

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 617**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2010** **PCT/EP2010/007942**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011** **WO11120549**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2010** **E 10805213 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017** **EP 2552946**

54 Título: **Método para mejorar el rendimiento de granos y promover el crecimiento de plantas**

30 Prioridad:

27.03.2010 DE 102010013166

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

13.10.2017

73 Titular/es:

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT KAISERSLAUTERN
(100.0%)
Gottlieb-Daimler-Strasse,
67663 Kaiserslautern, DE**

72 Inventor/es:

**NEUHAUS, EKKEHARD;
TRENTMANN, OLIVER;
WORMIT, ALEXANDRA y
WINGENTER, KARINA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 637 617 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para mejorar el rendimiento de granos y promover el crecimiento de plantas

5 Campo técnico:

La presente invención se refiere a un método para incrementar el rendimiento de granos y promover el crecimiento de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas en comparación con el tipo salvaje mediante sobreexpresión de la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o una homóloga de la misma en células de plantas isogénicas o transgénicas, en la que la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o la homóloga de la misma, exhibe una identidad de secuencia del 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o 100% con una secuencia de aminoácidos de la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica) de *Arabidopsis thaliana* TMT1.

La invención se refiere además al uso de una planta transgénica que comprende células vegetales que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica una proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o una homóloga de la misma, así como una secuencia nucleotídica reguladora, enlazada operativamente con la misma para incrementar el rendimiento de granos y la promoción del crecimiento de las plantas en comparación con el tipo salvaje por sobreexpresión de la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o una homóloga de la misma, en las células vegetales de la planta transgénica. Una planta transgénica de acuerdo con la presente invención tiene la propiedad de un rendimiento de grano mejorado y un crecimiento incrementado en comparación con el tipo salvaje y comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), así como una secuencia nucleotídica reguladora, unida operativamente a la misma, para el control de una expresión genética aumentada de la proteína TMT en las células vegetales de la planta transgénica. Además, la invención se refiere al uso de una planta transgénica en el cultivo y producción de plantas cultivadas y plantas útiles o biomasa, aceites o proteínas producidas a partir de ellas. La invención se refiere además a una construcción genética que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica) de *Arabidopsis thaliana* TMT1.

Técnica antecedente:

Se utilizan muchas plantas como base para obtener aceites y proteínas y, por lo tanto, representan importantes transportadores de materias primas para la industria alimenticia. A este respecto, se puede hacer mención en primer lugar a la colza (*Brassica napus*), que es de importancia agronómica mundial y almacena grandes cantidades de aceite y proteínas en su grano. Sólo en Alemania, se cosecharon cerca de 6,2 millones de toneladas de colza en 2009. Debido a sus cualidades de almacenamiento de aceite, esta especie de planta es particularmente deseable en la agricultura para la producción de aceites y proteínas, como se demuestra por los muchos intentos de mejorar el rendimiento de grano y el rendimiento de los productos producidos por la planta. La producción de aceite a partir de los granos de colza ocupa el tercer lugar en todo el mundo después del aceite de soja y del aceite de palma (Jaworski et al., 1993, Rendimiento de granos de canola en relación con los métodos de cosecha. In Janick, JE Simon, eds, New Crops. Wiley, Nueva York, págs. 330 - 301). Los ingredientes principales de los granos de colza son predominantemente aceite (aproximadamente 35 - 45%) y proteína (20 - 22%). El aceite es, en consecuencia, el almacén de energía principal de los granos maduros.

Un pariente cercano de la colza es el organismo modelo *Arabidopsis thaliana*, que se utiliza en la investigación genética y es un excelente representante de la fisiología de las plantas superiores. Por esta razón, los resultados obtenidos en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* también se pueden transferir a otras especies de plantas. Debido a la capacidad de las plantas para actuar como proveedoras de aceite y proteína, ya se han hecho intentos durante un tiempo relativamente largo para incrementar el rendimiento de la planta y el rendimiento de los granos durante el cultivo con el fin último de incrementar la cantidad de aceite o proteína producida durante la producción. Si los rendimientos de granos pueden ser mejorados con éxito, entonces se espera un aumento en la cosecha de aceite y proteína por hectárea.

Un enfoque de este tipo se sigue en el documento WO 2008/092935 A2. Esta memoria descriptiva describe un método para mejorar la cosecha en plantas mediante la modulación de la expresión de un ácido nucleico que codifica la proteína YEP (proteína de mejora del rendimiento). La YEP se selecciona de un grupo de proteínas celulares, en particular un polipéptido similar a la proteína 1 de muestreo nucleosómico (tipo NAP1), un polipéptido LikeSm (proteína Lsm), una ciclina H truncada (CycH_{tr}), un polipéptido Remorin y una proteína DREB. La transfección de células vegetales con YEP conduce a una mayor tasa de crecimiento de las plantas y partes de plantas, tales como, por ejemplo, los granos. El método se basa en consecuencia en la introducción de genes extraños y la expresión de los mismos en plantas transgénicas. Sin embargo, no se hace referencia al transporte de azúcar desde el citosol a la vacuola de la planta.

Con el fin desarrollar granos para poder almacenar aceites y proteínas, en primer lugar debe haber comunicación entre las hojas verdes fotosintéticamente activas y los órganos de almacenamiento; es decir, los productos de la fotosíntesis son transportados desde las hojas al interior de los granos, en los que se ensamban en lípidos y proteínas. La fotosíntesis es un proceso en el que la energía de la luz se convierte en energía bioquímica y en el que los azúcares, el almidón, los aminoácidos y los ácidos orgánicos se producen en última instancia en la hoja. Si los

azúcares en particular no se eliminan de la hoja con suficiente rapidez, se produce una acumulación en el citosol de las células fotosintéticas individuales. Esta acumulación de azúcar señala a la hoja que la fotosíntesis era lo suficientemente eficiente, y a continuación se regula a nivel genético (Rolland et al., 2002, Detección y señalización de azúcares en plantas, *Plant Cell* 14: 185 - 205). Esto significa que los genes necesarios para la fotosíntesis eficiente se reducen en su expresión por altas concentraciones de azúcar en el citosol, lo que conduce a una caída en la eficiencia fotosintética (Koch, 1996, Expresión de genes modulados con carbohidratos en plantas, *Ann Rev Planta Physiol Plant Mol Biol* 47: 509 - 540). Esto a su vez tiene como resultado que la fotosíntesis máxima alcanzable es inhibida por altas concentraciones de azúcares, aquí en particular glucosa, en el citosol de las células fotosintéticamente activas.

En diversas plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas tales como *Nedicago* (número de identificación. AC131026), *Vitis vinifera* (número de identificación. AAX47312) y arroz (*Oryza sativa*; número de identificación. Os02g13560), se ha descubierto una proteína que es responsable de transportar azúcar desde el citoplasma de una célula vegetal a la vacuola de la misma. Las vacuolas de las plantas juegan un papel central en el almacenamiento a largo o corto plazo de los azúcares. Tejidos de almacenamiento tales como remolacha (*Beta vulgaris*) y *Saccharum officinarum* acumulan grandes cantidades de sacarosa para servir como fuente de energía para el metabolismo de las plantas. Los azúcares se acumulan en las hojas durante el día y se liberan de la vacuola por la noche.

Finalmente, se ha identificado un gen en la planta *Arabidopsis* cuyo producto proteico es un transportador de azúcar que está localizado en la membrana de la vacuola de células fotosintéticamente activas y es capaz de importar glucosa (monosacárido) desde el citosol a la vacuola (Wormit et al., 2006, Identificación molecular y caracterización fisiológica de un nuevo transportador de monosacáridos de *Arabidopsis* implicado en el transporte de azúcar vacuolar. *Cell Plant* 18: 3476 - 3490). Esta proteína de transporte, conocida como transportador de monosacáridos tonoplástica (TMT), está localizada en la membrana del organelo celular más grande. La vacuola como organelo de una célula vegetal ocupa un volumen de aproximadamente el 90% en una célula vegetal fotosintéticamente activa (Martinola et al., 2007, Transportadores Vacuolares y su papel esencial en el metabolismo de las plantas, *J Exp Bot* 58: 83 - 102) y por lo tanto, es de una enorme importancia para el almacenamiento del azúcar considerando solamente su tamaño (Neuhaus HE, 2007, Transporte de metabolitos primarios a través de la membrana vacuolar de la planta. *FEBS Lett* 581: 2223 - 2222). La proteína transportadora de monosacáridos tonoplástica (TMT) comprende tres isoformas en *Arabidopsis thaliana*, que se denominan TMT1, TMT2 y TMT3. Los genes de TMT1 y TMT2 muestran un patrón de expresión específico del tipo de tejido y de tipo de célula, mientras que el gen TMT3 se expresa muy débilmente. Por medio de desactivadores genéticos se ha podido demostrar que las plantas cambiadas de esta manera acumulaban notablemente menos glucosa y fructosa en la vacuola en comparación con las plantas de tipo salvaje. No se pudo detectar ninguna diferencia para el disacárido de sacarosa.

Solamente en las especies de plantas *Arabidopsis thaliana*, se han identificado más de 60 isoformas de proteínas de transporte de monosacáridos, las cuales se han clasificado en varios grupos (Lalonde et al., 2004, Mecanismos de transporte para formas orgánicas de carbono y nitrógeno entre fuente y sumidero, *Annu. Rev. Plant Biol*, 55, 341 - 372). Un número de estas proteínas de transporte también se localizan en la membrana vacuolar.

Los documentos US 2006/0150283 A1 y US 2007/0214517 A1 describen moléculas de DNA para facilitar la explotación de plantas como fábricas para la síntesis de moléculas valiosas. La caracterización de la proteína TMT (Transportadora de Monosacáridos Tonoplástica) también fue parte de la disertación que investigó la desactivación de las cadenas de TMT dando lugar a una síntesis de sacarosa y tasa de respiración incrementadas en condiciones de frío. Se encontró que el AtERD6.5 y la glucosa BvIMP se transportaron desde la vacuola, mientras que el AtERD6.5 transportó fructosa desde la vacuola (Charakterisierung von vakuolären Transportproteinen aus Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung abiotischer Stressbedingungen, Tesis Stefan Wic, Technische Universität Kaiserslautern, Oktober 2009). La familia de genes TMT (Transportadora de Monosacáridos Tonoplástica) también se investigó con más detalle y se identificaron homólogas en otros organismos vegetales (Johnson et al., La familia de genes transportadores de monosacáridos en plantas terrestres es antigua y muestra una expresión diferencial de subfamilia y expansión a través de los linajes, 2006. *BMC Evol. Biol.*, 6: 64 - 83; Wingenter et al., Aumento de Actividad del Transportador de Monosacáridos Vacuolar TMT1 Altera la División Celular del Azúcar, la Señalización del Azúcar y el Rendimiento de los granos en *Arabidopsis*, 2010. *Planta Physiol.* 154: 665 - 677).

Exposición de la Invención:

En este contexto, un objeto de la presente invención es proporcionar un método y una planta transgénica con los que se puede mejorar el rendimiento y el crecimiento del grano. De esta manera, el rendimiento de aceite y de proteína producido con la planta, *entre otros*, debe ser incrementado.

Ese objeto se consigue por un método que tiene las características de la reivindicación 1. Las realizaciones preferidas se encuentran en las reivindicaciones dependientes.

Los inventores han encontrado, sorprendentemente, que los mutantes de sobreexpresión de la proteína transportadora de monosacáridos tonoplástica (TMT) conducen a una concentración de azúcares tales como glucosa en la vacuola de células vegetales, mientras que las concentraciones de azúcar en el citosol celular son más bajas. La sobreexpresión de la proteína de transporte de azúcar resultó en una expresión mejorada de los genes

responsables de la fotosíntesis (también observable por el aumento de la eficiencia fotosintética) y, finalmente, en un aumento en el peso de los granos de la planta. El número de granos por silícula permaneció sin cambios. Sin embargo, el número de granos totales por planta aumentó significativamente. Esto conduce a la conclusión de que la sobreexpresión de una proteína de transporte de azúcar localizada en la membrana de la vacuola da como resultado un aumento en el rendimiento del grano y en la promoción del crecimiento en las plantas. Debido a que las proteínas de transporte para el transporte de mono y di sacáridos desde el citoplasma hacia la vacuola se encuentran en todas las células vegetales que contienen vacuolas, el método de acuerdo con la invención se puede usar tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas. Si los resultados obtenidos en esta invención son transferidos desde la *Arabidopsis* a la colza, entonces el método de acuerdo con la invención se puede usar para mejorar significativamente el rendimiento de aceite y proteína en la colza. Por medio de la invención, es posible mejorar las cosechas de plantas cultivadas y útiles que son de importancia mundial, y los productos producidos a partir de ellas.

El método de acuerdo con la invención se basa en la sobreexpresión de la proteína transportador de monosacáridos tonoplástica (TMT), o una homóloga o análoga a la misma, en células isogénicas o transgénicas de plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas. El clon de cDNA de acuerdo con la invención (número de identificación. 8B8T74) codifica 734 aminoácidos y muestra una similitud de secuencia de 32% con el transportador de glucosa bacteriana GTR de *Synechocystis* y 26% de similitud con la proteína de transporte de glucosa STP1 de *Arabidopsis* localizada en la membrana plasmática (Wormit et al., 2006, Identificación molecular y caracterización fisiológica de un nuevo transportador de monosacáridos de *Arabidopsis* implicado en el transporte de azúcar vacuolar. *Cell Plant* 18: 3476 - 3490). Esta proteína es conocida como la proteína transportadora de monosacáridos tonoplástica (TMT) 1. Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa fue posible amplificar dos isoformas de TMT adicionales además de TMT1, la proteína TMT2 que contenía 739 residuos de aminoácidos y la proteína TMT3 que contenía 729 residuos de aminoácidos.

La proteína TMT1 tiene 12 dominios transmembrana y un bucle hidrófilo central relativamente grande localizado que conecta los dominios 6 y 7 uno al otro. Este bucle contiene aproximadamente 320 residuos de aminoácidos y es, por consiguiente, cuatro a cinco veces mayor que las estructuras correspondientes en otras proteínas de transporte de monosacáridos conocidas en procariotas y eucariotas. La secuencia de cDNA de la proteína transportadora de monosacáridos tonoplástica (TMT) en la *Arabidopsis thaliana* se muestra en la SEQ ID NO: 2 y la secuencia de aminoácidos derivada de la misma se muestra en la SEQ ID NO: 1.

Los ensayos llevados a cabo en los siguientes ejemplos muestran claramente que, por sobreexpresión de la proteína transportadora de monosacáridos tonoplástica (TMT) de la *Arabidopsis thaliana* TMT1, el peso de los granos podría ser aumentado en comparación con las plantas de tipo silvestre y el contenido de aceite y proteínas en granos maduros de *Arabidopsis* mejoraron. Además, el rendimiento de cosechas de granos en varias líneas de *Arabidopsis* también podría ser aumentado. La sobreexpresión conduce además a que las plantas de *Arabidopsis* se desarrollan marcadamente más rápidamente en comparación con el tipo silvestre y exhiben un mayor crecimiento. Esto es atribuible presumiblemente al hecho de que la sobreexpresión de la proteína TMT conduce a una acumulación del azúcar desde el citosol en la vacuola de la célula vegetal y de esta manera aumenta la velocidad de fotosíntesis. Alternativamente, se puede suponer que los granos más grandes de los mutantes de sobreexpresión proporcionan a las plántulas más energía, lo que representaría una ventaja sobre las plántulas de tipo salvaje en particular en la fase temprana de desarrollo. Debido a que se conocen un número de proteínas de transporte de azúcar que están localizadas en la membrana de vacuola tanto en células vegetales monocotiledóneas como dicotiledóneas, es comprensible que el principio de acuerdo con la invención sea generalmente transferible a proteínas de transporte de azúcar correspondientes.

Debido a que la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica) identificada en *Arabidopsis thaliana* también exhibe homologías de secuencia para transportar proteínas en otras células vegetales (véase la introducción), las proteínas de transporte homólogas a la proteína de transporte TMT1 de *Arabidopsis thaliana* también están incluidas en la invención.

Por lo tanto, una "homóloga" dentro del alcance de la invención indica una proteína de transporte que exhibe una alta identidad de secuencia con la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica) de *Arabidopsis thaliana* TMT1. Preferiblemente, una homóloga tiene una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con una secuencia de aminoácidos proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica) de la *Arabidopsis thaliana* TMT1.

A título de distinción, una "análoga" dentro del alcance de la invención denota una proteína de transporte de azúcar que está localizada en la membrana de la vacuola y realiza la función de transportar azúcar desde el citoplasma a la vacuola sin tener que ser necesariamente una homología de secuencia con la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica). Por lo tanto, una análoga tiene la misma función que la proteína TMT1 pero puede ser estructuralmente diferente. A diferencia de una homóloga, una relación genética no es un requisito previo.

Preferiblemente, la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica) de la *Arabidopsis thaliana* TMT1 que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID N° 1, o una homóloga o análoga de la misma, se usa para mejorar el rendimiento de los granos para promover el crecimiento de plantas monocotiledóneas o

dicotiledóneas. Para la sobreexpresión o la expresión de genes regulados, se introduce preferiblemente una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o una homóloga o análoga de la misma, en las células vegetales y se sobreexpresa en las células vegetales bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. Ejemplos de promotores constitutivos son el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, el promotor de nopalina / octopina sintasa *Agrobacterium tumefaciens* o el promotor Emu de maíz. Además hay promotores inducibles por luz, tales como, por ejemplo, el promotor *rbcS* de la pequeña subunidad RUBISCO (arroz, tomate). Los métodos para la expresión genética de genes en células vegetales son generalmente convencionalmente conocidos y descritos en la literatura, así como los métodos de clonación específicos y la regulación controlada de la expresión genética. Además de los promotores, también pueden ser necesarias secuencias de terminación para la expresión controlada de genes. Para la selección de plántulas es posible introducir adicionalmente genes marcadores (por ejemplo, GFP) u otros genes de selección para los que están disponibles anticuerpos específicos para la detección, por ejemplo contra el motivo c - myc.

La expresión genética puede tener lugar ya sea por clonación de un plásmido con las correspondientes secuencias de nucleótidos o por incorporación en el genoma de la célula vegetal. La integración estable en el genoma de la célula vegetal y la posibilidad de regulación enfocada de la expresión genética conduce a una expresión estable de la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o una homóloga o análoga de la misma, en la célula vegetal.

Es posible de acuerdo con la invención que la sobreexpresión de la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o una homóloga o análoga de la misma, sea posible tanto en células vegetales isogénicas como transgénicas. En células vegetales isogénicas, el gen endógeno para la proteína transportadora en cuestión está sobreexpresado y, en última instancia, conduce a una mayor producción de granos y un crecimiento más rápido de la planta en comparación con el tipo salvaje. Además, también es posible utilizar proteína de transporte de azúcar de otras especies vegetales para la sobreexpresión, de manera que se obtiene una expresión genética transgénica en las células vegetales transfectadas. Por ejemplo, el gen para la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica) de la *Arabidopsis thaliana* TMT1 puede ser transfectado en la planta de colza *Brassica napus* y el gen puede ser expresado.

La expresión de la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o de una homóloga o análoga de la misma, en células vegetales, en particular en células vegetales que tienen una alta capacidad de almacenamiento vacuolar, tal como el *Brassica napus*, es particularmente interesante económicamente porque aquí se pueden producir grandes cantidades de aceite o proteína. Por ejemplo, la producción de endospermo o la producción de tubérculos de patata se puede mejorar mediante la inserción enfocada del gen de acuerdo con la invención para la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica) y su expresión, como resultado de lo cual se logra un rendimiento de almidón más alto lo cual a su vez incrementa la producción de bioetanol.

La incorporación enfocada y la expresión de la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o una homóloga o análoga de la misma, en células de plantas isogénicas o transgénicas, conduce adicionalmente a un aumento del rendimiento por unidad de área, porque las plantas alcanzan el tamaño de recolección mucho más temprano y se pueden modificar en consecuencia. Por lo tanto, es posible conseguir más cosechas en la misma superficie de cultivo en un tiempo más corto. El método de acuerdo con la invención conduce a aumentos marcados en la cosecha con un rendimiento de biomasa mejorado marcadamente por unidad de superficie en comparación con las plantas de tipo salvaje.

El método de acuerdo con la invención se puede utilizarse, en principio, en todas las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Las plantas cultivadas y las plantas útiles en particular son económicamente interesantes, tales como, por ejemplo, la colza *Brassica napus*. Se da preferencia, por ejemplo, a las especies y a sus géneros más altos de *Arabidopsis thaliana*, de *Brassica napus*, de *Brassica oleracea*, de *Brassica rapa*, de *Arachis hypogaea*, de *Boechera stricta*, de *Bruguiera gymnorhiza*, de *Citrus paradisi*, de *Poncirus trifoliata*, de *Euphorbia esula*, de *Fragaria vesca*, de *Gossypium hirsutum*, de *Gossypium raimondii*, de *Glycine max*, de *Helianthus annuus*, de *Ipomoea nil*, de *Lycopersicon esculentum*, de *Lactuca perennis*, de *Lactuca salina*, de *Lactuca serriola*, de *Lactuca sativa*, de *Loto japonicus*, de *Malus domestica*, de *Nicotiana tabacum*, de *Oryza australiensis*, de *Oryza brachyanth*, de *Oryza punctata*, de *Oryza ridleyi*, de *Oryza rufipogon*, de *Oryza sativa*, de *Populus trichocarpa*, de *Poncirus trifoliata*, de *Prunus Persica*, de *Solanum tuberosum*, de *Sorghum bicolor*, de *Triticum aestivum*, de *Zea mays*, de *Saccharum officinarum*, de *Panicum virgatum*, de *Miscanthus*, de *Vitis vinifera*, de *Cannabis sativa*.

La invención se refiere además a una planta transgénica que tiene la propiedad de un rendimiento de grano mejorado y un crecimiento mejorado en comparación con el tipo salvaje, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), así como una secuencia nucleotídica reguladora, operativamente ligados a la misma, para el control de una expresión genética aumentada de la proteína TMT en las células vegetales de la planta transgénica. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos codifica para la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica) de *Arabidopsis thaliana* TMT1 de acuerdo con SEQ ID NO: 1, o una homóloga o análoga de la misma.

La planta transgénica de acuerdo con la invención se puede utilizar en el cultivo de plantas cultivadas o plantas útiles. Además, se puede utilizar en la producción de biomasa, aceites o proteínas producidas a partir de las mismas.

5 La invención también incluye la construcción de genes que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica) TMT1 de *Arabidopsis thaliana* de acuerdo con SEQ ID NO: 1, o una homóloga o análoga de la misma, así como secuencias reguladoras de nucleótidos, enlazadas operativamente con la misma, para el control de una expresión genética aumentada de la proteína TMT en una célula vegetal. La invención se explica con mayor detalle en las siguientes figuras.

10 Breve descripción de los dibujos:
En las figuras:

15 La figura 1 muestra un diagrama de clonación para la producción de una construcción de sobreexpresión de proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica);
la figura 2 muestra una representación esquemática de las inserciones de T - DNA del mutante doble *TMT1 - 2*;
la figura 3 muestra el peso de mil granos de *Arabidopsis* ;
la figura 4 muestra los contenidos de aceite y lípidos de los granos de *Arabidopsis*;
20 la figura 5 muestra el número de granos por silícula en *Arabidopsis*;
la figura 6 muestra el peso total de los granos por planta de *Arabidopsis* ;
la figura 7 muestra el desarrollo de plantas de *Arabidopsis* después de 15 y 34 días.

25 Mejor modo de realizar la Invención:

Ejemplos:

Clonación de la construcción del plásmido para la sobreexpresión de la proteína TMT (*Attmt1*)

30 Para la expresión de la proteína de transporte de azúcar, el cDNA de la TMT proteína (transportadora de monosacáridos tonoplástica) de la *Arabidopsis thaliana* TMT1 (= *Attmt* - CDNA). Para la producción de la construcción de sobreexpresión, se utilizó *Attmt* - cDNA, que contiene un motivo c - myc en la región del bucle hidrófilo entre los dominios transmembrana putativos 6 y 7. Ésta es la construcción pMUT3 (véase la figura 1).

35 La secuencia completa de DNAC se cortó primero del plásmido pMUT3 con las enzimas de restricción EcoRI y ClaI y se ligó al plásmido pHannibal linealizado con las mismas enzimas (pSR3). Se formó un casete de expresión en la que un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor estaba situado aguas arriba del DNAC de TMT1 y un terminador OCS estaba situado aguas abajo del gen en el extremo de aguas abajo (señal de poliadenilación del gen de la octopina sintasa). Una digestión de restricción adicional con la enzima de restricción NotI del plásmido pSR3 condujo al aislamiento de la casete, que finalmente se introdujo en el vector de transformación de plantas pART27 (pSR6).

40 La secuencia de cDNA de *Attmt1* (SEQ ID NO: 2) con un motivo c - myc integrado (enfaticado en rojo) es la siguiente:

ATGAAGGGAGCGACTCTCGTTGCTCTCGCCGCCACAATCGGCAATTTCTTACAAGGATGGGACAATGCCACCATTGCTGGAGCT
 ATGGTTTATATCAACAAAGACTTGAATCTACCAACCTCTGTTCAAGGTCTTGTGCTGCTATGTATTGATCGGTGCAACGGTC
 ATCAGACTTGTCTCAGGACCGATATCTGATTGGCTCGGCAGACGCCCATGCTCATTTTATCATCAGTTATGTATTTCTGCTGCG
 GGTTTGATAATGTTGTGGTCTCCCAATGTCTATGTTCTGTGCTTTGCTAGGCTTCTTAATGGGTTTGGTGCCGGGCTCGCGGT
 AACTTGTCCCTGTTTACATTTCTGAAACCGCTCCTCCGAGATCAGAGGACAGTTAAATACTCTCCCTCAGTTTCTTGGCTCT
 GGTGGAATGTTTTGTCTATCTGATGGTTTTCTACTATGTCCCTGAGTGACTCCCTAGCTGGAGAGCCATGCTCGGTGTCTCTC
 TCGATCCCTTCTCTTTTATTGTTTTCTCAGGTGTTTTATTGCCCCGAGTCTCCTCGTTGGCTGGTTAGTAAAGGAAGAATG
 GACGAGGCTAAGCGAGTTCTTCAACAGTTATGTGGCAGAGAAGATGTTACCGATGAGATGGCTTTACTAGTTGAAGGACTAGAT
 ATAGGAGGAGAAAAACAATGAAGATCTCTTAGTAACCTTTGGAGGATCATGAAGGTGATGATACACTTGAAACCGTTGATGAG
 GATGGACAAATGCGGCTTTATGGAACCCACGAGAATCAATCGTACCTTGCTAGACCTGTCCCAAGACAAATAGCTCACTTGGG
 CTACGCTCTCGCCACGGAAGCTTAGCAAAACCAAGCATGATCCTTAAAGATCCGCTCGTCAATCTTTTGGCAGTCTCCACGAG
 AAGATGCCAGAAGCAGGCGGAAACACTCGGAGTGGGATTTCCCTCATTTCCGAAGCATGTTTCACTACTGCGGATGCGCCT
 CACGGTAAACCGGCTCATTTGGGAAAAGGACATAGAGAGGCCATTACAACAAAGACAATGATGACTATGCGACTGATGTTGCGG
 GAACAAAACTTATCTCGGCAGAAAGATTGCGTAGCCCTTAATGTGCGGCCAGACCACAAGCATGGACAAGGATATGATCCCA
 CATCCTACAAGTGAAGCACTTTAAGCATGAGACGACACAGTACGCTTATGCAAGGCAACGCGGAAAGTAGCATGGGAATTGGT
 GGTGGTTGGCATATGGGATATAGATACGAAAACGATGAATACAAGAGGTATTTATCTTAAAGAAGATGGAGCTGAATCTCGCCGT
 GGCTCGATCATCTCTATTCCCGGAGGTCCGGATGGTGGAGGCAGCTACATTACGCTTCTGCGCTTGTAAGCAGATCTGTTCTT
 GGTCTTAAATCAGTTTATGGATCCGCCATGGTTCCTCCCGGAGAAAATTGCTGCGCTCTGGACCACTCTGGTCTGCTCTTCTTGAA
 CCTGGTTTAAAGCGTGCCTTGTTGTTGGTGTGCGGCAATCAATACTGCAGCAGTTTTCAGGTATCAATGGAGTTCTCTACTAC
 ACTCCTCAGATTCTCGAACGGGCTGGCGTAGATATTCTTCTTCGAGCCTCGGACTAAGTTCCATCTCTGCGTCAATTCCTCATC
 AGCGGTTTAAACAACATTACTCATGCTCCAGCCATTGTGCTTGGCATGAGACTCATGGATGTATCCGGAAGAAGGTCATTACTT
 CTCTGGACAATCCAGTTCTCATTGTCTCACTTGTGCTCCTTGTCTATCAGCGAGCTCATCCACATCAGCAAAGTCGTGAACGCA
 GCACTCTCCACAGGTTGTGCTGCTCTACTTCTGCTTCTTCGTGATGGGTACGGTCCCATTCCAAACATCCTCTGTTCTGAA
 ATCTTCCCAACAAGAGTCCGTGGTCTCTGCATCGCCATATGTGCTATGGTCTTTTGGATTGGAGACATTATTGTACGTAATCA
 CTTCCGTTTCTCCTCAGCTCGATCGGACTAGTTGGTGTTCAGCATTTACGCTGCGGTTTGGCTTATCTCATGGATCTTCGTT
 TACATGAAAGTCCCGGAGACTAAAGGCATGCCTTTGGAAGTTATCACAGACTACTTTGCCCTTGGAGCTCAAGCTCAAGCTTCT
 GCTCCTTCTAAGGATATATAA

El diagrama de clonación que se muestra en la figura 1 muestra la producción de la construcción de sobreexpresión pSR6 basada en *Atmt1* cDNA.

- 5 Las secuencias de los vectores pMUT3 y pSR3 obtenida de esta manera se dan en el listado de secuencias o SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4.

Producción de líneas de sobreexpresión *Atmt1*

- 10 Para la introducción de la construcción de sobreexpresión en el genoma de las plantas *Arabidopsis*, se utilizó el denominado "proceso de inmersión floral". En este proceso, las inflorescencias se sumergieron en una suspensión de agrobacterias (cepa GV3101) que había sido previamente transformada con la construcción pSR6. Las plantas transformadas eran líneas celulares de inserción de t - DNA homocigótico, en las que tanto el gen nativo *tmt1* como el gen nativo *tmt2* se habían suprimido mediante la inserción de un DNA de transferencia (véase Wormit et al., 2006: Identificación molecular y caracterización fisiológica de un nuevo transportador de monosacáridos de *Arabidopsis*
- 15 implicado en el transporte de azúcar vacuolar. Cell Plant 18: 3476 - 3490). De esta manera, la producción del mRNA nativo para *tmt1* y *tmt2* se suprimió y se impidió la co - supresión del mRNA artificial. En lugar de una supresión de los genes de *tmt1* y *tmt2*, una secuencia heteróloga *tmt* también puede ser sobreexpresada. La expresión de una secuencia nativa *tmt1* - cDNA es además posible.

- 20 Cuando se completó la formación de granos, las plantas se cosecharon y se hicieron germinar en placas de agar que contenían kanamicina para la selección de líneas celulares transgénicas. Debido a que las células vegetales transfectadas portan un gen de resistencia a la kanamicina, sólo aquellas plántulas en las que la transfección con el gen *tmt1* - cDNA ha tenido éxito se pueden desarrollar, porque estas células desarrollan resistencia al antibiótico.

- 25 La selección de las líneas celulares de sobreexpresión se llevó a cabo mediante un análisis de transferencia de Northern, seleccionando aquellas líneas que exhiben un marcado incremento en la cantidad de la transcripción de *Atmt1* en comparación con el tipo salvaje.

- 30 Esta situación se ilustra de nuevo esquemáticamente en la figura 2. Las inserciones individuales de t - DNA en las regiones Exon del cDNA *Atmt1* y *Atmt2* se muestran.

Cultivo de plantas para el análisis de granos

- 35 Antes de la germinación, los granos de *Arabidopsis* se incubaron durante dos días en la oscuridad a 4°C para la inhibición. Las plantas de tipo salvaje, la línea celular mutante homocigótica *tmt1* - 2 y las tres líneas celulares de sobreexpresión *tmt1* 1, 4 y 10 se cultivaron en placas durante nueve semanas y se cultivaron a 22°C en condiciones de días cortos (10 horas de luz, 14 horas de oscuridad) en una cámara de crecimiento. A continuación, las plantas se cambiaron a condiciones de días largos (14 horas de luz, 10 horas de oscuridad) a 22°C. El riego se continuó durante tres semanas bajo esas condiciones. A continuación, se detuvo el riego y se cultivaron más las plantas hasta que se observó una sequedad completa de la infrutescencia. Los granos de las plantas individuales se recolectaron con la ayuda de un colector de granos (Aracon 720).
- 40

Análisis de granos

Para la cuantificación de ácidos grasos, se homogeneizaron 0,1 g de granos completamente maduros y secados al aire en un mortero en nitrógeno líquido. A continuación se añadió un volumen de 1,5 ml de isopropanol y se realizó otra homogeneización. La suspensión se transfirió a un recipiente de reacción que tenía un volumen de 1,5 ml y se incubó durante 12 horas a 4°C en un agitador de laboratorio a 100 rpm. Las muestras se centrifugaron a continuación durante 10 min a 12.000 g y el sobrenadante se transfirió a recipientes de reacción de 1,5 ml previamente medidos. Los recipientes de reacción se incubaron durante 8 horas a 60°C con el fin de evaporar el isopropanol. El contenido total de lípidos se determinó entonces por gravimetría.

Para la cuantificación de proteínas del grano, se homogeneizaron 0,1 g de grano en un mortero a temperatura ambiente. A continuación, un volumen de 1000 µl de un medio tampón (HEPES 50 mM, 5 mM MgCl₂, PH 7,5, Triton X100 al 1%, glicerol al 15%, SDS al 2%, EDTA 1 mM, PMSF, 1/100 (v / v)) y se realizó otra homogeneización. La suspensión se transfirió a recipientes de reacción de 1,5 ml, y las muestras se centrifugaron durante 10 min a 12.000 g a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a nuevos recipientes de reacción de 1,5 ml y las proteínas se cuantificaron con reactivo BCA de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Resultados

La figura 3 muestra el peso de mil granos de *Arabidopsis*. Como control se utilizó una planta de *Arabidopsis* de tipo salvaje, así como un mutante *tmt1 - 2* que mostró una actividad de TMT vacuolar muy reducida (Wormit et al., 2006, Identificación molecular y caracterización fisiológica de un nuevo transportador de monosacáridos de *Arabidopsis* implicado en el transporte de azúcar vacuolar. Cell Plant 18: 3476 - 3490). La sobreexpresión con las líneas de sobreexpresión 1, 4 y 10 conduce a un aumento significativo en el peso de mil granos en comparación con el tipo salvaje.

La figura 4 muestra los contenidos de aceite y lípidos de los granos de *Arabidopsis*. El contenido de aceite (figura 4A) y el contenido de proteína (figura 4B) se incrementan en comparación con la *Arabidopsis* de tipo salvaje (WT) y las tres líneas de sobreexpresión de TMT1 independientes.

La figura 5 muestra el número de granos por sílicula en la *Arabidopsis*. El número medio de granos por sílicula de las plantas de *Arabidopsis* de tipo salvaje (WT) y las tres líneas independientes de sobreexpresión de TMT1 es prácticamente el mismo.

La figura 6 resume el peso total de los granos por planta de *Arabidopsis*. El peso total medio de todos los granos maduros en las plantas de *Arabidopsis* de tipo salvaje (WT) y las tres líneas de sobreexpresión independientes de TMT1. El peso total de los granos aumenta notablemente en las líneas de sobreexpresión en comparación con el tipo salvaje. En la figura 6A, esto ya se puede ver visualmente, mientras que en la figura 6B se realizó una cuantificación de los granos por planta.

La figura 7 muestra el desarrollo de las plantas de *Arabidopsis* después de 15 y 34 días. Las líneas de sobreexpresión muestran un crecimiento marcadamente estimulado después de sólo 15 días y son notablemente mayores comparadas con la planta de *Arabidopsis* de tipo salvaje. Por lo tanto, una sobreexpresión de TMT1 conduce a un mayor crecimiento de las plantas.

En resumen, los resultados muestran claramente que el rendimiento de grano, la capacidad de germinación y el crecimiento de las plantas se pueden mejorar mediante una sobreexpresión de la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica).

Descripción del texto referente a las figuras:

Figura 1: Diagrama de clonación para la producción de la construcción de sobreexpresión de *Attmt1* pSR6 amp: gen de resistencia a la ampicilina; CaMV - 35S: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; OCS: señal de poliadenilación del gen de la octopina sintasa; *tmt1 - cmc*: cDNA de *Attmt1* con motivo *cmc* insertado;

Figura 2: Representación esquemática de las inserciones de T - DNA del mutante doble *tmt1 - 2 AttMT1* con inserción del T - DNA; B: *AttMT2* con inserción del T - DNA;

Figura.3: Peso de mil granos de *Arabidopsis*. Se muestra el peso de las plantas de *Arabidopsis* del tipo salvaje (Wt, basado en el 100%) y tres líneas de sobreexpresión de TMT1 independientes. *tmt1 - 2* es un mutante que no exhibe actividad de TMT vacuolar (Wormit et al., 2006). Los datos son estadísticamente significativos (valores medios +/- error estándar) y son de tres cultivos de plantas independientes;

Figura 4: Contenido de aceite y lípidos de los granos de *Arabidopsis*. El contenido de aceite (A) y el contenido de proteína (B) de las plantas de *Arabidopsis* de tipo salvaje (Wt) y tres líneas de sobreexpresión de TMT1 independientes. *tmt1 - 2* es un mutante que no exhibe actividad de TMT vacuolar (Wormit et al., 2006). Los datos son estadísticamente significativos (valores medios +/- error estándar) y son de tres cultivos de plantas independientes;

Figura 5: Número de granos por silícula en la *Arabidopsis*. El número medio de granos por silícula de las plantas de *Arabidopsis* de tipo salvaje (Wt) y tres líneas de sobreexpresión de TMT1 independientes. *tmt1* - 2 es un mutante que no exhibe actividad de TMT vacuolar (Wormit *et al.*, 2006). Los datos son estadísticamente significativos (valores medios +/- error estándar) y son de tres cultivos de plantas independientes;

Figura 6: Peso total de los granos por planta de *Arabidopsis*. El peso total medio de todos los granos maduros en las plantas de *Arabidopsis* de tipo salvaje (Wt) y tres líneas de sobreexpresión de TMT1 independientes. *tmt1* - 2 es un mutante que no exhibe actividad de TMT vacuolar (Wormit *et al.*, 2006). A. Representación visual, B. Cuantificación de granos. Los datos son estadísticamente significativos (valores medios +/- error estándar) y son de tres cultivos de plantas independientes;

Figura 7: Desarrollo de las plantas de *Arabidopsis* después de 15 y 34 días. El estado de desarrollo de las plantas de *Arabidopsis* de tipo salvaje (Wt), mutantes *tmt1* - 2, que carecen de la actividad del transportador de glucosa vacuolar TMT (Wormit *et al.*, 2006), y se muestran tres líneas de sobreexpresión de TMT1 independientes. El desarrollo más rápido de las líneas de sobreexpresión TMT se puede ver claramente.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Technische Universität Kaiserslautern
- <120> Método para mejorar el rendimiento de granos y promover el crecimiento
- <130> Transportador de TMT
- <160> 4
- <170> Versión de Patente 3.3
- <210> 1
- <211> 734
- <212> PRT
- <213> *Arabidopsis thaliana*
- <400> 1

ES 2 637 617 T3

Met Lys Gly Ala Thr Leu Val Ala Leu Ala Ala Thr Ile Gly Asn Phe
1 5 10 15

Leu Gln Gly Trp Asp Asn Ala Thr Ile Ala Gly Ala Met Val Tyr Ile
20 25 30

Asn Lys Asp Leu Asn Leu Pro Thr Ser Val Gln Gly Leu Val Val Ala
35 40 45

Met Ser Leu Ile Gly Ala Thr Val Ile Thr Thr Cys Ser Gly Pro Ile
50 55 60

Ser Asp Trp Leu Gly Arg Arg Pro Met Leu Ile Leu Ser Ser Val Met
65 70 75 80

Tyr Phe Val Cys Gly Leu Ile Met Leu Trp Ser Pro Asn Val Tyr Val
85 90 95

Leu Cys Phe Ala Arg Leu Leu Asn Gly Phe Gly Ala Gly Leu Ala Val
100 105 110

Thr Leu Val Pro Val Tyr Ile Ser Glu Thr Ala Pro Pro Glu Ile Arg
115 120 125

Gly Gln Leu Asn Thr Leu Pro Gln Phe Leu Gly Ser Gly Gly Met Phe
130 135 140

Leu Ser Tyr Cys Met Val Phe Thr Met Ser Leu Ser Asp Ser Pro Ser
145 150 155 160

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

ES 2 637 617 T3

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

ES 2 637 617 T3

Glu Tyr Lys Arg Tyr Tyr Leu Lys Glu Asp Gly Ala Glu Ser Arg Arg
 435 440 445
 Gly Ser Ile Ile Ser Ile Pro Gly Gly Pro Asp Gly Gly Gly Ser Tyr
 450 455 460
 Ile His Ala Ser Ala Leu Val Ser Arg Ser Val Leu Gly Pro Lys Ser
 465 470 475 480
 Val His Gly Ser Ala Met Val Pro Pro Glu Lys Ile Ala Ala Ser Gly
 485 490 495
 Pro Leu Trp Ser Ala Leu Leu Glu Pro Gly Val Lys Arg Ala Leu Val
 500 505 510
 Val Gly Val Gly Ile Gln Ile Leu Gln Gln Phe Ser Gly Ile Asn Gly
 515 520 525
 Val Leu Tyr Tyr Thr Pro Gln Ile Leu Glu Arg Ala Gly Val Asp Ile
 530 535 540
 Leu Leu Ser Ser Leu Gly Leu Ser Ser Ile Ser Ala Ser Phe Leu Ile
 545 550 555 560
 Ser Gly Leu Thr Thr Leu Leu Met Leu Pro Ala Ile Val Val Ala Met
 565 570 575
 Arg Leu Met Asp Val Ser Gly Arg Arg Ser Leu Leu Leu Trp Thr Ile
 580 585 590
 Pro Val Leu Ile Val Ser Leu Val Val Leu Val Ile Ser Glu Leu Ile
 595 600 605
 His Ile Ser Lys Val Val Asn Ala Ala Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
 610 615 620
 Leu Tyr Phe Cys Phe Phe Val Met Gly Tyr Gly Pro Ile Pro Asn Ile
 625 630 635 640
 Leu Cys Ser Glu Ile Phe Pro Thr Arg Val Arg Gly Leu Cys Ile Ala
 645 650 655
 Ile Cys Ala Met Val Phe Trp Ile Gly Asp Ile Ile Val Thr Tyr Ser
 660 665 670
 Leu Pro Val Leu Leu Ser Ser Ile Gly Leu Val Gly Val Phe Ser Ile
 675 680 685

ES 2 637 617 T3

Tyr Ala Ala Val Cys Val Ile Ser Trp Ile Phe Val Tyr Met Lys Val
690 695 700

Pro Glu Thr Lys Gly Met Pro Leu Glu Val Ile Thr Asp Tyr Phe Ala
705 710 715 720

Phe Gly Ala Gln Ala Gln Ala Ser Ala Pro Ser Lys Asp Ile
725 730

5 <210> 2
<211> 2205
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

10 <400> 2

```
atgaagggag cgactctcgt tgctctcgcc gccacaatcg gcaatttctt acaaggatgg      60
gacaatgccca ccattgctgg agctatgggtt tatatcaaca aagacttgaa tctaccaacc      120
tctgttcaag gtcttgctgt tgctatgtca ttgatcgggtg caacgggtcat cacgacttgc      180
tcaggaccga tatctgattg gctcggcaga cgccccatgc tcattttatc atcagttatg      240
tatttcgtct gcggtttgat aatgttggtg tctcccaatg tctatgttct gtgctttgct      300
aggcttctta atgggtttgg tgccgggctc gcggttacac ttgtccctgt ttacatttct      360
gaaaccgctc ctccggagat cagaggacag ttaaatactc tccctcagtt tcttggctct      420
gggtggaatgt ttttgtcata ctgtatgggtt ttcactatgt ccctgagtga ctcccctagc      480
tggaagagcca tgctcgggtg cctctcgatc ccttctcttc tttatttggt tctcacgggtg      540
ttttatttgc ccgagtctcc tcgttggtctg gttagtaaag gaagaatgga cgaggctaag      600
cgagttcttc aacagttatg tggcagagaa gatgttaccg atgagatggc tttactagtt      660
gaaggactag atataggagg agaaaaaaca atggaagatc tcttagtaac tttggaggat      720
catgaagggtg atgatacact tgaaaccgtt gatgaggatg gacaaatgcg gctttatgga      780
accacagaga atcaatcgta ccttgctaga cctgtcccag aacaaaatag ctcaattggg      840
ctacgctctc gccacggaag cttagcaaac caaagcatga tccttaaaga tccgctcgtc      900
aatctttttg gcagtctcca cgagaagatg ccagaagcag gcggaaacac tcggagtggg      960
attttccctc atttcggaag catgttcagt actactgccg atgcgcctca cggtaaaccg     1020
gctcattggg aaaaggacat agagagccat tacaacaaag acaatgatga ctatgcgact     1080
gatgatgggt cggaacaaaa acttatctcg gcagaagatt tgcgtagccc cttaatgtcg     1140
cgccagacca caagcatgga caaggatatg atcccacatc ctacaagtgg aagcacttta     1200
agcatgagac gacacagtac gcttatgcaa ggcaacggcg aaagtagcat ggggaattgg     1260
gggtggttggc atatgggata tagatacgaa aacgatgaat acaagaggta ttatcttaaa     1320
```

ES 2 637 617 T3

gaagatggag ctgaatctcg ccgtggctcg atcatctcta ttccccggagg tccggatggg 1380
 ggaggcagct acattcacgc ttctgccctt gtaagcagat ctgttcttgg tcctaaatca 1440
 gttcatggat ccgccatggt tcccccgagg aaaattgctg cctctggacc actctggctt 1500
 gctcttcttg aacctgggtg taagcgtgcc ttggttggtg gtgtcggcat tcaaatactg 1560
 cagcagtttt caggtatcaa tggagttctc tactacactc ctgagattct cgaacgggct 1620
 ggcgtagata ttcttctttc gagcctcgga ctaagttcca tctctgcgtc attcctcatc 1680
 agcggtttaa caacattact catgctccca gccattgtcg ttgccatgag actcatggat 1740
 gtatccggaa gaaggtcatt acttctctgg acaatcccag ttctcattgt ctcaactgtc 1800
 gtccttgta tcagcgagct catccacatc agcaaagtcg tgaacgcagc actctccaca 1860
 ggttggtgctg tgctctactt ctgcttcttc gtgatgggtt acgggtcccat tccaaacatc 1920
 ctctgttctg aaatcttccc aacaagagtc cgtggtctct gcacgccat atgtgctatg 1980
 gtcttttgga ttggagacat tattgtcacg tactcacttc ccgttctcct cagctcgatc 2040
 ggactagttg gtgttttcag catttaogct gcggtttgcg ttatctcatg gatcttcgtt 2100
 tacatgaaag tcccgagac taaaggcatg cctttggaag ttatcacaga ctactttgcc 2160
 tttggagctc aagctcaagc ttctgctcct tctaaggata tataa 2205

<210> 3
 <211> 5166
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa attcgcgtta aatttttggt aaatcagctc 60
 attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
 gataggggtg agtggtgttc cagtttgga caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180
 caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240
 ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc cttaaaggag 300
 cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa 360
 agcgaagga gcgggctgta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac 420
 cacaccgcgc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgctgcc cattcgccat tcaggctgctg 480
 caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 540
 gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg 600
 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg 660
 gccccccctc gaggtcgacg gtatcgataa gcttgattta tatatcctta gaaggagcag 720
 aagcttgagc ttgagctcca aaggcaaagt agtctgtgat aacttccaaa ggcattgcctt 780

ES 2 637 617 T3

tagtctccgg	gactttcatg	taaacgaaga	tccatgagat	aacgcaaacc	gcagcgtaaa	840
tgctgaaaac	tccaactagt	tcgatcgcgc	tgaggagaac	gggaagtgcg	tacgtgacaa	900
taatgtctcc	aatccaaaag	accatagcac	atatggcgat	gcagagacca	cggctctgctt	960
gttggaaga	tttcagaaca	gaggatgttt	ggaatggacc	gtaacccatc	acgaagaagc	1020
agaagtagag	cacgacacaa	cctgtggaga	gtgctgcgtt	cacgactttg	ctgatgtgga	1080
tgagctcgct	gatgacaagg	acgacaagtg	agacaatgag	aactgggatt	gtccagagaa	1140
gtaatgacct	tcttccggat	acatccatga	gtctcatggc	aacgacaatg	gctgggagca	1200
tgagtaatgt	tgtaaaccg	ctgatgagga	atgacgcaga	gatggaactt	agtccgaggc	1260
tcgaaagaag	aatatctacg	ccagcccgtt	cgagaatctg	aggagtgtag	tagagaactc	1320
cattgatacc	tgaaaactgc	tgcaagtattt	gaatgccgac	accaacaacc	aaggcacgct	1380
taacaccagg	ttcaagaaga	gcgaccaga	gtggtccaga	ggcagcaatt	ttctccgggg	1440
gaacctggc	ggatccatga	actgatttag	gaccaagaac	agatctgctt	acaagggcag	1500
aagcgtgaat	gtagctgcct	ccaccatccg	gacctccggg	aatagagatg	atcgagccac	1560
ggcgagattc	agctccatct	tctttaagat	aatacctctt	gtattcatcg	tttctgtatc	1620
tatatcccat	atgccaaaca	ccaccaattc	ccatgctaact	ttcgccgttg	ccttgcataa	1680
gcgtactgtg	tcgtctcatg	cttaaagtgc	ttccacttgt	aggatgtggg	atcatatcct	1740
tgtccatgct	tgtggtctgg	cgcgacatta	aggggctacg	caaactttct	tccgagataa	1800
gtttttgttc	cgcaccatca	tcagtcgcac	agtcacattt	gtctttgttg	taatggctct	1860
ctatgtcctt	ttcccaatga	gcgggtttac	cgtgaggcgc	atcggcagta	gtactgaaca	1920
tgcttccgaa	atgagggaaa	atcccactcc	gagtgtttcc	gcctgcttct	ggcatcttct	1980
cgtggagact	gccaaaaaga	ttgacgagcg	gatctttaag	gatcatgctt	tggtttgcta	2040
agcttccgtg	gcgagagcgt	agcccaagtg	agctattttg	ttctgggaca	ggtctagcaa	2100
ggtacgattg	attctcgtgg	gttcataaaa	gccgtatttg	tccatcctca	tcaacggttt	2160
caagtgtatc	atcaccttca	tgatcctcca	aagttactaa	gagatcttcc	attgtttttt	2220
ctcctcctat	atctagtcct	tcaactagta	aagccatctc	atcggttaaca	tcttctctgc	2280
cacataactg	ttgaagaact	cgcttagcct	cgtccattct	tcctttacta	accagccaac	2340
gaggagactc	gggcaaataa	aacaccgtga	gaaacaaata	aagaagagaa	gggatcgaga	2400
ggacaccgag	catggctctc	cagctagggg	agtcactcag	ggacatagtg	aaaaccatac	2460
agtatgacaa	aaacattcca	ccagagccaa	gaaactgagg	gagagtattt	aactgtcctc	2520
tgatctccgg	aggagcgggt	tcagaaatgt	aaacagggac	aagtgttaacc	gcgagcccgg	2580
caccaaacc	attaagaagc	ctagcaaaagc	acagaacata	gacattggga	gaccacaaca	2640
ttatcaaacc	gcagacgaaa	tacataactg	atgataaaaat	gagcatgggg	cgtctgccga	2700

ES 2 637 617 T3

gccaatcaga tatcggtcct gagcaagtcg tgatgaccgt tgcaccgatc aatgacatag 2760
 caacgacaag accttgaaca gaggttggtg gattcaagtc tttgttgata taaaccatag 2820
 ctccagcaat ggtggcattg tcccatcctt gtaagaaatt gccgattgtg gcggcgagag 2880
 caacgagagt cgctcccttc atatcgaatt cctgcagccc gggggatcca ctagttctag 2940
 agcggccgcc accgcggtgg agctccagct tttgttccct ttagtgaggg ttaattgcgc 3000
 gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc 3060
 cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg gggcgcctaa tgagtgaagt 3120
 aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc 3180
 agctgcatta atgaatcggc caacgcgagg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt 3240
 ccgcttcctc gctcactgac tcgtcgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag 3300
 ctactcaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca 3360
 tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa gcccgcggtt ctggcggttt 3420
 tccataggct ccgccccctt gacgagcatc aaaaaaatcg acgctcaagt cagagggtgc 3480
 gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaaagctcc ctogtgcgct 3540
 ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg 3600
 tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggc atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca 3660
 agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact 3720
 atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta 3780
 acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgtacaga gttcttgaag tgggtggccta 3840
 actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct 3900
 tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcgggtggt 3960
 tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga 4020
 tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggta 4080
 tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tcctttttaa ttaaaaatga agttttaaat 4140
 caatctaaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta ccaatgctta atcagtgaag 4200
 cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgcctgactc ccgctcgtgt 4260
 agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag 4320
 acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc 4380
 gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag 4440
 ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca 4500
 tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa 4560

ES 2 637 617 T3

ggcaggttac atgatcccc atgttggtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga 4620
tcgttggtcag aagtaagttg gccgcagtggt tatcactcat gggttatggca gcactgcata 4680
attctcttac tgtcatgcc tccgtaagat gcttttctgt gactgggtgag tactcaacca 4740
agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg 4800
ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg 4860
ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcatgtaa cccactcgtg 4920
caccctaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gaaaaacag 4980
gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac 5040
tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggatata 5100
tatttgaatg tatttagaaa aataaataaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag 5160
tgccac 5166

<210> 4
<211> 7242
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 4

tgaccaagtc agcttggtcac tggccgtcgt ttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg 60
cgtaacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc gtaatagcga 120
agaggcccg accgatcgcc ctcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatgggaaat 180
tgtaaacgtt aatattttgt taatattttg ttaaaattcg cgtaaaattt ttgttaaatac 240
agctcatttt ttaaccaata ggccgaaatc ggcaaaatcc cttataaatc aaaagaatag 300
accgagatag gggtgagtggt tgttccagtt tggaacaaga gtccactatt aaagaacgtg 360
gactccaacg tcaaagggcg aaaaaccgtc tatcaggggc atggccact acgtgaacca 420
tcaccctaata caagtttttt ggggtcgagg tgccgtaaag cactaaatcg gaaccctaaa 480
gggatgcccc gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag aaaggaaggg 540
aagaaagcga aaggagcggg cgctagggcg ctggcaagtg tagcggtcac gctgcgcgta 600
accaccacac ccgccgcgct taatgcgccg ctacagggcg cgtcaggtgg cacttttcgg 660
ggaaatgtgc gcggaacccc tatttggtta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg 720
ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt 780
attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcg cttttgcct tcctgttttt 840
gctcaccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg 900
ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg ccccgaaaga 960
cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgat 1020

ES 2 637 617 T3

gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctacagaatga cttggttgag 1080
tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt 1140
gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga 1200
ccgaaggagc taaccgcttt ttgacacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt 1260
tggaaccggg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta 1320
gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaaac tacttactct agcttcccgg 1380
caacaattaa tagactggat ggaggcgat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc 1440
cttcgggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt 1500
atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgtg tcgtagtatt ctacacgacg 1560
gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg 1620
attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa 1680
cttcattttt aatttaaaag gatctagggt aagatccttt ttgataatct catgacaaa 1740
atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 1800
tcttcttgag atcctttttt tctgcccgtg atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 1860
ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 1920
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 1980
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgctaatacct gttaccagtg 2040
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 2100
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 2160
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc 2220
gaaggagaaa agggcgacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 2280
agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 2340
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 2400
agcaacggcg ccttttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt 2460
cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc 2520
gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc 2580
ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag ctggcacgac 2640
aggtttcccg actggaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact 2700
cattaggcac ccaggtttt acactttatg ctccggctc gtatgttgtg tggaattgtg 2760
agcggataac aatttcacac aggaacagc tatgaccatg attacgaatt tggccaagtc 2820
ggcctctaata acgactcact ataggagct cgtcgagcgg ccgctcgacg aattaattcc 2880
aatcccacaa aaatctgagc ttaacagcac agttgctcct ctacagagcag aatcgggtat 2940

ES 2 637 617 T3

tcaacaccct	catatcaact	actacgttgt	gtataacggt	ccacatgccg	gtatatacga	3000
tgactggggt	tgtacaaagg	cggcaacaaa	cggcgttccc	ggagttgcac	acaagaaatt	3060
tgccactatt	acagaggcaa	gagcagcagc	tgacgcgtac	acaacaagtc	agcaaacaga	3120
caggttgaac	ttcatcccca	aaggagaagc	tcaactcaag	cccaagagct	ttgctaaggc	3180
cctaacaagc	ccaccaaaag	aaaaagccca	ctggctcacg	ctaggaacca	aaaggccag	3240
cagtgatcca	gccccaaaag	agatctcctt	tgccccggag	attacaatgg	acgatttcct	3300
ctatctttac	gatctaggaa	ggaagttcga	aggtgaaggt	gacgacacta	tgttcaccac	3360
tgataatgag	aaggtttagc	tcttcaattt	cagaaagaat	gctgaccocac	agatggttag	3420
agaggcctac	gcagcaggtc	tcatcaagac	gatctaccog	agtaacaatc	tccaggagat	3480
caaatacctt	cccaagaagg	ttaaagatgc	agtcaaaaaga	ttcaggacta	attgcatcaa	3540
gaacacagag	aaagacatat	ttctcaagat	cagaagtact	attccagtat	ggacgattca	3600
aggcttgctt	cataaaccia	ggcaagtaat	agagattgga	gtctctaaaa	aggtagttcc	3660
tactgaatct	aaggccatgc	atggagtcta	agattcaaatt	cgaggatcta	acagaactcg	3720
ccgtgaagac	tggcgaacag	ttcatacaga	gtcttttacg	actcaatgac	aagaagaaaa	3780
tcttcgtaaa	catggtggag	cacgacactc	tgggtctactc	caaaaatgtc	aaagatacag	3840
tctcagaaga	ccaaagggct	attgagactt	ttcaacaaaag	gataatttcg	ggaaacctcc	3900
tcggattcca	ttgccagct	atctgtcact	tcacgaaaag	gacagtagaa	aaggaagggtg	3960
gctcctacaa	atgccatcat	tgcgataaag	gaaaggctat	cattcaagat	ctctctgccg	4020
acagtgggtcc	caaagatgga	ccccaccca	cgaggagcat	cgtggaaaaa	gaagacgttc	4080
caaccacgtc	ttcaaagcaa	gtggattgat	gtgacatctc	cactgacgta	agggatgacg	4140
cacaatccca	ctatccttcg	caagaccctt	cctctatata	aggaagttca	tttcatttgg	4200
agaggacacg	ctcgaggaat	tcgatatgaa	gggagcgact	ctcgttgctc	tcgccgccac	4260
aatcggaat	ttcttacaag	gatgggacaa	tgccaccatt	gctggagcta	tggtttatat	4320
caacaaaagac	ttgaatctac	caacctctgt	tcaaggctctt	gtcgttgcta	tgctcattgat	4380
cgggtgcaacg	gtcatcacga	cttgctcagg	accgatattc	gattggctcg	gcagacgccc	4440
catgctcatt	ttatcatcag	ttatgtattt	cgtctgcggt	ttgataatgt	tggtggtctcc	4500
caatgtctat	gttctgtgct	ttgctaggct	tcttaatggg	tttggtgccg	ggctcgcggt	4560
tacacttgct	cctgtttaca	tttctgaaac	cgctcctccg	gagatcagag	gacagttaaa	4620
tactctccct	cagtttcttg	gctctgggtg	aatgtttttg	tcatactgta	tggttttcac	4680
tatgtccctg	agtgactccc	ctagctggag	agccatgctc	ggtgtcctct	cgatcccttc	4740
tcttctttat	ttgtttctca	cgggtgtttta	tttgcccagag	tctcctcggt	ggctgggttag	4800

ES 2 637 617 T3

taaaggaaga	atggacgagg	ctaagcgagt	tcttcaacag	ttatgtggca	gagaagatgt	4860
taccgatgag	atggctttac	tagttgaagg	actagatata	ggaggagaaa	aaacaatgga	4920
agatctctta	gtaacttttg	aggatcatga	aggtgatgat	acacttgaaa	ccgttgatga	4980
ggatggacaa	atacggtttt	atggaaccca	cgagaatcaa	tcgtaccttg	ctagacctgt	5040
cccagaacaa	aatagctcac	ttgggctacg	ctctcgccac	ggaagcttag	caaaccaaag	5100
catgatcctt	aaagatccgc	tcgtcaatct	ttttggcagt	ctccacgaga	agatgccaga	5160
agcaggcgga	aacactcgga	gtgggatttt	ccctcatttc	ggaagcatgt	tcagtactac	5220
tgccgatgcg	cctcacggtg	aaccggctca	ttgggaaaaa	gacatagaga	gccattacaa	5280
caaagacaat	gatgactatg	cgactgatga	tggtgcggaa	caaaaactta	tctcggaaga	5340
agatttgctg	agccccctaa	tgctgcgcca	gaccacaagc	atggacaagg	atatgatccc	5400
acatcctaca	agtggaagca	ctttaagcat	gagacgacac	agtacgctta	tgcaaggcaa	5460
cggcgaaagt	agcatgggaa	ttggtggtgg	ttggcatatg	ggatatagat	acgaaaacga	5520
tgaatacaag	aggtattatc	ttaaagaaga	tggaagtgaa	tctcgccgtg	gctcgatcat	5580
ctctattccc	ggaggtcggg	atggtggagg	cagctacatt	cacgcttctg	cccttgtaag	5640
cagatctgtt	cttggtccta	aatcagttca	tggaatccgc	atggttcccc	cggagaaaat	5700
tgctgcctct	ggaccaactct	ggtctgctct	tcttgaacct	ggtgttaagc	gtgccttggt	5760
tggttggtgc	ggcattcaaa	tactgcagca	gttttcaggt	atcaatggag	ttctctacta	5820
cactcctcag	attctcgaac	gggctggcgt	agatattctt	ctttcgagcc	tcggactaag	5880
ttccatctct	gcgtcattcc	tcatcagcgg	tttaacaaca	ttactcatgc	tcccagccat	5940
tgctggtgcc	atgagactca	tggaatgtatc	cggaagaagg	tcattacttc	tctggacaat	6000
cccagttctc	attgtctcac	ttgtcgtcct	tgatcatcagc	gagctcatcc	acatcagcaa	6060
agtcgtgaac	gcagcaactct	ccacaggttg	tgctgtgctc	tacttctgct	tcttcgtgat	6120
gggttacggg	ccattccaaa	catcctctgt	tctgaaatct	tcccaacaag	cagaccgtgg	6180
tctctgcctc	gccatatgtg	ctatggtctt	ttggattgga	gacattattg	tcacgtactc	6240
acttcccggt	ctcctcagct	cgatcgaact	agttggagtt	ttcagcattt	acgctgcggg	6300
ttgcgttatc	tcatggatct	tcgtttacat	gaaagtcccg	gagactaaag	gcatgccttt	6360
ggaagttatc	acagactact	ttgcctttgg	agctcaagct	caagcttctg	ctccttctaa	6420
ggatatataa	atcaagctta	tcgataagct	tggaatcctc	agagtcctgc	tttaatgaga	6480
tatgcgagac	gcctatgatc	gcgatgatatt	tgctttcaat	tctgttgtgc	acgttgtaaa	6540
aaacctgagc	atgtgtagct	cagatcctta	ccgccgggtt	cggttcattc	taatgaatat	6600
atcacccggt	actatcgtat	ttttatgaat	aatattctcc	gttcaattta	ctgattgtac	6660
cctactactt	atatgtacaa	tattaaaaatg	aaaacaatat	attgtgctga	atagggttat	6720

ES 2 637 617 T3

agcgacatct atgatatagagc gccacaataa caaacaattg cgtttttatta ttacaaatcc	6780
aatttttaaaa aaagcggcag aaccggtcaa acctaaaaga ctgattacat aaatcttatt	6840
caaatttcaa aaggccccag gggctagtat ctacgacaca ccgagcggcg aactaataac	6900
gttactgaa gggaactccg gttccccgcc ggcgcgcatg ggtgagattc cttgaagttg	6960
agtattggcc gtccgctcta ccgaaagtta cgggcaccat tcaaccgggt ccagcacggc	7020
ggccgggtaa ccgacttgct gccccgagaa ttatgcagca tttttttggt gtatgtgggc	7080
cccaaatgaa gtgcaggtca aaccttgaca gtgacgacaa atcgttgggc ggtccaggg	7140
cgaattttgc gacaacatgt cgaggctcag caggacctgc aggcattgcaa gctagcttac	7200
tagtgatgca tattctatag tgtcacctaa atctgcggcc gc	7242

REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar el rendimiento de granos y mejorar el crecimiento de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas en comparación con el tipo salvaje por sobreexpresión de la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o una homóloga de la misma, en células vegetales isogénicas o transgénicas, en el que la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o su homóloga, exhibe una identidad de secuencia del 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con una secuencia de aminoácidos de proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica) de la *Arabidopsis thaliana* TMT1 de acuerdo con SEQ ID NO: 1.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica) comprende la secuencia de aminoácidos de la *Arabidopsis thaliana* TMT1 de acuerdo con SEQ ID NO:
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o la homóloga de la misma, se introduce en las células vegetales y se sobreexpresa en las células vegetales bajo el control de un promotor constitutivo o inducible.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las plantas son plantas cultivadas o útiles de la especie o géneros superiores de *Arabidopsis thaliana*, de *Brassica napus*, de *Brassica oleracea*, de *Brassica rapa*, de *Arachis hypogea*, de *Boechera stricta*, de *Bruguiera gymnorhiza*, de *Citrus paradisi*, de *Poncirus trifoliado*, de *Euphorbia esula*, de *Fragaria vesca*, de *Gossypium hirsutum*, de *Gossypium raimondii*, de *Glycine max*, de *Helianthus annuus*, de *Ipomoea nil*, de *Lycopersicon esculentum*, de *Lactuca perennis*, de *Lactuca salina*, de *Lactuca serriola*, de *Lactuca sativa*, de *Loto japonicus*, de *Malus domestica*, de *Nicotiana tabacum*, de *Oryza australiensis*, de *Oryza brachyanth*, de *Oryza punctata*, de *Oryza ridleyi*, de *Oryza rufipogon*, de *Oryza sativa*, de *Populus trichocarpa*, de *Poncirus trifoliata*, de *Prunus Persica*, de *Solanum tuberosum*, de *Sorghum bicolor*, de *Triticum aestivum*, de *Zea mays*, de *Saccharum officinarum*, de *Panicum virgatum*, de *Miscanthus*, de *Vitis vinifera* y de *Cannabis sativa*.
5. Uso de una planta transgénica que comprende células vegetales que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o una homóloga de la misma, en la que la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o su homóloga, exhibe una identidad de secuencia de 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con una secuencia de aminoácidos de proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica) de la *Arabidopsis thaliana* TMT1 de acuerdo con SEQ ID NO: 1, así como una secuencia de nucleótidos reguladora, operativamente ligada con la misma, para mejorar el rendimiento de grano y mejorar el crecimiento de las plantas en comparación con el tipo salvaje por sobreexpresión de la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o una homóloga de la misma, en las células vegetales de la planta transgénica.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica) presenta una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con una secuencia de aminoácidos de proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica) de la *Arabidopsis thaliana* TMT1 de acuerdo con SEQ ID NO: 1.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, en el que la planta se selecciona de entre *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Arachis hypogea*, *Boechera stricta*, *Bruguiera gymnorhiza*, *Citrus paradisi*, *Poncirus trifoliado*, *Euphorbia esula*, *Fragaria vesca*, *Gossypium hirsutum*, *Gossypium raimondii*, *Glycine max*, *Helianthus annuus*, *Ipomoea nil*, *Lycopersicon esculentum*, *Lactuca perennis*, *Lactuca salina*, *Lactuca serriola*, *Lactuca sativa*, *Loto japonicus*, *Malus domestica*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza australiensis*, *Oryza brachyanth*, *Oryza punctata*, *Oryza ridleyi*, *Oryza rufipogon*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Poncirus trifoliata*, *Prunus Persica*, *Solanum tuberosum*, *Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Saccharum officinarum*, *Panicum virgatum*, *Miscanthus*, *Vitis vinifera* y *Cannabis sativa*.
8. Uso de una planta transgénica que comprende células vegetales que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o una homóloga de la misma, en la que la proteína TMT (transportadora de monosacáridos tonoplástica), o su homóloga, exhibe una identidad de secuencia de 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con una secuencia de aminoácidos de proteína TMT de (transportadora de monosacáridos tonoplástica) de la *Arabidopsis thaliana* TMT1 de acuerdo con SEQ ID NO: 1, así como una secuencia de nucleótidos reguladora, enlazada operativamente con la misma, para el cultivo o producción de plantas cultivadas o plantas útiles, o biomasa, aceites o proteínas producidas a partir de la misma.

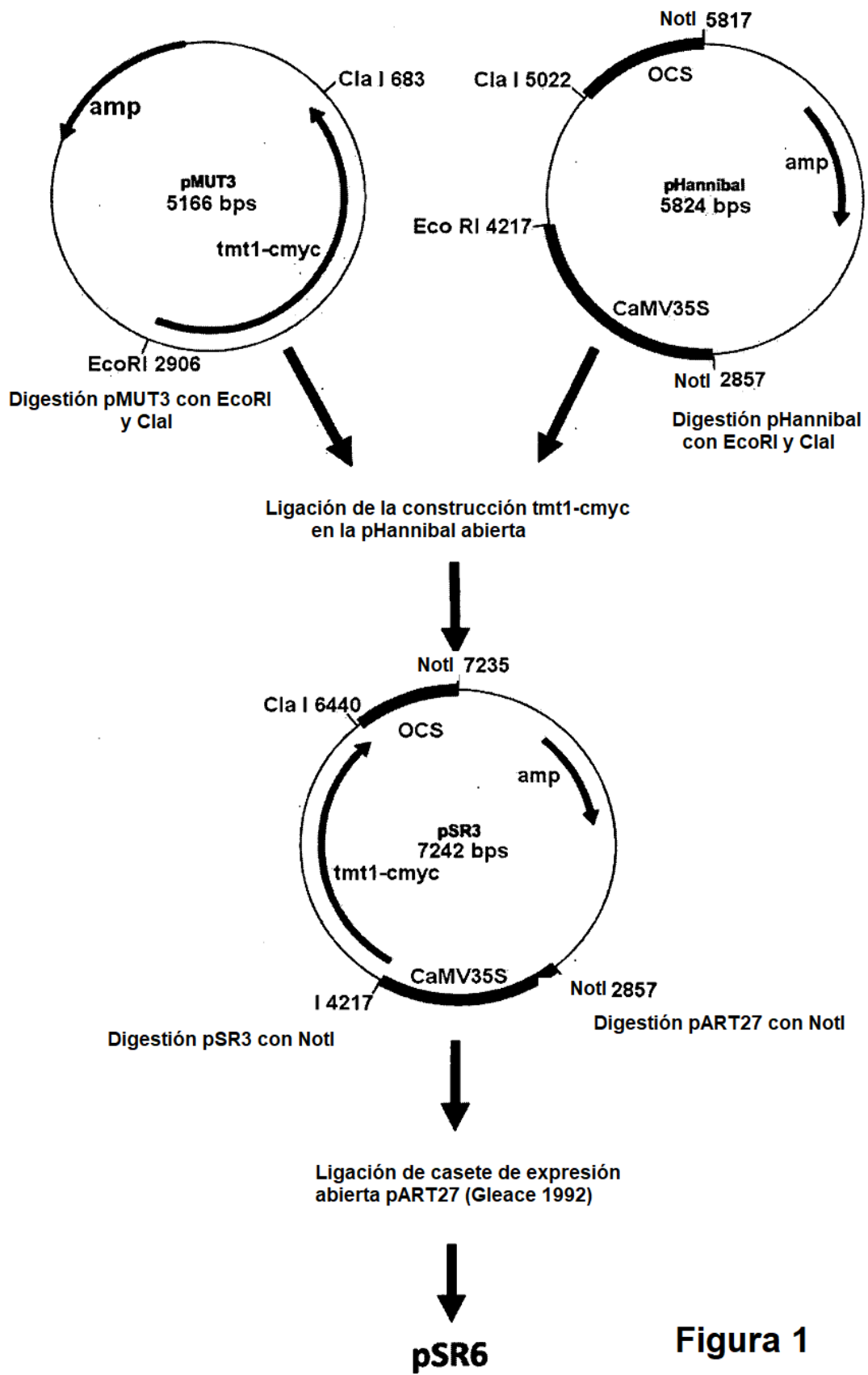


Figura 1

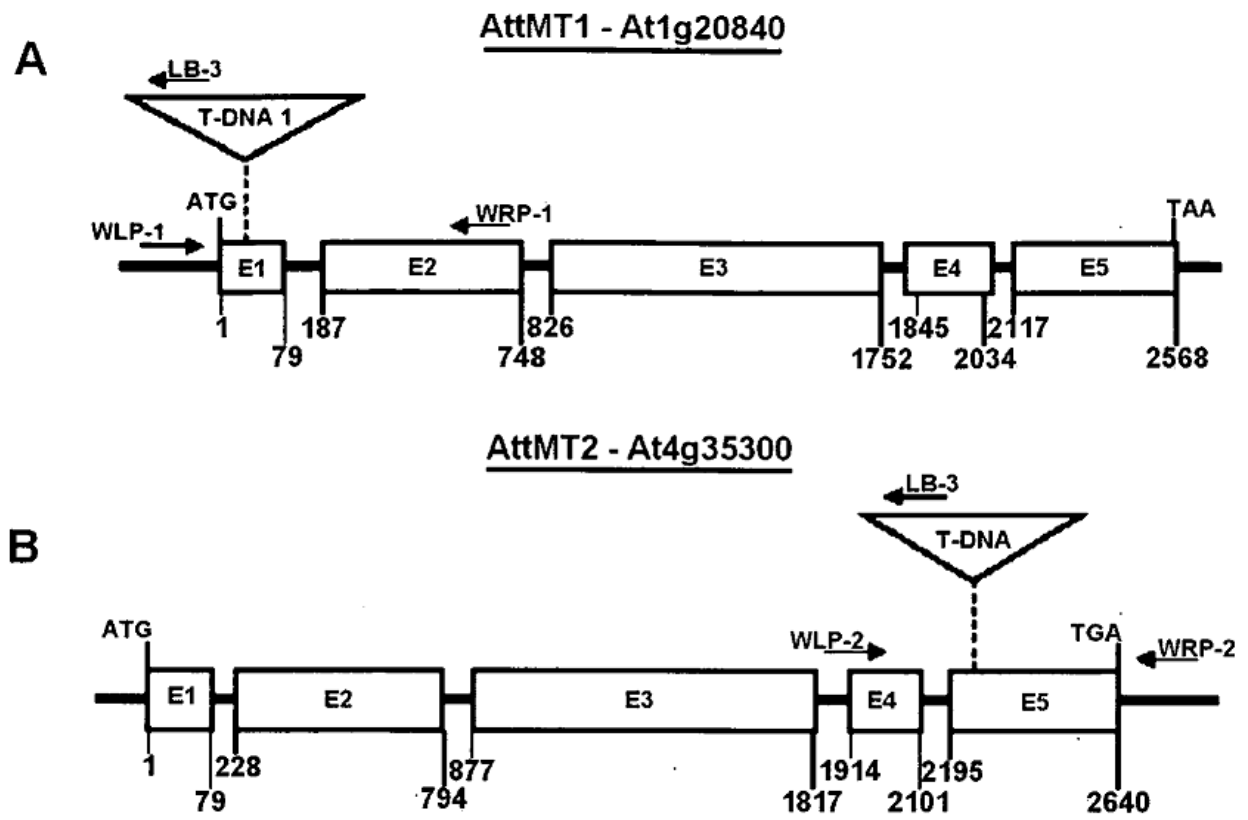


Figura 2

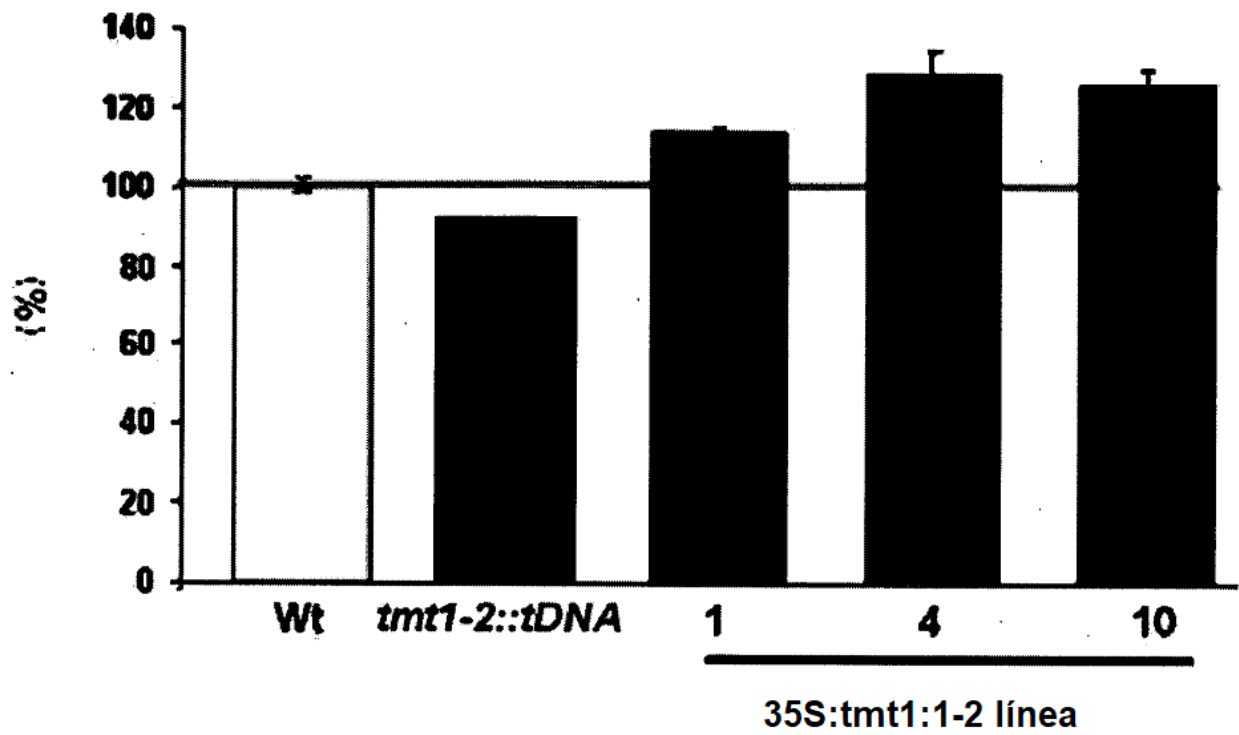


Figura 3

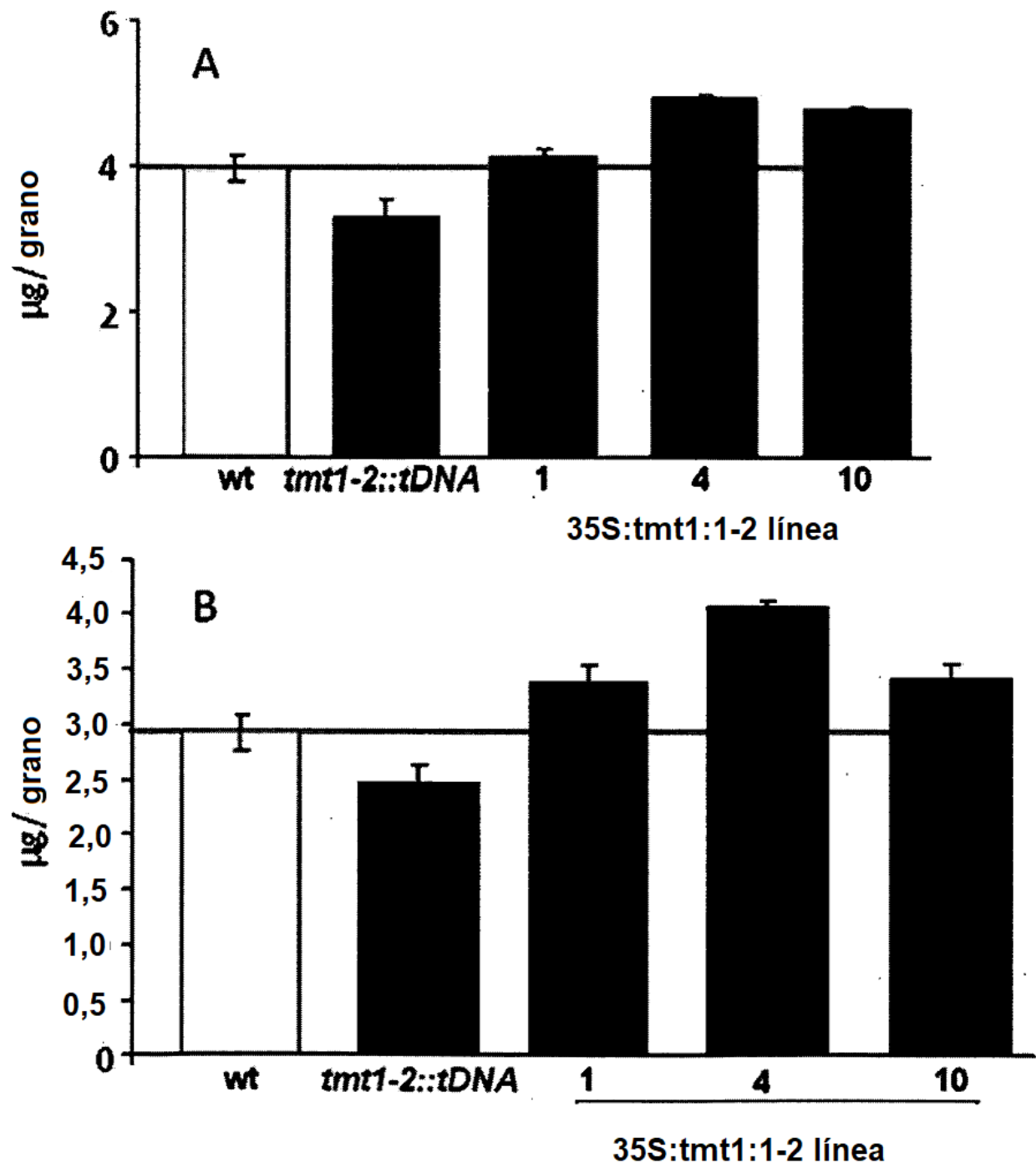


Figura 4

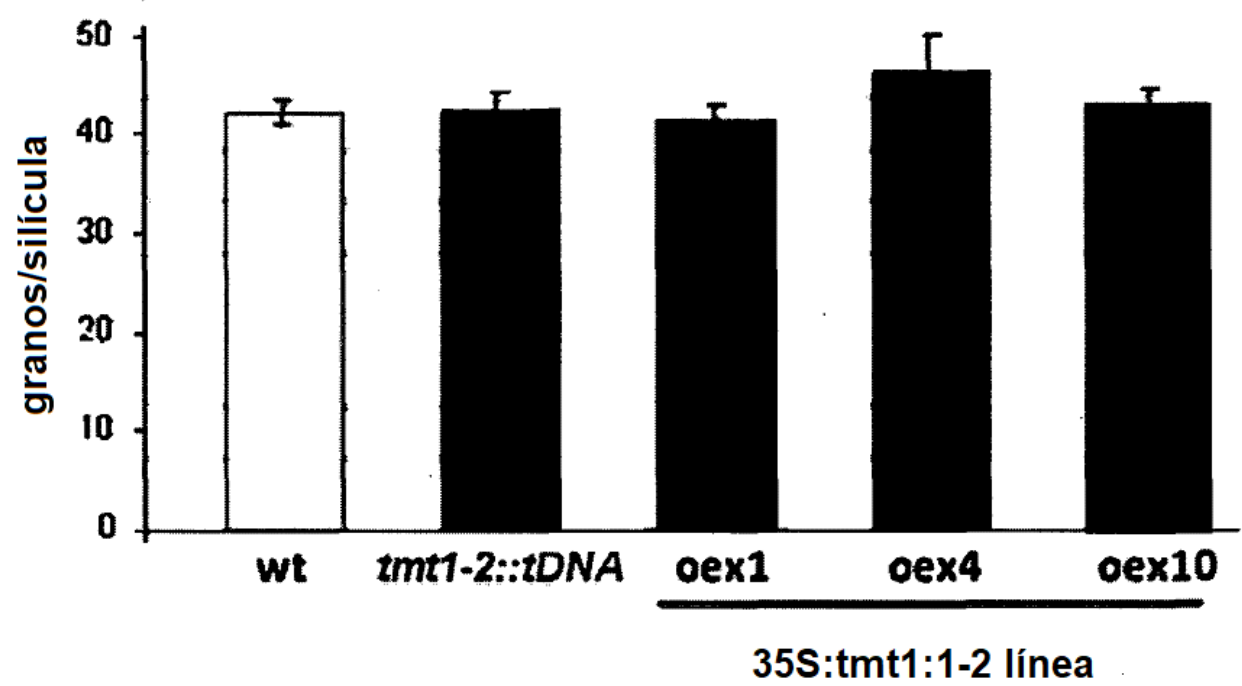


Figura 5

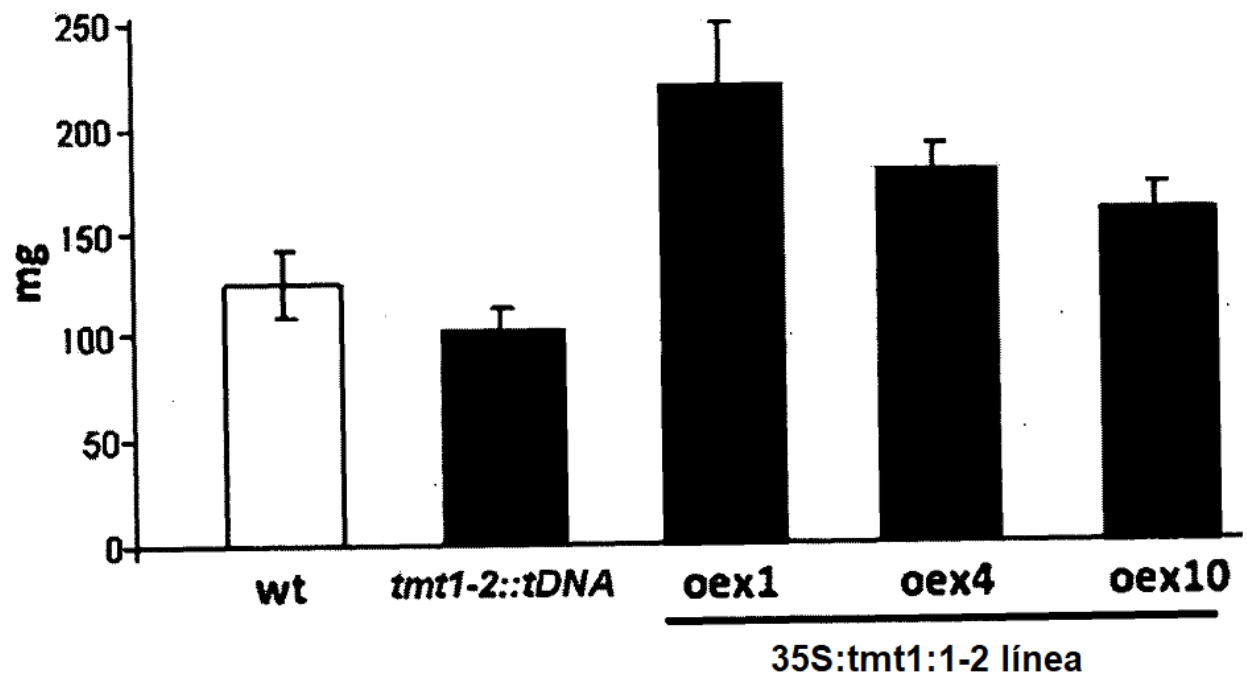


Figura 6

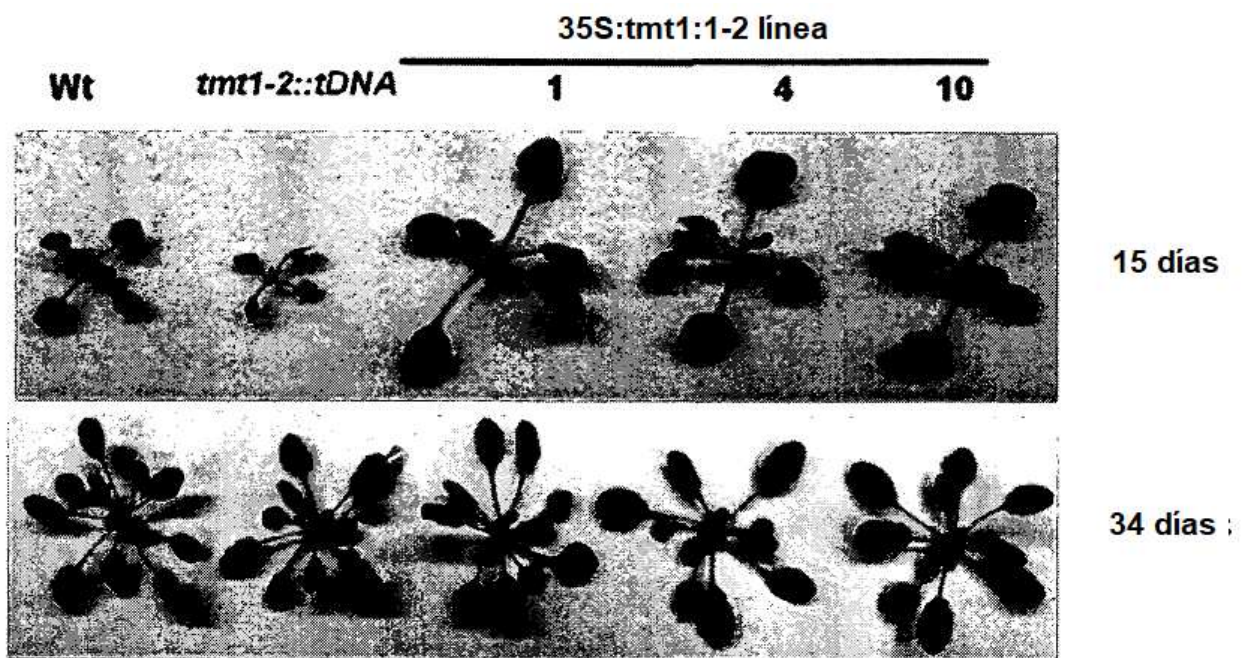


Figura 7