D. Cook (1991), 'Anti-Cancer Drug Design' 6: 585; J. Goodchild, 'Bioconjugate Chem. 1' (1990) 165; y, S. L. Beaucage y R. P. Iyer (1993), Tetrahedron 49: 6123; y F. Eckstein, Ed. (1991), 'Oligonucleotides and Analogues - A Practical Approach', IRL Press.

**[0067]** Las moléculas de ARN catalíticas o ribozimas también pueden usarse para inhibir la expresión de unos genes particulares seleccionados. Es posible diseñar ribozimas que, de manera específica, forman parejas con prácticamente cualquier ARN diana deseado y descomponen el esqueleto de fosfodiéster en una localización específica, desactivando así las funciones del ARN diana. Cuando lleva a cabo esta escisión o descomposición, la propia ribozima no se ve alterada y, por lo tanto, puede reciclar y descomponer otras moléculas. La inclusión de secuencias de ribozimas en ARNs antisentido les confiere actividad para descomponer ARN, aumentando así la actividad de los constructos. Se han identificado diversas clases de ribozimas. Por ejemplo, una clase de ribozimas se deriva de diversos ARNs pequeños y circulares que pueden autodescomponerse (o autoescindir) y reproducirse en plantas. Los ARNs son capaces de reproducirse por sí solos (ARNs viroides) o con un virus auxiliar (ARNs satélite). Los ejemplos de ARN incluyen ARNs del viroide de la mancha de sol del aguacate y los ARNs satélite del virus de la mancha anular del tabaco, el virus del veteado transitorio de la alfalfa, el virus del moteado suave del tabaco, el virus del moteado nodoso de la flor de género Solanum y el virus del moteado del trébol subterráneo. El diseño y el uso de ribozimas específicas para el ARN diana ya ha sido descrito. Ver, por ejemplo, Haseloff et al. (1988) Nature, 334: 585-591.

**[0068]** Otro método para desactivar un gen particular seleccionado inhibiendo la expresión es mediante la supresión de sentido. Se ha demostrado que la introducción de casetes de expresión en los que un ácido nucleico está configurado en la orientación con sentido con respecto al promotor es un medio eficaz para bloquear la transcripción de un gen diana deseado. Ver, por ejemplo, Napoli et al. (1990), 'The Plant Cell' 2: 279-289, y las Patentes de EE UU Nºs 5,034,323, 5,231,020 y 5,283,184.

**[0069]** Las disrupciones de la invención también pueden producirse usando silenciamiento o interferencia por ARN (RNAi), que también pueden denominarse silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) o cosupresión. En el contexto de esta invención, el 'silenciamiento por ARN' (también llamado RNAi o interferencia por mediación del ARN) hace referencia a cualquier mecanismo mediante el que la presencia de un ARN monocatenario o, normalmente, un ARN bicatenario en una célula da como resultado la inhibición de la expresión de un gen diana que comprende una secuencia idéntica o casi idéntica a la del ARN, incluyendo -pero sin limitarse a- la interferencia por ARN, la represión de la traducción de un ARNm diana transcrito a partir del gen diana sin alterar la estabilidad del ARNm y el silenciamiento transcripcional (por ejemplo, la acetilación de histonas y la formación de heterocromatina, que provocan la inhibición de la transcripción del ARNm diana). En la 'interferencia por ARN', la presencia del ARN monocatenario o bicatenario en la célula provoca una escisión endonucleolítica y la degradación del ARNm diana.

**[0070]** En una realización, un transgén (por ejemplo, una secuencia y/o subsecuencia de un gen o secuencia codificante de interés) se introduce en una célula vegetal para interrumpir uno o más genes mediante silenciamiento o interferencia por ARN (RNAi). Por ejemplo, una secuencia o subsecuencia (el transgén) incluye una pequeña subsecuencia, por ejemplo, con una longitud de 21-25 bases, una subsecuencia mayor, por ejemplo, con una longitud de alrededor de 25-100 bases o alrededor de 100-2000 (o alrededor de 200-1500 o alrededor de 250-1000 bases, etc.) y/o la secuencia de codificación entera o el gen seleccionados de o que son complementarios con:

a) una secuencia o subsecuencia de un gen de CKX3 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 1 o un ortólogo suyo;

b) una secuencia o subsecuencia de un gen de CKX2 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 2 o un ortólogo suyo;

c) una secuencia o subsecuencia de un gen de CKX4 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 3 o un ortólogo suyo;

d) una secuencia o subsecuencia de un gen de CKX5 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 4 o un ortólogo suyo;

e) una secuencia o subsecuencia de un gen de CKX6 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 5 o un ortólogo suyo; o

f) una secuencia o subsecuencia de un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con una entre SEQ ID No. 1, 2, 3, 4 ó 5 a lo largo de toda la longitud

**[0071]** Preferiblemente, un transgén incluye una región en la secuencia o subsecuencia que tiene una longitud de alrededor de 21-25 bases con al menos un 80%, al menos un 90% o al menos un 99% de identidad con una subsecuencia de una de las secuencias con SEQ ID No. 7, 8, 9, 10, 11, 12 ó 14.

**[0072]** El uso de la RNAi para inhibir la expresión génica en diversos tipos de células (incluyendo, por ejemplo, células vegetales) y organismos, por ejemplo, mediante la expresión de ARN horquillado ('stem loop') (o shRNA) o de las dos hélices de un ARN interferente, por ejemplo, se describe correctamente en la literatura, al igual que los métodos para determinar los ARNs interferentes adecuados para apuntar a un gen deseado y para generar dichos ARNs interferentes. Por ejemplo, la interferencia por ARN se describe en las publicaciones de solicitudes de patentes 20020173478, 20020162126 y 20020182223, y en Cogoni y Macino (2000), 'Post-transcriptional gene silencing across kingdoms', *Genes Dev.*, 10: 638-643; Guru T. (2000), 'A silence that speaks volumes' *Nature* 404: 804-808; Hammond et al., (2001), 'Post-transcriptional Gene Silencing by Double-stranded RNA' *Nature Rev. Gen.* 2: 110-119; Napoli et al., (1990), 'Introduction of a chalcone synthase gene into Petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trays.', *Plant Cell* 2: 279-289; etc.

**[0073]** Las secuencias o subsecuencias de polinucleótidos que van a expresarse para inducir la RNAi pueden expresarse, por ejemplo, bajo el control de un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor específico para un tejido. En algunas realizaciones, la expresión a partir de un promotor específico para un tejido puede ser ventajosa.

**[0074]** Una, más de una o todas las interrupciones en al menos uno de los genes endógenos previamente mencionados pueden introducirse mediante, por ejemplo, la desactivación basada en transposones. Por ejemplo, el paso de desactivación incluye producir una o más mutaciones en un gen, que es:

i) un gen de CKX3 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 1 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 1 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 1; y/o

ii) en al menos un gen endógeno adicional, que es:

a) un gen de CKX2 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 2 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 2 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 2;

b) un gen de CKX4 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 3 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 3 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 3;

c) un gen de CKX5 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 4 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con

SEQ ID No. 4 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 4; o

d) un gen de CKX6 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 5 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 5 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 5;

de manera que una o más mutaciones en la secuencia génica comprenden una o más inserciones de transposones y de manera que las disrupciones inihiben la expresión y/o actividad de -al menos- el gen interrumpido de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa en comparación con la correspondiente célula vegetal de control o planta de control que carecen de dichas disrupciones. Por ejemplo, las mutaciones -una o más- comprenden una disrupción homocigótica en uno o más genes previamente mencionados o las mutaciones -una o más- comprenden una disrupción heterocigótica en uno o más genes previamente mencionados o una combinación de disrupciones homocigóticas y disrupciones heterocigóticas.

**[0075]** Los transposones se identificaron por primera vez en el maíz, y fue Barbara McClintock quien lo hizo a finales de la década de 1940. La familia Mutator de los elementos transponibles, por ejemplo, los elementos transponibles del Mutator de Robertson ('Robertson's Mutator') (Mu), se usan normalmente en la mutagénesis de genes vegetales, ya que están presentes con un número de copias elevado (10-100) y se insertan preferentemente en los genes o cerca de estos.

**[0076]** Los elementos transponibles pueden clasificarse en dos categorías amplias según su modo de transposición. Estas se denominan Clase I y Clase II; ambas tienen aplicaciones como mutágenos y como vectores de entrega. Los elementos transponibles de la Clase I se transponen mediante un intermediario de ARN y usan transcriptasas inversas, es decir, son retroelementos. Hay al menos tres tipos de elementos transponibles de Clase I: retrotransposones, retroposones, elementos de tipo SINE. Normalmente, los retrotransposones contienen LTRs y genes que codifican proteínas virales de cubierta (gag) y genes de transcriptasa inversa, RnaseH, integrasa y polimerasa (pol). Se han descrito numerosos retrotransposones en especies vegetales. Estos retrotransposones se movilizan y se desplazan mediante un intermediario de ARN en una reacción catalizada mediante transcriptasa inversa y Rnase H codificadas por el transposón. Los ejemplos se incluyen en los grupos de Tyl-copia y Ty3-gypsy, así como en las clasificaciones de tipo SINE y de tipo LINE. Puede encontrarse una exposición más detallada en Kumar y Bennetzen (1999) 'Plant Retrotransposons in Annual Review of Genetics' 33: 479.

**[0077]** Además, los elementos transponibles de ADN como Ac, Taml y En/Spm también se encuentran en una gran variedad de especies vegetales, y pueden utilizarse en la invención.

**[0078]** Los transposones (y los elementos IS) son herramientas habituales para la introducción de mutaciones en células vegetales. Estos elementos genéticos móviles se liberan en las células, por ejemplo, mediante un cruce sexual, se selecciona la transposición y se analizan los mutantes de inserción resultantes, por ejemplo, en busca de un fenotipo de interés. Después, los genes interrumpidos pueden introducirse en otras plantas cruzando las plantas transgénicas o aisladas con una planta no interrumpida, por ejemplo, mediante cruce sexual. Puede utilizarse cualquiera de las diversas técnicas estándares de reproducción, dependiendo siempre de las especies que se van a cruzar. La localización de un TN en un genoma de una planta transgénica o aislada puede determinarse mediante métodos conocidos, por ejemplo, la secuenciación de las regiones adyacentes, tal y como se describe en el presente texto. Por ejemplo, una reacción de PCR de la planta puede usarse para amplificar la secuencia, que posteriormente puede someterse a un diagnóstico de secuenciación para confirmar su origen. De manera opcional, se examinan los mutantes de inserción en busca del fenotipo deseado, como la inhibición de la expresión o actividad de un gen de interés en comparación con una planta de control.

**[0079]** También puede usarse el Tilling para identificar una disrupción de la presente invención. El término técnico 'Tilling' es un acrónimo que proviene del inglés: 'Targeting Induced Local Lesions In Genomes' ('Detección de lesiones locales inducidas en genomas'). Ver, por ejemplo, McCallum et al., (2000), 'Targeting Induced Local Lesions In Genomes (TILLING) for Plant Functional Genomics', Plant Physiology 123: 439-442; McCallum et al., (2000), 'Targeted screening for induced mutations', Nature Biotechnology, 18: 455-457; y Colbert et al., (2001), 'High-Throughput Screening for Induced Point Mutations', Plant Physiology 126: 480-484.

**[0080]** El Tilling combina puntos de mutación de alta densidad con la detección sensible y rápida de las mutaciones. Normalmente, se usa metanosulfonato de etilo (EMS) para mutagenizar semillas de planta. El EMS alquila la guanina, lo que normalmente provoca un desapareamiento ('mispairing', en inglés). Por ejemplo, se empapan las semillas en una solución de EMS de alrededor de 10-20 mM durante alrededor de 10-20 horas; se lavan las semillas y luego se siembran. Las plantas de esta generación se conocen como M1. Después, las plantas M1 se autofertilizan o autofecundan. Las mutaciones que están presentes en las células que forman los tejidos reproductivos son heredadas por la siguiente generación (M2). Normalmente, las plantas M2 se examinan en busca de mutaciones en el gen deseado y/o de fenotipos específicos. Por ejemplo, se agrupa el ADN de plantas M2 y se detectan las mutaciones en un gen de interés mediante la detección de la formación de heterodúplex. Normalmente, el ADN se prepara a partir de cada planta M2 y se agrupa. El gen deseado se amplifica mediante PCR. Después, la



muestra agrupada se desnaturaliza y se temple para permitir la formación de heterodúplex. Si una mutación está presente en una de las plantas, los productos de la PCR serán de dos tipos: de tipo natural (o silvestre) y mutantes. Las agrupaciones que incluyen heterodúplex se identifican separando la reacción de PCR, por ejemplo, mediante DPHPLC ('Cromatografía líquida de desnaturalización de alto rendimiento'). La DPHPLC detecta desequilibrios o disparidades en los heterodúplex creados mediante el derretimiento y templado (endurecimiento) de ADN heteroalélico. La cromatografía se realiza mientras se calienta el ADN. Los heterodúplex tienen una estabilidad térmica menor y forman burbujas de fusión ('melting bubbles', en inglés), lo que provoca un movimiento más rápido en la columna de cromatografía. Cuando los heterodúplex están presentes además de los homodúplex esperados, se observa un doble pico. Como resultado de ello, se identifican las agrupaciones que portan la mutación en un gen de interés. Después, los ADN individuales de plantas que constituyen la población agrupada que se ha seleccionado pueden identificarse y secuenciarse. Opcionalmente, la planta que posee una mutación deseada en un gen de interés puede cruzarse con otras plantas para eliminar las mutaciones de fondo.

**[0081]** También pueden emplearse otros métodos mutagénicos para introducir una disrupción de la invención. Los métodos para introducir mutaciones genéticas en genes vegetales y seleccionar plantas con los rasgos o caracteres deseados son bien conocidos. Por ejemplo, las semillas u otros materiales vegetales pueden tratarse con una sustancia química mutagénica siguiendo las técnicas estándares. Estas sustancias químicas incluyen -pero no se limitan a- las siguientes: sulfato de dietilo, etilnimina y N-nitroso-N-etilurea. De manera alternativa, puede usarse radiación ionizante de fuentes como rayos X y rayos gamma.

**[0082]** También pueden emplearse otros métodos de detección utilizados para detectar mutaciones en un gen de interés, por ejemplo, electroforesis capilar (por ejemplo, electroforesis capilar desnaturalizante constante y polimorfismo conformacional de cadena sencilla). En otro ejemplo, los heterodúplex se pueden detectar utilizando enzimología para reparar disparidades ('mismatch repair enzymology', en inglés) (por ejemplo, endonucleasa CEL I del apio). CEL I reconoce una disparidad -o desajuste- y corta exactamente en el lado 3' de la misma. La posición precisa de la base de la disparidad puede determinarse cortando con la enzima de reparación de disparidades y aplicando después una electroforesis en gel desnaturalizante. Ver, por ejemplo, Oleykowski et al., (1998), 'Mutation detection using a novel plant endonuclease', *Nucleic Acid Res.* 26: 4597-4602; y Colbert et al., (2001), 'High-Throughput Screening for Induced Point Mutations', *Plant Physiology*, 126: 480-484.

**[0083]** La planta que contiene las disrupciones deseadas de la invención puede cruzarse con otras plantas para introducir las disrupciones en otra planta. Esto puede hacerse usando técnicas de reproducción estándares.

**[0084]** También puede utilizarse la recombinación homóloga para introducir una disrupción de la invención. La recombinación homóloga se ha demostrado en plantas. Ver, por ejemplo, Puchta et al. (1994), *Experientia* 50: 277-284; Swoboda et al. (1994), *EMBOJ.* 13: 484- 489; Offringa et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7346-7350; Kempin et al. (1997) *Nature* 389: 802-803; y Terada et al., (2002), 'Efficient gene targeting by homologous recombination in rice', *Nature Biotechnology*, 20 (10): 1030-1034.

**[0085]** La recombinación homóloga puede usarse para inducir modificaciones genéticas dirigidas marcando o apuntando específicamente a un gen de interés 'in vivo'. Las mutaciones en partes seleccionadas de una secuencia genética seleccionada (incluyendo 5' secuencia arriba, 3' secuencia abajo y regiones intragénicas), como, por ejemplo:

i) un gen de CKX3 endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 1 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 1 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 1; y/o

ii) en al menos un gen endógeno adicional, que es:

a) un gen de CKX2 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 2 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 2 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 2;

b) un gen de CKX4 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 3 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 3 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 3;

c) un gen de CKX5 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 4 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que

comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 4 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 4; o

d) un gen de CKX6 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID No. 5 ó un ortólogo suyo, de manera que el ortólogo es un gen endógeno que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos con al menos un 80% o al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 5 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID No. 5;

se realizan 'in vitro' y se introducen en la planta deseada usando técnicas estándares. El gen mutado interactuará con el gen diana natural (o de tipo silvestre) de tal forma que en las plantas transgénicas tendrá lugar la recombinación homóloga y la sustitución dirigida del gen de tipo silvestre.

**[0086]** Las células vegetales aisladas y/o las plantas transgénicas de la invención, que pueden ser consumidas por humanos y animales, también pueden usarse -por ejemplo, directamente o tras un proceso de preparación- como pienso o alimento.

**[0087]** Adicionalmente, la invención está relacionada con el uso de las previamente mencionadas células vegetales aisladas y/o plantas transgénicas de la invención, y con las células y cultivos celulares, como, por ejemplo, raíces, hojas, etc., en el caso de organismos vegetales transgénicos; y con materiales de reproducción transgénica como semillas, tubérculos, raíces típicas -hinchadas o de remolacha- o frutos/frutas derivados de ellos para la producción de alimentos, piensos, productos farmacéuticos o productos químicos finos.

**[0088]** A continuación, la presente invención se describe con más detalle mediante el uso de ejemplos:

FIGURAS:

**[0089]**

FIG. 1 (La Figura 1): muestra las posiciones del ADN-T y de las inserciones de transposones en los mutantes de *ckx*. Los mutantes de inserción se identificaron mediante 'screening' (también llamado 'cribado') de PCR, y el sitio de inserción se determinó mediante secuenciación de ADN del fragmento límite. Las franjas negras representan los exones, mientras que las franjas blancas representan los intrones y los triángulos indican las inserciones de ADN-T. G, colección de ADN-T de GABI-KAT; S, colección de ADN-T de Salk; T, colección de ADN-T de Torrey Mesa; Z, colección de transposones de ZIGIA.

FIG. 2: muestra la caracterización de ADN-T de *ckx* y los alelos de inserción de los transposones. Ausencia de expresión de los genes de CKX en los mutantes de inserción. El ARN de las plántulas de 10 días se usa como plantilla ('template', en inglés) para el análisis de RT-PCR. La Actin2 (Actina 2) se amplificó como control.

FIG. 3: muestra el contenido de citoquinina en mutantes de *ckx3* *ckx5* e inflorescencias de tipo silvestre. Se cosecharon 0,5 g de inflorescencias de *Arabidopsis* por cada muestra y se agruparon 30 días después de la germinación. Se cosecharon cinco muestras biológicas independientes para cada genotipo. Los datos que se muestran son los valores promedio del contenido de citoquinina [pmol/g de peso fresco]  $\pm$  s. d. ('desviación estándar'); n = 5. tZ, transzeatina; tZR, trans-zeatin ribosida; tZRMP, trans-zeatin ribosida 5'-monofosfato; tZ9G, trans-zeatin 9-glucosida; tZROG, trans-zeatin ribosida O-glucosida; iP, N6-( $\Delta$ 2isopentenil)adenina; iPR, N6-( $\Delta$ 2isopentenil)adenosina; iPRMP, N6-( $\Delta$ 2isopentenil)adenosina 5'-monofosfato; iP9G, N6-( $\Delta$ 2isopentenil)adenina 9-glucosida.

FIG. 4: muestra una comparación de morfología apical de mutantes de tipo silvestre y *ckx*. Número de silicuas producido por los mutantes de tipo silvestre y de *ckx* en el tallo principal durante un ciclo vital. Las plantas de tipo silvestre formaron 54,7 silicuas (100%). Altura de la planta de *Arabidopsis* de tipo silvestre y los mutantes de *ckx* al finalizar el tiempo de floración. La altura de las plantas de tipo silvestre fue de 39,5 cm (100%). Los datos representan los valores promedio  $\pm$  s. d. ('desviación estándar') (n = 13-17). \*, P < 0,01 comparado con el tipo silvestre; • = P < 0,01 comparado con *ckx3*.

FIG. 5: muestra el fenotipo de la flor y el rendimiento de semillas de los mutantes de *ckx*. a, b, Flores en etapa 13 (a) y los correspondientes gineceos (b). De izquierda a derecha se muestran *ckx3*, *ckx5* y *ckx3 ckx5* de tipo silvestre. c, Superficie del pétalo de los mutantes de *ckx*, flores en etapa 14, 39 días después de la germinación (n = 30). d, Número de óvulos por gineceo (n = 12). e, Rendimiento de semillas de tipo silvestre y *ckx3 ckx5* en condiciones de cámara de crecimiento (n = 30). Los datos representan los valores promedio  $\pm$  s. d. \*, P < 0,01 comparado con el tipo silvestre.

FIG. 6: muestra el número de silicuas producidas por los mutantes de tipo silvestre y *ckx* en el tallo principal durante un ciclo vital (n = 15). Las plantas de tipo silvestre formaron 54,7 silicuas (100%). Los datos representan los valores promedio  $\pm$  s. d. ('desviación estándar'). \*, P < 0,01 comparado con WT (de tipo silvestre); •, P < 0,01 comparado con *ckx3*.

FIG. 7: muestra óvulos jóvenes de tipo silvestre y de mutante de cck3 cck5. La preparación de los óvulos se realizó de acuerdo con la escala gráfica de Schneitz et al.: 10µm. El número de óvulos aumenta en los mutantes de cck3 cck5 en comparación con las plantas de tipo silvestre.

5

EJEMPLOS:

10 MÉTODOS

### Material vegetal y condiciones de crecimiento

15 **[0090]** El ecotipo Columbia (Col-0) de *Arabidopsis thaliana* se usó como el tipo silvestre. Los mutantes de inserción de ADN-T cck2-S1 (SALK\_068485), cck3-S1 (SALK\_050938), cck4-S1 (SALK\_055204), cck5-S1 (SALK\_064309) y cck6-S1 (SALK\_070071) provenían del 'Salk Institute Genomic Analysis Laboratory' (Alonso et al., (2003) Science 301, 653-657), el mutante de inserción del transposón cck4-Z provenía de la colección de transposones de ZIGIA (Baumann E, Lewald J, Saedler H, Schulz B, Wisman E (1998), 'Successful PCR-based reverse genetic screens using an En-1-mutagenised Arabidopsis thaliana population generated via single-seed descent'. Theoretical and Applied Genetics 97: 729-734), cck5-G2 (Line ID 332B10) y cck7-G1 (Line ID 363C02) provenían de la colección GABI-KAT (Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., and Weisshaar, B. (2003) Plant Mol. Biol. 53, 247-259) y cck7-T1 (SAIL\_515\_A07) provenía del Torrey Mesa Research Institute (ahora Syngenta). Para verificar el partidor (o 'primer') genómico 1 de inserción de ADN-T y el partidor del extremo izquierdo, y para hallar líneas homocigóticas, se usaron los partidores genómicos 1 y 2 (tabla 1). Los mutantes dobles se obtuvieron mediante cruces y las inserciones se confirmaron mediante PCR genómica con partidores extremos ('border primers', en inglés) de un gen específico y de ADN-T (tabla 1). La línea mutante cck4-Z no se usó como pareja de cruce. Las plantas crecieron en el invernadero en una tierra a 22° C con condiciones de día largo (16 h de luz / 8 h de oscuridad). Para medir los rendimientos de semilla, las plantas crecieron en cámaras de crecimiento (Percival AR-66L) en una tierra a 24° C en □100 mE y con una humedad del 65% con condiciones de día largo.

30

### Análisis de la expresión de CKX

35 **[0091]** El ARN total se extrajo de las plántulas de acuerdo con Verwoerd et al. (Verwoerd et al., 1989). El ARN se trató con DNasa I libre de DNasa (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania) a 37° C durante 30 minutos. Se añadió un microlitro de 25 mM de EDTA a 65° C durante 10 min. El ARN (0,5 µg) se usó para una reacción de RT-PCR. Todos los pares de partidores que se usaron abarcaron los respectivos sitios de inserción del ADN-T (tabla 2). En todas las reacciones de RT-PCR, los partidores para la Actin2 (Actina2) se usaron como controles. La RT-PCR se realizó con el kit de un paso de RT-PCR ('One-Step RT-PCR kit') (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR comprendió 35 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 57° C y 2 min. a 72° C.

40

### Microscopía electrónica de barrido

45 **[0092]** Se utilizó una técnica de microscopía electrónica de barrido tal y como la describen Krupková et al. (Krupková, E., Immerzeel, P., Pauly, M., y Schmölling, T. (2007) Plant J. 50, 735-750) usando un microscopio LEO 430 (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

### Medición de Citoquinina

50 **[0093]** Se cultivaron plantas en tierra hasta que la inflorescencia principal tuviera 10 cm de altura (aproximadamente 30 días después de la germinación). Para cada muestra se agruparon 0,5 g de inflorescencias con flores de la etapa 1 a la etapa 15 (Smyth, D.R., Bowman, J.L., y Meyerowitz, E.M. (1990) 'Plant Cell 2', 755-767), se recogieron cinco muestras independientes y se analizó cada genotipo. El contenido de citoquinina se determinó mediante espectrometría de masas en tándem por electrospray / cromatografía líquida de ultra-rendimiento (Novák, O., Hauserová, E., Amakorová, P., Dole al, K., y Strnad, M. (2008) Phytochemistry 69, 2214-2224).

55

### Superficie del pétalo

60 **[0094]** El área de los pétalos se midió con el programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EE UU) a partir de imágenes digitales de órganos diseccionados .

### Determinación de la altura final de la planta y parámetros de rendimiento

65 **[0095]** La altura final de la planta y el número de silicuas en el tallo principal se determinaron después de que hubiera acabado la floración. Para el análisis del rendimiento de las semillas, las plantas se colocaron en bolsas de papel después de que la floración hubiera acabado. Después de que las plantas se conservaran en seco durante tres semanas más, se determinó el peso total de las semillas.

**Microscopía de luz**

5 **[0096]** Para contar y observar los óvulos, se despejaron los gineceos y se montaron tal y como se ha descrito (Malamy y Benfey, 1997). Todas las muestras se observaron con un microscopio Axioskop 2 plus (Zeiss, Jena, Alemania).

**Recuento y preparación de óvulos**

10 **[0097]** Los óvulos de mutantes de tipo silvestre y de cck3 cck5 se prepararon, analizaron y clasificaron como se describe en Schneitz et al (1995) ('Wild-type ovule development in Arabidopsis thaliana: a light microscope study of cleared whole-mount tissue'. Plant J. 7, /31-749).

15 **[0098]** Según parece, la capacidad que tiene el tejido placentario para poner en marcha el primordio ovular se ve aumentada en los mutantes de cck3 cck5 en comparación con las plantas de tipo silvestre, lo que da como resultado un mayor número promedio y una mayor densidad de óvulos y semillas en los carpelos.

20

Tabla 1. Partidor utilizado para identificar las inserciones de ADN-T que se muestran en la Fig. 1 (Figura 1).

	partidor genómico 1	partidor genómico 2	partidor del extremo izquierdo de inserción de ADN-T
<b>ckx2-S1</b>	GAATGGTGAATTGGTGTGTC (SEQ ID No. 15)	GCGAGCATGTCAACATTTCA (SEQ ID No. 16)	TGGTTACGCTAGTGGGCCATCG (SEQ ID No. 17)
<b>ckx3-S1</b>	TCAAAGCCCTCCCAATTGTC (SEQ ID No. 18)	CTCGGCTAAAGACGGAGTTG (SEQ ID No. 19)	TGGTTCAAGTAGTGGGCCATCG (SEQ ID No. 20)
<b>ckx4-S1</b>	CTCTGCCGCTTCTCACGACTTCGGTA (SEQ ID No. 21)	CATAAACCCCTGGAGCGAAACCTAGAG (SEQ ID No. 22)	TGGTTCAAGTAGTGGGCCATCG (SEQ ID No. 23)
<b>ckx4-Z</b>	CAAGGTAAACTCACACGCCATAACC (SEQ ID No. 24)	CATAAACCCCTGGAGCGAAACCTAGAG (SEQ ID No. 25)	GAGCGTGGTCCCCACACTTCTATAC (SEQ ID No. 26)
<b>ckx5-S1</b>	TTGTTGCAGCAACGACCAACCGATAATGA (SEQ ID No. 27)	AATGGTATAATTGTGATGACAGGTGAGATG (SEQ ID No. 28)	TGGTTCAAGTAGTGGGCCATCG (SEQ ID No. 29)
<b>ckx5-G2</b>	AATGGTATATTGTGATGACAGGTGAGATG (SEQ ID No. 30)	TTGTTGCAGCAACGACCAACCGATAATGA (SEQ ID No. 31)	ATATTGACCATCATCACTCATTGC (SEQ ID No. 32)
<b>ckx6-S2</b>	AOCCTGTCCAAGAAATGCTTCA (SEQ ID No. 33)	TGTTGATTCCCCCTGCTCCATA (SEQ ID No. 34)	TGGTTCAAGTAGTGGGCCATCG (SEQ ID No. 35)
<b>ckx7-G1</b>	TTAGCCGTCGGATCAATCTC (SEQ ID No. 36)	CGGAAAATCTACGGATGGTG (SEQ ID No. 37)	ATATTGACCATCATCACTCATTGC (SEQ ID No. 38)
<b>ckx7-T1</b>	GCTAGTAAGTCAGAGAAAGAGTCATC (SEQ ID No. 39)	TTAGCCGTCGGATCAATCTC (SEQ ID No. 40)	GCCTTTTTCAGAAAATGGATAAATAGCCCTTGCTTCC (SEQ ID No. 41)

Tabla 2. Partidor utilizado para los análisis de RT-PCR que se muestran en la Fig. 2

	partidor 1	partidor 2
5	<i>ckx2-S1</i> GAATGGTGG AATTGGTGGTC (SEQ ID No. 42)	AGTCCCGAAGCTGATTTTTG (SEQ ID No. 43)
	<i>ckx3-S1</i> CTCGGCTAAAGACGGAGTTG (SEQ ID No. 44)	AATAGGTGGTTGTAAACGTAGACGCA (SEQ ID No. 45)
	<i>ckx4-S1</i> CTCTGCCGCTTCTCACGACTTCGGTA (SEQ ID No. 46)	CATAAACCCCTGGAGCGAAACCTAGAG (SEQ ID No. 47)
10	<i>ckx4-Z</i> CTCTGCCGCTTCTCACGACTTCGGTA (SEQ ID No. 48)	CATAAACCCCTGGAGCGAAACCTAGAG (SEQ ID No. 49)
	<i>ckx5-S1</i> GCACGAATCTCTCTCGAACC (SEQ ID No. 50)	CGCTGACGAAGAAGACGAC (SEQ ID No. 51)
	<i>ckx5-G2</i> GCACGAATCTCTCTCGAACC (SEQ ID No. 52)	AAATTCTTGGACCGGAGCTT (SEQ ID No. 53)
15	<i>ckx6-S2</i> TGTGGATTCCCCTGCTCCATA (SEQ ID No. 54)	ACCCTGTCCAAGAATGCTTCA (SEQ ID No. 55)
	<i>ckx7-G1</i> TTAGCCGTCCGATCAATCTC (SEQ ID No. 56)	CGGAAAATCTACGGATGGTG (SEQ ID No. 57)
	<i>ckx7-T1</i> TTAGCCGTCCGATCAATCTC (SEQ ID No. 58)	CGGAAAATCTACGGATGGTG (SEQ ID No. 59)
20	<i>actina2</i> TACAACGAGCTTCGTGTTGC (SEQ ID No. 60)	GATTGATCCTCCGATCCAGA (SEQ ID No. 61)

LISTA DE SECUENCIAS

25 **[0099]**

<110> Schmülling, Thomas

30 <120> La disrupción de la CKX3 y al menos otro gen de CKX en una planta o célula vegetal produce mejoras en los rasgos genéticos

<130> P663409EP

35 <160> 61

<170> Patente en versión 3.3

<210> 1

<211> 523

40 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

45

ES 2 621 992 T3

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

Ile Val Ile Ile Ile Thr Leu Ser Thr Pro Ile Thr Thr Asn Thr Ser  
20 25 30

Pro Gln Pro Trp Asn Ile Leu Ser His Asn Glu Phe Ala Gly Lys Leu  
35 40 45

Thr Ser Ser Ser Ser Ser Val Glu Ser Ala Ala Thr Asp Phe Gly His  
50 55 60

Val Thr Lys Ile Phe Pro Ser Ala Val Leu Ile Pro Ser Ser Val Glu  
65 70 75 80

Asp Ile Thr Asp Leu Ile Lys Leu Ser Phe Asp Ser Gln Leu Ser Phe  
85 90 95

Pro Leu Ala Ala Arg Gly His Gly His Ser His Arg Gly Gln Ala Ser  
100 105 110

Ala Lys Asp Gly Val Val Val Asn Met Arg Ser Met Val Asn Arg Asp  
115 120 125

Arg Gly Ile Lys Val Ser Arg Thr Cys Leu Tyr Val Asp Val Asp Ala  
130 135 140

Ala Trp Leu Trp Ile Glu Val Leu Asn Lys Thr Leu Glu Leu Gly Leu  
145 150 155 160

Thr Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Val Gly Gly Thr  
165 170 175

Leu Ser Asn Gly Gly Ile Ser Gly Gln Thr Phe Arg Tyr Gly Pro Gln

ES 2 621 992 T3

180					185					190					
Ile	Thr	Asn	Val	Leu	Glu	Met	Asp	Val	Ile	Thr	Gly	Lys	Gly	Glu	Ile
		195					200					205			
Ala	Thr	Cys	Ser	Lys	Asp	Met	Asn	Ser	Asp	Leu	Phe	Phe	Ala	Val	Leu
	210					215					220				
Gly	Gly	Leu	Gly	Gln	Phe	Gly	Ile	Ile	Thr	Arg	Ala	Arg	Ile	Lys	Leu
225					230					235					240
Glu	Val	Ala	Pro	Lys	Arg	Ala	Lys	Trp	Leu	Arg	Phe	Leu	Tyr	Ile	Asp
				245					250					255	
Phe	Ser	Glu	Phe	Thr	Arg	Asp	Gln	Glu	Arg	Val	Ile	Ser	Lys	Thr	Asp
			260					265					270		
Gly	Val	Asp	Phe	Leu	Glu	Gly	Ser	Ile	Met	Val	Asp	His	Gly	Pro	Pro
		275					280					285			
Asp	Asn	Trp	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Pro	Ser	Asp	His	Leu	Arg	Ile
	290					295					300				
Ala	Ser	Met	Val	Lys	Arg	His	Arg	Val	Ile	Tyr	Cys	Leu	Glu	Val	Val
305					310					315					320
Lys	Tyr	Tyr	Asp	Glu	Thr	Ser	Gln	Tyr	Thr	Val	Asn	Glu	Glu	Met	Glu
				325					330					335	
Glu	Leu	Ser	Asp	Ser	Leu	Asn	His	Val	Arg	Gly	Phe	Met	Tyr	Glu	Lys
			340					345					350		
Asp	Val	Thr	Tyr	Met	Asp	Phe	Leu	Asn	Arg	Val	Arg	Thr	Gly	Glu	Leu
		355					360					365			
Asn	Leu	Lys	Ser	Lys	Gly	Gln	Trp	Asp	Val	Pro	His	Pro	Trp	Leu	Asn
	370					375					380				
Leu	Phe	Val	Pro	Lys	Thr	Gln	Ile	Ser	Lys	Phe	Asp	Asp	Gly	Val	Phe
385					390					395					400
Lys	Gly	Ile	Ile	Leu	Arg	Asn	Asn	Ile	Thr	Ser	Gly	Pro	Val	Leu	Val
				405					410					415	
Tyr	Pro	Met	Asn	Arg	Asn	Lys	Trp	Asn	Asp	Arg	Met	Ser	Ala	Ala	Ile
			420					425					430		
Pro	Glu	Glu	Asp	Val	Phe	Tyr	Ala	Val	Gly	Phe	Leu	Arg	Ser	Ala	Gly
		435					440					445			



ES 2 621 992 T3

Phe Asp Asn Trp Glu Ala Phe Asp Gln Glu Asn Met Glu Ile Leu Lys  
 450 455 460  
 5  
 Phe Cys Glu Asp Ala Asn Met Gly Val Ile Gln Tyr Leu Pro Tyr His  
 465 470 475 480  
 10  
 Ser Ser Gln Glu Gly Trp Val Arg His Phe Gly Pro Arg Trp Asn Ile  
 485 490 495  
 15  
 Phe Val Glu Arg Lys Tyr Lys Tyr Asp Pro Lys Met Ile Leu Ser Pro  
 500 505 510  
 20  
 Gly Gln Asn Ile Phe Gln Lys Ile Asn Ser Ser  
 515 520  
 25  
 <210> 2  
 <211> 501  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 <400> 2  
 30  
 Met Ala Asn Leu Arg Leu Met Ile Thr Leu Ile Thr Val Leu Met Ile  
 1 5 10 15  
 35  
 Thr Lys Ser Ser Asn Gly Ile Lys Ile Asp Leu Pro Lys Ser Leu Asn  
 20 25 30  
 40  
 Leu Thr Leu Ser Thr Asp Pro Ser Ile Ile Ser Ala Ala Ser His Asp  
 35 40 45  
 45  
 Phe Gly Asn Ile Thr Thr Val Thr Pro Gly Gly Val Ile Cys Pro Ser  
 50 55 60  
 50  
 Ser Thr Ala Asp Ile Ser Arg Leu Leu Gln Tyr Ala Ala Asn Gly Lys  
 65 70 75 80  
 55  
 Ser Thr Phe Gln Val Ala Ala Arg Gly Gln Gly His Ser Leu Asn Gly  
 85 90 95  
 60  
 Gln Ala Ser Val Ser Gly Gly Val Ile Val Asn Met Thr Cys Ile Thr  
 100 105 110  
 65  
 Asp Val Val Val Ser Lys Asp Lys Lys Tyr Ala Asp Val Ala Ala Gly  
 115 120 125  
 70  
 Thr Leu Trp Val Asp Val Leu Lys Lys Thr Ala Glu Lys Gly Val Ser  
 130 135 140

ES 2 621 992 T3

Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu His Ile Thr Val Gly Gly Thr Leu  
 145 150 155 160  
 Ser Asn Gly Gly Ile Gly Gly Gln Val Phe Arg Asn Gly Pro Leu Val  
 165 170 175  
 Ser Asn Val Leu Glu Leu Asp Val Ile Thr Gly Lys Gly Glu Met Leu  
 180 185 190  
 Thr Cys Ser Arg Gln Leu Asn Pro Glu Leu Phe Tyr Gly Val Leu Gly  
 195 200 205  
 Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Val Leu Asp  
 210 215 220  
 His Ala Pro Lys Arg Ala Lys Trp Phe Arg Met Leu Tyr Ser Asp Phe  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Phe Thr Lys Asp Gln Glu Arg Leu Ile Ser Met Ala Asn Asp  
 245 250 255  
 Ile Gly Val Asp Tyr Leu Glu Gly Gln Ile Phe Leu Ser Asn Gly Val  
 260 265 270  
 Val Asp Thr Ser Phe Phe Pro Pro Ser Asp Gln Ser Lys Val Ala Asp  
 275 280 285  
 Leu Val Lys Gln His Gly Ile Ile Tyr Val Leu Glu Val Ala Lys Tyr  
 290 295 300  
 Tyr Asp Asp Pro Asn Leu Pro Ile Ile Ser Lys Val Ile Asp Thr Leu  
 305 310 315 320  
 Thr Lys Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Gly Phe Ile Ser Met His Asp Val  
 325 330 335  
 Ala Tyr Phe Asp Phe Leu Asn Arg Val His Val Glu Glu Asn Lys Leu  
 340 345 350  
 Arg Ser Leu Gly Leu Trp Glu Leu Pro His Pro Trp Leu Asn Leu Tyr  
 355 360 365  
 Val Pro Lys Ser Arg Ile Leu Asp Phe His Asn Gly Val Val Lys Asp  
 370 375 380  
 Ile Leu Leu Lys Gln Lys Ser Ala Ser Gly Leu Ala Leu Leu Tyr Pro  
 385 390 395 400  
 Thr Asn Arg Asn Lys Trp Asp Asn Arg Met Ser Ala Met Ile Pro Glu

ES 2 621 992 T3

				405					410					415		
5	Ile	Asp	Glu	Asp	Val	Ile	Tyr	Ile	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ser	Ala	Thr
				420					425					430		
10	Pro	Lys	Asp	Leu	Pro	Glu	Val	Glu	Ser	Val	Asn	Glu	Lys	Ile	Ile	Arg
			435					440					445			
15	Phe	Cys	Lys	Asp	Ser	Gly	Ile	Lys	Ile	Lys	Gln	Tyr	Leu	Met	His	Tyr
		450					455					460				
20	Thr	Ser	Lys	Glu	Asp	Trp	Ile	Glu	His	Phe	Gly	Ser	Lys	Trp	Asp	Asp
	465					470					475					480
25	Phe	Ser	Lys	Arg	Lys	Asp	Leu	Phe	Asp	Pro	Lys	Lys	Leu	Leu	Ser	Pro
				485						490					495	
30	Gly	Gln	Asp	Ile	Phe											
				500												

35 <210> 3  
 <211> 524  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana

40 <400> 3

ES 2 621 992 T3

Met Thr Asn Thr Leu Cys Leu Ser Leu Ile Thr Leu Ile Thr Leu Phe  
1 5 10 15

Ile Ser Leu Thr Pro Thr Leu Ile Lys Ser Asp Glu Gly Ile Asp Val  
20 25 30

Phe Leu Pro Ile Ser Leu Asn Leu Thr Val Leu Thr Asp Pro Phe Ser  
35 40 45

Ile Ser Ala Ala Ser His Asp Phe Gly Asn Ile Thr Asp Glu Asn Pro  
50 55 60

Gly Ala Val Leu Cys Pro Ser Ser Thr Thr Glu Val Ala Arg Leu Leu  
65 70 75 80

Arg Phe Ala Asn Gly Gly Phe Ser Tyr Asn Lys Gly Ser Thr Ser Pro  
85 90 95

Ala Ser Thr Phe Lys Val Ala Ala Arg Gly Gln Gly His Ser Leu Arg  
100 105 110

Gly Gln Ala Ser Ala Pro Gly Gly Val Val Val Asn Met Thr Cys Leu  
115 120 125

ES 2 621 992 T3

Ala Met Ala Ala Lys Pro Ala Ala Val Val Ile Ser Ala Asp Gly Thr  
130 135 140

Tyr Ala Asp Val Ala Ala Gly Thr Met Trp Val Asp Val Leu Lys Ala  
145 150 155 160

Ala Val Asp Arg Gly Val Ser Pro Val Thr Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr  
165 170 175

Leu Ser Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile Gly Gly Gln Thr  
180 185 190

Phe Arg His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val His Glu Leu Asp Val Ile  
195 200 205

Thr Gly Lys Gly Glu Met Met Thr Cys Ser Pro Lys Leu Asn Pro Glu  
210 215 220

Leu Phe Tyr Gly Val Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr  
225 230 235 240

Arg Ala Arg Ile Ala Leu Asp His Ala Pro Thr Arg Val Lys Trp Ser  
245 250 255

Arg Ile Leu Tyr Ser Asp Phe Ser Ala Phe Lys Arg Asp Gln Glu Arg  
260 265 270

Leu Ile Ser Met Thr Asn Asp Leu Gly Val Asp Phe Leu Glu Gly Gln  
275 280 285

Leu Met Met Ser Asn Gly Phe Val Asp Thr Ser Phe Phe Pro Leu Ser  
290 295 300

Asp Gln Thr Arg Val Ala Ser Leu Val Asn Asp His Arg Ile Ile Tyr  
305 310 315 320

Val Leu Glu Val Ala Lys Tyr Tyr Asp Arg Thr Thr Leu Pro Ile Ile  
325 330 335

Asp Gln Val Ile Asp Thr Leu Ser Arg Thr Leu Gly Phe Ala Pro Gly  
340 345 350

Phe Met Phe Val Gln Asp Val Pro Tyr Phe Asp Phe Leu Asn Arg Val  
355 360 365

Arg Asn Glu Glu Asp Lys Leu Arg Ser Leu Gly Leu Trp Glu Val Pro  
370 375 380

ES 2 621 992 T3

His Pro Trp Leu Asn Ile Phe Val Pro Gly Ser Arg Ile Gln Asp Phe  
 385 390 395 400  
 5  
 His Asp Gly Val Ile Asn Gly Leu Leu Leu Asn Gln Thr Ser Thr Ser  
 405 410 415  
 10  
 Gly Val Thr Leu Phe Tyr Pro Thr Asn Arg Asn Lys Trp Asn Asn Arg  
 420 425 430  
 15  
 Met Ser Thr Met Thr Pro Asp Glu Asp Val Phe Tyr Val Ile Gly Leu  
 435 440 445  
 20  
 Leu Gln Ser Ala Gly Gly Ser Gln Asn Trp Gln Glu Leu Glu Asn Leu  
 450 455 460  
 25  
 Asn Asp Lys Val Ile Gln Phe Cys Glu Asn Ser Gly Ile Lys Ile Lys  
 465 470 475 480  
 30  
 Glu Tyr Leu Met His Tyr Thr Arg Lys Glu Asp Trp Val Lys His Phe  
 485 490 495  
 35  
 Gly Pro Lys Trp Asp Asp Phe Leu Arg Lys Lys Ile Met Phe Asp Pro  
 500 505 510  
 40  
 Lys Arg Leu Leu Ser Pro Gly Gln Asp Ile Phe Asn  
 515 520  
 45 <210> 4  
 <211> 540  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 50 <400> 4

ES 2 621 992 T3

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

ES 2 621 992 T3

Ala Arg Gly His Gly His Ser Ile Asn Gly Gln Ala Ala Ala Gly Arg  
100 105 110

Asn Gly Val Val Val Glu Met Asn His Gly Val Thr Gly Thr Pro Lys  
115 120 125

Pro Leu Val Arg Pro Asp Glu Met Tyr Val Asp Val Trp Gly Gly Glu  
130 135 140

Leu Trp Val Asp Val Leu Lys Lys Thr Leu Glu His Gly Leu Ala Pro  
145 150 155 160

Lys Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Val Gly Gly Thr Leu Ser  
165 170 175

Asn Ala Gly Ile Ser Gly Gln Ala Phe His His Gly Pro Gln Ile Ser  
180 185 190

Asn Val Leu Glu Leu Asp Val Val Thr Gly Lys Gly Glu Val Met Arg  
195 200 205

Cys Ser Glu Glu Glu Asn Thr Arg Leu Phe His Gly Val Leu Gly Gly  
210 215 220

Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Ser Leu Glu Pro  
225 230 235 240

Ala Pro Gln Arg Val Arg Trp Ile Arg Val Leu Tyr Ser Ser Phe Lys  
245 250 255

Val Phe Thr Glu Asp Gln Glu Tyr Leu Ile Ser Met His Gly Gln Leu  
260 265 270

Lys Phe Asp Tyr Val Glu Gly Phe Val Ile Val Asp Glu Gly Leu Val  
275 280 285

Asn Asn Trp Arg Ser Ser Phe Phe Ser Pro Arg Asn Pro Val Lys Ile  
290 295 300

Ser Ser Val Ser Ser Asn Gly Ser Val Leu Tyr Cys Leu Glu Ile Thr  
305 310 315 320

Lys Asn Tyr His Asp Ser Asp Ser Glu Ile Val Asp Gln Glu Val Glu  
325 330 335

Ile Leu Met Lys Lys Leu Asn Phe Ile Pro Thr Ser Val Phe Thr Thr  
340 345 350



ES 2 621 992 T3

Asp Leu Gln Tyr Val Asp Phe Leu Asp Arg Val His Lys Ala Glu Leu  
 355 360 365  
 5  
 Lys Leu Arg Ser Lys Asn Leu Trp Glu Val Pro His Pro Trp Leu Asn  
 370 375 380  
 10  
 Leu Phe Val Pro Lys Ser Arg Ile Ser Asp Phe Asp Lys Gly Val Phe  
 385 390 395 400  
 15  
 Lys Gly Ile Leu Gly Asn Lys Thr Ser Gly Pro Ile Leu Ile Tyr Pro  
 405 410 415  
 20  
 Met Asn Lys Asp Lys Trp Asp Glu Arg Ser Ser Ala Val Thr Pro Asp  
 420 425 430  
 25  
 Glu Glu Val Phe Tyr Leu Val Ala Leu Leu Arg Ser Ala Leu Thr Asp  
 435 440 445  
 30  
 Gly Glu Glu Thr Gln Lys Leu Glu Tyr Leu Lys Asp Gln Asn Arg Arg  
 450 455 460  
 35  
 Ile Leu Glu Phe Cys Glu Gln Ala Lys Ile Asn Val Lys Gln Tyr Leu  
 465 470 475 480  
 40  
 Pro His His Ala Thr Gln Glu Glu Trp Val Ala His Phe Gly Asp Lys  
 485 490 495  
 45  
 Trp Asp Arg Phe Arg Ser Leu Lys Ala Glu Phe Asp Pro Arg His Ile  
 500 505 510  
 50  
 Leu Ala Thr Gly Gln Arg Ile Phe Gln Asn Pro Ser Leu Ser Leu Phe  
 515 520 525  
 55  
 Pro Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ser Trp  
 530 535 540

<210> 5  
 <211> 533  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 5

65

ES 2 621 992 T3

Met Ser Tyr Leu His Ala Ser Leu Leu Arg Lys Arg Thr Met Leu Ile  
1 5 10 15

Val Arg Ser Phe Thr Ile Leu Leu Leu Ser Cys Ile Ala Phe Lys Leu  
20 25 30

Ala Cys Cys Phe Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Lys Ala Leu Pro Leu

ES 2 621 992 T3

	35					40					45				
Val	Gly	His	Leu	Glu	Phe	Glu	His	Val	His	His	Ala	Ser	Lys	Asp	Phe
	50					55					60				
Gly	Asn	Arg	Tyr	Gln	Leu	Ile	Pro	Leu	Ala	Val	Leu	His	Pro	Lys	Ser
65					70					75					80
Val	Ser	Asp	Ile	Ala	Ser	Thr	Ile	Arg	His	Ile	Trp	Met	Met	Gly	Thr
				85					90					95	
His	Ser	Gln	Leu	Thr	Val	Ala	Ala	Arg	Gly	Arg	Gly	His	Ser	Leu	Gln
			100					105					110		
Gly	Gln	Ala	Gln	Thr	Arg	His	Gly	Ile	Val	Ile	His	Met	Glu	Ser	Leu
		115					120					125			
His	Pro	Gln	Lys	Leu	Gln	Val	Tyr	Ser	Val	Asp	Ser	Pro	Ala	Pro	Tyr
	130					135					140				
Val	Asp	Val	Ser	Gly	Gly	Glu	Leu	Trp	Ile	Asn	Ile	Leu	His	Glu	Thr
145					150					155					160
Leu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Ala	Pro	Lys	Ser	Trp	Thr	Asp	Tyr	Leu	His	Leu
				165					170					175	
Thr	Val	Gly	Gly	Thr	Leu	Ser	Asn	Ala	Gly	Ile	Ser	Gly	Gln	Ala	Phe
			180					185					190		
Arg	His	Gly	Pro	Gln	Ile	Ser	Asn	Val	His	Gln	Leu	Glu	Ile	Val	Thr
		195					200					205			
Gly	Lys	Gly	Glu	Ile	Leu	Asn	Cys	Thr	Lys	Arg	Gln	Asn	Ser	Asp	Leu
	210					215					220				
Phe	Asn	Gly	Val	Leu	Gly	Gly	Leu	Gly	Gln	Phe	Gly	Ile	Ile	Thr	Arg
225					230					235					240
Ala	Arg	Ile	Ala	Leu	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Met	Val	Lys	Trp	Ile	Arg
				245					250					255	
Val	Leu	Tyr	Leu	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Ala	Lys	Asp	Gln	Glu	Gln	Leu
			260					265					270		
Ile	Ser	Ala	Gln	Gly	His	Lys	Phe	Asp	Tyr	Ile	Glu	Gly	Phe	Val	Ile
		275					280					285			
Ile	Asn	Arg	Thr	Gly	Leu	Leu	Asn	Ser	Trp	Arg	Leu	Ser	Phe	Thr	Ala
	290					295					300				

ES 2 621 992 T3

5  
 Glu Glu Pro Leu Glu Ala Ser Gln Phe Lys Phe Asp Gly Arg Thr Leu  
 305 310 315 320

10  
 Tyr Cys Leu Glu Leu Ala Lys Tyr Leu Lys Gln Asp Asn Lys Asp Val  
 325 330 335

15  
 Ile Asn Gln Glu Val Lys Glu Thr Leu Ser Glu Leu Ser Tyr Val Thr  
 340 345 350

20  
 Ser Thr Leu Phe Thr Thr Glu Val Ala Tyr Glu Ala Phe Leu Asp Arg  
 355 360 365

25  
 Val His Val Ser Glu Val Lys Leu Arg Ser Lys Gly Gln Trp Glu Val  
 370 375 380

30  
 Pro His Pro Trp Leu Asn Leu Leu Val Pro Arg Ser Lys Ile Asn Glu  
 385 390 395 400

35  
 Phe Ala Arg Gly Val Phe Gly Asn Ile Leu Thr Asp Thr Ser Asn Gly  
 405 410 415

40  
 Pro Val Ile Val Tyr Pro Val Asn Lys Ser Lys Trp Asp Asn Gln Thr  
 420 425 430

45  
 Ser Ala Val Thr Pro Glu Glu Glu Val Phe Tyr Leu Val Ala Ile Leu  
 435 440 445

50  
 Thr Ser Ala Ser Pro Gly Ser Ala Gly Lys Asp Gly Val Glu Glu Ile  
 450 455 460

55  
 Leu Arg Arg Asn Arg Arg Ile Leu Glu Phe Ser Glu Glu Ala Gly Ile  
 465 470 475 480

60  
 Gly Leu Lys Gln Tyr Leu Pro His Tyr Thr Thr Arg Glu Glu Trp Arg  
 485 490 495

65  
 Ser His Phe Gly Asp Lys Trp Gly Glu Phe Val Arg Arg Lys Ser Arg  
 500 505 510

70  
 Tyr Asp Pro Leu Ala Ile Leu Ala Pro Gly His Arg Ile Phe Gln Lys  
 515 520 525

75  
 Ala Val Ser Tyr Ser  
 530

80  
 <210> 6  
 <211> 524

85  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana

90  
 <400> 6

ES 2 621 992 T3

Met Ile Ala Tyr Ile Glu Pro Tyr Phe Leu Glu Asn Asp Ala Glu Ala  
1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Thr Ala Ala Gly Lys Ser Thr Asp Gly Val Ser Glu  
20 25 30

Ser Leu Asn Ile Gln Gly Glu Ile Leu Cys Gly Gly Ala Ala Ala Asp  
35 40 45

Ile Ala Gly Arg Asp Phe Gly Gly Met Asn Cys Val Lys Pro Leu Ala  
50 55 60

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

Ala Leu Arg Ser Asp Lys Leu Thr Val Ala Ala Arg Gly Asn Gly His  
85 90 95

Ser Ile Asn Gly Gln Ala Met Ala Glu Gly Gly Leu Val Val Asp Met  
100 105 110

Ser Thr Thr Ala Glu Asn His Phe Glu Val Gly Tyr Leu Ser Gly Gly  
115 120 125

Asp Ala Thr Ala Phe Val Asp Val Ser Gly Gly Ala Leu Trp Glu Asp  
130 135 140

Val Leu Lys Arg Cys Val Ser Glu Tyr Gly Leu Ala Pro Arg Ser Trp  
145 150 155 160

Thr Asp Tyr Leu Gly Leu Thr Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly  
165 170 175

Val Ser Gly Gln Ala Phe Arg Tyr Gly Pro Gln Thr Ser Asn Val Thr  
180 185 190

Glu Leu Asp Val Val Thr Gly Asn Gly Asp Val Val Thr Cys Ser Glu  
195 200 205

Ile Glu Asn Ser Glu Leu Phe Phe Ser Val Leu Gly Gly Leu Gly Gln  
210 215 220

Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Val Leu Leu Gln Pro Ala Pro Asp  
225 230 235 240

Met Val Arg Trp Ile Arg Val Val Tyr Thr Glu Phe Asp Glu Phe Thr

ES 2 621 992 T3

				245						250						255
Gln	Asp	Ala	Glu	Trp	Leu	Val	Ser	Gln	Lys	Asn	Glu	Ser	Ser	Phe	Asp	
			260					265					270			
Tyr	Val	Glu	Gly	Phe	Val	Phe	Val	Asn	Gly	Ala	Asp	Pro	Val	Asn	Gly	
		275					280					285				
Trp	Pro	Thr	Val	Pro	Leu	His	Pro	Asp	His	Glu	Phe	Asp	Pro	Thr	Arg	
	290					295					300					
Leu	Pro	Gln	Ser	Cys	Gly	Ser	Val	Leu	Tyr	Cys	Leu	Glu	Leu	Gly	Leu	
305					310					315					320	
His	Tyr	Arg	Asp	Ser	Asp	Ser	Asn	Ser	Thr	Ile	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	
				325					330					335		
Arg	Leu	Ile	Gly	Arg	Leu	Arg	Phe	Asn	Glu	Gly	Leu	Arg	Phe	Glu	Val	
			340					345					350			
Asp	Leu	Pro	Tyr	Val	Asp	Phe	Leu	Leu	Arg	Val	Lys	Arg	Ser	Glu	Glu	
		355					360					365				
Ile	Ala	Lys	Glu	Asn	Gly	Thr	Trp	Glu	Thr	Pro	His	Pro	Trp	Leu	Asn	
	370					375					380					
Leu	Phe	Val	Ser	Lys	Arg	Asp	Ile	Gly	Asp	Phe	Asn	Arg	Thr	Val	Phe	
385					390					395					400	
Lys	Glu	Leu	Val	Lys	Asn	Gly	Val	Asn	Gly	Pro	Met	Leu	Val	Tyr	Pro	
				405					410					415		
Leu	Leu	Arg	Ser	Arg	Trp	Asp	Asp	Arg	Thr	Ser	Val	Val	Ile	Pro	Glu	
			420					425					430			
Glu	Gly	Glu	Ile	Phe	Tyr	Ile	Val	Ala	Leu	Leu	Arg	Phe	Val	Pro	Pro	
		435					440					445				
Cys	Ala	Lys	Val	Ser	Ser	Val	Glu	Lys	Met	Val	Ala	Gln	Asn	Gln	Glu	
	450					455					460					
Ile	Val	His	Trp	Cys	Val	Lys	Asn	Gly	Ile	Asp	Tyr	Lys	Leu	Tyr	Leu	
465					470					475					480	
Pro	His	Tyr	Lys	Ser	Gln	Glu	Glu	Trp	Ile	Arg	His	Phe	Gly	Asn	Arg	
				485					490					495		
Trp	Ser	Arg	Phe	Val	Asp	Arg	Lys	Ala	Met	Phe	Asp	Pro	Met	Ala	Ile	
			500					505					510			



ES 2 621 992 T3

atggcgagtt ataatcttcg ttcacaagtt cgtcttatag caataacaat agtaatcatc 60  
 attactctct caactccgat cacaaccaac acatcaccac aacctggaa taccctttca 120  
 cacaacgaat tcgccggaaa actcacctcc tcctcctcct ccgtcgaatc agccgccaca 180  
 gatttcggcc acgtcaccaa aatcttcctt tccgccgtct taatcccttc ctccgttgaa 240  
 gacatcacag atctcataaa actctctttt gactctcaac tgtcttttcc tttagccgct 300  
 cgtggtcacg gacacagcca ccgtggccaa gcctcggcta aagacggagt tgtggccaac 360  
 atgcgggtcca tggtaaaccg ggatcgagggt atcaagggtg ctaggacctg tttatatgtt 420  
 gacgtggacg ctgcgtggct atggattgag gtggtgaata aaactttgga gttagggtta 480  
 acgccggttt cttggacgga ttatttgtat ttaacagtcg gtgggacggt atcaaaccggc 540  
 ggaattagtg gacaaacggt tcggtagcgt ccacagatca ctaatgttct agagatggat 600  
 gttattactg gtacgtacca cgatcttttt cacacagaga ttaaaaaaaaa cagtaatagt 660  
 gattttaact tcgtacgttt ctgatagaca acaaagaact tcgtacgttt ttcgaagttt 720  
 tttcgtcttt ttcatttttag atctgcgcgg ccatttttgg ttatgctatt gtttgtttgt 780  
 attgtttgtc tctgtttatt tatttctcga acttgttgat agcttttctt cttttcacac 840  
 atcaatctaa tcaccttttt tggctttaag attagaaaga agatacggac taggtaaaaa 900  
 taggtggttg taaacgtaga cgcattaaaa aatattggt ttttttattt tttgataagc 960  
 aaaattggtg gttggtctaa gattataaac ttgatattaa tgcaaaggtc gatctagcaa 1020  
 tagaagatta atcaatattc ttggtgtttt aacaacagat tatttcatca ttaaaatcgt 1080  
 gaaacaaaga aattttggta gtatacatta cgtgtagttt tgtagttta ttaaaaaaaaa 1140  
 tagtatatag ttttgttaaa acgcgattta tttagtaaca cattagtata ttacacgttt 1200  
 aaccaactaa actttttttt ttgaataatt atgttctata tttcttactc aaattatgca 1260  
 aatttcgtgg attcgaagtc aaatttctgc gaaatttaca tggcatata ttataaaact 1320  
 gttcatataa cccggtgaac aaacagacaa ttaagggttt gaatggttac gccggttggg 1380  
 gcggacacaa ccgtcaatag atcagaccgt tttttattta ccattcatca attatattcc 1440  
 gcagtggttt ggggtaaaaa aatagaaga aaaccgcagc ggaccaattc cataccgttt 1500  
 ttacatacaa ataaacatgg tgcgcaacgg tttattgtcc gcctcaaaaa tgaaatggac 1560  
 taaaccgcag ataaattaga ccgctttgtc cgctgcctcc attcatagac taaaaaaaaa 1620



ES 2 621 992 T3

5 caacccaaaa aaaaatggtc ccacgcccac gattttacac gaggtttcctt gtggcgtaag 1680  
gacaaaactc aaaagtcat aacgtttggc cctaaccagg tgtaatggat taagtaacag 1740  
tcaatthttct tattatagct gtatccatta tgtccacata tgcattccata tacattacac 1800  
10 tgttggctc aagtgtagtt agattacgaa gactttcaag ttccatthttt tggttaggag 1860  
ataaacataa tttaatgata ccgacttttag cactctaggc tcaaaacaag tacagaagag 1920  
aatagthttta tttcaaacctc gttgcattgt tgtatcaatt aattgtgtta gtctttgtat 1980  
15 attcttacat aacggctcaa gtttgttgaa atagthttact tactaaactt ttcctaatgg 2040  
ggctcaaattt tathtttatag gaaaaggaga gattgcaact tgttccaagg acatgaactc 2100  
ggatctthttc ttcgctgggt taggaggthtt gggctcaattc ggcattataa caagagccag 2160  
20 aathaaactt gaagtagctc cgaaaagggt atgttaaatt tgtaaattat gcaactacag 2220  
aaaattctat gaaathttatg aatgaacata tatgcathttt tggaththttg taggccaagt 2280  
25 ggtaaggtt tctatacata gaththctccg aattcacaag agatcaagaa cgagtgatat 2340  
cgaaaacgga cgggttagat thcttagaag gthtccattat ggtggacctt ggcccaccgg 2400  
ataactggag atccacgtat tatccaccgt ccgatcactt gaggatcgcc tcaatggctca 2460  
30 aacgacatcg tgtcatctac tgccttgaag tctgcaagta ttacgacgaa actthctcaat 2520  
acacagtcaa cgaggctccgt acatacacat aatcataaat catacatgta taathgggag 2580  
35 atctthtatgc athattcaat tatathaat tactthtagtt aththaactta tgcaggaaat 2640  
ggaggagtha agcgatagtt taaacctatg aagaggthtt atgtacgaga aagatgtgac 2700  
gtatatggat thcctaaacc gagttcgaac cggagagcta aacctgaaat ccaaaggcca 2760  
40 atgggatgth ccacatccat ggctthaatct ctctgtacca aaaactcaaa thtccaaatt 2820  
tgatgatggt gththtaagg gtathatctt aagaaataac atcactagcg gthctgttct 2880  
45 tgtthtatct atgaatcgca acaagtaagt thaaactgat attgcaaaat thactatcta 2940  
caththctgtt thggaatccg aaathattctt acaagctaat thtatgctggc gthththtaggt 3000  
ggaatgatcg gatgtctgcc gctatacccg aggaagatgt aththtatgct gtagggthttt 3060  
50 taagatccgc gggththtgac aathgggagg ctththgatca agaaaacatg gaaathactga 3120  
agthththgtga ggatgctaat atgggggthta tacaathatct thctthtatcat thcatcacaag 3180  
aaggatgggt tagacaththt ggtccgagg ggaathaththt cgtagagaga aathataaat 3240  
55 atgatcccaa aatgatatha thaccgggac aaathathatt thcaaaaata aactcgagtht 3300  
agacgataat thaatctatt gthtagctgtt thcaccactt tg 3342

60

<210> 8  
<211> 2991  
<212> ADN

65

ES 2 621 992 T3

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

atggctaatac ttcgtttaat gatcacttta atcacggttt taatgatcac caaatcatca 60  
aacgggtatta aaattgattt acctaaatcc cttaacctca ccctctctac cgatccttcc 120  
atcatctccg cagcctctca tgacttcgga aacataacca ccgtgacccc cggcggcgta 180  
atctgcccct cctccaccgc tgatatctct cgtctcctcc aatacgcgc aaacggaaaa 240  
agtacattcc aagtagcggc tcgtggccaa ggcactcct taaacggcca agcctcggtc 300  
tccggcggag taatcgtcaa catgacgtgt atcactgacg tggtggtttc aaaagacaag 360  
aagtagcgtg acgtggcggc cgggacgtta tgggtgatg tgcttaagaa gacggcggag 420  
aaaggggtgt cgccggtttc ttggacggat tatttgcata taaccgtcgg aggaacgttg 480  
tcgaatggtg gaattggtgg tcaagtgttt cgaaacggtc ctcttgtag taacgtcctt 540  
gaattggacg ttattactgg tacgcatctt ctaaactttg atgtacatac aacaacaaaa 600  
actgtttttg ttttatagta ttttcattt tttgtacat aggttttatg ttttatagtt 660  
gtgctaaact tcttgacca cacgtaagtc ttcgaaacac aaaatgcgta acgcatctat 720  
atgttttttg tacatattga atgttgttca tgagaaataa agtaattaca tatacacaca 780  
tttattgtcg tacatatata aataatataa gacaaatttt cacaattggt agcgtgttaa 840  
tttgggattt ttgtaatgta catgcatgac gcatgcatat ggagcttttc ggttttctta 900  
gatttgtgta gtatttcaaa tatatcattt attttctttc gaataaagag gtggtatatt 960  
tttaaaatag caacatttca gaatttttct ttgaatttac actttttaaa ttgttattgt 1020  
taatatggat tttgaataaa taatttcagg gaaagggtgaa atgttgacat gctcgcgaca 1080  
gctaaaccca gaattgttct atggagtgtt aggaggtttg ggtcaatttg gaattataac 1140  
gagagccaga attgttttg accatgcacc taaacgggta cgtatcatca tattttacca 1200  
tttgttttag tcagcattca ttttccatta gtaattccgt ttcaatttct aaattttttt 1260  
agtcaataga aaatgattct tatgtcagag cttgattatt tagtgatttt tattgagata 1320  
aaataaaata taacctaacg gaaataatta ttttactaat cggataatgt ctgattaaaa 1380  
cattttatga tattacacta agagagttag agacgtatgg atcacaaaac atgaagcttt 1440  
cttagatggt atcctaaaaac taaagttagg tacaagtttg gaatttaggt caaatgctta 1500  
agttgcatta atttgaacaa aatctatgca ttgaataaaa aaaagatatg gattatttta 1560  
taaagtatag tccttgtaat ctaggactt gttgtctaata cttgtcttat gcggtgcaaat 1620  
cttttgatg tcaatatata atccttgttt attagagtca agctctttca ttagtcaact 1680  
actcaaatac actccaaagt ttagaatata gtcttctgac taattagaat cttacaaccg 1740  
ataaacgtta caatttggtt atcattttaa aaaacagatt tggtcataat atacgatgac 1800  
gttctgtttt agtttcatct attcacaaat tttatataat tattttcaag aaaatattga 1860  
aatactatac tgtaatatgg tttctttata tatgtgtgta taaattaaat gggattgttt 1920

ES 2 621 992 T3

tctctaaatg aaattgtgta ggccaaatgg tttcggatgc tctacagtga tttcacaact 1980  
 5 tttacaaagg accaagaacg tttgatatca atggcaaacg atattggagt cgactattta 2040  
 gaaggtcaaa tatttctatc aaacgggtgtc gttgacacct cttttttccc accttcagat 2100  
 10 caatctaaag tcgctgatct agtcaagcaa cacgggatca tctatggttct tgaagtagcc 2160  
 aagtattatg atgatcccaa tctccccatc atcagcaagg tactacacat ttacattttc 2220  
 atcatcgttt ttatcatacc ataagatatt taaatgattc atcattgcac cacattaaga 2280  
 15 tattcatcat catcatcgtt acattttttt ttgcatctta tgcttctcat aatctactat 2340  
 tgtgtaggtt attgacacat taacgaaaac attaagttac ttgcccgggt tcatatcaat 2400  
 20 gcacgacgtg gcctacttcg atttcttgaa ccgtgtacat gtcgaagaaa ataaactcag 2460  
 atctttggga ttatgggaac ttcctcatcc ttggcttaac ctctacgttc ctaaactctcg 2520  
 25 gattctcgat tttcataacg gtgttgtcaa agacattctt cttaaagcaaa aatcagcttc 2580  
 gggactcgct cttctctatc caacaaaccg gaataagtac atacttctct tcattcatat 2640  
 ttatcttcaa gaaccaaagt aaataaattt ctatgaactg attatgctgt tattgttaga 2700  
 30 tgggacaatc gtatgtcggc gatgatacca gagatcgatg aagatgttat atatattatc 2760  
 ggactactac aatccgctac cccaaaggat cttccagaag tggagagcgt taacgagaag 2820  
 35 ataattaggt tttgcaagga ttcaggtatt aagattaagc aatatctaata gcattatact 2880  
 agtaaagaag attggattga gcatttttga tcaaaatggg atgatttttc gaagaggaaa 2940  
 40 gatctatttg atcccaagaa actgttatct ccagggcaag acatcttttg a 2991

45 <210> 9  
 <211> 2782  
 <212> ADN  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 50 <400> 9

ES 2 621 992 T3

atgactaata ctctctgttt aagcctcatc accctaataa cgctttttat aagtttaacc 60  
ccaaccttaa tcaaatcaga tgagggcatt gatgttttct taccatatac actcaacctt 120  
acggctoctaa ccgatccctt ctccatctct gccgcttctc acgacttcgg taacataacc 180  
gacgaaaatc ccggcgccgt cctctgccct tcctccacca cggaggtggc tcgtctcctc 240  
cgtttcgcta acggaggatt ctcttacaat aaaggctcaa ccagccccgc gtctactttc 300  
aaagtggctg ctcgaggcca aggccactcc ctccgtggcc aagcctctgc acccggaggt 360  
gtcgtcgtga acatgacgtg tctcgccatg ggggctaaac cagcggcggt tgttatctcg 420  
gcagacggga cttacgctga cgtggctgcc gggacgatgt gggtgatgt tctgaaggcg 480  
gcggtgata gaggcgtctc gccggttaca tggacggatt atttgtatct cagcgtcggc 540  
gggacgttgt cgaacgctgg aatcgggtgt cagacgttta gacacggccc tcagattagt 600  
aacgttcatt agcttgacgt tattaccggt acgtaaatac caaaacttca ctaatctcgt 660

ES 2 621 992 T3

tacaatTTTT taatTTTTtg gtaatataaa ttttgtacgg ctcaactcct aattaagaat 720  
gaaacagtat ctatgatcct ctagatgctc tttttttgtc tgcaagcttt aattgtagta 780  
acatcagcga tatatatatc acatgcatgt gtattattga tgataatata taatgtttta 840  
gttacaaatt tgattctcaa ggtaaaactc acacgccata accagtataa aactccaaaa 900  
atcacgtttt ggtcagaaat acatatcctt cattaacagt agttatgcta taatttgtga 960  
ttataaataa ctccggagtt tgttcacaat actaaatttc aggaaaaggt gaaatgatga 1020  
cttgctctcc aaagttaaac cctgaattgt tctatggagt tttaggaggt ttgggtcaat 1080  
tcggtattat aacgagggcc aggattgcgt tggatcatgc acccacaagg gtatgtatca 1140  
tgcactata gtgtaatcaa tttataatTT taatgtagtg gtccataatc caaaatttga 1200  
tttgatttgg ttggaacgta cgtatatata ataagtcaaa aggctgattt tgaagacgaa 1260  
tttatatact tttgttgaat taaatctgat tttgcttacg ttttattaga ttctgcgtaa 1320  
taaactcctag gacttgctcg agtgtaatct tgtcttatgc ttgcaaactc tgttgatgct 1380  
aatatctaact cttttttatt atatttccct acgtaagttt tagatatagt tattttaaac 1440  
tgctataaat tgtgtacgta tagactttag ataaaaagtt gtggtcgctt gcacctatTT 1500  
gtttatcgct atagtgattc aaaggctctat atatgattct tggTTTTTct ttttgaaaaa 1560  
aatagaccat acaatccaag gaagatgatc ttaaattggac taatttatgg atataaattg 1620  
atatacaaat ctgcaggTga aatggtctcg catactctac agtgacttct cggctTTTTaa 1680  
aagagaccaa gagcgtTTaa tatcaatgac caatgatctc ggagttgact ttttggaagg 1740  
tcaacttatg atgtcaaatg gcttcgtaga cacctctttc ttcccactct ccgatcaaac 1800  
aagagtcgca tctcttTgta atgaccaccg gatcatctat gttctcgaag tagccaagta 1860  
ttatgacaga accacccttc ccattattga ccaggTacta aaatccatta ttcatgatga 1920  
ttatcttcac acaatcagta tcatcaccaa ttaccatcat cacttTgcat atatgatcca 1980  
aagtaaatat atcacatgat ataaataaat cgttcaaatc ttttttttta aagaataaaa 2040  
gaatcatttt caagcattac tcatacacat ctacgaatca ccgtgaccat atataacat 2100  
acgcttatta aataatcatt tttgtttgta ggtgattgac acgttaagta gaactctagg 2160  
tttcgctcca gggtttatgt tcgtacaaga tgttcogtat ttcgatttct tgaaccgtgt 2220  
ccgaaacgaa gaagataaac tcagatcttt aggactatgg gaagttcctc atccatggct 2280  
taacatcttt gtcccggggt ctogaatcca agattttcat gatggTgta ttaatggcct 2340  
tcttctaAAC caaacctcaa cttctggTgt tactctcttc tatcccaca accgaaaca 2400  
gtaaataatt actttttgat tttgttttat ttgaaagtat atcccataa tgtatgTtaa 2460  
attgttaaca agaatttatt ttattaatag atggaacaac cgcattgcaa cgatgacacc 2520  
ggacgaagat gttttttatg tgatcggatt actgcaatca gctggTggat ctcaaaattg 2580  
gcaagaactt gaaaatctca acgacaaggT tattcagttt tgtgaaaact cgggaattaa 2640

# ES 2 621 992 T3

5        gattaaggaa tatttgatgc actatacaag aaaagaagat tgggttaaac attttgacc      2700  
      aaaatgggat gattttttaa gaaagaaat tatgtttgat ccctaaaagac tattgtctcc      2760  
      aggacaagac atatttaatt aa    2782

10      <210> 10  
         <211> 2817  
         <212> ADN  
         <213> Arabidopsis thaliana

15      <400> 10

ES 2 621 992 T3

atgaatcgtg aatgacgtc aagctttctt ctccctgacgt tcgccatgatg taaactgatc 60  
 atagccgtgg gtctaaacgt gggccccagt gagctcctcc gcacccggagc catagatgtc 120  
 gacggccact tcaccgtcca cccttccgac ttagcctccg tctcctcaga cttcgggatg 180  
 ctgaagtcaac ctgaagagcc attggccgtg cttcatccat catcggccga agacgtggca 240  
 cgactcgtca gaacagctta cggttcagcc acggcgtttc cggctcagc ccgaggccac 300  
 ggccattcca taaacggaca agccgcggcg gggaggaacg gtgtggtggt tgaatgaac 360  
 cacggcgtaa ccgggacgcc caagccactc gtccgaccgg atgaaatgta tgtggatgta 420  
 tgggggtggag agttatgggt cgatgtggtg aagaaaacgt tggagcatgg cttagcacca 480  
 aaatcatgga cggattactt gtatctaacc gttggaggta cactctccaa tgcaggaatc 540  
 agtggccaag cttttcacca tggtcctcaa attagtaacg tccttgagct cgacgttgta 600  
 actggttagt attaaaacat tcaagtccat atatttttaa tgcttttgtc tgaagtttta 660  
 ctaataacaa gaaattgata ccaaaaagta gggaaaggag aggtgatgag atgctcagaa 720  
 gaagagaaca caaggctatt ccatggagtt cttggtggat taggtcaatt tgggatcatc 780  
 actcgagcac gaatctctct cgaaccagct ccccaaaggg taatattttt ttaatgacta 840  
 gctatcaaaa atccctggcg ggtccatacg ttgtaatctt tttagttttt actgttgatg 900  
 gtatttttta tatattttgg ataataaac cctaaaatgg tatattgtga tgacaggtga 960  
 gatggatacg ggtattgtat tcgagcttca aagtgtttac ggaggaccaa gagtacttaa 1020  
 tctcaatgca tgggtcaatta aagtttgatt acgtggaagg ttttgtgatt gtggacgaag 1080  
 gactcgtcaa caattggaga tcttctttct tctctccacg taaccccgtc aagatctcct 1140  
 ctgttagttc caacggctct gttttgtatt gccttgagat caccaagaac taccacgact 1200  
 ccgactccga aatcgttgat caggtcactt tcattattca cttagaaaaa agcgatattt 1260  
 tcatttttta tattgatgaa tatctggaag gatttaacgc tatgacgacta ttgggaaatc 1320  
 attatgaaaa aatatttagt ttatatgatt gaaagtggtc tccatagtat ttttgttg 1380  
 tcgactttat tataacttaa atttggaaga ggacatgaag aagaagccag agaggatcta 1440  
 cagagatcta gcttttccac ctgaaactaa taatgcacat ttatataatt atttttcttc 1500  
 ttctaaagtt tagtttatca ctagcgaatt aatcatggtt actaattaag tagtggacag 1560

ES 2 621 992 T3

5 ggtcatggac cactcactca ccaaataatg attcctcttt actcttaagt ttaattttaa 1620  
 taaaaccaac tctactggaa tcttaactta tccttggttt tggtaggctt ttatagcaac 1680  
 acggtttttt taattttcct attccagatt ttgtatatta aatgtcagatt ttttttcttt 1740  
 10 ttgtttcagg aagttgagat tctgatgaag aaattgaatt tcataccgac atcggctcttt 1800  
 acaacggatt tacaatatgt ggactttctc gaccgggtac acaaggccga attgaagctc 1860  
 cggtcacaaga atttatggga ggttccacac ccatggctca acctcttcgt gccaaaatca 1920  
 15 agaatctctg acttcgataa aggcgttttc aagggcattt tgggaaataa aacaagtggc 1980  
 cctattctta tctaccccat gaacaaagac aagtaagtct tgacattacc attgattact 2040  
 20 acttctaaat ttcttctcta gaaaaaagaa taaaacgagt tttgcattgc atgcatgcaa 2100  
 agttacactt gtgggggatta attagtggtc caagaaaaaa agtttgtcaa aattgaaaaa 2160  
 25 aactagacac gtggtacatg ggattgtccg aaaaacgttg tccacatgtg catcgaacca 2220  
 gctaagattg acaacaacac ttcgctcggct cgtatttctc tttttgtttt gtgaccaaata 2280  
 ccgatggctc agattgggtt tatttgtttt taagttccta gaactcatgg tgggtgggtc 2340  
 30 ccaatcagat tctcctagac caaaccgatc tcaacgaacc ctccgcacat cattgattat 2400  
 tacattaata tagatattgt cgttgctgac gtgtcgtaat ttgatgttat tgtcagatgg 2460  
 35 gacgagagga gctcagccgt gacgccgat gaggaagttt tctatctggt ggctctattg 2520  
 agatcagctt taacggacgg tgaagagaca cagaagctag agtatctgaa agatcagaac 2580  
 40 cgtcggatct tggagttctg tgaacaagcc aagatcaatg tgaagcagta tcttcctcac 2640  
 cacgcaacac aggaagagtg ggtggctcat tttggggaca agtgggatcg gttcagaagc 2700  
 45 ttaaaggctg agtttgatcc gcgacacata ctcgctactg gtcagagaat ctttcaaac 2760  
 ccatctttgt ctttgtttcc tccgctcgtc tcttcttcgt cagcggcttc atggtga 2817

50 <210> 11  
 <211> 1975  
 <212> ADN  
 <213> Arabidopsis thaliana

55 <400> 11

60

65



ES 2 621 992 T3

atgagctatc	tacatgcaag	cctcctcagg	aaaagaacca	tgcttatagt	aagaagtttc	60
accatcttgc	ttctcagctg	catagccttt	aagttggctt	gctgcttctc	tagcagcatt	120
tcttctttga	aggcgcttcc	cctagtaggc	catttggagt	ttgaacatgt	ccatcacgcc	180
tccaaagatt	ttggaaatcg	ataccagttg	atccctttgg	cggtcttaca	tcccaaatcg	240
gtaagcgaca	tcgcctcaac	gatacgacac	atctggatga	tgggcactca	ttcacagctt	300
acagtggcag	cgagaggtcg	tggacattca	ctccaaggcc	aagctcaaac	aagacatgga	360
attggtatac	acatggaatc	actccatccc	cagaagctgc	aggtctacag	tgtggattcc	420
cctgctccat	atgttgatgt	gtctggtggt	gagctgtgga	taaacatttt	gcatgagacc	480

ES 2 621 992 T3

ctcaagtacg ggcttgcacc aaaatcatgg acggattacc tgcatttaac tgtaggtggt 540  
 5 actctgtcca atgctggaat aagcggccag gcattccgac atggaccaca gatcagcaat 600  
 gttcatcaac tggagattgt cacaggttag ttcagagttg cagtattcgt gttttgaaag 660  
 10 catagactct atatggttgg tgactattaa caacatgaag agattcccga gaatagctac 720  
 ccactaatgt catgcctatt tattgactgc aggaaaaggc gagatcctaa actgtacaaa 780  
 gaggcagaac agcgacttat ttaatggtgt tcttggtggt ttaggtcagt ttggcatcat 840  
 15 aacgcgggca agaatagcat tggaaaccagc accaaccatg gtaaacaata aataaataaa 900  
 aaacttaaaa actgaacacg cgtgtgtcct cctaactctg tataatggac aggtaaaatg 960  
 20 gataagagtg ttatacctgg attttgcagc ttttgccaag gaccaagagc aactaatatc 1020  
 tgcccagggc cacaaattcg attacataga agggtttgtg ataataaaca ggacaggcct 1080  
 cctgaacagc tggaggttgt ctttcaccgc agaagagcct ttagaagcaa gccaatcaaa 1140  
 25 gtttgatgga aggactctgt attgtctgga gctagccaag tatttgaagc aagataacaa 1200  
 agacgtaatc aaccaggtga gaaaacagag tagaagcaat cggtagaatc ttctttggta 1260  
 30 gatgacattc attggaactg aaaatatata tatatttgtc caatccagga agtgaaagaa 1320  
 acattatcag agctaagcta cgtgacgtcg aactgttta caacggaggt agcatatgaa 1380  
 35 gcattcttgg acaggttaca tgtgtctgag gtaaaactcc gatcgaaagg gcagtgggag 1440  
 gtgccacatc catggctgaa cctcctggta ccaagaagca aaatcaatga atttgcaaga 1500  
 ggtgtatttg gaaacatact aacggatata agcaacggcc cagtcacgt ctaccagtg 1560  
 40 aacaaatcaa agtaagaaag aaagaaagaa agagctagtc atgattttgt ttcttttcac 1620  
 ttgttgacaa aacaaaagca tgttggtgag caggtgggac aatcaaacat cagcagtaac 1680  
 45 accggaggaa gaggtattct acctggtggc gatcctaaca tcggcatctc cagggtcggc 1740  
 aggaaaggat ggagtagaag agatcttgag gcggaacaga agaatactgg aattcagtga 1800  
 50 agaagcaggg atagggttga agcagtatct gccacattac acgacaagag aagagtggag 1860  
 atcccatttc ggggacaagt ggggagaatt tgtgaggagg aaatccagat atgatccatt 1920  
 55 ggcaattctt gcgcctggcc accgaatfff tcaaaaggca gtctcactact catga 1975

<210> 12  
 <211> 3211  
 60 <212> ADN  
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 12

65

ES 2 621 992 T3

atgatagctt	acatagaacc	atacttcttg	gaaaacgacg	ccgaggctgc	ctctgccgcc	60
accgccgccg	gaaaatctac	ggatgggtgtt	tctgagtcac	ttaacatcca	aggagaaatc	120
ttatgtggtg	gagctgcggc	ggatatcgcc	gggagagatt	ttggcggcat	gaactgtgtg	180
aagcctcttg	ctgtggtgag	accagtggga	ccggaagata	tcgccggagc	ggtgaaagcg	240

ES 2 621 992 T3

gctctgaggt cagataaaact aacgggtggcg gcgcgtggaa acggccattc tatcaacggg 300  
caagccatgg cgggaaggagg actcgttgtc gatatgagta ccacggcgga gaatcatttc 360  
gaggttggtt atttatccgg cggatgatgcc acggcgtttg ttgatgtctc cggaggggca 420  
ttatgggaag atgtattgaa acgggtgcgtt tcggagtacg gtttggtcc gaggtcttgg 480  
actgattatc ttgggttaac ggtgggagg acgttgtaa atgccggcgt tagtggtaa 540  
gcgttccggt acggaccaca gacgtcaaat gtaacggagt tggacgtcgt tacgggaaat 600  
ggtgacgtcg ttacttgctc ggagattgag aattcagagc tattcttctc tgttttaggt 660  
ggtcttggtc agtttggtat catcaccaga gctagggttt tgctacagcc agctcctgat 720  
atggtgaata cttaaaacca acaatataaa taacaatctc agttatatat atatatattt 780  
tctctaatac aatcaaaaat aagatatttg gtccataata taaatgattg ttgtgtagg 840  
tgagatggat aagagtagta tacaccgagt tcgatgagtt cactcaagac gccgagtggc 900  
tagtaagtca gaagaacgag tcatcgttcg attacgtgga aggattcgtg tttgtcaacg 960  
gtgctgacct ggtaaacgga tggccaacag ttcccctcca cccggaccac gagtttgacc 1020  
cgaccgact accacaatct tgcgggtcgg ttctttattg cctcgaactc ggtcttcaact 1080  
acagagactc cgattccaac tcaaccattg acaaggtaat aataactttg agaaacttta 1140  
taacatTTTT cagaaattca agaaccgttc atcttttatg atctaaccgc ggtggaagat 1200  
tctgatgttc tagaaacttt gtttgaccga aattgacctt agattgaagt gtgaagttga 1260  
cccgttttat tccaactaact gttatacagc acgtagttca tataggaccg ttttcagatt 1320  
tctcgacctc catgattaca caaacataca attcaaaaaa cagtaaaaag atgataataa 1380  
taataatata tggtttagtt aaggaaatat aatagggtgg gaaagggaaat tatacagtct 1440  
cttgtctgac tgcataatat gaaactgacg agacattgtg taatgtatct tcgattttgg 1500  
attgtctgac atgaaaaaaaa tatttatttg cttctctcta atgcccttgt cgtaaccacg 1560  
ttattacgaa aaggacattt gtcttcgttt tctttttctt ttcttttttt ttgttgcttt 1620  
tgttgtcttt ctcatgaaac acatatttta agatcacttt gcctttttct actcaattat 1680  
ttagattaaa ccaacacgtg tgacgtgtcc attggtcgtg cggtatggga cgtaagggtg 1740  
aaatcgtaat tgtagcatgt aaacgtttct gtagtaaaac attgatgata tgatttcaaa 1800  
cggccccggc taaaatctgg ccatcgtttt atatggaatc atctatgtat gtaccgaaat 1860  
accccctgac tgattttttt ccattttttt gtgtagaggg tggagagatt gatcggacgg 1920  
ctaagattta atgaaggatt aagattcgag gtagatctgc cgtacgttga ctttttacta 1980  
cgagtcaaac ggtcagaaga aatcgcaag gagaacggta cgtgggaaac gcctcaccct 2040  
tggtcaacc tcttcgtgtc gaagcgagac atcggagatt tcaatcggac ggtgttcaaa 2100  
gaacttgtca agaacggagt caatggtcca atgcttgtgt acccactctt gcgaagcagg 2160

ES 2 621 992 T3

tgaatattgc tctctcttcc tctcttttaa ctaggacca tctttttatt ttgggttaga 2220  
 5 caaggcacct atctaaaaga ctaaaagaag atcggctctag tttagtttta tggcatgtgt 2280  
 ttatcacgtg tgatgattag tcgtgcatgc ttaaactaaa aaaaggctcc acaagtcgca 2340  
 10 agtcgtgtga tcaacaaatt gtcgccaatg tggcacacgt gtctttcttc agtcccctcg 2400  
 tcattttttt taccctgacg gggttttaag tacaataaaa gttggaattt agtgtggctg 2460  
 ttagattttt gtaggcgaga taaaaaaaaag aataactaac taatcagatg ccgtattagg 2520  
 15 tattacgggtt ggggtgggtga cggatatgta ttgtaaccgt cgtaaggtt agcgtcatat 2580  
 agggaaagag atgaaatttg tagggacca atatgaacta acgttaaatt ttttatttta 2640  
 20 catttctaaa atagcctttt gtaggttact gaagggtagt ttcgtcttta tatgttttac 2700  
 tttatgtgga aatgagatt tgctggtaca aatagtagac gtaagaaatg aaaccaatcg 2760  
 25 tgagcaaagg gccaccaaaa tgtttatttt ttattctccg atttttttat ggaaaatgct 2820  
 ttttgttcca tttagattta gtgggtattt gttttataat atgaatgatt aaataataat 2880  
 ttggttggtt tttatcaggt gggatgatcg gacgtccgtg gttataccgg aagaaggaga 2940  
 30 gatattctac attgtggcat tgcttcggtt cgtgccgccg tgtgcgaaag tctcttcggt 3000  
 agagaaaatg gtagctcaa accaagagat cgttcattgg tgtgtcaaaa acggaattga 3060  
 35 ttacaaattg tatcttcctc attacaagtc tcaagaggaa tggattcgcc attttgaaa 3120  
 ccgatggtcg agatttggtg ataggaaagc tatgtttgat cccatggcta tactttcacc 3180  
 40 ggtcaaaaag attttcaata ggtctctttg a 3211

<210> 13

<211> 575

<212> PRT

45 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 13

50

55

60

65

ES 2 621 992 T3

Met Gly Leu Thr Ser Ser Leu Arg Phe His Arg Gln Asn Asn Lys Thr  
 1 5 10 15

Phe Leu Gly Ile Phe Met Ile Leu Val Leu Ser Cys Ile Pro Gly Arg  
 20 25 30

Thr Asn Leu Cys Ser Asn His Ser Val Ser Thr Pro Lys Glu Leu Pro  
 35 40 45

Ser Ser Asn Pro Ser Asp Ile Arg Ser Ser Leu Val Ser Leu Asp Leu  
 50 55 60

Glu Gly Tyr Ile Ser Phe Asp Asp Val His Asn Val Ala Lys Asp Phe  
 65 70 75 80

Gly Asn Arg Tyr Gln Leu Pro Pro Leu Ala Ile Leu His Pro Arg Ser

ES 2 621 992 T3

				85					90					95	
Val	Phe	Asp	Ile	Ser	Ser	Met	Met	Lys	His	Ile	Val	His	Leu	Gly	Ser
			100					105					110		
Thr	Ser	Asn	Leu	Thr	Val	Ala	Ala	Arg	Gly	His	Gly	His	Ser	Leu	Gln
		115					120					125			
Gly	Gln	Ala	Leu	Ala	His	Gln	Gly	Val	Val	Ile	Lys	Met	Glu	Ser	Leu
	130					135					140				
Arg	Ser	Pro	Asp	Ile	Arg	Ile	Tyr	Lys	Gly	Lys	Gln	Pro	Tyr	Val	Asp
145					150					155					160
Val	Ser	Gly	Gly	Glu	Ile	Trp	Ile	Asn	Ile	Leu	Arg	Glu	Thr	Leu	Lys
				165					170					175	
Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Lys	Ser	Trp	Thr	Asp	Tyr	Leu	His	Leu	Thr	Val
			180					185					190		
Gly	Gly	Thr	Leu	Ser	Asn	Ala	Gly	Ile	Ser	Gly	Gln	Ala	Phe	Lys	His
		195					200					205			
Gly	Pro	Gln	Ile	Asn	Asn	Val	Tyr	Gln	Leu	Glu	Ile	Val	Thr	Gly	Lys
	210					215					220				
Gly	Glu	Val	Val	Thr	Cys	Ser	Glu	Lys	Arg	Asn	Ser	Glu	Leu	Phe	Phe
225					230					235					240
Ser	Val	Leu	Gly	Gly	Leu	Gly	Gln	Phe	Gly	Ile	Ile	Thr	Arg	Ala	Arg
				245					250					255	
Ile	Ser	Leu	Glu	Pro	Ala	Pro	His	Met	Val	Lys	Trp	Ile	Arg	Val	Leu
			260					265					270		
Tyr	Ser	Asp	Phe	Ser	Ala	Phe	Ser	Arg	Asp	Gln	Glu	Tyr	Leu	Ile	Ser
		275					280					285			
Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Asp	Tyr	Val	Glu	Gly	Phe	Val	Ile	Ile	Asn	Arg
	290					295					300				
Thr	Asp	Leu	Leu	Asn	Asn	Trp	Arg	Ser	Ser	Phe	Ser	Pro	Asn	Asp	Ser
305					310					315					320
Thr	Gln	Ala	Ser	Arg	Phe	Lys	Ser	Asp	Gly	Lys	Thr	Leu	Tyr	Cys	Leu
				325					330					335	
Glu	Val	Val	Lys	Tyr	Phe	Asn	Pro	Glu	Glu	Ala	Ser	Ser	Met	Asp	Gln
			340					345					350		

ES 2 621 992 T3

Glu Thr Gly Lys Leu Leu Ser Glu Leu Asn Tyr Ile Pro Ser Thr Leu  
 355 360 365  
 5 Phe Ser Ser Glu Val Pro Tyr Ile Glu Phe Leu Asp Arg Val His Ile  
 370 375 380  
 10 Ala Glu Arg Lys Leu Arg Ala Lys Gly Leu Trp Glu Val Pro His Pro  
 385 390 395 400  
 15 Trp Leu Asn Leu Leu Ile Pro Lys Ser Ser Ile Tyr Gln Phe Ala Thr  
 405 410 415  
 20 Glu Val Phe Asn Asn Ile Leu Thr Ser Asn Asn Asn Gly Pro Ile Leu  
 420 425 430  
 25 Ile Tyr Pro Val Asn Gln Ser Lys Trp Lys Lys His Thr Ser Leu Ile  
 435 440 445  
 30 Thr Pro Asn Glu Asp Ile Phe Tyr Leu Val Ala Phe Leu Pro Ser Ala  
 450 455 460  
 35 Val Pro Asn Ser Ser Gly Lys Asn Asp Leu Glu Tyr Leu Leu Lys Gln  
 465 470 475 480  
 40 Asn Gln Arg Val Met Asn Phe Cys Ala Ala Ala Asn Leu Asn Val Lys  
 485 490 495  
 45 Gln Tyr Leu Pro His Tyr Glu Thr Gln Lys Glu Trp Lys Ser His Phe  
 500 505 510  
 50 Gly Lys Arg Trp Glu Thr Phe Ala Gln Arg Lys Gln Ala Tyr Asp Pro  
 515 520 525  
 55 Leu Ala Ile Leu Ala Pro Gly Gln Arg Ile Phe Gln Lys Thr Thr Gly  
 530 535 540  
 60 Lys Leu Ser Pro Ile Gln Leu Ala Lys Ser Lys Ala Thr Gly Ser Pro  
 545 550 555 560  
 65 Gln Arg Tyr His Tyr Ala Ser Ile Leu Pro Lys Pro Arg Thr Val  
 565 570 575

<210> 14

<211> 2236

<212> ADN

60 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 14

65 atgggattga cctcatcctt acggttccat agacaaaaca acaagacttt cctcgggaatc 60



ES 2 621 992 T3

ttcatgatct tggttctaag ctgtatacca ggtagaacca atctttgttc caatcattct 120  
 gttagtaccc caaaagaatt accttcttca aatccttcag atattcggtc ctcataggtt 180  
 tcaactagatt tggagggtta tataagcttc gacgatgtcc acaatgtggc caaggacttt 240  
 ggcaacagat accagttacc acctttggca attctacatc caaggtcagt ttttgatatt 300  
 tcatcgatga tgaagcatat agtacatctg ggctccacct caaatcttac agtagcagct 360  
 agaggccatg gtcactcgct tcaaggacaa gctctagctc atcaaggtgt tgtcatcaaa 420  
 atggagtcac ttcgaagtcc tgatatcagg atttataagg ggaagcaacc atatgttgat 480  
 gtctcaggtg gtgaaatatg gataaacatt ctacgcgaga ctctaaaata cggctcttca 540  
 ccaaagtctt ggacagacta ccttcatttg accgttggag gtacactatc taatgctgga 600  
 atcagcgggtc aagcattcaa gcatggacc caaatcaaca acgtctacca gctagagatt 660  
 gttacaggta tttcattcat gctttatctc tgcggtagtc tcaaaaaaat atgcacctgt 720  
 aaagaatata catctcttca tgagcaaaaa cactgacgac tttaaataat ttttgactat 780  
 aaaacaagag tgcataaggca caaatgtgaa atatgcaaca cacaattgta acttgacca 840  
 agaaaaaagt tataaaaaaca aacaactgat aagcaatata tttccaatat ttaatcaggg 900  
 aaaggagaag tcgtaacctg ttctgagaag cgggaattctg aacttttctt cagtgttctt 960  
 ggcgggcttg gacagtttg cataatcacc cgggcacgga tctctcttga accagcaccg 1020  
 catatggtaa agttctatct tgaacaaagt tcaaacataa tacgctatga ttctaagaac 1080  
 cactttcctg acacagtcaa ataactttta ataggttaaa tggatcaggg tactctactc 1140  
 tgacttttct gcattttcaa gggaccaaga atatctgatt tcgaaggaga aaacttttga 1200  
 ttacgttgaa ggatttga taatcaatag aacagacctt ctcaataatt ggcgatcgtc 1260  
 attcagtccc aacgattcca cacaggcaag cagattcaag tcagatggga aaactcttta 1320  
 ttgcctagaa gtggtcaaat atttcaacc agaagaagct agctctatgg atcaggtaa 1380  
 atgtgaaagc aatatataac tagacttagt ttccacagag agctccaaat caaccgttg 1440  
 ctactagcct actaacataa tgaatggtg ccggtgcagga aactggcaag ttactttcag 1500  
 agttaaatta tattccatcc actttgttt catctgaagt gccatatac gagtttctgg 1560  
 atcgcgtgca tatcgcagag agaaaactaa gagcaaaggg tttatgggag gttccacatc 1620  
 cctggctgaa tctcctgatt cctaagagca gcatatacca atttgctaca gaagttttca 1680  
 acaacattct cacaagcaac aacaacggtc ctatccttat ttatccagtc aatcaatcca 1740  
 agtaagtgag caaaatgcca aaagcaaatg cgtccagtga ttctgaaaca taaattacta 1800  
 accatatcca acattttgtg gtttcaggtg gaagaacat acatctttga taactccaaa 1860  
 tgaagatata ttctatctcg tagcctttct cccctctgca gtgccaaatt cctcagggaa 1920  
 aaacgatcta gagtaccttt tgaacaacaaa ccaaagagtt atgaacttct gcgcagcagc 1980

ES 2 621 992 T3

aaacctcaac gtgaagcagt atttgcccc ttatgaaact caaaaagagt ggaaatcaca 2040  
 ctttggcaaa agatgggaaa catttgcaca gaggaacaaa gcctacgacc ctctagcgat 2100  
 5 tctagcacct ggccaaagaa tattccaaaa gacaacagga aaattatctc ccatccaact 2160  
 cgcaaagtca aaggcaacag gaagtcctca aaggtaccat tacgcatcaa tactgccgaa 2220  
 10 acctagaact gtataa 2236  
 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 15 <220>  
 <223> partidor (o 'primer')  
 <400> 15  
 20 gaatggtgga atggtggtc 20  
 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> artificial  
 <220>  
 <223> partidor  
 30 <400> 16  
 gcgagcatgt caacatttca 20  
 <210> 17  
 <211> 22  
 35 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> partidor  
 40 <400> 17  
 tggttcacgt agtgggcat cg 22  
 <210> 18  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 50 <223> partidor  
 <400> 18  
 tcaaaagcct cccaattgct 20  
 55 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 60  
 65

<220>  
<223> partidori

5 <400> 19  
ctcggctaaa gacggagttg 20

<210> 20  
<211> 22  
10 <212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> partidori

15 <400> 20  
tggttcacgt agtgggcat cg 22

<210> 21  
<211> 26  
20 <212> ADN  
<213> artificial

<220>  
25 <223> partidori

<400> 21  
ctctgccgt tctcagact tcgta 26

30 <210> 22  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> artificial

35 <220>  
<223> partidori

<400> 22  
40 cataaacct ggagcgaac ctagag 26

<210> 23  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> artificial

45 <220>  
<223> partidori

<400> 23  
50 tggttcacgt agtgggcat cg 22

<210> 24  
<211> 26  
<212> ADN  
55 <213> artificial

<220>  
<223> partidori

60

65

# ES 2 621 992 T3

<400> 24  
caaggtaaaa ctcacacgcc ataacc 26

5 <210> 25  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> artificial

10 <220>  
<223> partidor

<400> 25  
cataaacctt ggagcgaac ctagag 26

15 <210> 26  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> artificial

20 <220>  
<223> partidor

<400> 26  
25 gagcgtcggg cccacactt ctatac 26

<210> 27  
<211> 29  
<212> ADN  
30 <213> artificial

<220>  
<223> partidor

35 <400> 27  
ttgtgcagc aacgaccaac cgataatga 29

<210> 28  
<211> 29  
40 <212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> partidor

45 <400> 28  
aatggtatat tgtgatgaca ggtgagatg 29

<210> 29  
<211> 22  
<212> ADN  
50 <213> artificial

<220>  
55 <223> partidor

<400> 29  
tgggtcacgt agtgggcat cg 22

60

65

<210> 30  
<211> 29  
<212> ADN  
5 <213> artificial

<220>  
<223> partidor

10 <400> 30  
aatggatat tgtgatgaca ggtgagatg 29

<210> 31  
<211> 29  
15 <212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> partidor

20 <400> 31  
ttgtgcagc aacgaccaac cgataatga 29

<210> 32  
<211> 23  
25 <212> ADN  
<213> artificial

<220>  
30 <223> partidor

<400> 32  
atattgacca tcatactcat tgc 23

35 <210> 33  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
40 <223> partidor

<400> 33  
45 acctgtcca agaatgcttc a 21

<210> 34  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> artificial

50 <220>  
<223> partidor

<400> 34  
55 tgtgattcc cctgctccat a 21

<210> 35  
<211> 22  
<212> ADN  
60

65

<213> artificial  
<220>  
5 <223> partidor  
<400> 35  
tggttcacgt agtgggcat cg 22  
10 <210> 36  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial  
15 <220>  
<223> partidor  
<400> 36  
ttagccgtcc gatcaatctc 20  
20 <210> 37  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial  
25 <220>  
<223> partidor  
<400> 37  
30 cggaaaatct acggatggtg 20  
<210> 38  
<211> 23  
<212> ADN  
35 <213> artificial  
<220>  
<223> partidor  
40 <400> 38  
atattgacca tcatactcat tgc 23  
<210> 39  
<211> 27  
45 <212> ADN  
<213> artificial  
<220>  
<223> partidor  
50 <400> 39  
gctagtaagt cagaagaacg agtcatc 27  
<210> 40  
55 <211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial  
<220>  
60  
65

<223> partidori  
 <400> 40  
 5 ttagccgtcc gatcaatctc 20  
 <210> 41  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 10 <213> artificial  
 <220>  
 <223> partidori  
 15 <400> 41  
 gccttttcag aaatggataa atagccttgc ttcc 34  
 <210> 42  
 <211> 20  
 20 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> partidori  
 25 <400> 42  
 gaatggtgga attggtggtc 20  
 <210> 43  
 <211> 20  
 30 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 35 <223> partidori  
 <400> 43  
 agtcccgaag ctgatttttg 20  
 40 <210> 44  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 45 <220>  
 <223> partidori  
 <400> 44  
 50 ctcggctaaa gacggagttg 20  
 <210> 45  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 55 <220>  
 <223> partidori  
 <400> 45  
 60  
 65

aataggtggt tgtaaacgta gacgca 26

5 <210> 46  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> artificial

10 <220>  
<223> partidor

<400> 46  
ctctgccgct tctcagact tcgta 26

15 <210> 47  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> artificial

20 <220>  
<223> partidor

<400> 47  
cataaacct ggagcgaac ctagag 26

25 <210> 48  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> artificial

30 <220>  
<223> partidor

35 <400> 48  
ctctgccgct tctcagact tcgta 26

40 <210> 49  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> partidor

45 <400> 49  
cataaacct ggagcgaac ctagag 26

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

<220>  
<223> partidor

55 <400> 50  
gcacgaatct ctctgaacc 20

60 <210> 51

65



ES 2 621 992 T3

<211> 19  
<212> ADN  
<213> artificial  
5  
<220>  
<223> partidor  
  
<400> 51  
10 cgctgacgaa gaagacgac 19  
  
<210> 52  
<211> 20  
<212> ADN  
15 <213> artificial  
  
<220>  
<223> partidor  
20 <400> 52  
gcacgaatct ctctgaacc 20  
  
<210> 53  
<211> 20  
25 <212> ADN  
<213> artificial  
  
<220>  
<223> partidor  
30 <400> 53  
aaattcttgg accggagctt 20  
  
<210> 54  
<211> 21  
35 <212> ADN  
<213> artificial  
  
<220>  
40 <223> partidor  
  
<400> 54  
tgtggattcc cctgctccat a 21  
45 <210> 55  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> artificial  
50 <220>  
<223> partidor  
  
<400> 55  
55 accctgtcca agaatgcttc a 21  
  
<210> 56  
<211> 20  
<212> ADN  
60 <213> artificial  
  
65

<220>  
 <223> partidor  
 5 <400> 56  
 ttagccgtcc gatcaatctc 20  
 <210> 57  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> partidor  
 15 <400> 57  
 cggaaaatct acggatggtg 20  
 <210> 58  
 <211> 20  
 20 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 25 <223> partidor  
 <400> 58  
 ttagccgtcc gatcaatctc 20  
 30 <210> 59  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 35 <220>  
 <223> partidor  
 <400> 59  
 cggaaaatct acggatggtg 20  
 40 <210> 60  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 45 <220>  
 <223> partidor  
 <400> 60  
 50 tacaacgagc ttcgtgttgc 20  
 <210> 61  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> artificial  
 <220>  
 <223> partidor  
 60 <400> 61  
 gattgatcct ccgatccaga 20  
 65

**Reivindicaciones**

1. Una célula vegetal aislada que comprende una disrupción (también llamada 'interrupción') en al menos:

5 i) un gen endógeno de CKX3 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de 'SEQ ID No. 1' ('Identificador de secuencia nº 1');

y

10 ii) en al menos un gen endógeno más, que es:

a) un gen de CKX2 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 2;

15 b) un gen de CKX4 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 3;

c) un gen de CKX5 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 4;

20 o

d) un gen de CKX6 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 5;

25 de manera que las mencionadas disrupciones inhiben la expresión y/o actividad de un producto de los -al menos- genes de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa interrumpidos en comparación con la correspondiente célula vegetal de control que carece de dichas disrupciones.

2. Una planta transgénica que comprende una disrupción en al menos:

30 i) un gen endógeno de CKX3 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 1;

y

35 ii) en al menos un gen endógeno más, que es:

a) un gen de CKX2 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 2;

40 b) un gen de CKX4 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 3;

c) un gen de CKX5 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 4;

45 o

d) un gen de CKX6 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 5;

50 de manera que las mencionadas disrupciones inhiben la expresión y/o actividad de un producto de los -al menos- genes de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa interrumpidos en comparación con la correspondiente planta de control que carece de dichas disrupciones.

55 3. Una célula vegetal aislada de la reivindicación 1 o una planta transgénica de la reivindicación 2, que comprenden una disrupción en al menos:

60 i) un gen endógeno de CKX3 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 95% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 1;

y

ii) en al menos un gen endógeno más, que es:

65 a) un gen de CKX2 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 95% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 2;

b) un gen de CKX4 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 95% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 3;

c) un gen de CKX5 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 95% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 4;

o

d) un gen de CKX6 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 95% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 5.

**4.** La célula vegetal aislada de una de las reivindicaciones 1 y 3, o la planta transgénica de una de las reivindicaciones 2 y 3, de manera que al menos:

i) un gen endógeno de CKX3 que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 7;

y

ii) al menos un gen endógeno más, que es:

a) un gen de CKX2 que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 8;

b) un gen de CKX4 que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 9;

c) un gen de CKX5 que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 10;

o

d) un gen de CKX6 que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 1;

están interrumpidos.

**5.** La célula vegetal aislada de la reivindicación 1 o la planta transgénica de la reivindicación 2, de manera que

i) al menos un gen endógeno de CKX3 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 1;

y

ii) al menos un gen endógeno de CKX5 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 4;

están interrumpidos.

**6.** La célula vegetal aislada de la reivindicación 4 o la planta transgénica de la reivindicación 4, de manera que

i) al menos un gen endógeno de CKX3 que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 7;

y

ii) al menos un gen endógeno de CKX5 que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 10;

están interrumpidos.

**7.** La célula vegetal aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 5, 6 o la planta transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4, 5, 6, de manera que una, más de una o todas las interrupciones se facilitan mediante la interrupción estructural, la supresión antisentido de genes polinucleotídicos, el silenciamiento génico inducido por ARN bicatenario, las técnicas con ribozimas, las interrupciones genómicas, el 'Tilling' y/o la recombinación homóloga.

**8.** La célula vegetal aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 5, 6 y 7 o la planta transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4, 5, 6 y 7, de manera que una, más de una o todas las interrupciones son interrupciones homocigóticas.

**9.** La planta transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, de manera que la planta se selecciona de la familia *Brassicaceae*, preferiblemente de los géneros *Brassica* o *Arabidopsis*.

**10.** Una célula, órgano, tejido o material de reproducción transgénico derivados de la planta transgénica de

cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, de manera que la célula, órgano, tejido o material de reproducción transgénico comprenden las mencionadas disrupciones en el mencionado gen endógeno de CKX3 y en al menos uno de los mencionados genes endógenos de CKX2, CKX4, CKX5 o CKX6.

5 **11.** Un método para aumentar el rendimiento de semillas de una planta y/o aumentar la altura de la planta y/o aumentar el grosor del tallo con respecto a la correspondiente planta de control, de manera que el método incluye introducir una disrupción en una planta en al menos:

10 i) un gen endógeno de CKX3 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 1;

y

ii) en al menos un gen endógeno más, que es:

15 a) un gen de CKX2 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 2;

20 b) un gen de CKX4 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 3;

c) un gen de CKX5 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 4;

o

25 d) un gen de CKX6 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 5;

30 de manera que las mencionadas disrupciones inhiben la expresión y/o actividad de un producto de los -al menos- genes de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa interrumpidos en comparación con la correspondiente planta de control que carece de dichas disrupciones.

**12.** Un método para producir una planta con un mayor rendimiento de semillas y/o una mayor altura de planta con respecto a la correspondiente planta de control, de manera que conlleva interrumpir en una planta al menos:

35 i) un gen endógeno de CKX3 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 1;

y

40 ii) en al menos un gen endógeno más, que es:

a) un gen de CKX2 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 2;

45 b) un gen de CKX4 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 3;

50 c) un gen de CKX5 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 4;

o

55 d) un gen de CKX6 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 5;

de manera que las mencionadas disrupciones inhiben la expresión y/o actividad de un producto de los -al menos- genes de citoquinina oxidasa/deshidrogenasa interrumpidos en comparación con la correspondiente planta de control que carece de dichas disrupciones.

60 **13.** El método de la reivindicación 11 o el método de la reivindicación 12, de manera que al menos

i) un gen endógeno de CKX3 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 1;

y

65 ii) un gen endógeno de CKX5 que codifica una citoquinina oxidasa/deshidrogenasa que comprende una

secuencia de polipéptidos que es idéntica a o tiene al menos un 80% de identidad con toda la longitud de SEQ ID No. 4

están interrumpidos.

5

**14.** El método de cualquiera de la reivindicaciones 11 a 13, de manera que una, más de una o todas las interrupciones son interrupciones homocigóticas.

10

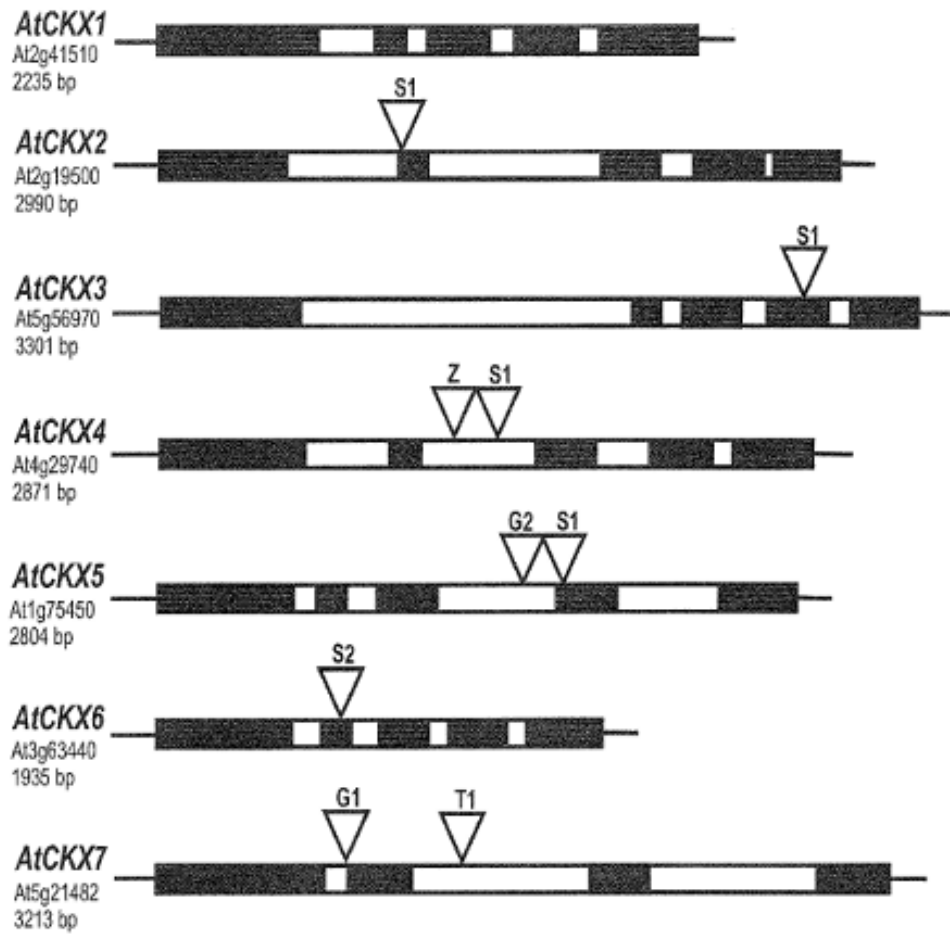


FIG. 1

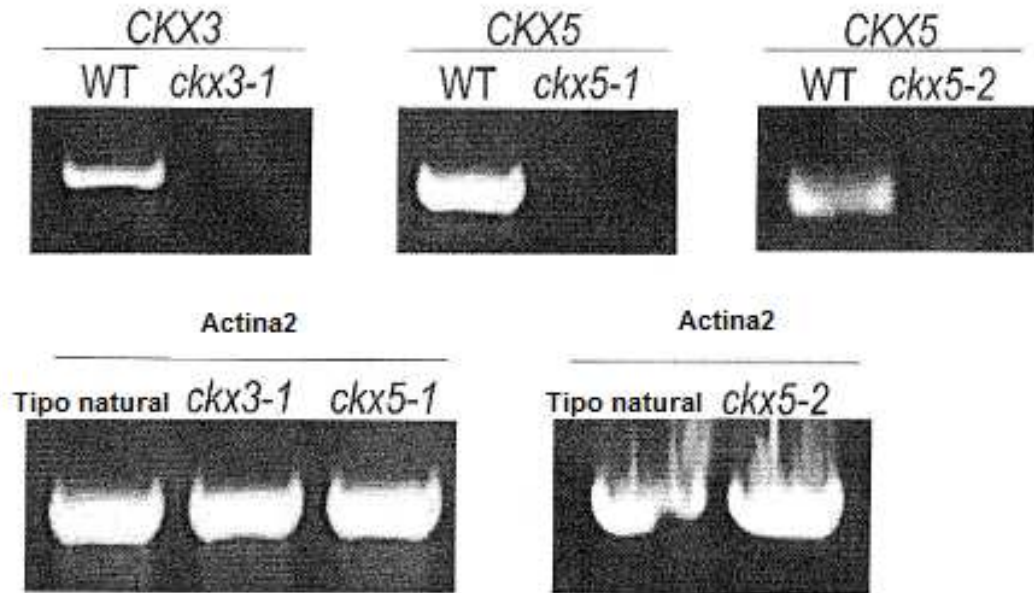


FIG. 2



genotipo	tZ	tZR	tZRMP	tZ9G	tZOG
tipo natural	4.1 ± 1.1	10.7 ± 5.9	174.6 ± 79.1	2.3 ± 0.3	3.4 ± 0.8
<i>clk3 clk5</i>	15.5 ± 3.7	46.0 ± 5.4	1129.0 ± 295.9	18.0 ± 2.0	17.3 ± 1.7

genotipo	tZROG	iP	iPR	iPRMP	iP9G
tipo natural	3.3 ± 1.1	0.23 ± 0.09	0.16 ± 0.13	30.0 ± 10.2	0.20 ± 0.24
<i>clk3 clk5</i>	24.6 ± 2.8	0.29 ± 0.10	0.35 ± 0.10	100.5 ± 25.0	0.20 ± 0.03

FIG. 3

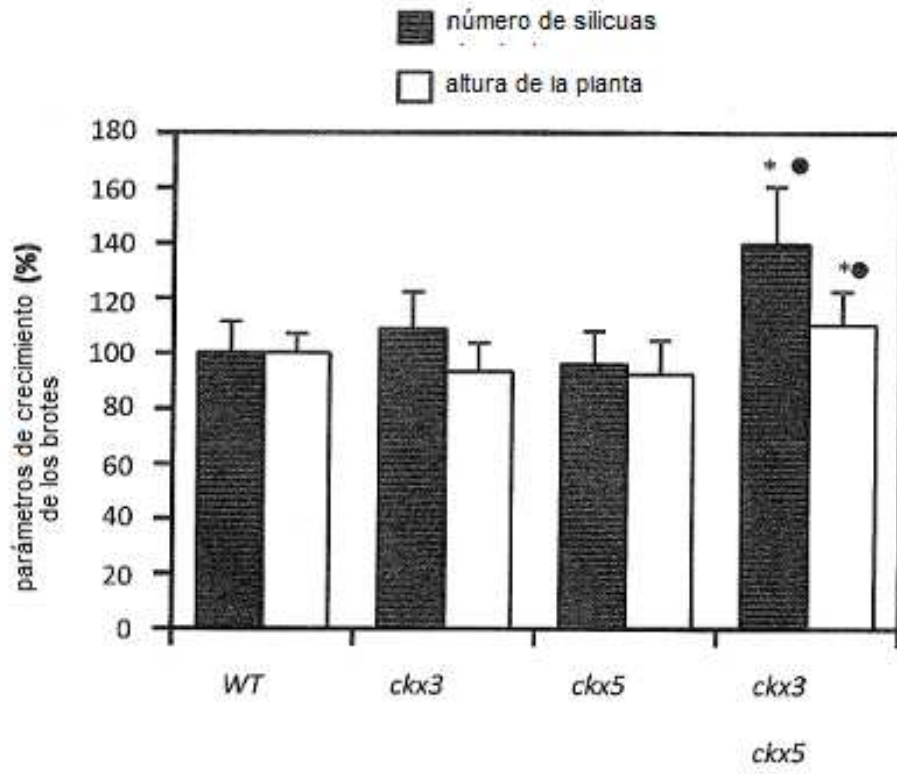


FIG. 4

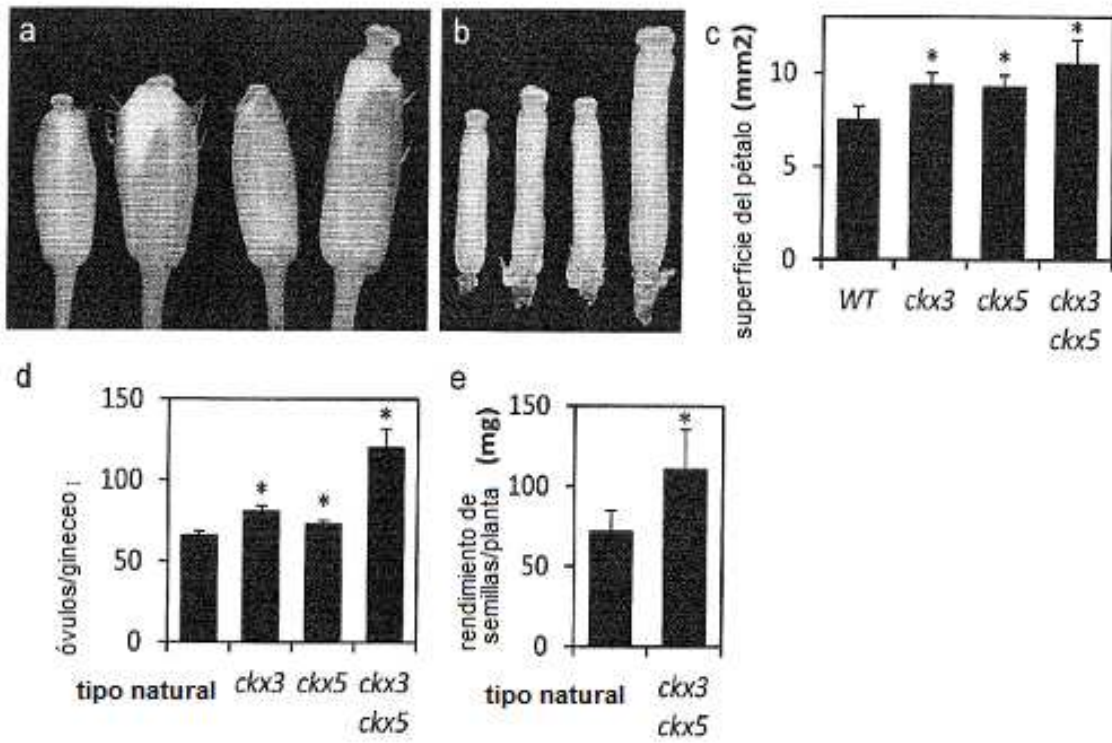


FIG. 5

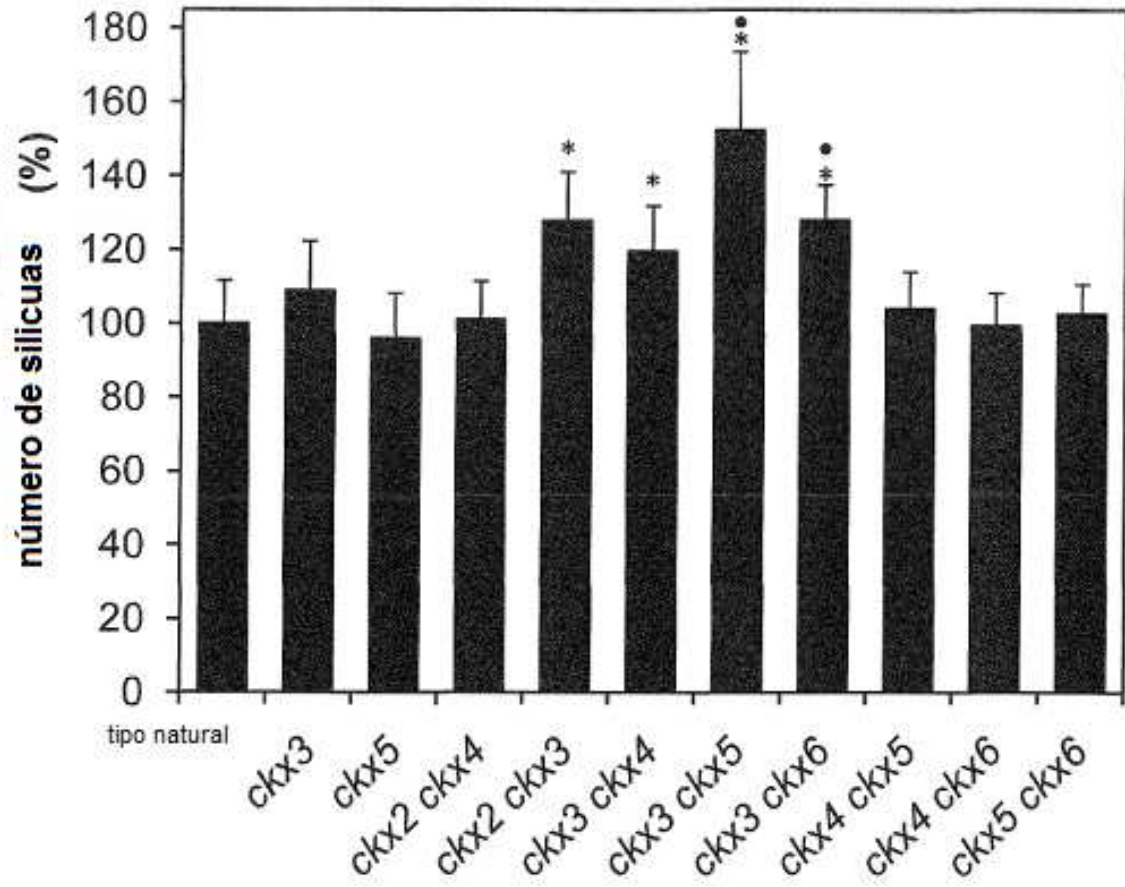


FIG. 6

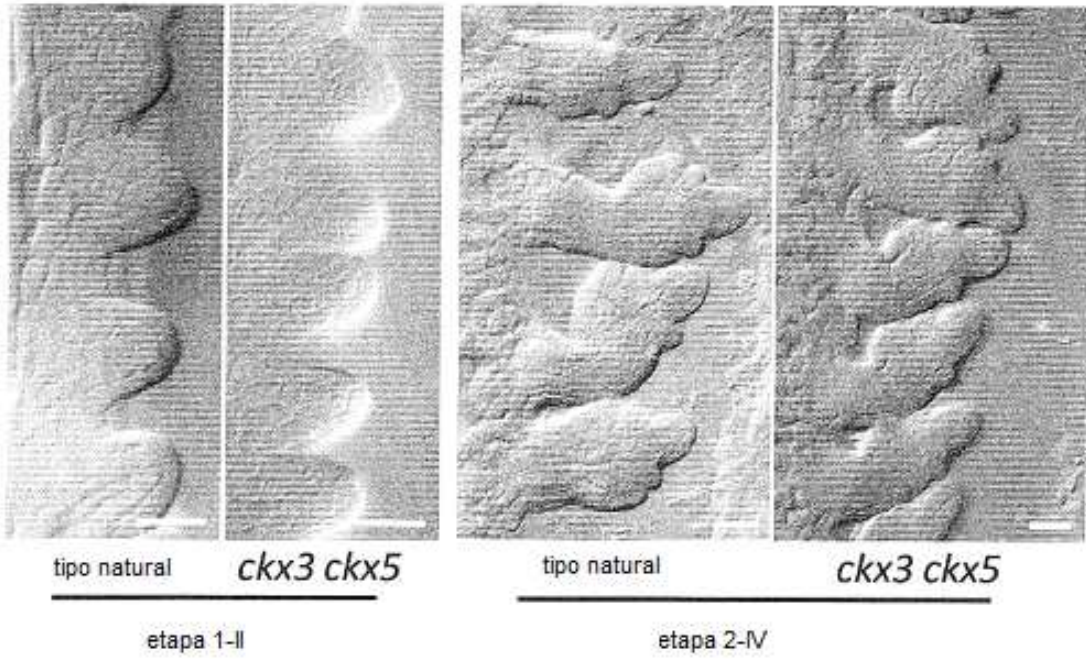


FIG. 7