

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 499**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/00** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2014 PCT/EP2014/066427**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2015 WO15022192**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2014 E 14749749 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 3033354**

54 Título: **Métodos de modulación del tamaño de la semilla y de los órganos de plantas**

30 Prioridad:

**14.08.2013 WO PCT/CN2013/081457**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.03.2019**

73 Titular/es:

**INSTITUTE OF GENETICS AND  
DEVELOPMENTAL BIOLOGY (50.0%)  
Chinese Academy of Sciences  
Beijing 100101, CN y  
PLANT BIOSCIENCE LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LI, YUNHAI;  
XIA, TIAN;  
LI, NA;  
DUMENIL, JACK y  
BEVAN, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 706 499 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

Métodos de modulación del tamaño de la semilla y de los órganos de plantas

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a métodos de alteración del tamaño de las semillas y de los órganos de plantas, por ejemplo para mejorar el rendimiento vegetal.

10 **Antecedentes de la invención**

El tamaño de las semillas y de los órganos es un carácter agrónomamente y ecológicamente importante que está bajo control genético (Alonso-Blanco, C. *PNAS USA* 96, 4.710-7 (1999); Song, X.J. *Nat. Genet.* 39, 623-30 (2007); Weiss, J. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 513-25 (2005); Dinneny, J.R. *Development* 131, 1.101-10 (2004); Disch, S. *Curr. Biol.* 16, 272-9 (2006); *Science* 289, 85-8 (2000); Horiguchi, G. *Plant J.* 43, 68-78 (2005); Hu, Y. *Plant J.* 47, 1-9 (2006); Hu, Y. *Plant Cell* 15, 1951-61 (2003); Krizek, B.A. *Dev. Genet* 25, 224-36 (1999); Mizukami, Y. *PNAS USA* 97, 942-7 (2000); Nath, U. *Science* 299, 1.404-7 (2003); Ohno, C.K. *Development* 131, 1.111-22 (2004); Szecsi, J. *Embo J.* 25, 3912-20 (2006); White, D.W. *PNAS USA* 103, 13.238-43 (2006); Horvath, B.M. *Embo J.* 25, 4.909-20 (2006); Garcia, D. *Plant Cell* 17, 52-60 (2005). El tamaño final de las semillas y los órganos es constante en una especie dada, mientras que la variación de tamaño de semilla y órgano interespecie es notablemente grande, sugiriendo que las plantas tienen mecanismos reguladores que controlan el crecimiento de semilla y órgano de una manera coordinada y oportuna. A pesar de la importancia del tamaño de semilla y órgano, sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos moleculares y genéticos que controlan el tamaño final de órgano y semilla en las plantas.

La regulación genética del tamaño de semilla se ha investigado en plantas, incluyendo en tomate, soja, maíz y arroz, usando mapeado de locus de carácter cuantitativo (QTL). Hasta la fecha, en la bibliografía publicada, se han identificado dos genes (Song, X.J. *Nat. Genet* 39, 623-30 (2007); Fan, C. *Theor. Appl. Genet.* 112, 1.164-1.171 (2006)), subyacentes a dos QTL principales para el tamaño de grano de arroz, aunque los mecanismos moleculares de estos genes siguen siendo elucidados. En *Arabidopsis*, se han mapeado once loci que afectan el peso y/o longitud de la semilla en cruces entre las accesiones Ler y Cvi {Alonso-Blanco, 1999 supra}, pero no se han identificado los correspondientes genes. Estudios recientes han revelado que AP2 y ARF2 están implicadas en el control del tamaño de semilla. Desafortunadamente, sin embargo, los mutantes ap2 y arf2 tienen menor fertilidad que el tipo silvestre (Schruff, M.C. *Development* 137, 251-261 (2006); Ohto, M.A. *PNAS USA* 102, 3.123-3.128 (2005); Jofuku, K.D. *PNAS USA* 102, 3.117-3.122 (2005)). Además, los estudios que usan plantas mutantes han identificado varios reguladores positivos y negativos que influyen en el tamaño de órgano actuando sobre la proliferación o expansión celular {Krizek, B.A. *Dev. Genet* 25, 224-36 (1999); Mizukami, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 942-7 (2000); Nath, U. *Science* 299, 1.404-7 (2003); Ohno, C.K. *Development* 131, 1.111-22 (2004); Szecsi, J. *Embo J.* 25, 3.912-20 (2006); White, D.W. *PNAS USA* 103, 13.238-43 (2006); Horvath, B.M. *Embo J.* 25, 4.909-20 (2006); Garcia, D. *Plant Cell* 17, 52-60 (2005). Horiguchi, G. *Plant J.* 43, 68-78 (2005); Hu, Y. *Plant J.* 47, 1-9 (2006) Dinneny, J.R. *Development* 131, 1.101-10 (2004)).

Se ha sabido que varios factores implicados en las actividades reguladas por ubiquitina influyen en el tamaño de semilla. Un factor de restricción del crecimiento, DA1, es un receptor de ubiquitina y contiene dos motivos de interacción de ubiquitina (UIM) que se unen a ubiquitina *in vitro*, y el mutante *da1-1* forma semillas grandes al influir en los integumentos maternos de los óvulos (Li y col., 2008). Las mutaciones en un potenciador de *da1-1* (*EOD1*), el cual codifica la E3 ubiquitina ligasa BIG BROTHER (BB) (Disch y col., 2006; Li y col., 2008), aumentan sinérgicamente el fenotipo de tamaño de semilla del *da1-1*, indicando que *DA1* actúa sinérgicamente con *EOD1/BB* para controlar el tamaño de semilla. En el arroz, un locus de carácter cuantitativo (QTL) para el *ANCHO* y *PESO DE GRANO2* (*GW2*), el cual codifica una E3 ubiquitina ligasa, controla el tamaño de grano restringiendo la división celular (Song y col., 2007). Se ha identificado un homólogo de *GW2* en trigo (Ta-*GW2*; Bednarek y col 2012). Se requiere una proteína desconocida codificada por *qSW5/GW5* de arroz para limitar el tamaño de grano en arroz (Shomura y col., 2008; Weng y col., 2008). *GW5* interactúa físicamente con poliubiquitina en un ensayo de dos híbridos de levadura, que sugiere que *GW5* puede estar implicado en la ruta de la ubiquitina-proteasa (Weng y col., 2008). Sin embargo, no está claro si estos dos factores actúan o no en tejidos maternos y/o cigóticos en arroz.

La identificación de más factores que controlan el tamaño final de tanto las semillas como los órganos no solamente adelantará el entendimiento de los mecanismos del control de tamaño en las plantas, sino que también puede tener aplicaciones sustanciales prácticas, por ejemplo, en el mejoramiento del rendimiento del cultivo y la biomasa vegetal para la generación de biocombustible.

60 **Sumario de la invención**

Los presentes inventores han identificado una E3 ubiquitina ligasa vegetal (denominada *DA2*) que regula el tamaño final de semillas y órganos restringiendo la proliferación celular en los integumentos de las semillas en desarrollo. Se encontró inesperadamente que *DA2* actúa sinérgicamente con *DA1* e independientemente de *EOD1* para controlar

el tamaño de semilla y órgano. Por lo tanto, la manipulación de DA2 y DA1 o DA1 y EOD1, puede ser útil en el mejoramiento del rendimiento vegetal.

En el presente documento la invención es como se define por las reivindicaciones.

5 En el presente documento se describe un método de incremento de la masa de semillas por unidad de área, crecimiento y/o biomasa de una planta que comprende;  
reducir la expresión o actividad de un polipéptido DA2 en células de la planta,  
en el que la planta es deficiente en la actividad o expresión de DA1.

10 En el presente documento también se describe un método de incremento de la masa de semillas por unidad de área, crecimiento y/o biomasa de una planta que comprende;  
reducir la expresión o actividad de un polipéptido de DA2 en células de la planta,  
en el que la planta es deficiente en la expresión o actividad de EOD1.

15 En el presente documento también se describe un método de incremento de la masa de semillas por unidad de área, crecimiento y/o biomasa de una planta que comprende;  
reducir la expresión o actividad de un polipéptido DA2 en células de dicha planta,  
en el que la planta es deficiente en la expresión o actividad de DA1 y EOD1.

20 En el presente documento también se describe un método de incremento de la masa de semillas por unidad de área, crecimiento y/o biomasa de una planta que comprende;  
reducir o abolir la expresión o actividad de un polipéptido DA2 en células de dicha planta, y;

25 i) reducir o abolir la expresión o actividad de un polipéptido DA1 en dichas células,  
ii) reducir o abolir la expresión o actividad de EOD1 en dichas células, y/o  
iii) expresar un polipéptido DA dominante negativo en dichas células.

30 En el presente documento también se describe un método de producción de una planta con una masa incrementada de semillas por unidad de área, crecimiento y/o biomasa que comprende:

35 proporcionar una célula vegetal que es deficiente en la expresión o actividad de DA1, o tanto DA1 como EOD1, incorporar un ácido nucleico heterólogo que abole o suprime la expresión o actividad de un polipéptido DA2 en la célula vegetal por medio de la transformación, y;  
regenerar la planta de una o más células transformadas.

### Breve descripción de dibujos

40 La Figura muestra el tamaño de semilla y órgano en el mutante *da2-1*. 1A muestra el área proyectiva de semillas de Col-0, *da2-1* y *35S::DA2N<sup>o</sup>1*. Las semillas se clasificaron en tres grupo (>0,13, 0,12-0,13 y <0,12 mm<sup>2</sup>). Los valores para cada grupo se expresan como un porcentaje del número total de semilla analizado. 1B muestra el número de semilla por silicua para Col-0, *da2-1* y *35S::DA2N<sup>o</sup>1*. Las silicuas (desde la cuarta silicua hasta la décima silicua) sobre el tallo principal se usaron para medir el número de semillas por silicua. 1C muestra el peso de semilla por planta para Col-0, *da2-1* y *35S::DA2N<sup>o</sup>1*. 1D muestra el número de semilla por planta para Col-0, *da2-1* y *35S::DA2N<sup>o</sup>1*. 1E muestra la altura de las plantas Col-0, *da2-1* y *35S::DA2N<sup>o</sup>1*. Los valores (B-E) se dan como media±SE en relación con el valor del tipo silvestre, fijado a 100 %. \*\*, *P*<0,01 y \*, *P*<0,05 en comparación con el tipo silvestre (prueba de t de Student). Barras: F, 1 cm; G, 1 mm.

50 La Figura 2 muestra plantas de 4 días (F) de Col-0 (izquierda), *da2-1* (centro) y *35S::DA2N<sup>o</sup>1* (derecha) y flores (G) de Col-0 (parte superior), *da2-1* (centro) y *35S::DA2N<sup>o</sup>1* (parte inferior).

55 La Figura 3 muestra que *DA1* y *DA2* actúan sinérgicamente para controlar el tamaño de semilla. 3A muestra semillas secas de Col-0, *da1-1*, *da2-1* y *da1-1 da2-1*. 3B muestra plantones de 10 días de Col-0, *da2-1 da1-1*, y *da1-1 da2-1* (de izquierda a derecha). 3C muestra el peso de semilla de Col-0, *da1-1*, *da2-1* y *da1-1 da2-1*. 3D muestra el peso de semilla de Col-0, *da1-ko1*, *da2-1* y *da1-ko1 da2-1*. Los valores se dan como media±SE en relación los valores del tipo silvestre, fijados a 100 %. \*\*, *P*<0,01 y \*, *P*<0,05 en comparación con el tipo silvestre (prueba de t de Student). Barras: A, 0,1 mm; B, 1 m.

60 La Figura 4 muestra que *DA1* y *DA2* actúan sinérgicamente para controlar el tamaño de semilla. El panel superior izquierda muestra el área de cotiledón de plantones de 10 días de Col-0, *da1-1*, *da2-1* y *da1-1 da2-1*. El panel superior derecho muestra el área de cotiledón de plantones de 10 días de Col-0, *da1-ko1*, *da2-1* y *da1-ko1 da2-1*. El panel inferior izquierdo muestra el área promedio de las células de empalizada en cotiledones de embriones de Col-0, *da1-1*, *da2-1* y *da1-1 da2-1*. El panel inferior derecha muestra el área proyectiva de semillas de Col-0, *da1-1*, *da1-1 da2-1*, *da1-ko1 da2-1*, *da1-ko1 dar1-1* y *da1-ko1 dar1-1 da2-1*. Los valores se dan como media±SE en relación con los valores de tipo silvestre, fijados a 100 %. \*\*, *P*<0,01 y \*, *P*<0,05 en comparación con el tipo silvestre (prueba de t de Student). Barras: A, 0,1 mm; B, 1 m.

La Figura 5 muestra que *DA1* y *DA2* actúan sinérgicamente para controlar la proliferación celular en integumentos maternos de semillas en desarrollo. (5A-5D) muestran óvulos maduros de Col-0, *da1-1*, *da2-1* y *da1-1 da2-1* respectivamente. La mutación *da2-1* aumenta sinérgicamente el tamaño del óvulo de *da1-1*.

5 La Figura 6 muestra (panel izquierdo) el área proyectiva de semillas de Col-0xCol-0 (c/c) F1, *da2-1*x*da2-1* (d2/d2) F1, Col-0x*da2-1* (c/d2) F1, y *da2-1*xCol-0 (d2/c) F1 y (panel del medio) el área proyectiva de semillas de Col-0xCol-0 (c/c) F1, *da2-1*x *da1-ko1 da2-1* (dd/dd) F1, Col-0x*da1-ko1 da2-1* (c/dd) F1, y *da1-ko1 da2-1*xCol-0 (dd/c) F1. El panel derecho muestra el área de semilla proyectiva después de la polinización de plantas *da1-ko1/+ da2-1/+* con polen de mutante doble *da1-ko1 da2-1* que conduce al desarrollo de embriones de *da1-ko1/+ da2-1/+* (a), *da1-ko1/+ da2-1da2-1* (b), *da1-ko1/da1-ko1 da2-1/+* (c) y *da1-ko1 da2-1* (d) embriones en tegumentos de *da1-ko1/+ da2-1/+*. Se midió el área proyectiva de las semillas individuales de plantas *da1-ko1/+da2-1/+* fertilizadas con polen de mutante doble *da1-ko1 da2-1*. Estas semillas se sometieron además a genotipado para mutaciones *da1-ko1* y *da2-1*. Los datos muestran que las mutaciones *da1-ko1* y *da2-1* no están asociadas con la variación en el tamaño de estas semillas ( $P > 0,05$ , prueba de t de Student). Los valores se dan como media±SE en relación con los respectivos valores de tipo silvestre, fijados a 100 %. \*\*,  $P < 0,01$  y \*,  $P < 0,05$  en comparación con el tipo silvestre (prueba de t de Student). Barras: A-D, 0,5 mm.

20 La Figura 7 muestra (panel izquierdo) el área proyectiva de óvulos maduros de Col-0, *da1-1*, *da2-1* y *da1-1 da2-1*; (panel del medio) el número de células en los integumentos exteriores de semillas de Col-0, *da1-1*, *da2-1* y *da1-1 da2-1* a 6 DDP y 8 DDP; y (panel derecho) la longitud promedio de las células en los integumentos exteriores de semillas de Col-0, *da1-1*, *da2-1* y *da1-1 da2-1* en 6 DDP y 8 DDP calculada a partir de la longitud del integumento exterior y el número de células para las semillas individuales.

25 La Figura 8A muestra la estructura del gen *DA2*. El codón de inicio (ATG) y el codón de parada (TAA) están indicados. Los recuadros rellenos indican la secuencia codificante, los recuadros en blanco indican las regiones no traducidas 5' y 3', y las líneas entre los recuadros indican los intrones. Se muestra el sitio de inserción de ADN-T (*da2-1*) en el gen *DA2*. La Figura 8B muestra que la proteína *DA2* contiene un dominio RING previsto.

30 La Figura 9 muestra la actividad E3 ubiquitina ligasa de *DA2*. Se analizaron la actividad de E3 ubiquitina ligasa en las proteínas de fusión MBP-*DA2* y *DA2* mutada (MBP-*DA2*C59S y MBP-*DA2*N91L) en presencia de E1, E2 y His-ubiquitina (His-Ub). Las proteínas ubiquitinadas se detectaron por inmunotransferencia (IB) con anticuerpo anti-His (Anti-His) y anticuerpo anti-MBP (Anti-MBP), respectivamente. La flecha inferior indica proteínas MBP-*DA2*, y la flecha superior muestra proteínas MBP-*DA2* ubiquitinadas.

35 La Figura 10 muestra el área proyectiva de semillas de Col-0, *da2-1*, *COMN*<sup>6</sup>, *COMN*<sup>8</sup>, y *COMN*<sup>10</sup> (panel superior), en las que COM es *da2-1* transformado con la secuencia codificante de *DA2* conducida por su propio promotor; área de pétalo de plantas Col-0, *da2-1*, *COMN*<sup>6</sup>, *COMN*<sup>8</sup>, y *COMN*<sup>10</sup> (panel del medio) y análisis por RT-PCR a tiempo real cuantitativa de la expresión del gen *DA2* en plantones de Col-0, *da2-1*, *COMN*<sup>6</sup>, *COMN*<sup>8</sup>, y *COMN*<sup>10</sup> (panel inferior). Los valores (D y E) se dan como media±SE en relación con los valores de *da2-1*, fijados a 100 %. \*\*,  $P < 0,01$  en comparación con el mutante *da2-1* (prueba de t de Student).

40 La Figura 11 muestra patrones de expresión de *DA2*. 11A muestra análisis por RT-PCR a tiempo real cuantitativa de la expresión del gen *DA2*. El ARN total se aisló de raíces (R), tallos (T), hojas (H), plantones (PI) e inflorescencia (In). 11B-11N muestran la actividad de expresión de *DA2* monitorizada por la expresión del transgen *pDA2:GUS*. Se observaron cuatro líneas de expresión de *GUS*, y todas mostraron un patrón similar, aunque diferían ligeramente en la intensidad de la tinción. El análisis de histoquímica de la actividad de *GUS* en un plantón de 4 días (11B), un plantón de 10 días (11C), una inflorescencia floral (11D), los pétalos en desarrollo (11E-11G), los estambres en desarrollo (11H y 11I), los carpelos en desarrollo (11J-11L), y los óvulos en desarrollo (11M y 11N). Barras: B-D, 1 mm; E-N, 0,1 mm.

50 La Figura 12 muestra que *DA1* interactúa directamente con *DA2 in vitro*. GST-*DA1*, GST-*DA1*R358K, GST-*DA1*-UIM, GST-*DA1*-LIM, GST-*DA1*-LIM+C y GST-*DA1*-C se sometieron a *pull down* (PD) por MBP-*DA2* inmovilizada sobre resina de amilosa y se analizó por inmunotransferencia (IB) usando un anticuerpo anti-GST.

55 La Figura 13 muestra un diagrama esquemático de *DA1* y sus derivados que contienen dominios de proteína específicos. La proteína *DA1* prevista contiene dos motivos UIM, un dominio LIM único y la región C-terminal.

60 La Figura 14 muestra que *DA1* interactúa con *DA2 in vivo*. Las hojas de *Nicotiana benthamiana* se transformaron por inyección de células de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 que portaban plásmidos 35S:*Myc-DA1* y 35S:*GFP-DA2*. Las proteínas totales se inmunoprecipitaron con GFP-TrapA, y se sondó la inmunotransferencia con anticuerpos anti-GFP y anti-Myc, respectivamente. *Myc-DA1* se detectó en el complejo GFP-*DA2* inmunoprecipitado, indicando que hay una asociación física entre *DA1* y *DA2 in planta*.

65 La Figura 15 muestra que la manifestación de los mutante *da2-1* incrementó el tamaño de órgano. 15A muestra la longitud de pétalo (LP), el ancho de pétalo (ANP), el área de pétalo (AP), el área de sépalo (AS), la longitud de carpelo (LC), la longitud de estambre largo (LEL), y la longitud de estambre corto (LEC) de plantas Col-0, *da2-1* y

35S:DA2N<sup>01</sup>. 15B muestra el área de la quinta hoja de plantas Col-0, da2-1 y 35S:DA2N<sup>01</sup>. 15C muestra el peso de las flores de Col-0, da2-1 y 35S:DA2N<sup>01</sup>. 15D muestra el tamaño de las células epidérmicas adaxiales en la región de ancho máximo de pétalos de Col-0 y da2-1. 15E muestra el tamaño de las células de empalizada en las quintas hojas de Col-0 y da2-1. Las flores abiertas (fase 14) se usaron para medir el tamaño de los pétalos (15A), peso de la flor (C) y el tamaño de las células epidérmicas (15D). Los valores (A-E) se dan como media±SE en relación con los respectivos valores del tipo silvestre, fijados a 100 %. \*\*, P<0,01 en comparación con el tipo silvestre (prueba de t de Student).

La Figura 16 muestra que DA1 y DA2 actúan sinérgicamente para controlar el tamaño de semilla. 16D muestra el área de pétalo de flores de Col-0, da1-ko1, da2-1 y da1-ko1da2-1. 16E muestra el tamaño de células epidérmicas adaxiales en la región de ancho máximo de pétalos de Col-0, da1-ko1, da2-1 y da1-ko1da2-1. 16F muestra el peso de semilla de Col-0, eod1-2, da2-1 y eod1-2 da2-1. 16G muestra el área de pétalo de Col-0, eod1-2, da2-1 y eod1-2 da2-1. Las flores abiertas (fase 14) se usaron para medir el tamaño de los pétalos (16D y 16G) y el tamaño de las células epidérmicas (16E). Los valores (16D-G) se dan como media±SE en relación con los respectivos valores del tipo silvestre, fijados a 100 %. \*\*, P<0,01 y \*, P<0,05 en comparación con el tipo silvestre (prueba de t de Student). Barra: 0,1 mm.

La Figura 17 muestra que la sobreexpresión de DA2 restringe el crecimiento de órgano. 17A muestra que el área de pétalo de Col-0, 35S:DA2N<sup>02</sup> y 35S:DA2N<sup>04</sup>. 17B muestra los niveles de expresión de DA2 en plántones de Col-0, 35S:DA2N<sup>02</sup> y 35S:DA2N<sup>04</sup>. Los valores (A y B) se dan como media±SE en relación con los valores de Col-0, fijados a 100 %. \*\*, P<0,01 en comparación con el tipo silvestre (prueba de t de Student).

La Figura 18 muestra que la sobreexpresión de DA2L restringe el crecimiento de órgano. 18A muestra plantas de 20 días de Col-0, 35S:DA2LN<sup>01</sup>, 35S:DA2LN<sup>03</sup>, 35S:DA2LN<sup>04</sup>, 35S:DA2LN<sup>05</sup>, y 35S:DA2LN<sup>06</sup>. 18B muestra plantas de 30 días de Col-0, 35S:DA2LN<sup>01</sup>, 35S:DA2LN<sup>03</sup>, 35S:DA2LN<sup>04</sup>, 35S:DA2LN<sup>05</sup>, y 35S:DA2LN<sup>06</sup>. 18C muestra el análisis por RT-PCR de la expresión de DA2L en plántones de Col-0, 35S:DA2LN<sup>01</sup>, 35S:DA2LN<sup>03</sup>, 35S:DA2LN<sup>04</sup>, 35S:DA2LN<sup>05</sup>, y 35S:DA2LN<sup>06</sup>. RT-PCR se realizó sobre ADNc de la primera cadena preparado a partir de plántones de 2 semanas. ADNc se estandarizó en referencia a un patrón de ACTIN2. Barras: A, 1 cm, B, 1 cm.

La Figura 19 muestra que la sobreexpresión de GW2 restringe el crecimiento de semilla y órgano. 19A muestra plantas de 30 días de Col-0, 35S:GW2N<sup>01</sup>, 35S:GW2N<sup>02</sup>, 35S:GW2N<sup>03</sup>, 35S:GW2N<sup>06</sup> y 35S:GW2LN<sup>07</sup>. 19B muestra el área proyectiva de semillas de Col-0, 35S:GW2N<sup>01</sup>, 35S:GW2N<sup>02</sup>, 35S:GW2N<sup>03</sup>, 35S:GW2N<sup>06</sup> y 35S:GW2LN<sup>07</sup>. 19C muestra el análisis por RT-PCR a tiempo real cuantitativa de la expresión del gen GW2 en plántones de Col-0, 35S:GW2N<sup>01</sup>, 35S:GW2N<sup>02</sup>, 35S:GW2N<sup>03</sup>, 35S:GW2N<sup>06</sup> y 35S:GW2LN<sup>07</sup>. Los valores (B) se dan como media±SE en relación con los valores de Col-0, fijados a 100 %. \*\*, P<0,01, en comparación con el tipo silvestre (prueba de t de Student). Barra: A, 1 cm.

#### Descripción detallada de las realizaciones de la invención

Esta invención se refiere a métodos de alteración de caracteres vegetales que afectan al rendimiento, tales como el tamaño de semilla y órgano, alterando la expresión o actividad de la E3 ubiquitina ligasa DA2 vegetal en combinación con las alteraciones en la expresión o actividad de DA1 o DA1 y EOD1. Preferentemente, se altera la expresión o actividad de DA2 y DA1 en la planta.

La expresión o actividad de expresión de DA2 se puede alterar antes, al mismo tiempo, o después de la alteración de la expresión o actividad de DA1 o DA1 y EOD1. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la expresión o actividad de un polipéptido DA2 se puede alterar en una o más células vegetales las cuales ya tienen uno de; expresión o actividad de DA1 alterada, expresión o actividad de EOD1 alterada, o expresión o actividad de DA1 y EOD1 alterada.

En el presente documento se proporcionan métodos de incremento del rendimiento de la planta, por ejemplo, incrementando el tamaño de órgano o semilla, que comprende proporcionar una planta que es deficiente en la expresión o actividad de DA1 o DA1 y EOD1 y reducir la expresión de DA2 en una o más células de la planta. En otras realizaciones, la expresión o actividad de DA1 o DA1 y EOD1 se puede reducir en una o más células vegetales que tienen expresión o actividad reducida de un polipéptido DA2.

Otros métodos pueden comprender reducir la expresión de DA2 en una o más células de la planta y reducir la expresión o actividad de DA1 o tanto DA1 como EOD1 en una o más células.

En el presente documento también se proporcionan métodos de producción de una planta con masa incrementada de semillas por unidad de área, crecimiento y/o biomasa en relación con la planta de tipo silvestre que comprenden;

- (a) incorporar en una célula vegetal por medios de transformación
  - (i) un primer ácido nucleico heterólogo que reduce la expresión de un polipéptido DA2,

- (ii) un segundo ácido nucleico heterólogo que reduce la expresión de uno de un polipéptido DA1 y un polipéptido EOD1, y opcionalmente,
- (iii) un tercer ácido nucleico heterólogo que reduce la expresión del otro de un polipéptido DA1 y un polipéptido EOD1, y

5 (b) regenerar la planta de una o más células transformadas.

Otros métodos de producción de una planta con masa incrementada de semillas por unidad de área, crecimiento y/o biomasa pueden comprender:

- 10 proporcionar una célula vegetal que es deficiente en la expresión o actividad de DA1 o DA1 y EOD1, preferentemente actividad de DA1,
- incorporar un ácido nucleico heterólogo que reduce la actividad o expresión de un polipéptido DA2 en la célula vegetal por medio de transformación, y;
- 15 regenerar la planta a partir de la célula transformada.

Después de la regeneración, se puede seleccionar una planta con actividad o expresión reducida de un polipéptido DA2 y actividad o expresión reducida de DA1 o DA1 y EOD1 en relación con la planta de tipo silvestre.

20 La combinación de expresión reducida de DA2 y expresión reducida de DA1 o DA1 y EOD1 incrementa sinérgicamente el tamaño de las semillas y/u órganos de la planta, incrementando de ese modo la masa vegetal de semillas por unidad de área, crecimiento y/o biomasa.

25 Uno o más caracteres relacionados con el rendimiento en la planta se pueden mejorar por la combinación de expresión o actividad de DA2 reducida y expresión o actividad de DA1 o DA1 y EOD1 reducida. Por ejemplo, se pueden incrementar uno o más de la vida útil, el tamaño de órgano y el tamaño de semilla en la planta en relación con el control de las plantas de tipo silvestre en las que no se ha reducido la expresión del polipéptido DA2.

30 Se puede reducir la expresión o actividad de DA2, DA1 o EOD1 en los métodos descritos en el presente documento en al menos el 50 % en relación con la planta de tipo silvestre, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 %. En algunas realizaciones preferidas, la expresión o actividad se reduce a cero o básicamente cero (es decir, se abole la expresión o actividad).

35 Los métodos de la invención comprenden alterar la expresión o actividad de un polipéptido DA2 en una o más células de una planta. Los polipéptidos DA2 son E3 ubiquitina ligasas encontradas en las plantas. Los polipéptidos DA2 cuya expresión o actividad se reduce como se describe en el presente documento pueden comprender un dominio RING (Stone, S.L. y col. (2005)), preferentemente un dominio RING C5HC2, C5NC2 o C5TC2. Un dominio RING adecuado puede consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;

$C(X)_2C(X)_{11}CC(X)_4CX_2CX_7(H/N/T)X_6CX_2C$ . (SEQ ID NO: 1)

40 Los polipéptidos DA2 de la invención comprenden un dominio RING que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

CPICFL (Y/F) YPSLNRS (K/R) CC (S/M/T/A) K (G/S) ICTECFL (Q/R) MK (P/  
N/S/V/T/N) (T/P) (H/N/T) (T/S) (A/T/C) (R/Q/K) PTQCP (F/Y) C  
(SEQ ID NO: 2)

45 En algunas realizaciones, el resto H/N/T en la posición 33 en el dominio RING de SEQ ID NO: 2 puede ser T o N.

50 En algunas realizaciones, un polipéptido DA2 puede comprender un dominio RING que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 3-19), por ejemplo, DA2 de *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 11); DAL2 de *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 13) o GW2 de arroz (SEQ ID NO: 7) o una variante de los mismos. Por ejemplo un dominio RING puede tener la secuencia de aminoácidos de los restos 59 a 101 de SEQ ID NO: 20 (Pt\_GI-224061326.pro), restos 59 a 101 de SEQ ID NO: 21 (Rc\_GI-255578534.pro), restos 59 a 101 de SEQ ID NO: 22 (Vv\_GI-147817790.pro), restos 59 a 101 de SEQ ID NO: 23 (Gm\_GI-356549538.pro), restos 59 a 101 de SEQ ID NO: 24 (At\_GI-18411948.pro), restos 61 a 103 de SEQ ID NO: 25 (Ta\_GI\_408743661.pro), restos 61 a 103 de SEQ ID NO: 26 (Hv\_GI-164371454.pro), restos 61 a 103 de SEQ ID NO: 27 (Bd\_GI-357140854.pro), restos 62 a 104 de SEQ ID NO: 28 (Os\_GI-115445269.pro), restos 63 a 105 de SEQ ID NO: 29 (Sb\_GI-242064618.pro), restos 65 a 107 de SEQ ID NO: 30 (Zm\_GI-220961719.pro), restos 61 a 103 de SEQ ID NO: 31 (Ta\_GI-408743658.pro), restos 43 a 85 de SEQ ID NO: 32 (Bd\_GI-357125256.pro), restos 62 a 104 de SEQ ID NO: 33 (Os\_GI-218197613.pro), restos 62 a 104 de SEQ ID NO: 34 (Zm\_GI-260935347.pro) o restos 62 a 104 de SEQ ID NO: 35 (Sb\_GI-242092026.pro).

Se pueden identificar más secuencias de dominio RING adecuadas usando las técnicas de análisis de secuencia convencionales como se describe en el presente documento (por ejemplo, "Simple Modular Architecture Research Tool" (SMART); EMBL Heidelberg, DE).

- 5 Los polipéptidos DA2 además pueden comprender un primer dominio consenso. El primer dominio consenso puede estar localizado en dirección 5' (es decir, sobre el lado N terminal) del dominio RING. Un primer dominio consenso adecuado puede consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

Q(Q/.Ausente) GLY(P/M/N/V/Q/L/V/E) (H/S/N) (P/K/R) D(I/V) D(L/I/  
H/V/Q) (K/R) KL(R/K) (R/K) LI(V/L) (E/D) (A/S/T) KLAPC  
(SEQ ID NO: 36)

- 10 En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido DA2 puede comprender un primer dominio consenso de una secuencia de aminoácidos de DA2 mostrada en la Tabla 2, por ejemplo, los restos 20 a 45 de SEQ ID NO: 20, restos 20 a 45 de SEQ ID NO: 21, restos 20 a 45 de SEQ ID NO: 22, restos 20 a 45 de SEQ ID NO: 23, restos 20 a 45 de SEQ ID NO: 24, restos 21 a 46 de SEQ ID NO: 25, restos 21 a 46 de SEQ ID NO: 26, restos 21 a 46 de SEQ ID NO: 27, restos 21 a 46 de SEQ ID NO: 28, restos 21 a 46 de SEQ ID NO: 29, restos 21 a 46 de SEQ ID NO: 30, restos 21 a 46 de SEQ ID NO: 31, restos 4 a 29 de SEQ ID NO: 32, restos 23 a 48 de SEQ ID NO: 33, restos 23 a 48 de SEQ ID NO: 34 o restos 23 a 48 de SEQ ID NO: 35.

- 20 Un polipéptido DA2 además puede comprender un segundo dominio consenso. El segundo dominio consenso puede estar localizado en dirección 3' (es decir, en el lado C terminal) del dominio RING. El segundo dominio consenso puede consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

(N/S) YAVEYRG(V/G) K(T/S) KEE(K/R) (G/S) (V/T/I/F/L/M) EQ(L/I/V  
/F) EEQ(R/L/K) VIEA(Q/K) (I/M) RMR(H/Q) (K/Q) (E/A)  
(SEQ ID NO: 37).

- 25 En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido DA2 puede comprender un segundo dominio consenso de una secuencia de aminoácidos de DA2 mostrada en la Tabla 2, por ejemplo, los restos 106 a 141 de SEQ ID NO: 20, restos 106 a 141 de SEQ ID NO: 21, restos 106 a 141 de SEQ ID NO: 22, restos 106 a 141 de SEQ ID NO: 23, restos 106 a 141 de SEQ ID NO: 24, restos 107 a 143 de SEQ ID NO: 25, restos 107 a 143 de SEQ ID NO: 26, restos 107 a 143 de SEQ ID NO: 27, restos 108 a 144 de SEQ ID NO: 28, restos 109 a 145 de SEQ ID NO: 29, restos 111 a 147 de SEQ ID NO: 30, restos 107 a 143 de SEQ ID NO: 31, restos 90 a 125 de SEQ ID NO: 32, restos 108 a 143 de SEQ ID NO: 33, restos 108 a 143 de SEQ ID NO: 34 o restos 108 a 143 de SEQ ID NO: 35.

- 35 Se pueden identificar más ejemplos de las secuencias de primer y segundo dominio adecuadas usando técnicas de análisis de secuencia convencionales como se describe en el presente documento (por ejemplo, "Simple Modular Architecture Research Tool" (SMART); EMBL Heidelberg, DE).

- 40 En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido DA2 cuya expresión o actividad se reduce como se describe en el presente documento pueden comprender un dominio RING de SEQ ID NO: 2, el primer dominio consenso de SEQ ID NO: 36 y un segundo dominio consenso de SEQ ID NO: 37.

Por ejemplo, un polipéptido DA2 puede comprender cualquier combinación de secuencia de dominio RING, secuencia del primer dominio consenso y secuencia del segundo dominio consenso como se expuso anteriormente.

- 45 Un polipéptido DA2 adecuado puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 20 a 35 expuestas en la Tabla 2 o pueden ser variante de una de estas secuencias. En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido DA2 puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 o 33 (OsGW2), SEQ ID NO: 24 (AtDA2), SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 31 (TaGW2) o puede ser una variante de una cualquiera de estas secuencias que tenga actividad E3 ubiquitina ligasa.

- 50 Un polipéptido DA2 que es una variante de una cualquiera de las SEQ ID NO: 20 a 35 u otra secuencia de DA2 de referencia puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de DA2 de referencia.

- 55 Un polipéptido DA2 que es una variante de una cualquiera de las SEQ ID NO: 20 a 35 además puede comprender un dominio RING que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2 un primer dominio consenso que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 36 y un segundo dominio consenso que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 37. Anteriormente se expusieron ejemplos de secuencias adecuadas. En algunas realizaciones preferidas, un polipéptidos DA2 puede

comprender el dominio RING, el primer dominio consenso y el segundo dominio consenso de una cualquiera de las SEQ ID NO: 20 a 35.

5 Un ácido nucleico que codifica un polipéptido DA2 puede comprender una secuencia de nucleótidos expuesta en una entrada de la base de datos seleccionada del grupo que consiste en JN896622.1 GI:408743658 (TaGW2-A); y JN896623.1 GI:408743660 (TaGW2-B) o puede ser la variante de una de estas secuencias.

10 En algunas realizaciones preferidas, un ácido nucleico que codifica un polipéptido DA2 puede comprender la secuencia de nucleótidos que codifica AtDA2, AtDAL2, OsGW2, TaGW2-A o TaGW2-B o puede ser una variante de una cualquiera de estas secuencias de DA2 que codifica un polipéptido que tiene actividad de DA2.

15 Los polipéptidos DA2 y los ácidos nucleicos se pueden identificar en cualquier especie de interés, en particular, una planta de cultivo, tal como trigo, cebada, maíz, arroz, soja y otras plantas agrícolas, usando técnicas de análisis de secuencia rutinarias.

20 En el presente documento se muestra que la reducción en la expresión o actividad de DA2 en una planta aumenta sinérgicamente el efecto sobre los caracteres asociados al rendimiento en plantas de mutaciones que reducen la actividad o expresión de DA1. En realizaciones preferidas, los métodos descritos en el presente documento pueden comprender reducir la expresión de DA2 en una planta que es deficiente en expresión o actividad de DA1 o reducir la expresión de tanto DA1 como DA2 en una planta.

25 Los polipéptidos DA1 son receptores de ubiquitina encontrados en plantas y están descritos en detalle en Li y col. (2008), Wang y col (2012) y el documento WO2009/047525. Los polipéptidos DA1 cuya expresión o actividad se reduce como se describe en el presente documento pueden comprender un dominio LIM, un dominio de C terminal conservado y uno o más dominios UIM.

30 Un dominio LIM comprende dos motivos dedo de Zn y pueden tener la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 38);  

$$\underline{C(X)}_2\underline{C(X)}_{16-23}\underline{(H/C)(X)}_{2/4}\underline{(C/H/E)(X)}_2\underline{C(X)}_2\underline{C(X)}_{14-21}\underline{(C/H)(X)}_{2/1/3}\underline{(C/H/D/E)X}$$
 en la que X es cualquier aminoácido y los restos coordinadores de Zn están subrayados.

Los restos coordinadores de Zn en el dominio LIM pueden ser C, H, D o E, preferentemente C.

35 En algunas realizaciones preferidas, un dominio LIM puede comprender motivos CXXC, HXXCXXCXXC y HxxC, en los que X es cualquier aminoácido. Por ejemplo, un dominio LIM puede comprender la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 39);

$$\underline{C(X)}_2\underline{C(X)}_{16-23}\underline{(H)(X)}_2\underline{(C)(X)}_2\underline{C(X)}_2\underline{C(X)}_{14-21}\underline{H(X)}_2\underline{CX}$$
 en la que X es cualquier aminoácido y los restos coordinadores de Zn están subrayados.

40 En algunas realizaciones, un dominio LIM puede comprender la secuencia de aminoácidos del dominio AtDA1 LIM;  

$$\underline{CAGCNMEIGHGRFLNCLNSLWHPECFRCYGCSPISEYEFSTSGNYPFHKACY}$$
 (SEQ ID NO: 40; los restos coordinadores de Zn están subrayados)

45 Otros dominios LIM incluyen el dominio LIM de una secuencia de aminoácidos DA1 mostrada en la Tabla 3, por ejemplo, los restos 141 a 193 de SEQ ID NO: 41 (Si\_GI-514815267.pro), restos 123 a 175 de SEQ ID NO: 42 (Bd\_GI-357157184.pro), restos 155 a 207 de SEQ ID NO: 43(Br\_DA1b.pro), restos 172 a 224 de SEQ ID NO: 44 (Br\_DA1a.pro), restos 172 a 224 de SEQ ID NO: 45 (At\_GI-15221983.pro), restos 117 a 169 de SEQ ID NO: 46 (Tc\_GI-508722773.pro), restos 117 a 169 de SEQ ID NO: 47 (Gm\_GI-356564241.pro), restos 121 a 173 de SEQ ID NO: 48 (Gm\_GI-356552145.pro), restos 119 a 171 de SEQ ID NO: 49 (Vv\_GI-302142429.pro), restos 122 a 174 de SEQ ID NO: 50 (Vv\_GI-359492104.pro), restos 125 a 177 de SEQ ID NO: 51 (S1\_GI-460385048.pro), restos 516 a 568 de SEQ ID NO: 52 (Os\_GI-218197709.pro), restos 124 a 176 de SEQ ID NO: 53 (Os\_GI-115466772.pro), restos 150 a 202 de SEQ ID NO: 54 (Bd\_GI-357160893.pro), restos 132 a 184 de SEQ ID NO: 55 (Bd\_GI-357164660.pro), restos 124 a 176 de SEQ ID NO: 56 (Sb\_GI-242092232.pro), restos 147 a 199 de SEQ ID NO: 57 (Zm\_GI-212275448.pro), restos 190 a 242 de SEQ ID NO: 58 (At\_GI-240256211.pro), restos 162 a 214 de SEQ ID NO: 59 (At\_GI-145360806.pro), restos 1240 a 1291 de SEQ ID NO: 60 (At\_GI-22326876.pro), restos 80 a 122 de SEQ ID NO: 61 (At\_GI-30698242.pro), restos 347 a 402 de SEQ ID NO: 62 (At\_GI-30698240.pro), restos 286 a 341 de SEQ ID NO: 63 (At\_GI-15240018.pro) o restos 202 a 252 de SEQ ID NO: 64 (At\_GI-334188680.pro).

60 Las secuencias de dominio LIM se pueden identificar usando técnicas de análisis de secuencia convencionales (por ejemplo, "Simple Modular Architecture Research Tool" (SMART); EMBL Heidelberg, DE).

Además de un dominio LIM, una proteína DA1 puede comprender además una región terminal carboxilo que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % de identidad de aminoácidos a la secuencia de los restos 198 a 504 de SEQ ID NO: 41, restos 180 a 487 de SEQ ID NO: 42, restos 212 a 514 de



SEQ ID NO: 43, restos 229 a 532 de SEQ ID NO: 44, restos 229 a 532 de SEQ ID NO: 45, restos 174 a 478 de SEQ ID NO: 46, restos 174 a 474 de SEQ ID NO: 47, restos 178 a 478 de SEQ ID NO: 48, restos 176 a 462 de SEQ ID NO: 49, restos 179 a 482 de SEQ ID NO: 50, restos 182 a 486 de SEQ ID NO: 51, restos 573 a 878 de SEQ ID NO: 52, restos 181 a 486 de SEQ ID NO: 53, restos 207 a 512 de SEQ ID NO: 54, restos 189 a 491 de SEQ ID NO: 55, restos 181 a 486 de SEQ ID NO: 56, restos 204 a 508 de SEQ ID NO: 57, restos 247 a 553 de SEQ ID NO: 58, restos 219 a 528 de SEQ ID NO: 59, restos 1296 a 1613 de SEQ ID NO: 60, restos 128 a 450 de SEQ ID NO: 61, restos 404 a 702 de SEQ ID NO: 62, restos 343 a 644 de SEQ ID NO: 63 o restos 256 a 587 de SEQ ID NO: 64.

La región terminal carboxilo de la proteína DA1 puede comprender el motivo de metalopeptidasa HEMMH (SEQ ID NO: 65).

La región terminal carboxilo además puede comprender un motivo EK(X)<sub>8</sub>R(X)<sub>4</sub>SEEQ (SEQ ID NO: 66) o EK(X)<sub>8</sub>R(X)<sub>4</sub>SEQ (SEQ ID NO: 67) colocado entre el dominio LIM y el motivo HEMMH.

Además de un dominio LIM y una región terminal carboxilo conservada, una proteína DA1 puede comprender un dominio UIM1 y un dominio UIM2. Los dominios UIM1 y UIM2 pueden estar localizados entre el terminal N y el dominio LIM de la proteína DA1.

Un dominio UIM1 puede consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 68 y un dominio UIM2 puede consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 69.

p---pLpbAl pb.Sbp-.pp p (SEQ ID NO: 68)

p---pLpbAl pb.Sbp-spp p (SEQ ID NO: 69)

en las que;

p es un resto de aminoácido polar, por ejemplo, C, D, E, H, K, N, Q, R, S o T;

b es un resto de aminoácido grande, por ejemplo, E, F, H, I, K, L, M, Q, R, W o Y;

s es un resto de aminoácido pequeño, por ejemplo, A, C, D, G, N, P, S, T o V;

l es un resto de aminoácido alifático, por ejemplo, I, L o V;

. está ausente o es cualquier aminoácido, y

- es cualquier aminoácido.

Se pueden identificar más ejemplos de secuencias de dominio UIM1 y UIM2 usando técnicas de análisis de secuencia convencionales como se describe en el presente documento (por ejemplo, "Simple Modular Architecture Research Tool" (SMART); EMBL Heidelberg, DE).

En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido DA1 puede comprender: un dominio LIM de SEQ ID NO: 39, una región terminal C que tiene al menos 20 % de identidad de secuencia con los restos 229 a 532 de la SEQ ID NO: 45 o la región equivalente de una cualquiera de las SEQ ID NO: 41 a 44 o 46 a 64, expuestas anteriormente y que comprende un motivo EK(X)<sub>8</sub>R(X)<sub>4</sub>SEEQ o EK(X)<sub>8</sub>R(X)<sub>4</sub>SEQ y un motivo HEMMH, un dominio UIM de SEQ ID NO: 66, y un dominio UIM de SEQ ID NO: 67.

Una proteína DA1 puede comprender una secuencia de aminoácidos de una proteína DA1 vegetal mostrada en la Tabla 3 (SEQ ID NO: 41 a 64) o puede ser un homólogo o variante de una de estas secuencias que tiene actividad de DA1. Por ejemplo, un polipéptido DA1 puede comprender una secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 3 (SEQ ID NO: 41 a 64) o puede ser variante de una de estas secuencias que tiene actividad de DA1.

Por ejemplo, un polipéptido DA1 puede comprender una secuencia de aminoácidos de AtDA1, AtDAR1, AtDAR2, AtDAR3, AtDAR4, AtDAR5, AtDAR6, AtDAR7, BrDA1a, BrDA1b, BrDAR1, BrDAR2, BrDAR3-7, BrDAL1, BrDAL2, BrDAL3, OsDA1, OsDAR2, OsDAL3, OsDAL5, PpDAL1, PpDAL2, PpDAL3, PpDAL4, PpDAL5, PpDAL6, PpDAL7, PpDAL8, SmDAL1, SmDAL2 o ZmDA1, preferentemente AtDA1, AtDAR1 BrDA1a, BrDA1b, OsDA1 o ZmDA1 o un homólogo o variante de una de estas secuencias.

En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido DA1 puede comprender la secuencia de aminoácidos de AtDA1 (AT1G19270; NP\_173361.1 GI: 15221983) o puede ser variante de esta secuencia que tiene actividad de DA1.

Otras secuencias de proteína DA1 que incluyen en los rasgos característicos anteriormente expuestos se pueden identificar usando herramientas de análisis de secuencia convencionales. Un experto en la técnica es capaz de identificar fácilmente secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas DA1 en cualquier especie vegetal de interés.

Una proteína DA1 en una especie vegetal de interés puede tener una secuencia de aminoácidos que es una variante de una secuencia de aminoácidos de referencia de la proteína DA1 expuesta en el presente documento.

5 Un polipéptido de DA1 que es una variante de una secuencia de DA1 de referencia, tal como una cualquiera de las SEQ ID NO 41 a 64, puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de referencia.

10 Las variantes de secuencia de aminoácidos particulares que se dan en una especie vegetal pueden diferir de una secuencia de referencia expuesta en el presente documento por inserción, adición, sustitución o delección de 1 aminoácido, 2, 3, 4, 5-10, 10-20 20-30, 30-50, o más de 50 aminoácidos.

15 En algunas realizaciones, un polipéptido DA1 el cual es una variante de la secuencia de AtDA1 de la SEQ ID NO: 45 puede comprender un dominio UIM1 que tiene la secuencia QENEDIDRAIALSLLEENQE (SEQ ID NO: 70) y un dominio UIM2 que tiene la secuencia DEDEQIARALQESMVGNSP (SEQ ID NO: 71).

Un polipéptido DA1 que es una variante de la secuencia AtDA1 de la SEQ ID NO: 45 puede comprender un dominio LIM que tiene la secuencia:

ICAGCNMEIGHGRFLNCLNSLWHPECFRCYGCSQPISEYEFSTSGNYPFHKAC (SEQ ID NO: 72)

20 Un ácido nucleico que codifica un polipéptido DA1 puede comprender una secuencia de nucleótidos expuesta en una entrada de base de datos seleccionada del grupo que consiste en NM\_101785.3 GI:42562170 (AtDA1); NM\_001057237.1 GI:115454202 (OsDA1); BT085014.1 GI: 238008663 (ZmDA1) o puede ser variante de una de estas secuencias que codifica un polipéptido DA1 activo.

25 En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de DA1 puede comprender la secuencia de nucleótidos de AtDA1 (NM\_101785.3 GI: 42562170), ZmDA1 (BT085014.1 GI: 238008663), OsDA1 (NM\_001057237.1 GI:115454202) o puede ser una variante de una cualquiera de estas secuencias que codifica un polipéptido que conserva actividad de DA1.

30 Los polipéptidos DA1 y los ácidos nucleicos codificantes se pueden identificar en especies vegetales, en particular plantas de cultivo, tales como trigo, cebada, maíz, arroz, y otras plantas agrícolas, usando técnicas de análisis de secuencia rutinarias.

35 En algunas realizaciones preferidas, la actividad de DA1 en una o más células de una planta se puede reducir mediante la expresión de un polipéptido DA1 dominante negativo en la una o más células (véase, por ejemplo, Li y col. (2008); documento WO2009/047525; Wang y col. 2012). Una planta que expresa un polipéptido DA1 dominante negativo puede tener un fenotipo *da1-1*.

40 Un alelo dominante negativo de un polipéptido DA1 puede comprender un polipéptido DA1 que tiene una mutación, por ejemplo, una sustitución o delección, en un resto R conservado que está localizado en la posición 358 de la secuencia de aminoácidos de DA1 de *A. thaliana*, posición 333 de la secuencia de aminoácidos de DA1 de *Z. mays* o la posición equivalente en otra secuencia de aminoácidos de DA1. Por ejemplo, un alelo negativo dominante de un polipéptido DA1 puede comprender una mutación del resto R conservado en una posición equivalente a la posición 358 de la secuencia de aminoácidos de DA1 de *A. thaliana* o la posición 333 de la secuencia de aminoácidos de DA1 de *Z. mays*. En realizaciones preferidas, el resto R conservado puede estar sustituido por K.

50 El resto R conservado que está localizado en una posición en una secuencia de aminoácidos de DA1 la cual es equivalente a la posición 358 de SEQ ID NO. 45 de DA1 de *A. thaliana* o la posición 333 de la DA1 de *Z. mays* de SEQ ID NO: 57 está localizada en la posición en la secuencia de aminoácidos de DA1 que corresponde a R333 de SEQ ID NO: 57 y R358 de SEQ ID NO: 45, es decir, está en la misma posición en relación con los otros motivos y dominios de la proteína DA1. El resto R conservado está localizado entre el dominio LIM y el motivo de peptidasa HEMMH de la región del terminal C y está completamente conservado en el mismo contexto de secuencia en las proteínas DA1. El resto R conservado puede estar contenido en un motivo EK(X)<sub>8</sub>R(X)<sub>4</sub>SEQ (SEQ ID NO: 66) o EK(X)<sub>8</sub>R(X)<sub>4</sub>SEQ (SEQ ID NO: 67) en la región de terminal C.

55 El resto R conservado se puede identificar alineando estas regiones terminales C conservadas usando análisis de secuencia convencional y herramientas de alineamiento y está identificado con una flecha en las secuencias de la Tabla 3.

60 El ácido nucleico que codifica un alelo dominante negativo de una proteína DA se puede producir por cualquier técnica conveniente. Por ejemplo, se puede emplear mutagénesis dirigida a sitio sobre un ácido nucleico que codifica un polipéptido DA1 para alterar el resto R conservado en la posición equivalente a R358 de DA1 de *A. thaliana* o R333 de la DA1 de *Zea mays*, por ejemplo, a K. Los reactivos y los kits para la mutagénesis *in vitro* están comercialmente disponibles.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido DA1 dominante negativo como se describe en el presente documento puede estar unido de manera operativa a una secuencia reguladora heteróloga, tal como un promotor, por ejemplo, un promotor constitutivo, inducible, específico a tejido o específico al desarrollo. El ácido nucleico que codifica el polipéptido DA1 dominante negativo puede estar comprendido en uno o más vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico mutado que codifica el alelo dominante negativo de una proteína DA1 además se puede clonar en un vector de expresión y expresar en células vegetales como se describe más adelante para alterar el fenotipo vegetal.

En otras realizaciones, una mutación se puede introducir en un ácido nucleico DA1 endógeno en una planta, de modo que el polipéptido DA1 codificado por el ácido nucleico de DA1 mutante tenga actividad dominante negativa.

El ácido nucleico que codifica un polipéptido DA1 dominante negativo se puede expresar en la misma especie vegetal o variedad de la cual se aisló originalmente o en una especie vegetal o variedad diferente (es decir, una planta heteróloga).

En el presente documento también se muestra la reducción o abolición de la expresión de DA2 en una planta que aumenta el efecto de las mutaciones que reducen la expresión o actividad de EOD1 sobre los caracteres asociados al rendimiento en plantas.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender reducir la expresión o actividad de DA2 en una planta que es deficiente en la expresión o actividad de EOD1 o reducir la expresión o actividad de tanto DA2 como EOD1 en una planta. En realizaciones preferidas, la planta también puede ser deficiente en la actividad de DA1 o el método puede comprender además reducir o abolir la expresión de DA1 en la planta.

Los polipéptidos EOD1 son E3 ubiquitina ligasas encontradas en las plantas y están descritos en detalle en Disch y col. (2006), Li y col. (2008) y el documento WO2009/047525.

Un polipéptido EOD1 cuya expresión o actividad se reduce como se describe en el presente documento puede comprender un dominio EOD. Un dominio EOD adecuado puede consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73;

```
(E/K)RCVICQ(L/M)(K/R/G/T/E)Y(K/R)(R/I)(G/K)(D/N/E)(R/Q/K/L)Q(I
/M/V)(K/N/T/A)L(L/P)C(K/S)H(V/A)YH(S/T/G/A)(E/Q/D/S/G)C(I/G/T/
V)(S/T)(K/R)WL(G/T/S)INK(V/I/A/K)CP(V/I)C (SEQ ID NO: 73)
```

En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido EOD1 puede comprender un dominio EOD que tiene una secuencia de aminoácidos de los restos 195 a 237 de SEQ ID NO: 74 (Zm\_GI-223973923.pro), restos 195 a 237 de SEQ ID NO: 75 (Sb\_GI-242042045.pro), restos 195 a 237 de SEQ ID NO: 76 (Zm\_GI-226496789.pro), restos 218 a 260 de SEQ ID NO: 77 (Os\_GI-222624282.pro), restos 196 a 238 de SEQ ID NO: 78 (Os\_GI-115451045.pro), restos 197 a 239 de SEQ ID NO: 79 (Bd\_GI-357113826.pro), restos 193 a 235 de SEQ ID NO: 80 (Sl\_GI-460410949.pro), restos 187 a 229 de SEQ ID NO: 81 (Rc\_GI-255582236.pro), restos 150 a 192 de SEQ ID NO: 82 (Pt\_GI-224059640.pro), restos 194 a 236 de SEQ ID NO: 83 (Gm\_GI-356548935.pro), restos 194 a 236 de SEQ ID NO: 84 (Gm\_GI-356544176.pro), restos 194 a 236 de SEQ ID NO: 85 (Vv\_GI-359487286.pro), restos 189 a 231 de SEQ ID NO: 86 (Tc\_GI-508704801.pro), restos 192 a 234 de SEQ ID NO: 87 (Pp\_GI-462414664.pro), restos 190 a 232 de SEQ ID NO: 88 (Cr\_GI-482561003.pro), restos 195 a 237 de SEQ ID NO: 89 (At\_GI-22331928.pro) o restos 195 a 237 (Sl\_GI-460370551.pro) de SEQ ID NO: 90, mostrados en la Tabla 4.

Se pueden identificar más secuencias dominio de EOD adecuadas usando técnicas de análisis de secuencia convencionales como se describe en el presente documento (por ejemplo, "Simple Modular Architecture Research Tool" (SMART); EMBL Heidelberg, DE).

Un polipéptido EOD1 cuya expresión o actividad se reduce como se describe en el presente documento puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO 74 a 90 expuestas en la Tabla 4. En algunas realizaciones realizadas, un polipéptido EOD1 puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89 (AtEOD1) o SEQ ID NOS: 77 o 78 (OsEOD1) o puede ser una variante de esta secuencia que conserva la actividad E3 ubiquitina ligasa.

Un polipéptido EOD1 que es una variante de una cualquiera de las SEQ ID NO: 74 a 90 u otra secuencia de EOD1 de referencia puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de EOD1 de referencia.

Un polipéptido EOD que es una variante de una cualquiera de las SEQ ID NO: 74 a 90 además puede comprender un dominio de EOD que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 73. Anteriormente se expusieron ejemplos de secuencias adecuadas .

Un ácido nucleico que codifica un polipéptido EOD1 puede comprender una secuencia de nucleótidos expuesta en una entrada de base de datos seleccionada del grupo que consiste en XM\_002299911.1 GI:224059639 (PtEOD1);

XM\_002531864.1 GI:255582235 (RcEOD1); XM\_002279758.2 GI:359487285 (VvEOD1); XM\_003542806.1 GI:356548934 (GmEOD1a); XM\_003540482.1 GI:356544175 (GmEOD1b); XM\_002468372.1 GI:242042044 (SbEOD1); NM\_001147247.1 GI:226496788 (ZmEOD1); o NP\_001030922.1 GI: 79316205 (AtEOD1; At3g63530) o puede ser variante de una de estas secuencias.

5 En algunas realizaciones preferidas, un ácido nucleico que codifica un polipéptido EOD1 puede comprender la secuencia de nucleótidos que codifica AtEOD1 o OsEOD1 o puede ser una variante de una cualquiera de estas secuencias que codifica un polipéptido que tiene actividad de EOD1.

10 Los polipéptidos EOD1 y los ácidos nucleicos codificantes cuya expresión o actividad se reduce como se describe en el presente documento se pueden identificar fácilmente en cualquier especie vegetal de interés, en particular una planta de cultivo, tal como trigo, cebada, maíz, arroz, y otras plantas agrícolas, usando técnicas de análisis de secuencia rutinarias.

15 En el presente documento también se muestra que la mutación de DA2 en plantas aumenta sinérgicamente el efecto de las combinaciones de las mutaciones de DA1 y EOD1 sobre los caracteres asociados con el rendimiento en plantas.

20 Los métodos descritos en el presente documento no se limitan a especies vegetales particulares y la expresión o actividad de DA2, DA1 o DA1 y EOD1 se puede reducir en cualquier especie vegetal de interés, como se describe en el presente documento.

25 Un polipéptido DA1, DA2 o EOD1 en una especie vegetal de interés puede tener una secuencia de aminoácidos que es una variante de una respectiva secuencia de aminoácidos de referencia de DA1, DA2 o EOD1 expuesta en el presente documento. Un polipéptido de DA1, DA2 o EOD1 que es una variante de una secuencia de referencia expuesta en el presente documento, puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de referencia.

30 Las variantes particulares de la secuencia de aminoácidos que se dan en una especie vegetal pueden diferir de una secuencia de referencia expuesta en el presente documento por inserción, adición, sustitución o delección de 1 aminoácido, 2, 3, 4, 5-10, 10-20 20-30, 30-50, o más de 50 aminoácidos.

35 Un ácido nucleico de DA1, DA2 o EOD1 en una especie vegetal de interés puede tener una secuencia de nucleótidos que es una variante de una respectiva secuencia de nucleótidos de referencia de DA1, DA2 o EOD1 expuesta en el presente documento. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos variante puede ser un homólogo, o alelo de una secuencia de DA1, DA2 o EOD1 de referencia expuesta en el presente documento, y puede diferir de la secuencia de nucleótidos de DA1, DA2 o EOD1 de referencia por una o más de adición, inserción, delección o sustitución de uno o más nucleótidos en el ácido nucleico, por ejemplo, 2, 3, 4, 5-10, 10-20 20-30, 30-50, o más de 40 50, conduciendo a la adición, inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos en el polipéptido codificado. Por supuesto, se incluyen los cambios al ácido nucleico que no producen diferencia con la secuencia de aminoácidos codificada. Un ácido nucleico codificante de DA1, DA2 o EOD1 puede comprender una secuencia que tiene al menos 20 % o al menos 30 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de referencia, preferentemente al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 %. La identidad de secuencia se describió anteriormente.

50 La similitud e identidad de secuencia se definen comúnmente con referencia al algoritmo GAP (Wisconsin Package, Accelerlys, San Diego USA). GAP usa el algoritmo de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas que maximiza el número de apareamientos y minimiza el número de huecos (*gaps*). Generalmente, se usan los parámetros por defecto, con una penalización de creación de hueco = 12 y penalización de extensión de hueco = 4. Se puede preferir el uso de GAP pero se pueden usar otros algoritmos, por ejemplo, BLAST (el cual usa el método de Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:405-410), FASTA (el cual usa el método de Pearson y Lipman (1988) *PNAS USA* 85:2.444-2.448), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981) *J. Mol Biol.* 147:195-197), o el programa TBLASTN, de Altschul y col. (1990) *supra*, generalmente empleando los parámetros por defecto. En particular, se puede usar el algoritmo psi-Blast (*Nucl. Acids Res.* (1997) 25:3.389-3.402).

La comparación de secuencia se puede realizar sobre la longitud completa de la secuencia relevante descrita en el presente documento.

60 Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos variantes adecuadas se pueden identificar en cualquier especie vegetal de interés usando técnicas de análisis de secuencia convencionales.

65 La secuencia de nucleótidos de DA1, DA2 o EOD1 que es una variante de una secuencia de ácidos nucleicos de DA1, DA2 o EOD1 de referencia expuesta en el presente documento, puede hibridar selectivamente bajo condiciones estrictas con esta secuencia de ácidos nucleicos o el complemento de la misma.

Las condiciones estrictas incluyen, por ejemplo, para la hibridación de secuencias que son aproximadamente idénticas al 80 a 90 %, hibridación durante la noche a 42 °C en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 M, pH 7,2, 6,5 % de SDS, 10 % de sulfato de dextrano y un lavado final a 55 °C en 0,1x SSC, 0,1 % de SDS. Para la detección de las secuencias que son idénticas al más de aproximadamente 90 %, las condiciones adecuadas incluyen hibridación durante la noche a 65 °C en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 M, pH 7,2, 6,5 % de SDS, 10 % de sulfato de dextrano y un lavado final a 60 °C en 0,1x SSC, 0,1 % de SDS.

Una alternativa, la cual puede ser particularmente apropiada con las preparaciones de ácido nucleico vegetal, es una solución de 5x SSPE (final NaCl 0,9 M, fosfato de sodio 0,05 M, EDTA 0,005 M pH 7,7), 5x solución de Denhardt, 0,5 % de SDS, a 50 °C o 65 °C durante la noche. Los lavados se pueden realizar en 0.2x SSC/0,1 % de SDS a 65 °C o a 50-60 °C en 1x SSC/0,1 % de SDS, como sea requerido.

Los ácidos nucleicos como se describe en el presente documento pueden ser completamente o parcialmente sintéticos. En particular, pueden ser recombinantes en el sentido de que las secuencias de ácidos nucleicos que no se encuentran juntas en la naturaleza (no van contiguamente) se han ligado o si no combinado artificialmente. Alternativamente, se pueden haber sintetizado directamente, por ejemplo, usando un sintetizador automatizado.

La expresión de un ácido nucleico de DA2 y un ácido nucleico de DA1 y/o EOD1 se puede reducir o abolir en una o más células de una planta por cualquier técnica conveniente.

Los métodos para reducir la expresión o actividad de un polipéptido DA2 y un polipéptido DA1 y/o EOD1 en una planta son bien conocidos en la técnica y se describen a más detalle a continuación. En algunas realizaciones, la expresión del polipéptido DA2, DA1 y/o EOD1 activo se puede reducir, preferentemente abolir, introduciendo una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos en una célula vegetal que codifica el polipéptido o que regula la expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos. La mutación puede alterar la expresión o función del polipéptido DA2, DA1 y/o EOD1. Las mutaciones adecuadas incluyen mutaciones de inactivación (*knockout*) y atenuación (*knockdown*). En algunas realizaciones, una mutación puede producir un alelo dominante negativo de DA1. A continuación, una planta se puede regenerar a partir de la célula mutada. Los ácidos nucleicos se pueden mutar por inserción o delección de uno o más nucleótidos. Las técnicas para la mutagénesis, la inactivación o *knockout* de los genes diana son bien conocidas en la técnica (por ejemplo, "In Vitro Mutagenesis Protocols; Methods in Molecular Biology" (2<sup>o</sup> Edición) Ed Jeff Braman; Sambrook J. y col. 2012. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (4<sup>o</sup> Edición) CSH Press; "Current Protocols in Molecular Biology"; Ed Ausubel y col (2013) Wiley). En algunas realizaciones, las mutaciones se pueden introducir en un gen de EOD1, DA2 o DA1 diana por técnicas de edición de genoma, por ejemplo, técnicas de nucleasa guiada a ARN tales como CRISPR, nucleasas de dedo de Zinc (ZFN) y nucleasas efectoras tipo transactivador (TALEN) (Urnov, F.D. y col. *Nature reviews. Genetics* 11, 636-646 (2010); Joung, J.K. y col. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 49-55 (2013); Gasiunas, G. y col *PNAS USA* 109, E2579-2586 (2012); Cong, L. y col. *Science* 339, 819-823 (2013)).

Las mutaciones que reducen la expresión o actividad pueden incluir una delección, inserción o sustitución de uno o más nucleótidos, en relación con la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre, una amplificación de gen o un incremento o descenso en metilación, para ejemplo, hipermetilación. La una o más mutaciones puede estar en una región codificante o no codificante de la secuencia de ácidos nucleicos. Las mutaciones en la región codificante del gen que codifica el componente puede prevenir la traducción de la proteína activa de longitud completa, es decir, mutaciones truncadoras, o permitir la traducción de la proteína de función de longitud completa pero inactiva o alterada, es decir, mutaciones de sentido erróneo. Las mutaciones o cambios epigenéticos, tales como metilación, en regiones no codificantes del gen que codifica el componente, por ejemplo, en un elemento regulador, pueden prevenir la transcripción del gen. Un ácido nucleico que comprende una o más mutaciones de secuencia puede codificar un polipéptido variante que ha reducido o abolido la actividad o puede codificar un polipéptido del tipo silvestre que tiene poca o ninguna expresión en la célula, por ejemplo, por la actividad alterada de un elemento regulador. Un ácido nucleico que comprende una o más mutaciones de secuencia pueden tener una, dos, tres, cuatro o más mutaciones en relación con la secuencia inmadura.

Por ejemplo, la actividad de EOD1 se puede reducir, preferentemente abolir, introduciendo una mutación, tal como una delección, inserción o sustitución, a una posición correspondiente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 89, por ejemplo, una sustitución A por T. Una posición en una secuencia de polipéptido EOD1 que es equivalente a la posición 44 de la SEQ ID NO: 89 se puede identificar usando análisis de secuencia convencional y herramientas de alineamiento, como se muestra en la Tabla 4.

Las secuencias codificantes de DA2, DA1 y EOD1 se pueden identificar en cualquier especie vegetal de interés usando técnicas de análisis de secuencia convencionales, por ejemplo, por comparación con las secuencias de referencia expuestas en el presente documento.

Las mutaciones adecuadas para abolir la expresión de un polipéptido de DA2, DA1 y/o EOD1 activa estarán fácilmente claras para el experto.

En algunas realizaciones preferidas, una mutación que reduce o abole la expresión o actividad de DA2 se puede introducir en una célula vegetal que expresa un polipéptido DA1 dominante negativo y opcionalmente comprende o bien i) un ácido nucleico heterólogo que codifica un ácido nucleico supresor de EOD1 o ii) una mutación que reduce la expresión o actividad de EOD1.

5 En algunas realizaciones, la expresión de un polipéptido DA1, DA2 y/o EOD1 se puede reducir en una célula vegetal mediante la expresión de un ácido nucleico heterólogo que codifica o transcribe un ácido nucleico supresor, por ejemplo, una molécula de ARN o ARNi supresora, dentro de las células de dicha planta. El ARN supresor suprime la expresión de su polipéptido diana (es decir, DA1, DA2 o EOD1) en las células vegetales.

10 Los ácidos nucleicos como se describe en el presente documento pueden ser completamente o parcialmente sintéticos. En particular, pueden ser recombinantes en el sentido de que las secuencias de ácidos nucleicos que no se encuentran juntas en la naturaleza (no van contiguamente) se han ligado o si no combinado artificialmente. Alternativamente, se pueden haber sintetizado directamente, por ejemplo, usando un sintetizador automatizado.

15 El ácido nucleico, por supuesto, puede ser de cadena doble o sencilla, ADNc o ADN genómico, o ARN. El ácido nucleico puede ser completamente o parcialmente sintético, dependiendo del diseño. Naturalmente, el experto en la técnica entenderá que cuando el ácido nucleico incluye ARN, la referencia a la secuencia mostrada se debería construir como referencia al equivalente de ARN, con U sustituida por T.

20 “Heterólogo” indica que el gen/secuencia de nucleótidos en cuestión o una secuencia que regula el gen/secuencia en cuestión, se ha introducido en dichas células de la planta o un ancestro de la misma, usando modificación por ingeniería genética o medios recombinantes, es decir, por intervención humana. Las secuencias de nucleótidos que son heterólogas a una célula vegetal pueden ser de origen natural en células de ese tipo, variedad o especie (es decir, exógena o extraña) o pueden ser secuencias que no se dan de manera natural en ese ambiente subcelular o genómico de las células o pueden ser secuencias que no se regulan de manera natural en la células, es decir, unidas de manera operativa a un elemento regulador no natural.

30 La supresión de la expresión de un polipéptido diana en las células vegetales es bien conocido en la técnica. Un ácido nucleico supresor adecuado puede ser una copia de todo o parte del gen de DA1, DA2 y/o EOD1 diana insertado en la orientación antisentido o sentido o ambas en relación con el gen de DA1, DA2 y/o EOD1, para conseguir la reducción en la expresión del gen diana. Véase, por ejemplo, van der Krol y col., (1990) *The Plant Cell* 2, 291-299; Napoli y col., (1990) *The Plant Cell* 2, 279-289; Zhang y col., (1992) *The Plant Cell* 4, 1.575-1.588, y US-A-5.231.020. Más mejoras de este planteamiento se pueden encontrar en el documento WO95/34668 (Biosource); Angell & Baulcombe (1997) *The EMBO Journal* 16, 12:3.675-3.684; y Voinnet & Baulcombe (1997) *Nature* 389: pg 553.

40 En algunas realizaciones, el ácido nucleico supresor puede ser un supresor sentido de la expresión del polipéptido DA1, DA2 y/o EOD1.

45 Un ácido nucleico supresor adecuado puede ser un ARN de doble cadena (Fire A. y col. *Nature*, Vol. 391, (1998)). El silenciamiento mediado por ARNdc es específico a gen y con frecuencia se denomina interferencia por ARN (ARNi). La ARNi es un proceso en dos etapas. Primero, el ARNdc se escinde dentro de la célula para producir ARN interferentes cortos (ARNic) de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud con fosfato terminal 5' y salientes cortos 3' (aproximadamente 2 nucleótidos). El ARNic dirige la secuencia de ARNm correspondiente específicamente para la destrucción (Zamore P.D. *Nature Structural Biology*, 8, 9, 746-750, (2001)).

50 Los ARNic (algunas veces llamados microARN) regulan a la baja la expresión génica uniéndose a ARN complementarios y o bien desencadenando la eliminación del ARNm (ARNi) o parando la traducción del ARNm a proteína. El ARNic se puede derivar procesando los ARN de doble cadena largos y cuando se encuentra en la naturaleza son generalmente de origen exógeno. Los ARN microinterferentes (ARNmi) son ARN no codificantes pequeños endógenamente codificados, derivados por el procesamiento de horquillas cortas. Tanto los ARNic como los ARNmi pueden inhibir la traducción de los ARNm que portan secuencias diana parcialmente complementarias sin escisión de ARN y degradan los ARNm que portan secuencias completamente complementarias.

55 Por lo tanto, la presente invención proporciona el uso de secuencias de ARNi basadas en la secuencia de ácidos nucleicos de DA1, DA2 y/o EOD1 para la supresión de la expresión del polipéptido DA1, DA2 y/o EOD1. Por ejemplo, una secuencia de ARNi puede corresponder a un fragmento de una secuencia de nucleótidos de DA1, DA2 o EOD1 de referencia expuesta en el presente documento o puede ser una variante del mismo.

60 Las moléculas de ARNic generalmente son de doble cadena, para optimizar la eficacia de la regulación a la baja mediada por ARN de la función de un gen diana, es preferido que se elija la longitud y la secuencia de la molécula de ARNic para asegurar el reconocimiento correcto del ARNic por el complejo RISC que media el reconocimiento por el ARNic de la diana de ARNm y de manera que el ARNic sea suficientemente corto para reducir una respuesta del hospedador.

65

Los ligandos de ARNmi generalmente son de cadena sencilla y tienen regiones que son parcialmente complementarias que posibilitan que los ligandos formen una horquilla. Los ARNmi son secuencias de ARN que se transcriben del ADN, pero no se traducen a proteína. Una secuencia de ADN que codifica un ARNmi es mayor que el ARNmi. Esta secuencia de ADN incluye la secuencia de ARNmi y un complemento inverso aproximado. Cuando esta secuencia de ADN se transcribe a una molécula de ARN de cadena sencilla, la secuencia de ARNmi y su par de bases complemento inverso forman un segmento de ARN de parcialmente doble cadena. El diseño de las secuencias de microARN se analiza en John y col, *PLoS Biology*, 11(2), 1.862-1.879, 2004.

Generalmente, las moléculas de ARN destinadas a imitar los efectos del ARNic o ARNmi tienen entre 10 y 40 ribonucleótidos (o análogos sintéticos de los mismos), más preferentemente entre 17 y 30 ribonucleótidos, más preferentemente entre 19 y 25 ribonucleótidos y lo más preferentemente entre 21 y 23 ribonucleótidos. En algunas realizaciones de la invención que emplean ARNic de doble cadena, la molécula puede tener salientes 3' simétricos, por ejemplo, de uno o dos (ribo)nucleótidos, generalmente un UU de saliente 3' dTdT. Basándose en la descripción proporcionada en el presente documento, el experto puede fácilmente diseñar secuencias de ARNic y ARNmi adecuadas, por ejemplo, usando recursos tales como buscador de ARNic (Ambion). Las secuencias de ARNic y ARNmi se pueden producir sintéticamente y añadir exógenamente para causar regulación a la baja del gen o se producen usando sistemas de expresión (por ejemplo, vectores). En una realización preferida, el ARNic se sintetiza sintéticamente.

Se pueden procesar ARN de doble cadena mayores en la célula para producir ARNic (véase, por ejemplo, Myers (2003) *Nature Biotechnology* 21:324-328). La molécula de ARNdc mayor puede tener salientes 3' o 5' simétricos, por ejemplo, de uno o dos (ribo)nucleótidos, o pueden tener extremos romos. La molécula de ARNdc mayor puede ser de 25 nucleótidos o mayor. Preferentemente, las moléculas de ARNdc mayores son de entre 25 y 30 nucleótidos de longitud. Más preferentemente, las moléculas de ARNdc mayores son de entre 25 y 27 nucleótidos de longitud. Lo más preferentemente, las moléculas de ARNdc son de 27 nucleótidos de longitud. Los ARNdc de 30 nucleótidos o más de longitud se pueden expresar usando el vector pDECAP (Shinagawa y col., *Genes and Dev.*, 17, 1.340-5, 2003).

Otra alternativa es la expresión de una molécula de ARN de horquilla corta (ARNhc) en la célula. Los ARNhc son más estables que los ARNic sintéticos. Un ARNhc consiste en repeticiones invertidas cortas separadas por una secuencia de bucle pequeño. Una repetición invertida es complementaria a la diana génica. En la célula el ARNhc se procesa por DICER en un ARNic que degrada el ARNm de gen diana y suprime la expresión. En una realización preferida el ARNhc se produce endógenamente (dentro de una célula) por transcripción de un vector. Los ARNhc se pueden producir dentro de una célula por transfección de la célula con un vector que codifica la secuencia de ARNhc bajo control de un promotor de ARN polimerasa III tal como el promotor H1 o 7SK humano o un promotor de ARN polimerasa II. Alternativamente, el ARNhc se puede sintetizar exógenamente (*in vitro*) mediante la transcripción de un vector. El ARNhc, a continuación, se puede introducir directamente en la célula. Preferentemente, la molécula de ARNhc comprende una secuencia parcial de DA1, DA2 y/o EOD1. Por ejemplo, la secuencia de ARNhc es de entre 40 y 100 bases de longitud, más preferentemente entre 40 y 70 bases de longitud. El tallo de la horquilla es preferentemente de entre 19 y 30 pares de bases de longitud. El tallo puede contener apareamientos G-U para estabilizar la estructura de la horquilla.

Las moléculas de ARNic, las moléculas de ARNdc mayores o las moléculas de ARNmi se pueden producir recombinantemente mediante la transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos, preferentemente contenida en un vector. Preferentemente, la molécula de ARNic, la molécula de ARNdc mayor o la molécula de ARNmi comprende una secuencia parcial de una secuencia de nucleótidos de DA2, DA1 o EOD1 de referencia expuesta en el presente documento o una variante de la misma.

En otras realizaciones, el ácido nucleico supresor puede ser un supresor antisentido de la expresión del polipéptido DA1, DA2 y/o EOD1. En el uso de las secuencias antisentido para regular a la baja la expresión génica, se coloca una secuencia de nucleótidos bajo el control de un promotor en una "orientación inversa" de modo que la transcripción produce ARN que es complementario al ARNm normal transcrito a partir de la cadena "sentido" del gen diana. Véase, por ejemplo, Rothstein y col., 1987; Smith y col., (1988) *Nature* 334, 724-726; Zhang y col, (1992) *The Plant Cell* 4, 1.575-1.588, English y col., (1996) *The Plant Cell* 8, 179-188. La tecnología antisentido también se revisa en Bourque, (1995), *Plant Science* 105, 125-149, y Flavell (1994) *PNAS USA* 91, 3.490-3.496.

Un ácido nucleico supresor antisentido puede comprender que una secuencia antisentido de al menos 10 nucleótidos de una secuencia de nucleótidos que es un fragmento de una secuencia de nucleótidos de DA2, DA1 o EOD1 de referencia expuesta en el presente documento o una variante de la misma.

Puede ser preferible que haya identidad de secuencia completa en la secuencia usada para la regulación a la baja de la expresión de una secuencia diana, y la secuencia diana, aunque no es esencial la complementariedad o similitud total de secuencia. Uno o más nucleótidos pueden diferir en la secuencia usada del gen diana. Por tanto, una secuencia empleada en una regulación a la baja de la expresión génica de acuerdo con la presente invención puede ser una secuencia de tipo silvestre (por ejemplo, gen) seleccionada de aquellas disponibles, o una variante de dicha secuencia.

- La secuencia no necesita incluir un marco de lectura abierto o especificar un ARN que sea traducible. Puede ser preferido que haya suficiente homología para las respectivas moléculas de ARN antisentido y sentido para hibridar. Puede haber regulación a la baja de la expresión génica incluso cuando hay aproximadamente 5 %, 10 %, 15 % o 20 % o más desapareamiento entre la secuencia usada y el gen diana. Efectivamente, la homología debería ser suficiente para que tenga lugar la regulación a la baja de la expresión génica.
- Una molécula de ARN supresora puede comprender 10 a 40 nucleótidos de la cadena sentido o antisentido de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica polipéptido DA2, DA1 y/o EOD1.
- Los ácidos nucleicos supresores pueden estar unidos de manera operativa a promotores heterólogos, por ejemplo, promotores específicos a tejido o inducibles. Por ejemplo, se pueden usar promotores específicos a integumento y semilla para regular a la baja específicamente dos o más ácidos nucleicos de DA1, DA2 y/o EOD1 en óvulos y semillas en desarrollo para incrementar el tamaño de semilla final.
- En algunas realizaciones preferidas, el ácido nucleico supresor de DA2 se puede expresar en una célula vegetal con un ácido nucleico que codifica un polipéptido DA1 dominante negativo y opcionalmente un ácido nucleico supresor de EOD1.
- El ácido nucleico que codifica el ácido nucleico supresor y/o un polipéptido DA1 dominante negativo puede estar comprendido en uno o más vectores.
- El ácido nucleico que codifica el(los) ácido(s) nucleico(s) supresor(es) como se describe en el presente documento y/o el polipéptido DA1 dominante negativo pueden estar unidos de manera operativa a una secuencia reguladora heteróloga, tal como un promotor, por ejemplo, un promotor constitutivo, inducible, específico a tejido o de desarrollo como se describió anteriormente.
- El ácido nucleico que codifica el(los) ácido(s) nucleico(s) supresor(es) como se describe en el presente documento y/o los polipéptidos DA1 dominantes negativos pueden estar contenidos en una construcción o vector de ácido nucleico. La construcción o vector es preferentemente adecuada para la transformación en y/o expresión en una célula vegetal. Un vector es, *inter alia*, cualquier plásmido, cósmido, fago o vector binario de *Agrobacterium* en forma lineal o circular de doble cadena o sencilla, el cual puede ser o puede no ser auto-transmisible o movilizable, y el cual puede transformar el hospedador procarionta o eucariota, en particular, un hospedador vegetal, o bien por integración en el genoma celular o salida extracromosómicamente (por ejemplo, plásmido de replicación autónoma con un origen de replicación).
- Específicamente se incluyen vectores lanzaderas por lo cual se quiere decir un vehículo de ADN capaz, de manera natural o por diseño, de replicación en dos organismos diferentes, los cuales se pueden seleccionar de *Actinomyces* y especies relacionadas, bacterias y células eucariotas (por ejemplo, de planta superior, mamífero, levadura u hongo).
- Una construcción o vector que comprende ácido nucleico como se describió anteriormente no necesita incluir un promotor u otra secuencia reguladora, particularmente si el vector es para usarse para introducir el ácido nucleico en las células para la recombinación en el genoma.
- Las construcciones y los vectores además pueden comprender marcadores genéticos seleccionables que consisten en genes que confieren fenotipos seleccionables tales como resistencia a antibióticos tales como kanamicina, higromicina, fosfotricina, clorsulfurón, metotrexato, gentamicina, espectinomicina, imidazolinonas, glifosato y diaminoácidos.
- Los expertos en la técnica pueden construir vectores y diseñar protocolos para la expresión génica recombinante, por ejemplo, en una célula microbiana o vegetal. Los vectores adecuados se pueden elegir o construir, conteniendo secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias como sea apropiado. Para más detalles, véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: a Laboratory Manual": 3ª Edición, Sambrook y col, 2001, "Cold Spring Harbor Laboratory Press and Protocols in Molecular Biology", Segunda Edición, Ausubel y col. eds. John Wiley & Sons, 1992. Los procedimientos y vectores específicos previamente usados con amplio éxito sobre las plantas están descritos por Bevan, *Nucl. Acids Res.* (1984) 12, 8.711-8.721, y Guerineau y Mullineaux, (1993) "Plant transformation and expression vectors. In: Plant Molecular Biology Labfax" (Croy RRD ed) Oxford, BIOS Scientific Publishers, pp 121-148.
- Cuando se introduce una construcción génica elegida en una célula, se deben tener en cuenta ciertas consideraciones, bien conocidas por los expertos en la técnica. El ácido nucleico a insertar se debería reunir dentro de una construcción que contiene elementos reguladores eficaces que conducirán la transcripción. Debe haber disponible un método de transporte de la construcción dentro de la célula. Una vez que la construcción está dentro de la membrana celular, ocurrirá o no la integración en el material cromosómico endógeno. Finalmente, el tipo de célula diana es preferentemente de modo que las células se pueden regenerar en plantas completas.



Es deseable usar una construcción y el método de transformación que aumenta la expresión del ácido nucleico que codifica el ácido nucleico supresor o polipéptido DA1 dominante negativo. La integración de una copia única del gen dentro del genoma de la célula vegetal puede ser beneficioso para minimizar los efectos del silenciamiento génico. Igualmente, el control de la complejidad de la integración puede ser beneficioso a este respecto. De particular interés a este respecto es la transformación de las células vegetales que utilizan una construcción de expresión génica mínima según, por ejemplo, la Patente Europea N.º EP1407000B1.

Las técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica se pueden usar para introducir las construcciones de ácido nucleico y los vectores en las células vegetales para producir plantas transgénicas con las propiedades descritas en el presente documento.

La transformación en *Agrobacterium* es un método muy usado por los expertos en la técnica para transformar especies vegetales. La producción de plantas transgénicas fértiles estables es ahora rutinaria en la técnica (véase, por ejemplo, Toriyama, y col. (1988) *Bio/Technology* 6, 1.072-1.074; Zhang, y col. (1988) *Plant Cell Rep.* 7, 379-384; Zhang, y col. (1988) *Theor. Appl. Genet* 76, 835-840; Shimamoto, y col. (1989) *Nature* 338, 274-276; Datta, y col. (1990) *Bio/Technology* 8, 736-740; Christou, y col. (1991) *Bio/Technology* 9, 957-962; Peng, y col. (1991) *International Rice Research Institute*, Manila, Filipinas 563-574; Cao, y col. (1992) *Plant Cell Rep.* 11, 585-591; Li, y col. (1993) *Plant Cell Rep.* 12, 250-255; Rathore, y col. (1993) *Plant Molecular Biology* 21, 871-884; Fromm, y col. (1990) *Bio/Technology* 8, 833-839; Gordon-Kamm, y col. (1990) *Plant Cell* 2, 603-618; D'Halluin, y col. (1992) *Plant Cell* 4, 1.495-1.505; Walters, y col. (1992) *Plant Molecular Biology* 18, 189-200; Koziel, y col. (1993) *Biotechnology* 11, 194-200; Vasil, I.K. (1994) *Plant Molecular Biology* 25, 925-937; Weeks, y col. (1993) *Plant Physiology* 102, 1.077-1.084; Somers, y col. (1992) *Bio/Technology* 10, 1.589-1.594; WO92/14828; Nilsson, O. y col (1992) *Transgenic Research* 1, 209-220).

Otros métodos, tales como bombardeo de microproyectil o partículas (documentos US 5100792, EP-A-444882, EP-A-434616), electroporación (documentos EP 290395, WO 8706614), microinyección (documentos WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083, EP 175966, Green y col. (1987) "Plant Tissue and Cell Culture", Academic Press), captación directa de ADN (documentos DE 4005152, WO 9012096, US 4684611), captación de ADN mediada por liposoma (por ejemplo, Freeman y col. *Plant Cell Physiol.* 29:1.353 (1984)) o el método de vórtice (por ejemplo, Kindle, *PNAS U.S.A.* 87:1.228 (1990d)) pueden ser preferidos cuando la transformación en *Agrobacterium* es ineficaz o ineficiente, por ejemplo, en alguna especie de gimnosperma. Los métodos físicos para la transformación de las células vegetales se revisan en Oard, 1991, *Biotech. Adv.* 9:1-11.

Alternativamente, una combinación de diferentes técnicas se pueden emplear para aumentar la eficiencia del proceso de transformación, por ejemplo, bombardeo con micropartículas revestidas con *Agrobacterium* (documento EP-A-486234) o bombardeo con microproyectiles para inducir la formación de herida seguido de cocultivo con *Agrobacterium* (documento EP-A-486233).

Después de la transformación, una planta se puede regenerar a partir de, por ejemplo, células únicas, tejido de callo o discos de hojas, como es normal en la técnica. Casi cualquier planta se puede regenerar enteramente a partir de células, tejidos y órganos de la planta. Las técnicas disponibles se revisan en Vasil y col., "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol I, II and III, Laboratory Procedures and Their Applications", Academic Press, 1984, y Weissbach y Weissbach, "Methods for Plant Molecular Biology", Academic Press, 1989.

La elección particular de una tecnología de transformación se determinará por su eficiencia para transformar cierta especie vegetal así como la experiencia y la preferencia de la persona que pone en práctica la invención con una metodología particular de elección. Estará claro para el experto en la técnica que la elección particular de un sistema de transformación para introducir ácido nucleico en células vegetales no es esencial para o una limitación de la invención, tampoco es la elección de la técnica para la regeneración vegetal.

Después de la transformación, se puede identificar y/o seleccionar una célula vegetal con expresión de DA2 reducida y expresión o actividad de DA1 o DA1 y EOD1 reducida. Una planta se puede regenerar a partir de la célula vegetal.

Una planta con actividad o expresión de DA2 reducida que es también deficiente en la expresión o actividad de DA1 o tanto DA1 como EOD1, como se describió anteriormente se puede propagar asexualmente o cultivar para producir descendencia o descendientes. La descendencia o descendientes de la planta regenerada a partir de la una o más células se puede propagar asexualmente o cultivar.

La secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de DA1, DA2 y/o EOD1 se puede emplear como un marcador molecular para determinar la expresión o actividad de uno o más de los polipéptidos DA1, DA2 y/o EOD1 en una planta antes, durante o después de cultivar o propagar asexualmente como se expuso anteriormente. Un método puede comprender:

proporcionar una población de plantas,

determinar la cantidad de expresión de un polipéptido DA1, DA2 y/o EOD1 en una o más plantas en la población, e  
 identificar una o más plantas en la población con la expresión reducida del polipéptido DA1, DA2 y/o EOD1 en relación con los otros miembros de dicha población.

5 La población de las plantas se pueden producir como se describió anteriormente.

En algunas realizaciones, un método puede comprender:

10 cruzar una primera y segunda planta para producir una población de plantas progenie;  
 determinar la expresión de uno o más de los polipéptidos DA1, DA2 y/o EOD1 en las plantas progenie en la población, e  
 identificar una planta progenie en la población en la que la expresión del polipéptido DA1, DA2 y/o EOD1 se reduce en relación con los controles.

15 Una o ambas de la primera y segunda planta se pueden producir como se describió anteriormente.

Una planta progenie en la que la expresión del polipéptido DA1, DA2 y/o EOD1 se reduce en relación con los controles (por ejemplo, otros miembros de la población) puede manifestar tamaño de semilla y/u órgano incrementado en relación con los controles y puede tener rendimientos vegetales mayores.

20 En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos de DA1 y EOD1 se pueden emplear como un marcador molecular para determinar la expresión o actividad de uno o más polipéptidos DA1 y/o EOD1 en una planta para identificar una planta o célula vegetal deficiente en DA1 y/o EOD1 en la cual la expresión o actividad de un polipéptido DA2 se puede reducir como se describió anteriormente. Un método puede comprender:

25 proporcionar una población de plantas,  
 determinar la cantidad de expresión de un polipéptido DA1 y/o EOD1 en una o más plantas en la población, e  
 30 identificar una o más plantas en la población con expresión reducida del polipéptido DA1 y/o EOD1 en relación con los otros miembros de dicha población.

La expresión o actividad de DA2 se puede reducir en las plantas identificadas con los métodos anteriormente descritos.

35 Una planta o planta progenie se puede identificar i) midiendo la cantidad de polipéptido DA1, DA2 y/o EOD1 en una o más células de la planta ii) midiendo la cantidad de ARNm de DA1, DA2 y/o EOD1 en una o más células de la planta o iii) secuenciando el ácido nucleico que codifica el polipéptido DA1, DA2 y/o EOD1 en una o más células de la planta e identificando la presencia de una o más mutaciones.

40 En algunas realizaciones, la cantidad de expresión de DA1, DA2 y/o EOD1 se puede determinar en el nivel de proteína. Un método puede comprender:

45 proporcionar una población de plantas,  
 determinar la cantidad polipéptido DA1, DA2 y/o EOD1 en una o más plantas en dicha población, e  
 identificar una o más plantas en la población con cantidad reducida de un polipéptido DA1, DA2 y/o EOD1 en relación con otros miembros de dicha población.

50 Convenientemente, se pueden emplear técnicas inmunológicas, tales como la transferencia Western, usando anticuerpos que se unen al polipéptido DA1, DA2 o EOD1 y muestran poca o ninguna unión a otros antígenos en la planta. Por ejemplo, la cantidad de un polipéptido DA1, DA2 o EOD1 en una célula vegetal se puede determinar poniendo en contacto una muestra que comprende la célula vegetal con un anticuerpo u otro miembro de unión específica dirigido al polipéptido DA1, DA2 o EOD1, y determinando la unión del polipéptido DA1, DA2 o EOD1 a la muestra. La cantidad de unión del miembro de unión específico es indicativo de la cantidad de polipéptido DA1, DA2 o EOD1 que se expresa en la célula.

55 La cantidad de polipéptido DA1, DA2 y/o EOD1 se puede determinar en una o más células de la planta, preferentemente células de una parte o tejido aéreo de la planta, tal como el sistema vascular y los meristemos primarios y secundarios en el brote.

60 En otras realizaciones, la expresión del polipéptido DA1, DA2 o EOD1 se puede determinar al nivel de ácido nucleico. Por ejemplo, se puede determinar la cantidad de ácido nucleico que codifica un polipéptido DA1, DA2 o EOD1. Un método de producción de una planta que tiene caracteres relacionados con el rendimiento incrementado puede comprender:

65 proporcionar una población de plantas,

determinar el nivel o la cantidad de ácido nucleico, por ejemplo ARNm, que codifica el polipéptido DA1, DA2 o EOD1 en una célula de una o más plantas en dicha población, e identificar una o más plantas en la población con cantidad reducida de un ácido nucleico codificante de DA1, DA2 o EOD1 en relación con otros miembros de dicha población.

5 El nivel o la cantidad de ácido nucleico codificante en una célula vegetal se puede determinar, por ejemplo, detectando la cantidad de ácido nucleico codificante transcrito en la célula. Esto se puede realizar usando técnicas convencionales tales como transferencia Northern o RT-PCR.

10 Alternativamente, se pueden determinar la presencia de variaciones de secuencia que afectan a la expresión o actividad de un polipéptido DA1, DA2 o EOD1. Otro método de producción de una planta que tiene crecimiento incrementado y/o biomasa puede comprender:

15 proporcionar una población de plantas, determinar la presencia de una o más variaciones de secuencia, por ejemplo, polimorfismos, mutaciones o regiones de hipermetilación, en un ácido nucleico que codifica un polipéptido DA1, DA2 y/o EOD1 en una célula en una o más plantas de dicha población, en el que dicha una o más variaciones de secuencia que reducen la expresión o actividad del polipéptido DA1, DA2 y/o EOD1 codificado, e  
20 identificar una o más plantas en la población con una o más variaciones de secuencia que reducen la expresión o actividad de DA1, DA2 y/o EOD1 en relación con otros miembros de dicha población.

Los polipéptidos DA1, DA2 y/o EOD1 y el ácido nucleico codificante se describieron a más detalle anteriormente.

25 La presencia de una o más variaciones de secuencia en un ácido nucleico se puede determinar detectando la presencia de la secuencia de ácido nucleico variante en una o más células vegetales o detectando la presencia del polipéptido variante que está codificado por la secuencia de ácido nucleico. Las técnicas de detección de variación de secuencia de ácidos nucleicos preferidas incluyen la amplificación específica de alelo ARMS™, OLA, ALEX™, COPS, Taqman, Balizas Moleculares, RFLP, y técnicas de PCR y FRET basadas en el sitio de restricción.

30 Numerosos métodos adecuados para determinar la cantidad de un ácido nucleico que codifica un polipéptido DA1, DA2 o EOD1, o la presencia o ausencia de la variación de secuencia en un ácido nucleico que codifica un polipéptido DA1, DA2 o EOD1, en una célula vegetal, están disponibles en la técnica (véase, por ejemplo, (véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: a Laboratory Manual": 3ª edición, Sambrook & Russell (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press NY; "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel y col. eds. John Wiley & Sons (1992); "DNA Cloning, The Practical Approach Series" (1995), serie eds. D. Rickwood and B.D. Hames, IRL Press, Oxford, UK y "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (Innis, y col. 1990. Academic Press, San Diego, Calif.)). Muchos métodos actuales para la detección de la variación de secuencia están revisados por Nollau y col., *Clin. Chem.* 43, 1.114-1.120, 1997; y en libros de texto convencionales, por ejemplo "Laboratory Protocols for Mutation Detection", Ed. por U. Landegren, Oxford University Press, 1996 y "PCR", 2ª Edición por Newton & Graham, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997.

45 Técnicas de variación de secuencia de polipéptido preferidas incluyen inmunoensayos, los cuales son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, "A Practical Guide to ELISA" de D.M Kemeny, Pergamon Press 1991; "Principles and Practice of Immunoassay", 2ª edición, C.P Price & D.J Newman, 1997, publicado por Stockton Press en EEUU & Canadá y por Macmillan Reference en el Reino Unido.

50 En algunas realizaciones, el ácido nucleico o una región amplificada del mismo se puede secuenciar para identificar o determinar la presencia de polimorfismo o mutación en el mismo. Un polimorfismo o mutación se puede identificar comparando la secuencia obtenida con la secuencia conocida de DA1, DA2 o EOD1, por ejemplo, como se expone en las bases de datos de secuencia. Alternativamente, se puede comparar con la secuencia del correspondiente ácido nucleico de las células control. En particular, se puede determinar la presencia de uno o más polimorfismos o mutaciones que causan reducción pero no abrogación total de la función. La secuenciación se puede realizar usando una cualquiera de un rango de secuencias patrones. La secuenciación de un producto amplificado puede, por ejemplo, implicar la precipitación con isopropanol, resuspensión y secuenciación usando un kit de secuenciación de terminador por Colorante TaqFS+ (por ejemplo, de GE Healthcare UK Ltd UK). Los productos de extensión se pueden someter a electroforesis en un secuenciador de ADN ABI 377 y los datos se analizan usando el programa informático "Sequence Navigator".

60 Una planta progenie identificada por tener expresión de DA1, DA2 y/o EOD1 reducida se puede ensayar para caracteres relacionados con el rendimiento incrementado o aumentado, tales como el tamaño de semilla u órgano incrementado, en relación con los controles.

65 La planta progenie identificada se puede ensayar para el tamaño de semilla, tamaño de órgano y/o rendimiento vegetal en relación con los controles.

Una planta producida como se describe en el presente documento puede ser deficiente en expresión o actividad de DA2 y puede ser además deficiente en expresión o actividad de DA1, expresión o actividad de EOD1 o tanto expresión o actividad de DA1 como EOD1.

5 La expresión o actividad de DA2, DA1 y EOD1 se puede reducir o abolir en la planta mediante mutación de uno o más nucleótidos en la secuencia codificante de la planta y/o mediante la expresión de un ácido nucleico heterólogo que codifica un ácido nucleico supresor. En algunas realizaciones preferidas, la actividad de DA1 se puede reducir o abolir en la planta mediante la expresión de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido DA1 dominante negativo.

10 Por tanto, una planta puede comprender ácido nucleico heterólogo que codifica un ácido nucleico supresor, tal como un ARNic o ARNhc, que reduce la expresión de uno o más de DA1, DA2 y EOD1 o que codifica un polipéptido DA1 dominante negativo.

15 Se puede emplear cualquier combinación de mutaciones, ácidos nucleicos supresores en una planta como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una planta puede comprender i) una mutación que reduce la actividad o expresión de DA2, un ácido nucleico heterólogo que codifica un ácido nucleico supresor que reduce la expresión de EOD1 y un ácido nucleico heterólogo que codifica un ácido nucleico que codifica un polipéptido DA1 dominante negativo; ii) un ácido nucleico heterólogo que codifica un ácido nucleico supresor que reduce la expresión de DA2 o la expresión, una mutación que reduce la expresión de EOD1 y un ácido nucleico heterólogo que codifica un ácido nucleico que codifica un polipéptido DA1 dominante negativo iii) ácidos nucleicos heterólogos que codifican los ácidos nucleicos supresores que reducen la expresión de EOD1 y DA2 y un ácido nucleico heterólogo que codifica un ácido nucleico que codifica un polipéptido DA1 dominante negativo, o iv) mutación que reduce la actividad o expresión de EOD1 y DA2 y un ácido nucleico heterólogo que codifica un ácido nucleico que codifica un polipéptido DA1 dominante negativo.

20 En otras realizaciones, una planta puede comprender i) una mutación que reduce la actividad o expresión de DA2, un ácido nucleico heterólogo que codifica un ácido nucleico supresor que reduce la expresión de DA1 ii) un ácido nucleico heterólogo que codifica un ácido nucleico supresor que reduce la expresión o expresión de DA2, una mutación que reduce la expresión de DA1 iii) ácidos nucleicos heterólogos que codifican los ácidos nucleicos supresores que reducen la expresión de DA1 y DA2, iv) mutaciones que reducen la actividad o expresión de DA1 y DA2 o v) una mutación que reduce la actividad o expresión de DA2 o un ácido nucleico heterólogo que codifica un ácido nucleico supresor que reduce la expresión de DA2 y un ácido nucleico heterólogo que codifica un ácido nucleico que codifica un polipéptido DA1 dominante negativo.

30 Los ácidos nucleicos heterólogos que codifican el polipéptido DA1 dominante negativo y/o los ácidos nucleicos supresores pueden estar en los mismos o diferentes vectores de expresión y se pueden incorporar en la célula vegetal mediante técnicas convencionales.

35 Ejemplos de plantas adecuadas para su uso como se describe en el presente documento incluyen planta superior monocotiledónea y dicotiledónea, por ejemplo, una planta agrícola o de cultivo, tal como una planta seleccionada del grupo que consiste en *Lithospermum erythrorhizon*, *Taxus* spp, tabaco, cucurbitáceas, zanahoria, *Brassica* de verdura, melones, pimientos, vides, lechuga, fresa, *Brassica* de semilla oleaginosa, remolacha azucarera, trigo, cebada, maíz, arroz, sojas, guisantes, sorgo, girasol, tomate, patata, pimienta, crisantemos, clavel, linaza, cáñamo y centeno.

40 Una planta producida como se describió anteriormente se puede propagar asexualmente o cultivar para producir descendencia o descendientes. La descendencia o descendientes de la planta regenerada a partir de la una o más células se pueden propagar asexualmente o cultivar.

50 En el presente documento también se describe una planta transgénica que tiene expresión o actividad reducida o abolida del polipéptido DA2 dentro de una o más células de la misma, en el que la planta es deficiente en la expresión o actividad de DA1 o tanto DA1 como EOD1.

55 La planta puede comprender un ácido nucleico exógeno que reduce o abole la expresión o actividad de uno o más de DA2, DA1 y EOD1. En algunas realizaciones, la planta transgénica puede expresar un polipéptido DA1 dominante negativo que reduce la actividad de DA1.

60 En algunas realizaciones, la planta puede tener expresión reducida o abolida de DA1, DA2 y EOD1 o puede tener expresión reducida o abolida de DA2 y EOD1 y puede expresar un DA1 dominante negativo.

Además de una planta producida por un método descrito en el presente documento, la invención abarca cualquier clon de dicha planta, semilla, progenie propia o híbrida y descendientes, y cualquier parte o propágulo de cualquiera de estas, tal como esquejes y semilla, que se pueden usar en reproducción o propagación, sexual o asexual. La invención también abarca una planta que es una descendencia propagada asexualmente, clon o descendiente de dicha planta, o cualquier parte o propágulo de dicha planta, descendencia, clon o descendiente.

Una planta adecuada se puede producir mediante un método anteriormente descrito.

La planta puede tener rendimiento incrementado en relación con el control de plantas de tipo silvestre (es decir, plantas idénticas en las que la expresión o actividad de DA2 y DA1, o DA2, DA1 y EOD1 no se ha reducido). Por ejemplo, la masa de semillas (por ejemplo, grano) u otro producto vegetal por unidad de área se puede incrementar en relación con las plantas control.

Por ejemplo, se pueden mejorar uno o más caracteres relacionados con el rendimiento en la planta. Los caracteres relacionados con el rendimiento pueden incluir vida útil, tamaño de órgano y tamaño de semilla.

Un carácter relacionado con el rendimiento se puede mejorar, incrementar o aumentar en la planta en relación con las plantas control en las que la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido DA2 no está abolido o reducido (es decir, plantas idénticas en las que la expresión de DA2 y opcionalmente DA1 y/o EOD1 no se ha reducido o abolido).

En el presente documento se muestra que DA1 interactúa físicamente con DA2 *in vivo*. Los compuestos que alteran o interfieren con la interacción pueden ser útiles en el incremento del tamaño de semilla u órgano y el mejoramiento del rendimiento vegetal.

Un método de identificación de un compuesto que incrementa el rendimiento vegetal puede comprender; determinar el efecto de un compuesto de ensayo sobre la unión de un polipéptido DA2 a un polipéptido DA1, una reducción o abolición de la unión siendo indicativo de que el compuesto puede ser útil en el incremento del rendimiento vegetal.

Anteriormente se describieron a más detalle los polipéptidos DA1 y DA2 .

Los polipéptidos DA1 y DA2 se pueden aislar o se pueden expresar recombinante o endógenamente en una célula vegetal.

Un compuesto que reduce o abole la unión DA1/DA2 puede ser útil en el tratamiento de plantas para incrementar el rendimiento.

"y/o" cuando se usa en el presente documento se puede tomar como descripción específica de cada uno de los dos rasgos o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo "A y/o B" es para ser tomado como descripción específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, justo como si cada uno está expuesto individualmente en el presente documento.

A menos que el contexto dicte lo contrario, las descripciones y definiciones de los rasgos expuestos anteriormente no se limitan a cualquier aspecto o realización particular de la invención y se aplican igualmente a todos los aspectos y realizaciones que se describen.

Otros aspectos y realizaciones de la invención proporcionan los aspectos y realizaciones descritas anteriormente con el término "que comprende" reemplazado por el término "que consiste en" y los aspectos y las realizaciones descritas anteriormente con el término "que comprende" reemplazado por el término "que consiste básicamente en".

## Experimentos

### 1. Métodos

#### 1.1 Materiales vegetales y condiciones de crecimiento

El ecotipo Columbia de *Arabidopsis* (Col-0) era la línea de tipo silvestre usada. Todos los mutantes estaban en el contexto de Col-0. *da2-1* (SALK\_150003) se obtuvo de las colecciones de ABRC y el "Arabidopsis Stock Centre" NASC. La inserción del ADN-T se confirmó por PCR y secuenciación. Las semillas se esterilizaron en superficie con isopropanol al 100 % durante 1 min y 10 % (v/v) de lejía doméstica durante 10 min, se lavaron al menos tres veces con agua estéril, se estratificaron a 4 °C durante 3 d en oscuridad, se dispersaron sobre medio GM con agar al 0,9 % y glucosa al 1 % y, a continuación, se cultivaron a 22 °C. Las plantas se cultivaron bajo la condición de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) a 22 °C.

#### 1.2 Construcciones y transformación

La construcción *pDA2:DA2* se realizó usando un sistema Gateway basado en PCR. La secuencia promotor de 1.960 pb de *DA2* se amplificó usando los cebadores DA2proGW-F y DA2proGW-R. A continuación, los productos de PCR se clonaron al vector de clonación *pCR8/GW/TOPO TA* (Invitrogen). La CDS de *DA2* se amplificó y los productos de PCR, a continuación, se clonaron a los sitios *AscI* y *KpnI* del vector Gateway *pMDC110* para obtener el plásmido *DA2CDS-pMDC110*. El promotor de *DA2*, a continuación, se subclonó al *DA2CDS-pMDC110* por la reacción LR para generar la construcción *pDA2:DA2*. El plásmido *pDA2:DA2* se introdujo en las plantas mutantes *da2-1* usando

*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 y los transformantes se seleccionaron sobre medio que contenía higromicina (30 µg/ml).

5 La construcción 35S:DA2 se realizó usando un sistema Gateway basado en PCR. Los productos de PCR se subclonaron en el vector de clonación *pCR8/GW/TOPO TA* (Invitrogen) usando enzima TOPO. A continuación, el gen *DA2* se subclonó en el vector binario Gateway *pMDC32* que contenía el promotor 35S (Curtis y Grossniklaus, 2003). El plásmido 35S:DA2 se introdujo en las plantas Col-0 usando *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 y los transformantes se seleccionaron sobre medio que contenía higromicina (30 µg/ml).

10 La secuencia del promotor de 1.960 pb de *DA2* se amplificó y los productos de PCR se clonaron al vector *pGEM-T* (Programa) usando T4 ADN ligasa y se secuenció. El promotor de *DA2*, a continuación, se insertó en los sitios *SacI* y *NcoI* del vector binario *pGreen-GUS* (Curtis y Grossniklaus, 2003) para generar el plásmido de transformación *pDA2:GUS*. El plásmido *pDA2:GUS* se introdujo en plantas Col-0 usando *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 y los transformantes se seleccionaron sobre medio que contenía kanamicina (50 µg/ml). La construcción 35S:GW2 se realizó usando un sistema Gateway basado en PCR. Los productos de PCR se subclonaron en el vector de clonación *pCR8/GW/TOPO TA* (Invitrogen) usando la enzima TOPO. El gene *GW2*, a continuación, se subclonó en el vector binario Gateway *pMDC32* que contenía el promotor 35S (Curtis y Grossniklaus, 2003). El plásmido 35S:GW2 se introdujo en plantas Col-0 usando *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 y los transformantes se seleccionaron sobre medio que contenía higromicina (30 µg/ml).

### 20 1.3 Morfología y análisis celular

Se determinó el peso de semilla promedio pesando semillas secas maduras en lotes de 500 usando una balanza analítica electrónica (METTLER MOLEDO AL104 CHINA). Los pesos de los cinco lotes de muestra se midieron para cada lote de semilla. Las semillas se fotografiaron bajo microscopio Leica (LEICA S8APO) usando un Leica CCD (DFC420) y se midió el tamaño de semilla usando el programa informático "Image J". Las medidas de área de los pétalos (fase 14), hojas y cotiledones se realizaron escaneando los órganos para producir una imagen digital, y, a continuación, calculando el área, longitud y ancho usando el programa informático "Image J". Los tamaños de hoja, pétalo y embrión se midieron a partir de las imágenes de DIC. La acumulación de biomasa en flores (fase 14) se midió pesando los órganos.

### 30 1.4 Tinción de GUS

Las muestras (*pDA2:GUS*) se tiñeron en una solución de X-gluc 1 mM, tampón Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, 3 mM de cada K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, EDTA 10 mM, y 0,1 % de Nodidet-P40, y se incubaron a temperatura ambiente durante 6 horas. Después de la tinción de GUS se separó la clorofila usando etanol al 70 %.

### 35 1.5 Aislación de ARN, RT-PCR y análisis por RT-PCR a tiempo real cuantitativa

40 El ARN total se extrajo de raíces, tallos, hojas, plantones e inflorescencias de *Arabidopsis* usando un Rneasy Plant Mini kit (TIANGEN, China). La transcripción inversa (RT)-PCR se realizó como se describe (Li y col., 2006). Las muestras de ADNc se estandarizaron sobre la cantidad de transcrito de actina usando los cebadores ACTIN2-F y ACTIN2-R. El análisis por RT-PCR a tiempo real cuantitativa se realizó con un motor lightcycler 480 (Roche) usando el lightcycler 480 SYBR Green Master (Roche). El ARNm de *ACTIN7* se usó como un control interno, y las cantidades relativas de ARNm se calcularon usando el método de ciclo umbral comparativo.

### 45 1.6 Ensayo de la actividad E3 ubiquitina ligasa

La secuencia codificante de *DA2* se clonó en los sitios *BamH I* y *PstI* del vector *pMAL-C2* para generar la construcción *MBP-DA2*. Las *DA2* (*DA2C59S* y *DA2N91L*) mutadas se generaron siguiendo el siguiente manual de instrucciones del kit de mutagénesis dirigida a multisitio (Stratagene).

Los lisados bacterianos que expresan MBP-DA2 y MBP-DA2 mutada se prepararon a partir de *E. coli* BL21 inducida con IPTG 0,4 mM durante 2 horas. Las bacterias se lisaron en tampón de lisis TGH (HEPES 50 mM [pH 7,5], NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, EGTA 1 mM, 1 % de Triton X-100, 10 % de glicerol, y coctel inhibidor de proteasa [Roche]) y se sometió a sonicación. Los lisados se aclararon por centrifugación y se incubaron con amilosa resina (New England Biolabs) a 4 °C durante 30 min. Las perlas se lavaron por tampón de columna (Tris 20 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM) y se equilibraron mediante el tampón de reacción (Tris 50 mM pH 7,4, DTT 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP 2 mM). 110 ng de E1 (Boston Biochem), 170 ng de E2 (Boston Biochem), 1 µg de His-ubiquitina (Sigma-Aldrich), y 2 µg de proteína de fusión DA2-MBP mutada o DA2-MBP se incubó en 20 µl de tampón de reacción durante 2 horas a 30 °C.

Las proteínas poliubiquitinadas se detectaron por inmunotransferencia con un anticuerpo frente a His (Abmart) y un anticuerpo frente a MBP (New England Biolabs).

65

### 1.7 Interacción proteína-proteína *in vitro*

Las secuencias codificantes de derivados de *DA1*, *da1-1*, y *DA1* que contienen dominios de proteína específicos se clonaron en los sitios *BamHI* y *NotI* del vector *pGEX-4T-1* para generar construcciones *GST-DA1*, *GST-DA1R358K*, *GST-DA1-UIM*, y *GST-DA1-LIM+C*, y sitios *EcoRI* y *XhoI* del vector *pGEX-4T-1* para generar construcciones *GST-DA1-LIM* y *GSTDA1-C*.

Para ensayar la interacción proteína-proteína, los lisados bacterianos que contenían aproximadamente 15 µg de proteínas de fusión MBP-DA2 se combinaron con lisados que contenían aproximadamente 30 µg de proteínas de fusión *GST-DA1*, *GST-DA1R358K*, *GST-DA1-UIM*, *GST-DA1-LIM*, *GST-DA1-LIM+C* o *GST-DA1-C*. Se añadieron 20 µl de amilosa resina (New England Biolabs) en cada solución combinada con balanceo continuado a 4 °C durante 1 hora. Las perlas se lavaron veces con tampón TGH, y las proteínas aisladas se separaron sobre gel de SDS-poliacrilamida al 10 % y se detectaron por análisis de transferencia western con anticuerpos anti-GST (Abmart) y anti-MBP (Abmart), respectivamente.

### 1.8 Co-inmunoprecipitación

La secuencia codificante de *DA1* y *DA1-C* se clonó en los sitios *KpnI* y *BamHI* del vector *pCAMBIA1300-221-Myc* para generar el plásmido de transformación *35S::Myc-DA1* y *35S::Myc-DA1-C*. Los productos de PCR se subclonaron en el vector de clonación *pCR8/GW/TOPO TA* (Invitrogen) usando la enzima TOPO. El gen *DA2*, a continuación, se subclonó en el vector binario Gateway *pMDC43* que contenía el promotor 35S y el gen *GFP* (Curtis y Grossniklaus, 2003). Los productos de PCR se subclonaron en el vector de clonación *pCR8/GW/TOPO TA* (Invitrogen) usando la enzima TOPO. El gen *PEX10*, a continuación, se subclonó en el vector binario Gateway *pH7FWG2* que contenía el promotor 35S y el gen *GFP*.

Las hojas de *Nicotiana benthamiana* se transformaron por inyección de células de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 que portaban los plásmidos *35S::Myc-DA1* y *35S::GFP-DA2* como se describió previamente (Voinnet y col, 2003). La proteína total se extrajo con tampón de extracción (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 20 % de glicerol, 2 % de Triton X-100, EDTA 1mM, 1x coctel completo de inhibidor de proteasa (Roche) y MG132 20 µg/ml) y se incubaron con GFP-Trap-A (Chromotek) durante 1 hora a 4 °C. Las perlas se lavaron 3 veces con tampón de lavado (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,1 % de Triton X-100 y 1x coctel completo de inhibidor de proteasa (Roche)). Los inmunoprecipitados se separaron en gel de SDS-poliacrilamida al 10 % y se detectaron por análisis de transferencia western con anticuerpos anti-GFP (Beyotime) y anti-Myc (Abmart), respectivamente.

### 1.9 Números de acceso

Los identificadores del locus Iniciativo del Genoma de *Arabidopsis* para los genes de *Arabidopsis* mencionados en el presente documento son los siguientes: At1g19270 (NP\_173361.1 GI:15221983) (*DA1*), At4g36860 (NP\_195404.6 GI:240256211) (*DAR1*), Atlg78420 (NP\_001185425.1 GI:334183988) (*DA2*), At1g17145 (NP\_564016.1 GI:18394446) (*DA2L*), y At3g63530 (NP\_001030922.1 GI:79316205) (*EOD1/BB*).

## 2. Resultados

### 2.1 El mutante *da2-1* produce semillas grandes

Para entender más los mecanismos del control mediado por ubiquitina del tamaño de semilla, recogimos las líneas de inserción de ADN-T públicamente disponibles de algunos genes de ubiquitina ligasa previstos que se expresaron en óvulos y/o semillas de *Arabidopsis* en varios estudios de micromatriz y se investigaron sus fenotipos de crecimiento de semilla. A partir de este cribado, identificamos varios mutantes de inserción de ADN-T con tamaño de semilla alterada. Diseñamos uno de estos mutantes *da2-1*, en referencia al orden de descubrimiento para los mutantes de tamaño de semilla grande (DA significa "grande" en Chino). Las semillas producidas por *da2-1* eran mayores y más pesadas que las semillas de tipo silvestre (Figuras 1A, 3C y 3D). El número de semilla por silicua y el rendimiento de semilla por planta en *da2-1* era ligeramente mayor que en aquellas de tipo silvestre (Figuras 1B y 1C). Por el contrario, el número total de semillas por planta en *da2-1* no se incrementó significativamente, en comparación con el del tipo silvestre (Figura 1D). Las plantas *da2-1* eran mayores que las plantas de tipo silvestre en la fase madura (Figura 1E). Además, las plantas mutantes *da2-1* formaron flores y hojas grandes así como biomasa incrementada en comparación con las plantas de tipo silvestre (Figura 2; Figura 15). El tamaño incrementado de los pétalos y las hojas del mutante *da2-1* no estaba causado por células mayores (Figura 15), indicando que es el número de células de pétalo y hoja el que es mayor.

### 2.2 *DA2* actúa sinérgicamente con *DA1* para controlar el tamaño de semilla, pero no así independientemente de *EOD1*

El mutante *da2-1* mostró un fenotipo de tamaño de semilla débil pero similar a *da1-1* (Li y col., 2008), proporcionando el indicio de que *DA1* y *DA2* podrían funcionar en una ruta común. Para ensayar una interacción genética entre *DA1* y *DA2*, generamos un mutante doble *da1-1 da2-1* y se determinó su tamaño de semilla. Aunque

el mutante *da2-1* tenía semillas ligeramente más grandes y pesadas que el tipo silvestre (Figuras 1A, 3C y 3D), la mutación *da2-1* aumentó sinérgicamente los fenotipos de tamaño y peso de semilla de *da1-1* (Figuras 3A y 3C), revelando una interacción genética sinérgica entre *DA1* y *DA2* en tamaño de semilla. Los cambios en el tamaño de semilla se reflejaron en el tamaño de los embriones y los plántones resultantes (Figura 3B). Además medimos el área de cotiledón de plántones de 10 días. También se observó un aumento sinérgico del tamaño de cotiledón de *da1-1* por la mutación *da2-1* (Figuras 3B y 4).

La proteína mutante codificada por el alelo *da1-1* tiene una actividad negativa hacia *DA1* y una proteína relacionada con *DA1* (*DAR1*), el miembro de la familia más estrechamente relacionado (Li y col., 2008).

Los mutantes de inserción en ADN-T de *da1-ko1 dar1-1* dobles presentaron los fenotipos de *da1-1*, mientras que los mutantes sencillos *da1-ko1* y *dar1-1* no mostraron un fenotipo de tamaño de semilla obvio (Li y col., 2008). Ya que *da1-1* y *da2-1* actúan sinérgicamente para incrementar el tamaño de semilla, uno se esperaría que el *da1-ko1* pudiera aumentar sinérgicamente los fenotipos de *da2-1*. Para ensayar esto, generamos el mutante doble *da1-ko1 da2-1*. Como se muestra en la Figura 3D, el tamaño de semilla y los fenotipos de peso de *da2-1* también se aumentaron sinérgicamente por la mutación *da1-ko1*. Además medimos el área de cotiledón de plántones de 10 días. La mutación *da1-ko1* aumentó sinérgicamente el fenotipo de tamaño de cotiledón de *da2-1* (Figura 4, parte superior derecha). Igualmente, también se observó un aumento sinérgico del tamaño de pétalo de *da2-1* por la mutación *da1-ko1* (Figura 16D). Estos resultados además demuestran los efectos sinérgicos de la alteración simultánea de tanto *DA1* como *DA2*.

Además medimos el tamaño de las células embrionarias y las células epidérmicas de pétalo. El tamaño de la célula en mutantes dobles *da1-1 da2-1* y *da1-ko1 da2-1* no se incrementó, en comparación con el medido en sus líneas parentales (Figura 4 parte inferior izquierda; Figura 16E), proporcionando el indicio de que *DA1* y *DA2* actúan sinérgicamente para restringir los procesos de proliferación celular.

El mutante doble *da1-1 da2-1* tenía semillas mayores que los mutantes dobles *da1-ko1 da2-1* (Figuras 3C, 3D y 4), lo cual es coherente con nuestro informe previo de que el alelo *da1-1* tenía fenotipos más fuertes que *da1-ko1* (Li y col., 2008). El tamaño de las semillas *da1-1* era similar al de las semillas del mutante doble *da1-ko1 dar1-1* debido a que el alelo de *da1-1* tiene una actividad negativa hacia *DA1* y *DAR1* (Figura 4 parte inferior derecha) (Li y col., 2008). Por lo tanto, uno esperaría que el tamaño de las semillas del mutante doble *da1-1 da2-1* pudieran ser similares al de las semillas del mutante triple *da1-ko1 dar1-1 da2-1*. Por lo tanto, generamos un mutante triple *da1-ko1 dar1-1 da2-1* e investigamos su tamaño de semilla. Como se muestra en la Figura 4, el tamaño de las semillas del mutante triple *da1-ko1 dar1-1 da2-1* era comparable con el de las semillas del mutante doble *da1-1 da2-1*, pero mayor que el de las semillas del mutante doble *da1-ko1 da2-1*. Por tanto, estos análisis genéticos además sostienen que el alelo de *da1-1* tiene un efecto negativo sobre tanto *DA1* como *DAR1* (Li y col., 2008).

Previamente hemos identificado un potenciador de *da1-1* (*EOD1*), el cual es alélico a *BIG BROTHER* (*BB*) (Disch y col., 2006; Li y col., 2008). Las mutaciones *eod1* aumentaron sinérgicamente el fenotipo de tamaño de semilla de *da1-1* (Li y col., 2008). Igualmente, los fenotipos de tamaño y peso de semilla de *da2-1* fueron aumentados sinérgicamente por *da1-1* y *da1ko1* (Figuras 3A, 3C y 3D). Por lo tanto, nos cuestionamos si *DA2* y *EOD1* podrían funcionar en una ruta común. Para determinar las relaciones genéticas entre *DA2* y *EOD1*, analizamos un mutante doble *eod1-2 da2-1*. La interacción génica entre *eod1-2* y *da2-1* era básicamente aditiva para tanto el peso de semilla como el tamaño de pétalo en comparación con sus líneas parentales (Figura 16), proporcionando el indicio de que *DA2* funciona para influir en el crecimiento de semilla y órgano separadamente de *EOD1*.

### 2.3 *DA2* actúa maternalmente para influir en el tamaño de semilla

Considerando que el tamaño de las semillas está afectado por los tejidos maternos y/o cigóticos, nos cuestionamos si *DA2* funciona maternalmente o cigóticamente. Para probar esto, realizamos experimentos de cruces recíprocos entre el tipo silvestre y *da2-1*. Como se muestra en la Figura 6, el efecto de *da2-1* sobre el tamaño de semilla se observó solamente cuando las plantas maternas son homocigotas para la mutación *da2-1*. Las semillas producidas por las plantas *da2-1*, independientemente del genotipo del donador de polen, eran consistentemente mayores que aquellas producidas por las plantas de tipo silvestre maternas. Este resultado indica que *da2-1* puede actuar maternalmente para influir en el tamaño de semilla. Previamente hemos demostrado que *DA1* también funciona maternalmente para controlar el tamaño de semilla (Li y col., 2008). Ya que la mutación *da1-ko1* aumentó sinérgicamente el fenotipo de tamaño de semilla de *da2-1* (Figura 3D), además condujimos experimentos de cruce recíproco entre el tipo silvestre y el mutante doble *da1-ko1 da2-1*. Igualmente, el efecto de *da1-ko1 da2-1* sobre el tamaño de semilla se observó solamente cuando *da1-ko1 da2-1* actuaba como la planta materna (Figura 6).

Polinizar plantas *da1-ko1/+ da2-1/+* con polen de mutante doble *da1-ko1 da2-1* conduce al desarrollo de embriones de *da1-ko1 da2-1*, *da1-ko1/da1-ko1 da2-1/+*, *da1-ko1/+ da2-1da2-1* y *da1-ko1/+ da2-1/+* dentro de los tegumentos de *da1-ko1/+ da2-1/+*. Además medimos el tamaño de las semillas individuales de plantas *da1-ko1/+ da2-1/+* fertilizadas con polen de mutante doble *da1-ko1 da2-1* y sometimos a genotipado las mutaciones *da1-ko1* y *da2-1*. Nuestros resultados muestran que las mutaciones *da1-ko1* y *da2-1* no están asociadas con la variación en el tamaño de estas semillas (Figura 6). Juntos, estos análisis indican que los genotipos de embrión y endosperma para *DA1* y



*DA2* no afectan al tamaño de semilla, y *DA1* y *DA2* son requeridas en el tejido esporofítico de la planta madre para controlar el crecimiento de la semilla.

#### 2.4 *DA2* actúa sinérgicamente con *DA1* para afectar a la proliferación celular en los integumentos maternos

Los cruces recíprocos mostraron que *DA1* y *DA2* funcionan maternalmente para determinar el tamaño de semilla (Figura 6) (Li y col., 2008). Los integumentos que rodean al óvulo son tejidos maternos y forman el tegumento después de la fertilización, lo cual puede restringir físicamente el crecimiento de la semilla. Varios estudios mostraron que el tamaño del tegumento de los óvulos determina el tamaño de la semilla (Schruff y col., 2006; Adamski y col., 2009). Por lo tanto, nos cuestionamos si *DA1* y *DA2* actúan a través de los integumentos maternos para controlar el tamaño de la semilla. Para probar esto, investigamos óvulos maduros del tipo silvestre, *da1-1*, *da2-1* y *da1-1 da2-1* 2 días después de la emasculación. El tamaño de los óvulos de *da1-1* eran drásticamente mayores que los de los óvulos de tipo silvestre (Figuras 5 y 7), coherente con nuestros descubrimientos previos (Li y col., 2008).

Los óvulos de *da2-1* también eran mayores que los óvulos del tipo silvestre (Figuras 5, y 7). La mutación *da2-1* aumentó sinérgicamente el fenotipo del tamaño de óvulo de *da1-1*, coherente con sus interacciones sinérgicas en el tamaño de semilla.

Investigamos el número celular del tegumento exterior de las semillas en desarrollo en el tipo silvestre, *da1-1*, *da2-1* y *da1-1 da2-1* a 6 DDP y 8 DDP. En semillas del tipo silvestre, el número celular del tegumento exterior a 6 DDP era similar al de 8 DDP (Figura 7 panel del medio), indicando que las células en los tegumentos exteriores de las semillas del tipo silvestre paraban completamente la división a 6 DDP. Igualmente, las células en los tegumentos exteriores de las semillas de *da1-1*, *da2-1* y *da1-1 da2-1* paraban completamente la proliferación celular a 6 DDP. El número de las células de tegumento exterior en semillas de *da1-1* y *da2-1* se incrementó significativamente en comparación con el de en las semillas del tipo silvestre (Figura 7). La mutación *da2-1* aumentó sinérgicamente el número celular del tegumento exterior de *da1-1*. Además investigamos la longitud celular del tegumento semillas del tipo silvestre, de *da1-1*, *da2-1* y *da1-1 da2-1* a los 6 y 8 días después de la polinización. Las células en los integumentos exteriores de *da1-1*, *da2-1* y *da1-1 da2-1* eran significativamente más cortos que aquellos en los integumentos exteriores del tipo silvestre (Figura 7 panel derecho), proporcionando el indicio de un mecanismo de compensación entre la proliferación celular y la expansión celular en los integumentos. Por tanto, estos resultados muestran que *DA2* actúa sinérgicamente con *DA1* para restringir la proliferación celular en los integumentos maternos.

#### 2.5 *DA2* codifica una E3 ubiquitina ligasa funcional

La mutación *da2-1* se identificó con la inserción de ADN-T en el séptimo exón del gen At1g78420 (Figura 8A). El sitio de inserción de ADN-T se confirmó además por PCR usando cebadores específicos a ADN-T y flanqueantes y productos de PCR de secuenciación. El ARNm de longitud completa de At1g78420 no se podía detectar mediante RT-PCR semicuantitativa en el mutante *da2-1*. Expresamos la CDS de At1g78420 bajo el control de su propio promotor en las plantas *da2-1* y aislamos 62 plantas transgénicas. Casi todas las líneas transgénicas presentaron complementación de los fenotipos de *da2-1* (Figura 10), indicando que At1g78420 es el gen *DA2*.

Para caracterizar más la función de *DA2*, en particular el aumento de los fenotipos de función, expresamos la región codificante de *DA2* bajo el control del promotor 35S de CaMV en plantas de tipo silvestre y se aislaron 77 plantas transgénicas. La sobreexpresión de *DA2* causó el descenso en el tamaño de semilla, el rendimiento de semilla por planta y el número de semilla por planta (Figuras 1A, 1C y 1D). Además, las mayoría de las plantas transgénicas que sobreexpresan *DA2* tenían flores y hojas pequeñas, silicuas cortas, altura de planta reducida, así como biomasa disminuida en comparación con el tipo silvestre (Figuras 1E, 2 y 15). Estos resultados sostienen además el papel de *DA2* en la limitación del crecimiento de semilla y órgano.

Se previó que el gen *DA2* codifica una proteína de 402 aminoácidos que contenía un dominio RING previsto (59-101) (Figura 8B, Tabla 1). Para investigar si *DA2* tiene actividad E3 ubiquitina ligasa, expresamos *DA2* en *Escherichia coli* como una proteína de fusión con proteína de unión a maltosa (MBP) y se purificó proteína MBP-*DA2* de la fracción soluble. En presencia de una enzima de activación de E1 ubiquitina, una enzima de conjugación de E2, His-ubiquitina y MBP-*DA2*, se observó una señal de poliubiquitinación por transferencia western usando un anticuerpo anti-His (Figura 9, quinta línea desde la izquierda). El análisis de transferencia de anti-MBP también mostró que MBP-*DA2* estaba ubiquitinada (Figura 9, quinta línea desde la izquierda). Sin embargo, en ausencia de cualquiera de E1, E2, His-ubiquitina o MBP-*DA2*, no se detectó poliubiquitinación (Figura 9, primera a cuarta línea desde la izquierda), demostrando que *DA2* es una E3 ubiquitina ligasa funcional. El motivo RING es esencial para la actividad de E3 ubiquitina ligasa de proteínas de dedo RING (Xie y col., 2002). Por lo tanto, ensayamos si se requería un dominio de dedo RING intacto para la actividad de *DA2* E3 ligasa. Un alelo de sustitución de aminoácido único se produjo por mutagenización de Cisteína-59 a Serina (C59S), ya que esta mutación se prevé que altera el dominio RING (Tablas 1 y 2). Un ensayo de ubiquitinación *in vitro* indicó que la actividad E3 ligasa se abolió en el mutante C59S de *DA2* (Figura 9, sexta línea desde la izquierda), indicando que un dominio RING intacto es requerido para la actividad de *DA2* E3 ubiquitina ligasa. Además sobreexpresamos *DA2 C59S* (35S:*DA2C59S*) en

plantas Col-0 de tipo silvestre y se aislaron 69 plantas transgénicas. El tamaño de semilla de las plantas transgénicas era comparable con las de las plantas de tipo silvestre aunque las plantas transgénicas tenían altos niveles de expresión de *DA2 C59S*, indicando que la mutación *DA2 C59S* afecta la función de *DA2* en el crecimiento de semilla.

5 Se han descrito en *Arabidopsis* tres tipos de RING, RING-H2, RING-HCa y RING-HCb, y cinco tipos de RING modificados, RING-C2, RING-v, RING-D, RING-S/T y RING-G (Stone y col., 2005). Se ha propuesto un nuevo tipo de dominio RING (C5HC2) encontrado en GW2 de arroz (Song y col., 2007). Aunque el espaciado de las  
10 cisteínas en el dominio RING previsto de DA2 era similar al del en el dominio RING (C5HC2) de GW2 de arroz, el dominio RING de DA2 carecía de un resto de histidina conservado que estaba reemplazado por un resto de asparagina (Asn-91) (Tablas 1 y 2). Esta sustitución de aminoácidos también se observó en el dominio RING previsto de homólogos de DA2 en dicotiledóneas, tales como soja y colza de semilla oleaginosa (Tabla 1). Por lo tanto, nos cuestionamos si este resto de asparagina (Asn-91) es crucial para su actividad E3 ubiquitina ligasa. Se produjo un alelo de sustitución de aminoácido único mutagenizando Asn-91 a Leucina (N91L). Un ensayo de  
15 ubiquitinación *in vitro* mostró que el mutante N91L de DA2 tenía la actividad E3 ligasa (Figura 9, la séptima línea desde la izquierda), sugiriendo que Asn-91 no podía ser requerido para la actividad E3 ligasa de DA2. Estos resultados sugieren que el dominio RING de DA2 podría ser una variante del encontrado en GW2. Además sobreexpresamos *DA2 N91L (35S:DA2N91L)* en plantas de tipo silvestre y aislamos 26 plantas transgénicas. Las semillas de las plantas transgénicas eran más pequeñas que las semillas de tipo silvestre, sugiriendo que el *DA2 N91L* podría restringir el crecimiento de semilla.  
20

### 2.6 Homólogos de DA2 de *Arabidopsis*

Se encontraron proteínas que comparten homología significativa con DA2 fuera del dominio RING en *Arabidopsis* y  
25 plantas de cultivo incluyendo colza de semilla oleaginosa, soja, arroz, maíz y cebada (Tabla 2). Una proteína prevista en *Arabidopsis* comparte gran similitud de aminoácidos con DA2 y se denomina proteína tipo DA2 (DA2L; At1g17145). Igual que plantas *35S:DA2*, las líneas que sobreexpresan *DA2L* presentan pequeñas plantas y órganos (Figura 18), proporcionando el indicio de que *DA2* y *DA2L* tienen funciones similares. Las proteínas similares en otra especie vegetal muestran una identidad de secuencia de aminoácidos del 39,2 % a 84,5 % con DA2 (Tabla 2). El  
30 homólogo en *Brassica napus* tenía la identidad de secuencia de aminoácidos mayor con DA2 (84,5 %) (Tabla 2). El GW2 de arroz tenía identidades de secuencia de aminoácidos del 43,1 % con DA2 de *Arabidopsis* (Tabla 2). Ya que la sobreexpresión de GW2 redujo el ancho del grano en arroz (Song y col., 2007), nos cuestionamos si *DA2* y GW2 realizan función similar en el control del tamaño de semilla. Por lo tanto, sobreexpresamos GW2 en plantas de tipo silvestre. Igual que las líneas transgénicas *35S:DA2* y *35S:DA2L*, las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan GW2 produjeron semillas y órganos más pequeños que las plantas de tipo silvestre, indicando  
35 función conservada para DA2 de *Arabidopsis* y GW2 de arroz en el control del crecimiento de semilla y órgano.

### 2.7 DA2 y DA1 muestran patrones de expresión similares

40 Para determinar el patrón de expresión de *DA2*, los ARN de raíces, tallos, hojas, plántulas e inflorescencias se analizaron por análisis por RT-PCR a tiempo real cuantitativa. Se detectó el ARNm de *DA2* en todos los órganos de la planta ensayados (Figura 11A). Los patrones de expresión específicos a tejido de *DA2* se investigaron usando análisis histoquímico de la actividad de GUS de plantas transgénicas que contenían una fusión promotor de *DA2:GUS (pDA2:GUS)*. La actividad de GUS se detectó en raíces, cotiledones, hojas e inflorescencias (Figuras 11B y 11C). Se  
45 detectó actividad de GUS relativamente alta en primordios foliares y raíces (Figuras 11B y 11C). En las flores, se observó expresión relativamente más fuerte de *DA2* en órganos florales jóvenes que los órganos florales viejos (Figuras 11D a 11L). Igualmente, se detectó mayor actividad de GUS en óvulos más jóvenes que en los más viejos (Figura 11M y 11N). Esto muestra que la expresión de *DA2* se regula temporalmente y espacialmente.

### 2.8 DA1 interactúa con DA2 *in vitro* e *in vivo*

Nuestros análisis genéticos muestran que DA1 actúa sinérgicamente con DA2 para restringir el crecimiento de semilla y órgano. Por lo tanto, analizamos si DA1 interactúa con la E3 ubiquitina ligasa DA2 usando un experimento de interacción/*pull down in vitro*. DA1 se expresó como una proteína de fusión de GST, mientras que DA2 se  
55 expresó como una proteína de fusión de MBP. Como se muestra en la Figura 12 (la primera y segunda línea desde la izquierda), GST-DA1 unida a MBP-DA2, mientras que GST-DA1 no se unieron a un control negativo (MBP). Este resultado indica que DA1 interactúa físicamente con DA2 *in vitro*.

60 DA1 contiene dos motivos de interacción con ubiquitina (UIM), un dominio LIM único y la región terminal C altamente conservada (Figura 13) (Li y col., 2008). Además nos cuestionamos qué dominio de DA1 se requiere para la interacción entre DA1 y DA2. Se expresaron una serie de derivados DA1 que contienen dominios de proteína específicos en *Escherichia coli*: DA1-UIM que contenían solamente los dos dominios UIM, DA1-LIM con solamente el dominio LIM, DA1-LIM+C que contenía solamente el dominio LIM y la región terminal C, y DA1-C con solamente la región terminal C, se expresaron como proteínas de fusión GST (Figura 13).

65

DA2 se expresó como una proteína de fusión MBP y se usó en experimentos de *pull-down*. Como se muestra en la Figura 12, GST-DA1-LIM+C y GST-DA1-C interactuaron con MBP-DA2, pero GST-DA1-UIM y GST-DA1-LIM no se unieron a MBP-DA2. Este resultado indica que la región terminal C conservada de DA1 interactúa con DA2.

5 Considerando que la proteína mutante codificada por el alelo de *da1-1* (DA1R358K) tiene una mutación en la región terminal C (Figura 13) (Li y col., 2008), nos cuestionamos si la mutación DA1R358K afecta a las interacciones con DA2. Usando una proteína de fusión GST-DA1R358K en experimentos de *pull-down* con MBP-DA2, mostramos que la mutación en DA1R358K no afecta a la interacción entre DA1 y DA2 (Figura 12, tercera línea desde la izquierda).

10 Para investigar más la posible asociación entre DA1 y DA2 *in planta*, usamos análisis de coimmunoprecipitación para detectar sus interacciones *in vivo*. Transitoriamente coexpresamos 35S:Myc-DA1 y 35S:GFP-DA2 en hojas de *Nicotiana benthamiana*. La coexpresión transitoria de 35S:GFP y 35S:Myc-DA1 en hojas de *Nicotiana benthamiana* se usó como control negativo. Se aislaron proteínas totales y se incubaron con perlas de agarosa GFP-Trap-A para inmunoprecipitar GFP-DA2 o GFP. Los precipitados se detectaron con anticuerpos anti-GFP y anti-Myc, respectivamente. Como se muestra en la Figura 14, Myc-DA1 se detectó en el complejo GFP-DA2  
15 inmunoprecipitado pero no en el control negativo (GFP), indicando que hay una asociación física entre DA1 y DA2 *in planta*. Ya que la región terminal C de DA1 interactuó con DA2 en el ensayo *pull-down* (Figura 12), además nos cuestionamos si el terminal C de DA1 interactúa con DA2 *in planta*. El análisis de coimmunoprecipitación mostró que la región terminal C de DA1 (Myc-DA1-C) se detectaba en el complejo GFP-DA2 pero no en el control negativo (PEX10-GFP, una E3 ubiquitina ligasa tipo RING) (Platta y col., 2009; Kaur y col., 2013). Por tanto, estos resultados  
20 indican que la región terminal C de DA1 es requerida para la interacción con DA2 *in vitro* e *in vivo*.

El amaño de semilla en plantas superiores es un determinante clave del estado evolutivo, y también es un carácter agronómico importante en la domesticación del cultivo (Gomez, 2004; Orsi y Tanksley, 2009).

25 Se han identificado varios factores que actúan maternalmente para controlar el tamaño de semilla, tales como ARF2/MNT, AP2, KLU/CYP78A5, EOD3/CYP78A6 y DA1. Sin embargo, los mecanismos genéticos y moleculares de estos factores en el control de tamaño de semilla son casi totalmente desconocidos. Previamente demostramos que el receptor de ubiquitina DA1 actúa sinérgicamente con la E3 ubiquitina ligasa EOD1/BB para controlar el tamaño de  
30 semilla (Li y col, 2008).

En este estudio, identificamos DA2 de *Arabidopsis* como otra E3 ubiquitina ligasa RING implicada en el control del tamaño de semilla. Los análisis genéticos muestran que DA2 funciona sinérgicamente con DA1 para controlar el tamaño de semilla final, pero funciona así independientemente de la E3 ubiquitina ligasa EOD1. Además revelamos  
35 que DA1 interactúa físicamente con DA2. Nuestros resultados definen un sistema basado en ubiquitina que implica DA1, DA2 y EOD1 que controla el tamaño de semilla final en *Arabidopsis*.

### 2.9 DA2 actúa maternalmente para controlar el tamaño de semilla

40 El mutante de pérdida-de-función *da2-1* formó grandes semillas y órganos, mientras que las plantas que sobreexpresan DA2 produjeron semillas y órganos pequeños (Figura 1A), indicando que DA2 es un factor negativo de control de tamaño de semilla y órgano. Sorprendentemente, la DA2 de *Arabidopsis* recientemente se ha propuesto como regulador positivo del crecimiento de órgano, aunque no se conoce nada sobre cómo DA2 control el crecimiento de semilla y órgano (Van Daele y col., 2012). En este estudio, tenemos suficiente evidencia para probar  
45 que DA2 actúa como un factor negativo del control del crecimiento de semilla y órgano. El mutante de pérdida-de-función *da2-1* formó semillas y órganos grandes (Figuras 1 a 4). Sosteniendo esto, la mutación *da2-1* sinérgicamente aumentó los fenotipos de tamaño de semilla y órgano de *da1-1* y *da1-ko1* (Figuras 1 a 4). La mutación *da2-1* también aumentó los fenotipos de tamaño de semilla y órgano de *eod1-2*, indicando además que la mutación *da2-1* promueve el crecimiento de semilla y órgano. El mutante *da2-1* formó óvulos grandes con más  
50 células en los integumentos, y la mutación *da2-1* aumentó sinérgicamente el fenotipo de tamaño de óvulo de *da1-1* (Figura 6).

Además, la mayoría de las plantas transgénicas que sobreexpresan DA2 y DA2L eran más pequeñas que las plantas de tipo silvestre (Figura 2; Figura S9). Los fenotipos de crecimiento de órgano de estas plantas transgénicas se correlacionaron con sus respectivos niveles de expresión (Figuras S4 y S9). Por lo tanto, nuestros datos  
55 claramente demuestran que DA2 funciona como regulador negativo del tamaño de semilla y órgano. Varios mutantes de *Arabidopsis* con órganos grandes también formaron semillas grandes (Krizek, 1999; Mizukami y Fischer, 2000; Schruff y col., 2006; Li y col., 2008; Adamski y col., 2009), sugiriendo una posible conexión entre el tamaño de órgano y el crecimiento de semilla. Por el contrario, otros varios mutantes con órganos grandes presentaron semillas de tamaño normal (Hu y col., 2003; White, 2006; Xu y Li, 2011), indicando que el tamaño de  
60 órgano y semilla no está invariablemente relacionado positivamente. Estos resultados sugieren que las semillas y los órganos tienen tanto rutas comunes como distintas para controlar su respectivo tamaño.

Experimentos de cruce recíproco mostraron que DA2 actúa maternalmente para influir en el crecimiento de semilla, y los genotipos del embrión y el endosperma para DA2 no afectan al tamaño de semilla (Figuras 6). Los integumentos que rodean el óvulo son tejidos maternos y forman el tegumento después de la fertilización. Las alteraciones en el

tamaño del integumento materno, tales como las vistas en óvulos de *arf2*, *da1-1* y *klu*, se ha sabido que contribuyen a cambios en el tamaño de semilla (Schruff y col., 2006; Li y col., 2008; Adamski y col., 2009). Los óvulos de *da2-1* maduros eran mayores que los óvulos del tipo silvestre maduros (Figuras 5 y 7). La mutación *da2-1* también aumentó sinérgicamente el tamaño del integumento de los óvulos de *da1-1*. Por tanto, un tema general que surge de estos estudios es que el control del tamaño del integumento materno es uno de los mecanismos claves para determinar el tamaño de semilla final. Coherente con esta idea, los factores maternos vegetales del control de tamaño de semilla (por ejemplo, KLU, ARF2 y DA1) aislados hasta la fecha influyen en el tamaño del integumento (Schruff y col., 2006; Li y col., 2008; Adamski y col., 2009).

El tamaño del integumento y el tegumento se determina por la proliferación celular y la expansión celular, dos procesos que están coordinados. El número celular en los integumentos del óvulo maduro fija el potencial de crecimiento del tegumento después de la fertilización. Por ejemplo, mutantes *arf2* produjeron óvulos grandes con más células, conduciendo a semillas grandes (Schruff y col., 2006), mientras que los mutantes *klu* tenían óvulos pequeños con menos células, dando como resultado semillas pequeñas (Adamski y col., 2009). Nuestros resultados muestran que los integumentos de semillas de *da1-1* y *da2-1* tenían más células que aquellas de las semillas del tipo silvestre, y *da1-1* y *da2-1* actúan sinérgicamente para promover la proliferación celular en los integumentos. También observamos que las células en los integumentos exteriores de las semillas de *da1-1*, *da2-1*, y *da1-1 da2-1* eran más cortas que aquellas en los integumentos de tipo silvestre, sugiriendo un posible mecanismo de compensación entre la proliferación celular y la elongación celular en el integumento materno. Por tanto, es posible que el integumento o tegumento materno, el cual actúa como un contraste físico sobre el crecimiento celular, pueda fijar un límite superior al tamaño de semilla final.

#### 2.10 Un marco genético para el control mediado por ubiquitina del tamaño de semilla

DA2 codifica una proteína con un dominio RING previsto que es diferente de cualquiera de los dominios RING vegetales previamente descritos. El dominio RING de DA2 compartió la mayor homología con el de GW2 de arroz (C5HC2), pero carecía de un aminoácido ligando metal conservado (un resto de histidina) que estaba reemplazado por un resto de asparagina (Song y col., 2007). Aún es posible que el dominio RING de DA2 pudiera ser una variante del encontrado en GW2. Muchos dominios de tipo RING se encuentran en E3 ubiquitina ligasas que someten a ubiquitinación a sustratos, con frecuencia dirigiéndolos para posterior degradación proteosómica (Smalle y Vierstra, 2004). Ensayamos la actividad E3 de DA2 recombinante en un ensayo de ubiquitina-ligasa *in vitro* y demostramos que DA2 es una E3 ubiquitina ligasa funcional, sugiriendo que DA2 puede dirigir reguladores positivos de proliferación celular para la degradación dependiente de ubiquitina por el proteosoma 26S. Las proteínas que comparten homología con DA2 fuera del dominio RING se encuentran en *Arabidopsis* y otras especies vegetales. En *Arabidopsis*, la proteína tipo DA2 (DA2L) comparte gran similitud de aminoácidos con DA2. Igual que plantas 35S:DA2, las líneas que sobreexpresan DA2L mostraron plantas pequeñas (Figura 18), indicando que DA2 y DA2L pueden realizar funciones similares. El homólogo de DA2 en arroz es la proteína GW2 tipo RING (C5HC2) (Song y col., 2007), la cual se ha sabido que actúa como regulador negativo del tamaño de semilla. Sin embargo, los mecanismos genéticos y moleculares de GW2 en el control del tamaño de semilla son en gran parte desconocidos en el arroz.

Previamente identificamos DA1, un receptor de ubiquitina con actividad de unión a ubiquitina, como regulador negativo del tamaño de semilla (Li y col., 2008). Un cribado modificador identificó un potenciador de *da1-1* (EOD1) (Li y col., 2008), el cual es alélico a la E3 ubiquitina ligasa BB (Disch y col., 2006). El análisis de mutantes dobles *eod1-2 da1-1* reveló interacciones genéticas sinérgicas entre DA1 y EOD2 (Li y col., 2008), sugiriendo que pueden controlar el crecimiento de semilla modulando la actividad de una diana(s) común(es). Aunque las interacciones genéticas entre *da1-1* y *eod1-2* también aumentaron sinérgicamente el tamaño de semilla y órgano, nuestros análisis genéticos mostraron que DA2 actúa independientemente de EOD1 para influir en el crecimiento de semilla, sugiriendo que DA2 y EOD1 pueden dirigir distintos estimuladores de crecimiento para la degradación, con regulación común por DA1. Por tanto, nuestros descubrimientos establecen un marco para el control del tamaño de semilla y órgano por tres proteínas relacionadas con ubiquitina DA1, DA2 Y EOD1. Además, observamos que la sobreexpresión de GW2 restringe el crecimiento de semilla y órgano en *Arabidopsis*, proporcionando el indicio de una posible función conservada en *Arabidopsis* y arroz. Podría ser interesante investigar los efectos de la combinación de GW2 y los homólogos de arroz de DA1 y EOD1 sobre el tamaño de grano en arroz.

#### 2.11 Un mecanismo molecular posible de DA1 y DA2 en el control de tamaño de semilla

Nuestros resultados demuestran que la E3 ubiquitina ligasa DA2 interactúa con el receptor de la ubiquitina DA1 *in vitro* e *in vivo* (Figuras 12 a 14). Sin embargo, no es probable que DA2 dirija DA1 para degradación proteosómica debido a que un mutante insertado de ADN-T del gen DA1 (*da1-ko1*) sinérgicamente aumenta el fenotipo de tamaño de semilla de *da2-1* (Figuras 3 y 4). Sin embargo, muchos otros tipos de modificación de ubiquitina regulan las proteínas de una manera independiente a proteosoma (Schnell y Hicke, 2003). Por ejemplo, se ha implicado que la monoubiquitinación en la activación de las proteínas de señalización, endocitosis, y modificación de histona (Schnell y Hicke, 2003). En animales, la monoubiquitinación del receptor de ubiquitina eps15 depende de la interacción entre eps15 y la familia de Nedd4 de las E3 ligasas (Woelk y col., 2006). Por el contrario, también se han publicado una monoubiquitinación independiente de E3 de los receptores de ubiquitina (Hoeller y col., 2007). Considerando que

DA1 interactúa con DA2, ensayamos si DA2 puede someter a ubiquitinación o monoubiquitinación DA1. En presencia de E1, E2 y ubiquitina, DA2-His tenía una actividad E3 ubiquitina ligasa. Sin embargo, en presencia de E1, E2, ubiquitina y DA2-His (E3), se detectó DA1-HA no ubiquitinada bajo nuestras condiciones de reacción. Los receptores de ubiquitina pueden interactuar con sustratos poliubiquitinados de E3 por dominios UIM y facilitar su degradación por el proteosoma (Verma y col., 2004). Previamente demostramos que los dominios UIM de DA1 se puede unir a ubiquitina (Li y col., 2008).

Tomándolo junto con su interacción con DA2 por su región terminal C (Figuras 12 y 14). DA1 puede estar implicado en la mediación de la degradación de los sustratos ubiquitinados de DA2 por el proteosoma. Un mecanismo puede implicar la interacción de DA1 con DA2, que ayuda a DA1 a reconocer específicamente el(los) sustrato(s) ubiquitinado(s) de DA2. DA1 puede unir posteriormente cadenas de poliubiquitina del(de los) sustrato(s) ubiquitinado(s) por su dominio UIM y mediar la degradación del(de los) sustrato(s) ubiquitinado(s). El mejoramiento del rendimiento de semilla es un objetivo importante para cultivadores por todo el mundo, y el tamaño de las semillas es un componente importante de los rendimientos de semilla globales. Identificamos DA2 como un regulador importante del tamaño de semilla que funciona sinérgicamente con DA1 para influir en el tamaño de semilla.

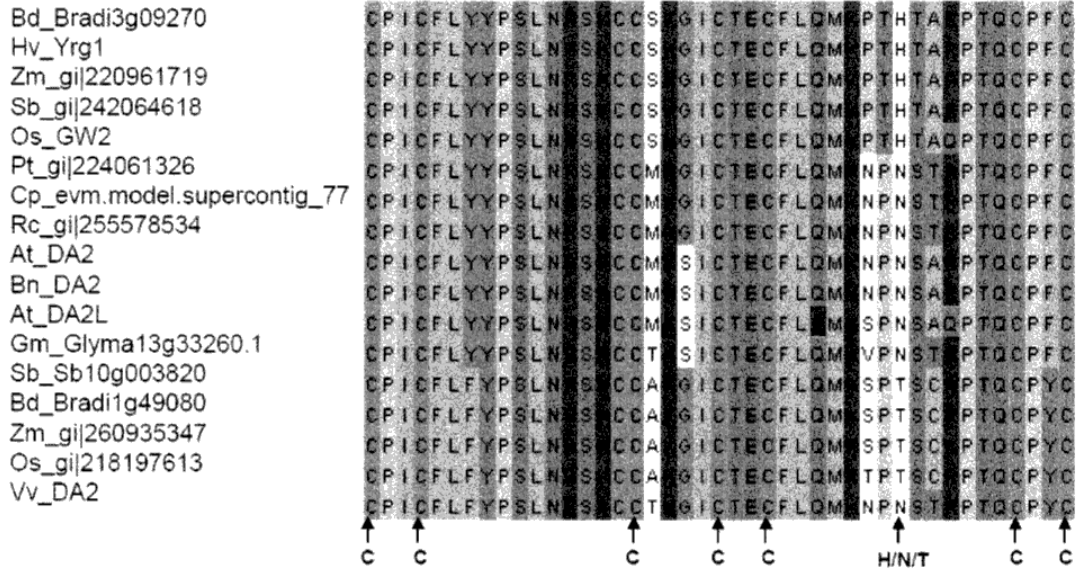
DA1 también actúa sinérgicamente con EOD1 para afectar al crecimiento de semilla. Se ha publicado que la sobreexpresión de una mutación *da1-1* dominante negativa (*Zmda1-1*) incrementa la masa de semilla de maíz (Wang y col., 2012), indicando la promesa de combinar los efectos de DA1, DA2 y EOD1 a partir de diferentes cultivos de semilla para modificar por ingeniería el tamaño grande de semilla en estos cultivos.

## Referencias

- Adamski, N.M. y col (2009) *PNAS USA* 106, 20.115-20.120.
- Alexandru, G. y col (2008) *Cell* 134, 804-816.
- Alonso-Blanco, C. y col (1999). *PNAS USA* 96, 4.710-4.717.
- Bandau, S. y col (2012) *BMC Biol.* 10, 36.
- Bednarek, J. y col *J. Exp. Bot.* (2012) 63 16 5.945-5.955
- Curtis, M.D. y col (2003) *Plant physiology* 133,462-469.
- Disch, S. y col (2006) *Curr. Biol.* 16, 272-279.
- Fan, C. y col (2006) *Theor. Appl. Genet.* 112, 1.164-1.171.
- Fang, W. y col (2012) *Plant J.* 70, 929-939.
- Garcia, D. y col (2005) *Plant Cell* 17, 52-60.
- Garcia, D. y col(2003) *Plant Physiology* 131, 1.661-1.670.
- Gegas, V.C. y col (2010) *Plant Cell* 22, 1.046-1.056.
- Gomez, J.M. (200) *Int. J. Org. Evol.* 58, 71-80.
- Hoeller, D. y col (2007) *Mol. Cell* 26, 891-898.
- Hu, Y. y col (2003) *Plant Cell* 15, 1951-1961.
- Jofuku, K.D. y col. (2005) *PNAS USA* 102, 3.117-3.122.
- Kaur, N. y col (2013). *J. Int. Plant Biol.* 55, 108-120.
- Krizek, B.A. (1999). *Dev Genet* 25, 224-236.
- Lanctot, A.A. y col (2013). *Developmental cell* 25, 241-255.
- Li, Y., y col (2008) *Genes Dev.* 22,1.331-1.336.
- Li, Y. y col (2006) *Genome Res.* 16, 414-427.
- Lopes, M.A. y col (1993) *Plant Cell* 5, 1.383-1.399.
- Luo, M. y col (2005) *PNAS USA* 102, 17.531-17.536.
- Mizukami, Y y col (2000) *PNAS USA* 97, 942-947.
- Moles, A.T. y col (2005) *Science* 307, 576-580.
- Ohto, M.A., y col (2005) *PNAS USA* 102, 3.123-3.128.
- Ohto, M.A. y col (2009) *Sex Plant Reprod.* 22, 277-289.
- Orsi, C.H. y col (2009) *PLoS Genet* 5, e1000347.
- Perez-Perez, J.M. y col (2009) *Trends Genet.* 25, 368-376.
- Platta, H.W. y col (2009) *Mol. Cell Biol.* 29, 5.505-5.516.
- Schnell, J.D. y col (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 35.857-35.860.
- Schruff, M.C. y col (2006) *Development* 133, 251-261.
- Seo, H.S. y col(2003) *Nature* 423, 995-999.
- Shomura, A., y col (2008) *Nat Genet* 40, 1.023-1.028.
- Smalle, J. y col (2004) *Annual review of plant biology* 55, 555-590.
- Song, X.J. y col (2007) *Nat. Genet.* 39, 623-630.
- Stone, S.L. y col. (2005) *Plant physiology* 137, 13-30.
- Van Daele, I. y col. (2012) *Plant Biotech J.* 10, 488-500.
- Verma, R. y col (2004) *Cell* 118, 99-110.
- Voinnet, O. y col (2003) *Plant J* 33, 949-956.
- Wang, A. y col (2010) *Plant J.*
- Wang, y col (2012) *African Journal of Biotechnology* 11, 13.387-13.395.
- Weng, J. y col (2008) *Cell Res* 18, 1.199-1.209.

Westoby, M. y col (2002) *Ann. Rev. Ecol. System.* 33, 125-159.  
 White, D.W. (2006) *PNAS USA* 103, 13.238-13.243.  
 Woelk, T. y col (2006) *Nat Cell Biol* 8, 1.246-1.254.  
 Xie, Q. y col (2002) *Nature* 419, 167-170.  
 Xu, R. y col (2011) *Development* 138, 4.545-4.554.  
 Zhou, Y. y col (2009) *Plant Cell* 21, 106-117.

5



10

Tabla 1: Alineamiento de dominios RING de DA2 (SEQ ID NO: 3-19)

Pt_GI-224061326.pro	MGNKLG---RRRQVVDERYTRPQGLYVHKDVDHKKLRKLIILESKLAPCFPGDEDESCND--	55
Rc_GI-255578534.pro	MGNKLG---RRRQVVDERYTRPQGLYVHKDVDHKKLRKLIILESKLAPCYPGDEDFGND--	55
Vv_GI-147817790.pro	MGNKLG---RRRQVVEDEKYTRPQGLYQHKDVDHKKLRKLIILESKLAPCYPGDEEATND--	55
Gm_GI-356549538.pro	MGNKLG---RRRQVVEDEKYTRPQGLYNHKDVDHKKLRKLIILESKLAPCYPGDEETAYD--	55
At_GI-18411948.pro	MGNKLG---RRKQVVEERYTKPQGLYVVKDVDVKKLRKLIILESKLAPCYPGDDESCHD--	55
Ta_GI-408743661.pro	MGNRIGG--RRKAGVEERYTRPQGLYEHRDIDQKLRKLIILEAKLAPCYPGADDAAGG--	56
Hv_GI-164371454.pro	MGNRIGG--RRKAGVEERYTRPQGLYEHRDIDQKLRKLIILEAKLAPCYPGADDAAGG--	56
Bd_GI-357140854.pro	MGNRIGG--RRKAGVEERYTRPQGLYEHRDIDQKLRKLIILEAKLAPCYPGADDAAGG--	56
Os_GI-115445269.pro	MGNRIGG--RRKAGVEERYTRPQGLYEHRDIDQKLRKLIILEAKLAPCYMGADDAAAA--	57
Sb_GI-242064618.pro	MGNRKG--RPKSGGKRFTRPQGLYEHRDIDQKLRKLIILEAKLAPCYPGADDAAAAAGG	58
Zm_GI-220961719.pro	MGNRIGG--RRKPGVEERFTRPQGLYEHRDIDQKLRKLIILEAKLAPCYPGADDAAGGG	58
Ta_GI-408743658.pro	MGNRIGG--RRKAGVEERYTRPQGLYEHRDIDQKLRKLIILEAKLAPCYPGADDAAGG--	56
Bd_GI-357125256.pro	MGN-----QGLYPHPDIDLRKLRRLIILEAKLAPCHPGSDDPAD--	39
Os_GI-218197613.pro	MGNQVGGRRRRRPAVEERYTRPQGLYPHPDIDLRKLRRLIILEAKLAPCHPGSDDPAD--	58
Zm_GI-260935347.pro	MGNQVGGRRRRRPPVDERYTRPQGLYPHPDIDLRKLRRLIILEAKLAPCHPGADARAD--	58
Sb_GI-242092026.pro	MGNQVGGRRRRRPAVDERYTPQGLYPHPDIDLRKLRRLIILEAKLAPCHPGADARAD--	58
	***	
	**** : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Pt_GI-224061326.pro	---HEECPICFLYPSLNRSCCKMGICTEFLQMKPNSTRPTQCPFCKTSNKAVEYRG	112
Rc_GI-255578534.pro	---HEECPICFLYPSLNRSCCKMGICTEFLQMKPNSTRPTQCPFCKTTNKAVEYRG	112
Vv_GI-147817790.pro	---FEECPICFLYPSLNRSCCTKMGICTEFLQMKPNSTRPTQCPYCKTANKAVEYRG	112
Gm_GI-356549538.pro	---REECPICFLYPSLNRSCCTKSICTEFLQMKVNSTTRPTQCPFCKTANKAVEYRG	112
At_GI-18411948.pro	---LEECPICFLYPSLNRSCCKMSICTEFLQMKPNSTRPTQCPFCKTPNKAVEYRG	112
Ta_GI-408743661.pro	--DLEECPICFLYPSLNRSCCKSKGICTEFLQMKPHTARPTQCPFCKTPNKAVEYRG	114
Hv_GI-164371454.pro	--DLEECPICFLYPSLNRSCCKSKGICTEFLQMKPHTARPTQCPFCKTPNKAVEYRG	114
Bd_GI-357140854.pro	--DLEECPICFLYPSLNRSCCKSKGICTEFLQMKPHTARPTQCPFCKTPNKAVEYRG	114
Os_GI-115445269.pro	--DLEECPICFLYPSLNRSCCKSKGICTEFLQMKPHTAQTQCPFCKTPNKAVEYRG	115
Sb_GI-242064618.pro	--DLEECPICFLYPSLNRSCCKSKGICTEFLQMKPHTARPTQCPFCKTPNKAVEYRG	116
Zm_GI-220961719.pro	DLLEECPICFLYPSLNRSCCKSKGICTEFLQMKPHTARPTQCPFCKTANKAVEYRG	118
Ta_GI-408743658.pro	--DLEECPICFLYPSLNRSCCKSKGICTEFLQMKPHTARPTQCPFCKTPNKAVEYRG	114
Bd_GI-357125256.pro	---LDECPICFLYPSLNRSCCKAKGICTEFLQMKSPTSRPTQCPYCKMLNKAVEYRG	96
Os_GI-218197613.pro	---LEECPICFLYPSLNRSCCKAKGICTEFLQMRTPTSRPTQCPYCKMASYAVEYRG	115
Zm_GI-260935347.pro	---LDECPICFLYPSLNRSCCKAKGICTEFLQMKSPTSRPTQCPYCKTLNKAVEYRG	115
Sb_GI-242092026.pro	---LDECPICFLYPSLNRSCCKAKGICTEFLQMKSPTSRPTQCPYCKTLNKAVEYRG	115
	:*****:*****:***:*****: : : :*****:*** :*****	
Pt_GI-224061326.pro	VKTKEEGLEQIEEQRVIEAKIRMRQQLQDEEERMQRRLDVSSSSANIEPG-ELECGPT	171
Rc_GI-255578534.pro	VKTKEEGMEQIEEQRVIEAKIRMRQQLQDEEERMQRRLSSSSSSSIAPG-EVECGSA	171
Vv_GI-147817790.pro	VKTKEEGMEQIEEQRVIEAKIRMRQKEIQDEEERMQRQEISSSSSILAQG-EVEYSTT	171
Gm_GI-356549538.pro	VKSKEEGLEQIEEQRVIEAKIRMRQQLQDEEERMHQRRLSSSSNVNVAVA-DVEYSSN	171
At_GI-18411948.pro	VKSKEEGQIEEQVEEQRVIEAKIRMRQKEMQDEEEMQRRLSCSSSTSAMTG-EMEYGST	171
Ta_GI-408743661.pro	VKTKEERSIEQFEEQKVIEAQMRRQALQDEEDKMKRKRQSRSSSRTIAPTTEVEYRDI	174
Hv_GI-164371454.pro	VKTKEERSIEQFEEQKVIEAQMRRQALQDEEDKMKRKRQSRSSSRTIAPTTEVEYRDI	174
Bd_GI-357140854.pro	VKTKEERSIEQLEEQKVIEAQMRRQALQDEEDKMKRKRQSRSSSRTIAPTTEVEYRDI	174
Os_GI-115445269.pro	VKTKEERSIEQFEEQKVIEAQMRRQALQDEEDKMKRKRQSRSSSRTITPTTEVEYRDI	175
Sb_GI-242064618.pro	VKTKEERSIEQFEEQKVIEAQLRMRQKELQDEEAKMKRKRQSRSSSRTVPTTEVEYRDI	176
Zm_GI-220961719.pro	VKTKEERSIEQFEEQKVIEAQLRMRQKELQDEEAKMKRKRQSRSSSRTVPTTEVEYRDI	178
Ta_GI-408743658.pro	VKTKEERSIEQFEEQKVIEAQMRRQALQDEEDKMKRKRQSRSSS-CKTPNYAVEYRGV	173
Bd_GI-357125256.pro	VKTKEEGVEQLEEQRVIEAQMRRQALQDEEDKMKRKRQSRSSS--TATLSDVITTPQVECEA	154
Os_GI-218197613.pro	VKTKEEGTEQIEEQRVIEAQMRRQALQDDAERMKKKQ--AAALTDVVTTAQVEHCDT	173
Zm_GI-260935347.pro	VKTKEEGQIEEQVEEQRVIEAQMRRQALQDEEAKMKRKRQSRSSS--TATLGDVVASAQVDSNT	173
Sb_GI-242092026.pro	VKTKEEGQIEEQVEEQRVIEAQMRRQALQDEEAKMKRKRQSRSSS--TATLGDVVASAQVDSNT	173
	**:*:*:* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Pt_GI-224061326.pro	TVPS-DTTPVE-----SGEIVSSQYS-----SRRPPHAGANRDEFDLLEDIMVMEA	218
Rc_GI-255578534.pro	AVQS-FRSPLE-----AEGSIPSF-----IRHPPHYRANRDEFDLLEDIMVMEA	218
Vv_GI-147817790.pro	AVPS-FRSPVE-----GDEIDSSQDPRASMIQTLPPQRNDEFDLLEDIMVMEA	223
Gm_GI-356549538.pro	AVSSSVSVVE-----NDEIVSSQDSCATSVVRANATTRNRDDEFDLLEDIMVMEA	224

At\_GI-18411948.pro SAIS-YNSLMD-----DGEIAPSQNAS---VVRQHSRPRGNREDEVDVLEELMVMEA 220  
Ta\_GI-408743661.pro CSTS-YSVPSY--QCTEQETECCSSEPCSAQANMRSFHSRHRTRDDNIDMNIEDMMVMEA 231  
Hv\_GI-164371454.pro CSTS-YSAPPY--RCTEQETECCSSEPCSAQANMRSFHSRHRTRDGNIDMNIEDMMVMEA 231  
Bd\_GI-357140854.pro CSTS-YSVPSY--QCTEQEAECSSSEPCSAQSNMRPFVHSRHRNDDNIGMNIEEMMVMEA 231  
Os\_GI-115445269.pro CSTS-FSVPSY--RCAEQETECCSSEPCSAQTSMRPFHSRHRNDDNIDMNIEDMMVMEA 232  
Sb\_GI-242064618.pro CSTS-FSVPSY--QCTEQNECCSSEPCSSQANMRPFHSRHRNDDNVDNLEDDMMVMEA 233  
Zm\_GI-220961719.pro CSTS-FSVPSY--QRTEQNECCSSEPCSSQANMRPFHSRHRNDDNVDNLEDDMMVME 235  
Ta\_GI-408743658.pro KTKEERSIEQFEEQKVIEAQMRVVRQALQDEEDKMKRKQSRCS--SSMDMNIEDMMVMEA 231  
Bd\_GI-357125256.pro GGTSTPAASSA-----QGNDALLSQVQHSELLKNSERLQKMRNNFVDVLEEVMLMEA 208  
Os\_GI-218197613.pro GGASTTVKSSG-----QGSMDLSSQVQHAELLLKTSERLQKMRNNFMDPDEVMLVEA 227  
Zm\_GI-260935347.pro DGASTAVANSP-----RGNDVLSSEVQHSSELISRNSEAFKQMRGNFVLEEVMLMEA 227  
Sb\_GI-242092026.pro DGASTGAASSP-----QGSDAISSEVQHSSELILRNSEAFKQMRGNFVDVLEEVMLMEA 227

Pt\_GI-224061326.pro IWLSIQ-ENGRQKNFLCGDAAP-----PAQYTMEARVYVTP---AMAPPLAGSSSSPSGG 268  
Rc\_GI-255578534.pro IWLSIQ-ENGRQKNPIYTDAA-----SENYAVQGHYALQ---AMPP-VTESSSSPSGG 267  
Vv\_GI-147817790.pro IWLSIQ-DNGRHRNPLYGDTT-----AEQYVTEEHYVLP---AMAP-QVSSSSPSGG 272  
Gm\_GI-356549538.pro IWLSIQ-ENGRRRNLSFVDATSGHYVADGRYVSSVSSVSS---VMGP-PTGSSSSPSGG 278  
At\_GI-18411948.pro IWLSVQ-ETGTQRNSASGEITS-----SRQYVTDNHSYVSSPPRVTPIVEPATPSSSSGG 274  
Ta\_GI-408743661.pro IWRSIQ-EQGSIGNPACGSFMP-----FEQP-TCERQ---AFVAAPLEIPHP-GG 276  
Hv\_GI-164371454.pro IWRSIQ-EQGSIGNPACGSFMP-----FEQP-TRERQ---AFVAASPLEIPHP-GG 276  
Bd\_GI-357140854.pro IWRSIQ-EQGSIGNPACGSFMP-----FEQP-TRERQ---AFVAASPLEIPHP-GG 276  
Os\_GI-115445269.pro IWRSIQ-EQGSIGNPACGSFMP-----FEQP-TRERQ---AFVAASPLEIPHP-GG 276  
Sb\_GI-242064618.pro IWRSIQ-EQGSIGNPACGSFMP-----FEQP-TRERQ---AFVAASPLEIPHP-GG 276  
Zm\_GI-220961719.pro IWRSIQ-EQGSIGNPACGSFMP-----FEQP-TRERQ---AFVAASPLEIPHP-GG 276  
Ta\_GI-408743658.pro IWRSIQ-EQGSIGNPACGSFMP-----FEQP-TRERQ---AFVAASPLEIPHP-GG 276  
Bd\_GI-357125256.pro IWLSVQ-D--ASGNP GITGAAP-----PTIPPRSYD-----TSVTASAEAAPSG-G 250  
Os\_GI-218197613.pro LWLSLQ-DQEASGNPTCGNTVS-----SVHPPRSFE-----GSMTPIAEAASSSSA 272  
Zm\_GI-260935347.pro IWLSIQ-DQEALGNPGCVSTTP-----SSIPSRPFD-----GDMTTTAEASSG-G 272  
Sb\_GI-242092026.pro IWLSIQ-DQEALGNPGCVSTTP-----SSIPSRPFD-----GAMTTTPEASSG-G 271  
:\* \*:\* \* .

Pt\_GI-224061326.pro LACAIAALAEERQQTGGES--IVHNSGNMPSFNMLPST-SSFYNRLEQDADNYSPAQSSSN 325  
Rc\_GI-255578534.pro LACAIAALAEERQQTGGES--FAHNNENVAACNMLPGG-SSFYNRMDQDAENYSPAQSSNN 324  
Vv\_GI-147817790.pro LACAIAALAEERQQTGGES--STNYNGNMPAFNMPPGS-SRFSNRVEQYYPENYPIESSMD 329  
Gm\_GI-356549538.pro LACAIAALAEERQQTGGES--MSLTNENMPSFNMLPST-RRFYNRLEGRDMANYPPGDNLNE 336  
At\_GI-18411948.pro LSCAISALAEERQQTGGES--SSHNHNNHNVNVSYSMLPGN-CDSYDIEQEVGDIDNHHHR- 332  
Ta\_GI-408743661.pro FSCAVAAMAEHQ-PSSMDFSYMAGSSAFFVDFMFRFP-CNIAGGSMCAVE-SSPDWSGI 333  
Hv\_GI-164371454.pro FSCAVAAMAEHQ-PSSMDFSYMAGSSAFFVDFMFRFP-CNIAGGSLRAVE-SSPDWSGI 333  
Bd\_GI-357140854.pro FSCAVAAMAEHQ-PSSMDFSYMAGSSAFFVDFMFRFP-CNIAGGSMCAVD-SSPDWSGI 333  
Os\_GI-115445269.pro FSCAVAAMAEHQ-PSSMDFSYMAGSSAFFVDFMFRFP-CNIAGGSMCNLE-SSPDWSGI 333  
Sb\_GI-242064618.pro YSCAVAALAEHQ-PASMDFSYMAGSSSTYPVDFMIRRP-CNMSSGSLCGVENSLLDTWSGI 337  
Zm\_GI-220961719.pro YSCAVAALAEHQ-APSMDFSYMAGSSSTYPVDFMIRRP-CNMSSGSPCAENSLLDTWSGI 340  
Ta\_GI-408743658.pro MDMNIEDMMVME-AIWRISIQEQ-GSIGNPSCGSFMPF-EQPTRERQAFVAAPLEMPHPG 333  
Bd\_GI-357125256.pro FACAVAALAEQQHMLVGS--SIPATCQASKHDTLSRSDRSFTEDLSIAGSSSGTRVDES 308  
Os\_GI-218197613.pro FACAVAALAEQQMYGGEA--SSATATCHTSRCDILSRSDRSFTEDLSINGSGSSGARSEEP 330  
Zm\_GI-260935347.pro FACAVAALAEQQHMHGES--SSASPCQTIRFGTILSRPDRSTTQDLSVAGSSSSDSRVEEP 330  
Sb\_GI-242092026.pro FAFAVAALAEQQHMHGES--SSASACQTPRFDILSRSDRSSTEDLSVVGSSSSDSRVEEP 329  
: : :

Pt\_GI-224061326.pro VLPCRMIVTRDDGEWGDARGSDAAEAGTSYASSETAEDAGGISSLLPPP--PPTDEIGG 383  
Rc\_GI-255578534.pro MLSDCRMA--RDDVQWVADARGSDAAEAGTSYASSETTEDSDGISVVLPPPPLPPPDEIVG 382  
Vv\_GI-147817790.pro ALPDGGLAVTKDDGEWGDARGSEVAEAGTSYASSDATDEAGGVAA-----LPPTDEAEG 383  
Gm\_GI-356549538.pro EPLDEAVTMRSHGEWDMHGTQLTETATSYTNSVAAEDRGELSS-----LPRSDNDG 390  
At\_GI-18411948.pro -----HHYEMGETGSSNSYVSSYMTGEGFHN-----FPPPP--- 363  
Ta\_GI-408743661.pro ASSCSRREVVREEGECSTHDWSEGAEGTSYAGSDIVVDAGTTPP-----LPVTDN--- 384  
Hv\_GI-164371454.pro APSGTRREVMREEGECSDHWSEGAEGTSYAGSDIMADAGTMPP-----LFFADN--- 384  
Bd\_GI-357140854.pro PPSCSR-EMIREEGECSTHDWSEGAEGTSYAGSDIVADAGTMQO-----LFFAEN--- 383  
Os\_GI-115445269.pro APSCSR-EVVREEGECSDHWSEGAEGTSYAGSDIVADAGTMQO-----LFFAEN--- 383



Sb_GI-242064618.pro	APSCSR-EVVRREEGECSTDHWSEGAEAGTSYAGSDIMADTGTMQP-----LPFAEN---	387
Zm_GI-220961719.pro	APSCSR-EVVRDEGECSADHWSEGAEAGTSYAGSDIMADAGAMQP-----LPFAEN---	390
Ta_GI-408743658.pro	GPSCSRREVVRREEGECSTDHLSEGAEAGTSYAGSDIVVDAGTMLP-----LPFADN---	384
Bd_GI-357125256.pro	SINRTRQTREGAEHSNN-DRWSEVADASTSCAGSDITREAGAANL-----VASDG---	357
Os_GI-218197613.pro	SSNKMHTREGMEYSN--ERWSEMAEASSSFTGSDLTTEAGAAN-----SGG---	375
Zm_GI-260935347.pro	PTSNTHRTIEAAEYSNSNVQWSEVAEAGTSIAESDGTVEAGVDNS-----STSAG---	380
Sb_GI-242092026.pro	SSSSTHRTIEGSEYSNSNGRWSEVAEAGTSIAEADVIVEAGVGNS-----STSVG---	379
	: : : : * :	
Pt_GI-224061326.pro	SFQNVSGPIP-ESFEEQMMLAMAVSLAEARAMTSG--PQSAWQ	423
Rc_GI-255578534.pro	S--DSGMIVP-ESFEEQMMLAMAVSLAEAQAMTGG--AGSAWQ	420
Vv_GI-147817790.pro	SFQNVGGPIVPESEFEEQMMLAMAVSLAEARARTS---TQGVWQ	423
Gm_GI-356549538.pro	SLQSATEPIVPESEFEEQMMLAMAVSLAEARAMSSG--QSASWQ	431
At_GI-18411948.pro	-----PLVIVPESEFEEQMMAMAVSMAEVHATTTCAPEVTTWQ	401
Ta_GI-408743661.pro	-YSMVASHFRPESIEEQMMYSMAVSLAEA-HGRTHT-QGLAWL	424
Hv_GI-164371454.pro	-YSMAASHFRPESIEEQMMYSMAVSLAEA-HGRTHT-QGLTWL	424
Bd_GI-357140854.pro	-YNMAPSHFRPESIEEQMMYSMTVSLAEA-HGRTHS-QGLAWL	423
Os_GI-115445269.pro	-FAMAPSHFRPESIEEQMMFSMALSLADG-HGRTHS-QGLAWL	423
Sb_GI-242064618.pro	-FTMAPSHFRPESIEEQMMFSMAVSLAEAHHGRTQA-QGLAWL	428
Zm_GI-220961719.pro	-FAMGPHFRPESVEEQMMFSMAVSLAEAHHGRTQA-QGLAWL	431
Ta_GI-408743658.pro	-YSMVASHFRPESIEEQMMYSMAVSLAEA-HGRTHS-QGLAWL	424
Bd_GI-357125256.pro	--SSIGSGNIPDSFEEQMMLAISLSLVDARAMASSPGPGLTWQ	398
Os_GI-218197613.pro	--SDTGAGSIPDSFEEQMMLAMALSLADARAKASSPG--LTWR	414
Zm_GI-260935347.pro	--SNIDSVSVPDSFEEQMMLAMALSLVDARARAGSPG--LAWR	419
Sb_GI-242092026.pro	--SNIGSSSVPDSFEEQMMLAMALSLVDARSRAGSPG--LAWR	418
	:*,*:*:* * : : : * : : :	*

Tabla 2; Alineamiento de polipéptidos DA2 (SEQ ID NO: 20-35)

- 5 \* indica restos idénticos
- : indica restos conservados
- . indica restos semiconservados

El dominio RING y el primer y segundo dominio de consenso están recuadrados.

Si\_GI-514815267.pro -----  
Bd\_GI-357157184.pro -----  
Br\_DA1b.pro -----  
Br\_DA1a.pro -----  
At\_GI-15221983.pro -----  
Tc\_GI-508722773.pro -----  
Gm\_GI-356564241.pro -----  
Gm\_GI-356552145.pro -----  
Vv\_GI-302142429.pro -----  
Vv\_GI-359492104.pro -----  
Sl\_GI-460385048.pro -----  
Os\_GI-218197709.pro -----  
Os\_GI-115466772.pro -----  
Bd\_GI-357160893.pro -----  
Bd\_GI-357164660.pro -----  
Sb\_GI-242092232.pro -----  
Zm\_GI-212275448.pro -----  
At\_GI-240256211.pro -----  
At\_GI-145360806.pro -----  
At\_GI-22326876.pro MEPPAARVTPSIKADC SHSVNIICEETVLHSLVSHLSAALRREGISVFVDACGLQETKFF 60  
At\_GI-30698242.pro -----  
At\_GI-30698240.pro -----  
At\_GI-15240018.pro -----  
At\_GI-334188680.pro -----

Si\_GI-514815267.pro -----  
Bd\_GI-357157184.pro -----  
Br\_DAlb.pro -----  
Br\_DAla.pro -----  
At\_GI-15221983.pro -----  
Tc\_GI-508722773.pro -----  
Gm\_GI-356564241.pro -----  
Gm\_GI-356552145.pro -----  
Vv\_GI-302142429.pro -----  
Vv\_GI-359492104.pro -----  
Sl\_GI-460385048.pro -----  
Os\_GI-218197709.pro -----  
Os\_GI-115466772.pro -----  
Bd\_GI-357160893.pro -----  
Bd\_GI-357164660.pro -----  
Sb\_GI-242092232.pro -----  
Zm\_GI-212275448.pro -----  
At\_GI-240256211.pro -----  
At\_GI-145360806.pro -----  
At\_GI-22326876.pro SIKQNQLTGDGARVLVVVISDEVEFYDPWFPKFLKVIQGWQNNNGHVVVVPVFGVDSLTRV 120  
At\_GI-30698242.pro -----  
At\_GI-30698240.pro -----  
At\_GI-15240018.pro -----  
At\_GI-334188680.pro -----

Si\_GI-514815267.pro -----  
Bd\_GI-357157184.pro -----  
Br\_DAlb.pro -----  
Br\_DAla.pro -----  
At\_GI-15221983.pro -----  
Tc\_GI-508722773.pro -----  
Gm\_GI-356564241.pro -----  
Gm\_GI-356552145.pro -----  
Vv\_GI-302142429.pro -----  
Vv\_GI-359492104.pro -----  
Sl\_GI-460385048.pro -----  
Os\_GI-218197709.pro -----  
Os\_GI-115466772.pro -----  
Bd\_GI-357160893.pro -----  
Bd\_GI-357164660.pro -----  
Sb\_GI-242092232.pro -----  
Zm\_GI-212275448.pro -----  
At\_GI-240256211.pro -----  
At\_GI-145360806.pro -----  
At\_GI-22326876.pro YGWANSWLEAEKLTSHQSKILSNVLTDSSELVEEIVRDVYGKLYPAERVGIYARLLEIEK 180  
At\_GI-30698242.pro -----  
At\_GI-30698240.pro -----  
At\_GI-15240018.pro -----  
At\_GI-334188680.pro -----

Si\_GI-514815267.pro -----  
Bd\_GI-357157184.pro -----  
Br\_DAlb.pro -----  
Br\_DAla.pro -----  
At\_GI-15221983.pro -----  
Tc\_GI-508722773.pro -----

Gm\_GI-356564241.pro -----  
 Gm\_GI-356552145.pro -----  
 Vv\_GI-302142429.pro -----  
 Vv\_GI-359492104.pro -----  
 Sl\_GI-460385048.pro -----  
 Os\_GI-218197709.pro -----  
 Os\_GI-115466772.pro -----  
 Bd\_GI-357160893.pro -----  
 Bd\_GI-357164660.pro -----  
 Sb\_GI-242092232.pro -----  
 Zm\_GI-212275448.pro -----  
 At\_GI-240256211.pro -----  
 At\_GI-145360806.pro -----  
 At\_GI-22326876.pro LLYKQHRDIRSIGIWGMPGIGKTTLAKAVFNHMSTDYDASCFIENFDEAFHKEGLHRLLK 240  
 At\_GI-30698242.pro -----  
 At\_GI-30698240.pro -----  
 At\_GI-15240018.pro -----  
 At\_GI-334188680.pro -----

Si\_GI-514815267.pro -----  
 Bd\_GI-357157184.pro -----  
 Br\_DAlb.pro -----  
 Br\_DAla.pro -----  
 At\_GI-15221983.pro -----  
 Tc\_GI-508722773.pro -----  
 Gm\_GI-356564241.pro -----  
 Gm\_GI-356552145.pro -----  
 Vv\_GI-302142429.pro -----  
 Vv\_GI-359492104.pro -----  
 Sl\_GI-460385048.pro -----  
 Os\_GI-218197709.pro -----  
 Os\_GI-115466772.pro -----  
 Bd\_GI-357160893.pro -----  
 Bd\_GI-357164660.pro -----  
 Sb\_GI-242092232.pro -----  
 Zm\_GI-212275448.pro -----  
 At\_GI-240256211.pro -----  
 At\_GI-145360806.pro -----  
 At\_GI-22326876.pro ERIGKILKDEFDISSYIMRPTLHRDKLYDKRILVVLDDVDRDSLAAESFLKRLDWFSGS 300  
 At\_GI-30698242.pro -----  
 At\_GI-30698240.pro -----  
 At\_GI-15240018.pro -----  
 At\_GI-334188680.pro -----

Si\_GI-514815267.pro -----  
 Bd\_GI-357157184.pro -----  
 Br\_DAlb.pro -----  
 Br\_DAla.pro -----  
 At\_GI-15221983.pro -----  
 Tc\_GI-508722773.pro -----  
 Gm\_GI-356564241.pro -----  
 Gm\_GI-356552145.pro -----  
 Vv\_GI-302142429.pro -----  
 Vv\_GI-359492104.pro -----  
 Sl\_GI-460385048.pro -----  
 Os\_GI-218197709.pro -----  
 Os\_GI-115466772.pro -----

Bd\_GI-357160893.pro -----  
 Bd\_GI-357164660.pro -----  
 Sb\_GI-242092232.pro -----  
 Zm\_GI-212275448.pro -----  
 At\_GI-240256211.pro -----  
 At\_GI-145360806.pro -----  
 At\_GI-22326876.pro LIIITSVDRKQVFAFCQINQIYTVQGLNVHEALQLFSQSVFGINEPEQNDRKL SMKVIDYV 360  
 At\_GI-30698242.pro -----  
 At\_GI-30698240.pro -----  
 At\_GI-15240018.pro -----  
 At\_GI-334188680.pro -----

Si\_GI-514815267.pro -----  
 Bd\_GI-357157184.pro -----  
 Br\_DAlb.pro -----  
 Br\_DAla.pro -----  
 At\_GI-15221983.pro -----  
 Tc\_GI-508722773.pro -----  
 Gm\_GI-356564241.pro -----  
 Gm\_GI-356552145.pro -----  
 Vv\_GI-302142429.pro -----  
 Vv\_GI-359492104.pro -----  
 Sl\_GI-460385048.pro -----  
 Os\_GI-218197709.pro -----  
 Os\_GI-115466772.pro -----  
 Bd\_GI-357160893.pro -----  
 Bd\_GI-357164660.pro -----  
 Sb\_GI-242092232.pro -----  
 Zm\_GI-212275448.pro -----  
 At\_GI-240256211.pro -----  
 At\_GI-145360806.pro -----  
 At\_GI-22326876.pro NGNPLALSIYGRELMGKKSEMETAFFELKHCPPLKIQDVLKNAYSALS DNEKNIVLDIAF 420  
 At\_GI-30698242.pro -----  
 At\_GI-30698240.pro -----  
 At\_GI-15240018.pro -----  
 At\_GI-334188680.pro -----

Si\_GI-514815267.pro -----  
 Bd\_GI-357157184.pro -----  
 Br\_DAlb.pro -----  
 Br\_DAla.pro -----  
 At\_GI-15221983.pro -----  
 Tc\_GI-508722773.pro -----  
 Gm\_GI-356564241.pro -----  
 Gm\_GI-356552145.pro -----  
 Vv\_GI-302142429.pro -----  
 Vv\_GI-359492104.pro -----  
 Sl\_GI-460385048.pro -----  
 Os\_GI-218197709.pro -----  
 Os\_GI-115466772.pro -----  
 Bd\_GI-357160893.pro -----  
 Bd\_GI-357164660.pro -----  
 Sb\_GI-242092232.pro -----  
 Zm\_GI-212275448.pro -----  
 At\_GI-240256211.pro -----  
 At\_GI-145360806.pro -----  
 At\_GI-22326876.pro FFKGETVNYVMQLEESHYFPRLAIDVLVDKCVLTI SENTVQMNLIQDTQOEIFNGEIE 480

ES 2 706 499 T3

At\_GI-30698242.pro -----  
At\_GI-30698240.pro -----  
At\_GI-15240018.pro -----  
At\_GI-334188680.pro -----  
  
Si\_GI-514815267.pro -----  
Bd\_GI-357157184.pro -----  
Br\_DA1b.pro -----  
Br\_DA1a.pro -----  
At\_GI-15221983.pro -----  
Tc\_GI-508722773.pro -----  
Gm\_GI-356564241.pro -----  
Gm\_GI-356552145.pro -----  
Vv\_GI-302142429.pro -----  
Vv\_GI-359492104.pro -----  
Sl\_GI-460385048.pro -----  
Os\_GI-218197709.pro -----  
Os\_GI-115466772.pro -----  
Bd\_GI-357160893.pro -----  
Bd\_GI-357164660.pro -----  
Sb\_GI-242092232.pro -----  
Zm\_GI-212275448.pro -----  
At\_GI-240256211.pro -----  
At\_GI-145360806.pro -----  
At\_GI-22326876.pro TCTRMWEPsRIRYlLEYDELEGSGETKAMPKsGLVABHIESIFLDTSNVKFDVKHDAFKN 540  
At\_GI-30698242.pro -----  
At\_GI-30698240.pro -----  
At\_GI-15240018.pro -----  
At\_GI-334188680.pro -----  
  
Si\_GI-514815267.pro -----  
Bd\_GI-357157184.pro -----  
Br\_DA1b.pro -----  
Br\_DA1a.pro -----  
At\_GI-15221983.pro -----  
Tc\_GI-508722773.pro -----  
Gm\_GI-356564241.pro -----  
Gm\_GI-356552145.pro -----  
Vv\_GI-302142429.pro -----  
Vv\_GI-359492104.pro -----  
Sl\_GI-460385048.pro -----  
Os\_GI-218197709.pro -----  
Os\_GI-115466772.pro -----  
Bd\_GI-357160893.pro -----  
Bd\_GI-357164660.pro -----  
Sb\_GI-242092232.pro -----  
Zm\_GI-212275448.pro -----  
At\_GI-240256211.pro -----  
At\_GI-145360806.pro -----  
At\_GI-22326876.pro MFNLKFLKIYNsCSKYISGLNFPKGLDslPYELRLLHWENYPLQSLPQDFDFGHLVKLSM 600  
At\_GI-30698242.pro -----  
At\_GI-30698240.pro -----  
At\_GI-15240018.pro -----  
At\_GI-334188680.pro -----  
  
Si\_GI-514815267.pro -----

Bd\_GI-357157184.pro -----  
Br\_DAlb.pro -----  
Br\_DAla.pro -----  
At\_GI-15221983.pro -----  
Tc\_GI-508722773.pro -----  
Gm\_GI-356564241.pro -----  
Gm\_GI-356552145.pro -----  
Vv\_GI-302142429.pro -----  
Vv\_GI-359492104.pro -----  
Sl\_GI-460385048.pro -----  
Os\_GI-218197709.pro -----  
Os\_GI-115466772.pro -----  
Bd\_GI-357160893.pro -----  
Bd\_GI-357164660.pro -----  
Sb\_GI-242092232.pro -----  
Zm\_GI-212275448.pro -----  
At\_GI-240256211.pro -----  
At\_GI-145360806.pro -----  
At\_GI-22326876.pro PYSQLHKLGTRVKDLVMLKRLILSHSLQLV ECDILIYAQNI ELIDLQCTGLQRF PDTSQ 660  
At\_GI-30698242.pro -----  
At\_GI-30698240.pro -----  
At\_GI-15240018.pro -----  
At\_GI-334188680.pro -----

Si\_GI-514815267.pro -----  
Bd\_GI-357157184.pro -----  
Br\_DAlb.pro -----  
Br\_DAla.pro -----  
At\_GI-15221983.pro -----  
Tc\_GI-508722773.pro -----  
Gm\_GI-356564241.pro -----  
Gm\_GI-356552145.pro -----  
Vv\_GI-302142429.pro -----  
Vv\_GI-359492104.pro -----  
Sl\_GI-460385048.pro -----  
Os\_GI-218197709.pro ----- MGDRE 5  
Os\_GI-115466772.pro -----  
Bd\_GI-357160893.pro -----  
Bd\_GI-357164660.pro -----  
Sb\_GI-242092232.pro -----  
Zm\_GI-212275448.pro -----  
At\_GI-240256211.pro -----  
At\_GI-145360806.pro -----  
At\_GI-22326876.pro LQNLRVVNLSGCTEIKCFSGVPPNIEELHLQGT RIREIPIFNATHPPKV KLD RKKLWNLL 720  
At\_GI-30698242.pro -----  
At\_GI-30698240.pro -----  
At\_GI-15240018.pro -----  
At\_GI-334188680.pro -----

Si\_GI-514815267.pro -----  
Bd\_GI-357157184.pro -----  
Br\_DAlb.pro -----  
Br\_DAla.pro -----  
At\_GI-15221983.pro -----  
Tc\_GI-508722773.pro -----  
Gm\_GI-356564241.pro -----  
Gm\_GI-356552145.pro -----

ES 2 706 499 T3

Vv\_GI-302142429.pro -----  
 Vv\_GI-359492104.pro -----  
 Sl\_GI-460385048.pro -----  
 Os\_GI-218197709.pro DMGAGVALRFSHNDWTLEEDSKALHFLQPDVLVLF TGDYGNENVQLVKISISDLQLPKAAIL 65  
 Os\_GI-115466772.pro -----  
 Bd\_GI-357160893.pro -----  
 Bd\_GI-357164660.pro -----  
 Sb\_GI-242092232.pro -----  
 Zm\_GI-212275448.pro -----  
 At\_GI-240256211.pro -----  
 At\_GI-145360806.pro -----  
 At\_GI-22326876.pro ENFSDVEHIDLECVTNLATVTSNNHVMGKLVCLNMKYCSNLRGLPDMVSLES LKVLVYLSG 780  
 At\_GI-30698242.pro -----  
 At\_GI-30698240.pro -----  
 At\_GI-15240018.pro -----  
 At\_GI-334188680.pro -----

Si\_GI-514815267.pro -----  
 Bd\_GI-357157184.pro -----  
 Br\_DA1b.pro -----  
 Br\_DAla.pro -----  
 At\_GI-15221983.pro -----  
 Tc\_GI-508722773.pro -----  
 Gm\_GI-356564241.pro -----  
 Gm\_GI-356552145.pro -----  
 Vv\_GI-302142429.pro -----  
 Vv\_GI-359492104.pro -----  
 Sl\_GI-460385048.pro -----  
 Os\_GI-218197709.pro GNHDCWHTYQFSEKKVDRVQLQLES LGEQHVGYKCLDFPTIKLSVVGGRPPFSCGGNRIFR 125  
 Os\_GI-115466772.pro -----  
 Bd\_GI-357160893.pro -----  
 Bd\_GI-357164660.pro -----  
 Sb\_GI-242092232.pro -----  
 Zm\_GI-212275448.pro -----  
 At\_GI-240256211.pro -----  
 At\_GI-145360806.pro -----  
 At\_GI-22326876.pro CSELEKIMGFPRNLK KLYVGGTAIRELPQLPNSLEFLNAHGCKHLKSINLDFEQ LPRHFI 840  
 At\_GI-30698242.pro -----  
 At\_GI-30698240.pro -----  
 At\_GI-15240018.pro -----  
 At\_GI-334188680.pro -----

Si\_GI-514815267.pro -----  
 Bd\_GI-357157184.pro -----  
 Br\_DA1b.pro -----  
 Br\_DAla.pro -----  
 At\_GI-15221983.pro -----  
 Tc\_GI-508722773.pro -----  
 Gm\_GI-356564241.pro -----  
 Gm\_GI-356552145.pro -----  
 Vv\_GI-302142429.pro -----  
 Vv\_GI-359492104.pro -----  
 Sl\_GI-460385048.pro -----  
 Os\_GI-218197709.pro PKLLSKWYGVNDMAESAKRIYDAATNAPKEHAVILLAHNGPTCLGSRMEDICGRDWWVAGG 185  
 Os\_GI-115466772.pro -----  
 Bd\_GI-357160893.pro -----  
 Bd\_GI-357164660.pro -----



ES 2 706 499 T3

Sb\_GI-242092232.pro -----  
 Zm\_GI-212275448.pro -----  
 At\_GI-240256211.pro -----  
 At\_GI-145360806.pro -----  
 At\_GI-22326876.pro FSNCYRFSSQVIAEFVEKGLVASLARAQOEELIKAPEVLIICIPMDTRQRSSFRLLQAGRNA 900  
 At\_GI-30698242.pro -----  
 At\_GI-30698240.pro -----MPISDVASLVGGAALGAPLSE 21  
 At\_GI-15240018.pro -----MASDYSSDDEGFGEKVGLIG 21  
 At\_GI-334188680.pro -----MWCLSCFKPSTKHDP 15

Si\_GI-514815267.pro -----  
 Bd\_GI-357157184.pro -----  
 Br\_DA1b.pro -----  
 Br\_DA1a.pro -----  
 At\_GI-15221983.pro -----  
 Tc\_GI-508722773.pro -----  
 Gm\_GI-356564241.pro -----  
 Gm\_GI-356552145.pro -----  
 Vv\_GI-302142429.pro -----  
 Vv\_GI-359492104.pro -----  
 Sl\_GI-460385048.pro -----  
 Os\_GI-218197709.pro GDHGDPLEQAIISDLQREITGVSIPLVVFHMHKSLAYGRGLRKMIAFGANRTIYLNGAVV 245  
 Os\_GI-115466772.pro -----  
 Bd\_GI-357160893.pro -----  
 Bd\_GI-357164660.pro -----  
 Sb\_GI-242092232.pro -----  
 Zm\_GI-212275448.pro -----  
 At\_GI-240256211.pro -----  
 At\_GI-145360806.pro -----  
 At\_GI-22326876.pro MTDLVFWMQKPISGFMSVVVSFQDDYHNDVGLRIRCVGTWKTWNNQPDRIVERFFQCWA 960  
 At\_GI-30698242.pro -----  
 At\_GI-30698240.pro IFKLVIEEAKKVKDFKP-----L 39  
 At\_GI-15240018.pro EKDRFEAETHVIEVSQ-----H 39  
 At\_GI-334188680.pro SEDRFEEETNIVITGIS-----31

Si\_GI-514815267.pro -----  
 Bd\_GI-357157184.pro -----  
 Br\_DA1b.pro -----  
 Br\_DA1a.pro -----  
 At\_GI-15221983.pro -----  
 Tc\_GI-508722773.pro -----  
 Gm\_GI-356564241.pro -----  
 Gm\_GI-356552145.pro -----  
 Vv\_GI-302142429.pro -----  
 Vv\_GI-359492104.pro -----  
 Sl\_GI-460385048.pro -----  
 Os\_GI-218197709.pro PRVNHAQSSRQPAISTSEKTLGLEGLTGLMVPTSRAFTIVDLFEGAVEKISEVWVTVGDAR 305  
 Os\_GI-115466772.pro -----  
 Bd\_GI-357160893.pro -----  
 Bd\_GI-357164660.pro -----  
 Sb\_GI-242092232.pro -----  
 Zm\_GI-212275448.pro -----  
 At\_GI-240256211.pro -----  
 At\_GI-145360806.pro -----MDSSSSSSSSPSSSYGVARVS 22  
 At\_GI-22326876.pro PTEAPKVVADHIFVLYDTKMHPSDSEENHISMWAHEVKFEFHTVSGENNPGLGASCKVTEC 1020  
 At\_GI-30698242.pro -----  
 At\_GI-30698240.pro SQDLASTMERLVPIFNEIDMMQOGSNRGTSELKVLTTETMERAGEMVHKCSRIQWYSIAKK 99

ES 2 706 499 T3

```

At_GI-15240018.pro EADIQKAKQRSLATHEAEKLDLATHEAEQLDLAIQEFSTRQEEEEERRRTRELENDQIAN 99
At_GI-334188680.pro -----LYEDVILRQRSEADQIEWAIQDSFNPQE---TSRCRQREDDQIAR 75

Si_GI-514815267.pro -----MGWLSKIFKGSVN-RVSRGHYNGNSHE---GYS 29
Bd_GI-357157184.pro -----MGWLNKIFKGSVN-RVSRGNIDGNWHD----GNS 29
Br_DA1b.pro -----MGWLNKIFKGSNQ-RHPLGNEHYHHNGGYENYP 33
Br_DA1a.pro -----MGWLNKIFKGSSTQ-RFRLGNDHDHN---GYYSYP 31
At_GI-15221983.pro -----MGWLNKIFKGSNQ-RLRVGNKHNHN-VYYDNYP 32
Tc_GI-508722773.pro -----MDWIKKIFKGCAR-KFSEG---HHG---NYV 25
Gm_GI-356564241.pro -----MGWLSRIFKGSDHNKLESGHYKEDA----GY 29
Gm_GI-356552145.pro -----MGWLSRIFKGSDHNKLESGHYKEDA----GY 29
Vv_GI-302142429.pro -----MGWLNKIFKGSSTH-KISEGNYHGRYQ----GDT 28
Vv_GI-359492104.pro -----MGWLNKIFKGSSTH-KISEGNYHGRYQ----GDT 28
Sl_GI-460385048.pro -----MGWLNKIFKGSSTH-KISEGQYDWRCE----GHT 28
Os_GI-218197709.pro TELEQELVLYKQPHKSVPSNIAIWSMGWLTKEFFRGSTH-KISEGQYHSPAEETIWN 364
Os_GI-115466772.pro -----MGWLTKEFFRGSTH-KISEGQYHSPAEETIWN 33
Bd_GI-357160893.pro -----MGWLTKEFFRGSTH-KISEGQYHSPAEETIWN 33
Bd_GI-357164660.pro -----MGWLTKEFFRGSTH-NISEGQDQSKPAEETVWNEP 33
Sb_GI-242092232.pro -----MGWLTKEFFRGSTH-NISEGQYHSPAEETIWN 33
Zm_GI-212275448.pro -----MGWLTKEFFRGSTH-NISEGQYHSPAEETIWN 33
At_GI-240256211.pro -----MGWLTKEFFRGSTH-NISEGQYHSPAEETIWN 33
At_GI-145360806.pro HISNPCIFGVBVSSSSSTYRDKKWKLMKVVSKLFKSGSNGGSGAHTNHHPQFQEDENM 82
At_GI-22326876.pro GVEVITAAATGDTSVSGIIRESETITIEKEDTIDEEDTPLLRSRPEETNRSRSSLQ 1080
At_GI-30698242.pro -----
At_GI-30698240.pro ALYTREIKA--INQDFLFCQIELQLIQRNQLQYMRSMGMASVSTKADLLSDIGNEFSK 157
At_GI-15240018.pro VLQHEERE-----RLINKKTALEDEDELLARTLEESLKENRRRMFEEQVKNDEQ 150
At_GI-334188680.pro GLQYVEET-----ELDKSVVDEED-----QQ 96

Si_GI-514815267.pro TQHTKSY----- 36
Bd_GI-357157184.pro SENIR----- 34
Br_DA1b.pro -HEHS-----EPSAETDA-----DHT 48
Br_DA1a.pro -HDEPSADTDPDPDPDE-----THT 52
At_GI-15221983.pro TASHDDEPSAADTDADNDEP-----HHT 55
Tc_GI-508722773.pro EDPHP-----QF 32
Gm_GI-356564241.pro LPSTS----- 34
Gm_GI-356552145.pro LPSTS----- 34
Vv_GI-302142429.pro VQNEP----- 33
Vv_GI-359492104.pro VQNEP----- 33
Sl_GI-460385048.pro EEDDP----- 33
Os_GI-218197709.pro SNSAVVTMVPLESTFGQLDLLLTLATDLRQLVIDDVCCKLRQQAQPVLHMLYSQLQLLQ 424
Os_GI-115466772.pro SNSAVVT----- 40
Bd_GI-357160893.pro SSSTVVT----- 40
Bd_GI-357164660.pro SSSTAVN----- 40
Sb_GI-242092232.pro SSSPVVT----- 40
Zm_GI-212275448.pro SSSPVVT----- 40
At_GI-240256211.pro RYSAEGSDFDKKEIECALALSLS-----EQEHVIPQDDKGGKIIIE 73
At_GI-145360806.pro VFPLPPS----- 89
At_GI-22326876.pro LSSTSSKVRSGNVFWKWLGCFF-----LQPKNLSRSRRRTALEEA 1122
At_GI-30698242.pro -----
At_GI-30698240.pro LCLVAQPEVVTKFWLKRPLMELKMLFEDGV-----VTVVVSAPYALGKTTLVTK 207
At_GI-15240018.pro LALIVQESLNMEYPIR-LEEYK-----SISRRLDQVDEQ-FAKA 189
At_GI-334188680.pro LSKIVEESLKE----- 107

Si_GI-514815267.pro -----GAHGNEDE-----DMDHAIALSLSQDQRKGAIDTEHHLDE-----ED 74
Bd_GI-357157184.pro -----GAYDESNE-----DIDRAIALSLAEDPNKGAIDDPDYS----- 70
Br_DA1b.pro QEPSTSEETWNGKENE-----EVDRVIALSILEE-ENQRPETNTG----- 88

```

ES 2 706 499 T3

Br_DAla.pro	QEPSTSEEDTS-GQENE-----DIDRAIALSLIENSQGGQTNNTCAAN-----	93
At_GI-15221983.pro	QEPSTSEDNTSNDQENE-----DIDRAIALSLLEE--NQEQTSISG-----	94
Tc_GI-508722773.pro	NAPSVS-GDAWQELENE-----DVDRAIALSLLGE--SQKGRKVID-----	70
Gm_GI-356564241.pro	GVTN-----NQENENE-----DIDRAIALSLVEESRRANNVNGER-----	69
Gm_GI-356552145.pro	GVTNDAWNQSQNQENENE-----DIDRAIALSLVEETQKANNVNV-----	73
Vv_GI-302142429.pro	----SCSGDVWAETENE-----DIDRAIALSLSEE--EQKGGKVID-----	68
Vv_GI-359492104.pro	----SCSGDVWAETENE-----DIDRAIALSLSEE--EQKGGKVID-----	69
Sl_GI-460385048.pro	----STAEDSWSEIE-----EIDRAIAISLSEE--EQKGGKVID-----	66
Os_GI-218197709.pro	TSHAHQHGDVPSEFDNE-----DIARAIISLLEEEQRKAKAIEKD-----	465
Os_GI-115466772.pro	-----DVPSEFDNE-----DIARAIISLLEEEQRKAKAIEKD-----	73
Bd_GI-357160893.pro	-----DVLSEFDNE-----DIDRAIALSLSEE-QRKSJGTGKD-----	72
Bd_GI-357164660.pro	-----YALSEFDNE-----DIDRAIALSLSEEEQRKSJGTGKD-----	73
Sb_GI-242092232.pro	-----DIFSEFNNE-----DIDRAIALSLSEEEQRKARTIDKD-----	73
Zm_GI-212275448.pro	-----DILSEFNNE-----DIDRAIALSLSEEEQRKEKAIDKD-----	73
At_GI-240256211.pro	YKSETEEDDDDEDEDEEYMQLEAAEEERRVAQAQIEEEKRAEAQLEETEKLAK	133
At_GI-145360806.pro	----SLDRSRGARDKE-----ELDRSISLSLADN-TKRPHGYGWS-----	125
At_GI-22326876.pro	LEEALKEREKLEDTREL-----QIALIESKKIKKIQADERDQIKHADER----	1167
At_GI-30698242.pro	----MVRKRQEEDEKI-----ETERVKEESLKLAKQAEKRRLEESKEQ----	41
At_GI-30698240.pro	LCHDADVKEKFKQIFFI-----SVSKFPNVRLLIGHKLEHIGCKANEYEN----	252
At_GI-15240018.pro	VKESLKNKGKGFEDFE-----QVKKDEQLALIVQESLNMVESPPRLEEN----	234
At_GI-334188680.pro	-----KGKSKQFEDD-----QVENDEQQALMVQESLYMVELSAQLEED----	145
Si_GI-514815267.pro	EQLARALQENTSPILDEDEQLAR-----ALQESMNDHEP	108
Bd_GI-357157184.pro	-----LEEDEQLAR-----ALHESLNTGSP	90
Br_DAlb.pro	-----AWKHAM-MDDDEQLAR-----AIQESMIARN-	113
Br_DAla.pro	-----AGKYAM-VDEDEQLAR-----AIQESMVGNT	119
At_GI-15221983.pro	-----KYSMPVDEDEQLAR-----ALQESMVGNS	119
Tc_GI-508722773.pro	-----DEYQLEDEDEQLAR-----ALQESLNFEP	94
Gm_GI-356564241.pro	-----ILSLQTLLEDEDEQLAR-----AIEQSLNLESP	96
Gm_GI-356552145.pro	-----DYRSQLEDEDEQLAR-----AIEQSLNLESP	98
Vv_GI-302142429.pro	-----NEFQLEDEDEQLAR-----AIQESLNIESP	92
Vv_GI-359492104.pro	-----L-DNEFQLEDEDEQLAR-----AIQESLNIESP	95
Sl_GI-460385048.pro	-----SESQLEDEDEQLAR-----ALQESLNIESP	90
Os_GI-218197709.pro	-----MHLEDEDEQLAR-----AIQESLNIESP	487
Os_GI-115466772.pro	-----MHLEDEDEQLAR-----AIQESLNIESP	95
Bd_GI-357160893.pro	-----LHLEDEDEQLAR-----AIHESLNIESP	94
Bd_GI-357164660.pro	-----QHLEDEDEQLAR-----AIQESLNIESP	95
Sb_GI-242092232.pro	-----MHLEDEDEQLAR-----AIQESLNIESP	95
Zm_GI-212275448.pro	-----MHLEDEDEQLAR-----AIQESLNIESP	95
At_GI-240256211.pro	ARLEEEEMRRSKAQLEDELLAK-----ALQESMNVGSP	167
At_GI-145360806.pro	-----MDNDRDPPR-----PFHGGLNPSSF	145
At_GI-22326876.pro	-----EQRKHSKDHEEEIEESNEKEERRHSDYVIEELVLKGGKRRKQLDDDKADEKEQ	1221
At_GI-30698242.pro	-----GKRIQVDDD-----QLAKTTSKDKGQ	62
At_GI-30698240.pro	-----DLDAMLYIQQLLQGLGRNGSILLVDDV-----WAEESLLQKFL	292
At_GI-15240018.pro	-----NNISTRAPVDEDEQLAK-----AVEESLKGKQ	262
At_GI-334188680.pro	-----KNISTIPPLNEDAQLQK-----VIWESAKGKQ	173
Si_GI-514815267.pro	PR-----QHIPIEDVHSESAPASSLPPYVFPPTNGSRVCA	142
Bd_GI-357157184.pro	PH-----QNVVVDVPSERVPTREPPPPVFLSSGFRACA	124
Br_DAlb.pro	-----GTT-----YDFGNAY-----GNCHMHGGGNVYDNGDIYYPRPIAFSMDFRICA	156
Br_DAla.pro	PRQKHGSS-----YDIGNAYGAGDVYGNCHMHGGGNVYANGDIYYPRPTAFPMDFRICA	173
At_GI-15221983.pro	PRHKS GST-----YDNGNAYGAGDLYGNCHMYGGGNVYANGDIYYPRPIFQMDFRICA	173
Tc_GI-508722773.pro	P-----QYENANMYQMPVHFPMGYRICA	118
Gm_GI-356564241.pro	P-----RYGNENMYQPPIQYFPLG--ICA	118
Gm_GI-356552145.pro	P-----RYGNENMYQPPIQYFPMGSRICA	122
Vv_GI-302142429.pro	PQ-----HGNGN-----GNGNIYQPIPPYSTGFRICA	120
Vv_GI-359492104.pro	PQ-----HGNGN-----GNGNIYQPIPPYSTGFRICA	123

Sl\_GI-460385048.pro PQ-----HVSRRNDHGGGNVYGNNGFYHVPVFPYSASFVCA 126  
 Os\_GI-218197709.pro -----PRARENGNANGGNMYQLPFMFSSGFRCA 517  
 Os\_GI-115466772.pro -----PRARENGNANGGNMYQLPFMFSSGFRCA 125  
 Bd\_GI-357160893.pro PCARDNGSPPH--ARDNSSPHARENSSHPRARENGIANGGNSIQHSPFMFSSGFRCA 151  
 Bd\_GI-357164660.pro -----PRAREKSSHPRARENGSANGGNSYQL-PLMFSSGFRCA 133  
 Sb\_GI-242092232.pro P-----PSRENGSANGGNAYHPLPFMFSSGFRACA 125  
 Zm\_GI-212275448.pro PRRNGSAN-----GGTMYHPPRETGNAYQPPRENGSANGGNAYHPLPFMFSSGFRACA 148  
 At\_GI-240256211.pro P-----RYDPGNILQPYPFLLIPSSHRICV 191  
 At\_GI-145360806.pro IP-----PYEPSYQYRRRQRICG 163  
 At\_GI-22326876.pro IKH-----SKDHVEE-----EVNPPLSKCK 1241  
 At\_GI-30698242.pro INH-----SKDVVEE-----DVPNPPS--I 80  
 At\_GI-30698240.pro IQLPDYKILVTSRFEFTSFGPTFHLKPLIDDEVECRDEIEENEKLP---EVNPPLSMCG 348  
 At\_GI-15240018.pro IKQ-----SKDEVEGDGMLL---ELNPPPSLCG 287  
 At\_GI-334188680.pro IEH-----FKDPVEEDGNLPRVDLNVNHPHSICD 202

Si\_GI-514815267.pro GCKTPIGQGRFLSCMDSVWHPQCFCRCYGCPIPISEYEFVAVHE---DHAYHRSCYKERF-H 198  
 Bd\_GI-357157184.pro GCNNPIGNRFLSCMDSVWHPQCFCRCFACNKPISEYEFAMHE---NQPYHKSCYKDF-H 180  
 Br\_DAlb.pro GCNMEIGHGRFLNCLNALWHPQCFCRCYGCSPHPISEYEFSTSG---NYPFHKACYRERF-H 212  
 Br\_DAla.pro GCNMEIGHGRFLNCLNALWHPQCFCRCYGCSPHPISEYEFSTSG---NYPFHKACYRERY-H 229  
 At\_GI-15221983.pro GCNMEIGHGRFLNCLNALWHPQCFCRCYGCSPHPISEYEFSTSG---NYPFHKACYRERY-H 229  
 Tc\_GI-508722773.pro GCNTEIGHGRFLNCLNAFWHPQCFCRCHACNLPISDYEFMSMG---NYRFHKSCYKERY-H 174  
 Gm\_GI-356564241.pro GCYTEIGFGRFLNCLNAFWHPQCFCRACNLPISDYEFSTSG---NYPYHKSCYKESY-H 174  
 Gm\_GI-356552145.pro GCYTEIGYGRFLNCLNAFWHPQCFCRACNLPISDYEFSTSG---NYPYHKSCYKESY-H 178  
 Vv\_GI-302142429.pro GCNTEIGHGRFLSCMGAVWHPQCFCRCHGCGYPISDYEFMSMG---NYPYHKSCYKEHY-H 176  
 Vv\_GI-359492104.pro GCNTEIGHGRFLSCMGAVWHPQCFCRCHGCGYPISDYEFMSMG---NYPYHKSCYKEHY-H 179  
 Sl\_GI-460385048.pro GCSTEIGHGRFLSCMGAVWHPQCFCRCHACNQPISDYEFMSMG---NYPYHKTCKYKEHY-H 182  
 Os\_GI-218197709.pro GCHSEIGHGRFLSCMGAVWHPQCFCRCHACNQPIYDYEFMSMG---NHPYHKTCKYKERF-H 573  
 Os\_GI-115466772.pro GCHSEIGHGRFLSCMGAVWHPQCFCRCHACNQPIYDYEFMSMG---NHPYHKTCKYKERF-H 181  
 Bd\_GI-357160893.pro GCHSEIGHGRFLSCMGAVWHPQCFCCHACSQPIYDYEFMSMG---NHPYHKTCKYKERF-H 207  
 Bd\_GI-357164660.pro GCHSEIGHGRFLSCMGAVWHPQCFCCHGCSQPIYDYEFMSMG---NHPYHKTCKYKERF-H 189  
 Sb\_GI-242092232.pro GCHREIGHGRFLSCMGAVWHPQCFCRCHACSQPIYDYEFMSMG---NHPYHKTCKYKEQF-H 181  
 Zm\_GI-212275448.pro GCHREIGHGRFLSCMGAVWHPQCFCRCHACSQPIYDYEFMSMG---NHPYHKTCKYKEQF-H 204  
 At\_GI-240256211.pro GCQAEIGHGRFLSCMGVWHPQCFCNACDKPIIDYEFMSMG---NRPYHKLCKYKEQH-H 247  
 At\_GI-145360806.pro GCNSDIGSGNYLGMGTFFHPECFRCHSCGYAITEHEFSLSG---TKPYHKLCKFKELT-H 219  
 At\_GI-22326876.pro DCKSAIEDGISINAYGSVWHPQCFCCLRCREPIAMNEISDLR---GMYHKPCYKELR-H 1296  
 At\_GI-30698242.pro DGKSEIGDGTSVN-----PRCLCCFCHRRPFVWHEILKK---GKPHIDCYKEYYRN 128  
 At\_GI-30698240.pro GCNSAVKHESVNLGLVWHPGCFCCRSCKPIAIEHELENHVSNSRKGKFKSCYER----404  
 At\_GI-15240018.pro GCNFAVEHGGSVNLGLVWHPGCFCCRACHKPIAIEHDIENHVSNSRKGKFKSCYER----343  
 At\_GI-334188680.pro GCKSAIEYGRSVHALGVNWHPECFCCRYCDKPIAMHEFS---NTKGRCHITCYERSH-- 256

\* \* \* \* \*

Si\_GI-514815267.pro PKCDVCNSFIPTNKNGLIEYRAHPFWMQKYCPSHENDGTPRCCSCEMPEPKHSQYITLDD 258  
 Bd\_GI-357157184.pro PKCDVCKDFIPTNKNGLIEYRAHPFWMQKYCPSHEDDGTTRCCSCEMPEPTDIKIRLDD 240  
 Br\_DAlb.pro PKCDVCSLFIPTNHAGLIEYRAHPFVWQKYCPSHEHDATPRCCSCEMPEPRNTGYFELND 272  
 Br\_DAla.pro PKCDVCSLFIPTNHAGLIEYRAHPFVWQKYCPSHEHDATPRCCSCEMPEPRNTGYVELND 289  
 At\_GI-15221983.pro PKCDVCSHFIPTNHAGLIEYRAHPFVWQKYCPSHEHDATPRCCSCEMPEPRNTRYVELND 289  
 Tc\_GI-508722773.pro PKCDVCNDFIPTNPAGLIEYRAHPFVWQKYCPSHEHDSTPRCCSCEMPEPQDTGYVALND 234  
 Gm\_GI-356564241.pro PKCDVCKHFIPTNPAGLIEYRAHPFVWQKYCPTHEHDGTTRCCSCEMPEQEAQYIALKD 234  
 Gm\_GI-356552145.pro PKCDVCKHFIPTNPAGLIEYRAHPFVWQKYCPTHEHDGTTRCCSCEMPEQEAQYIALKD 238  
 Vv\_GI-302142429.pro PKCDVCKHFIPTNPAGLIEYRAHPFVWQKYCPSHEHDRTPRCCSCEMPEPRDTRYVALND 236  
 Vv\_GI-359492104.pro PKCDVCKHFIPTNPAGLIEYRAHPFVWQKYCPSHEHDRTPRCCSCEMPEPRDTRYVALND 239  
 Sl\_GI-460385048.pro PKCDVCKHFIPTNAGLIEYRAHPFVWQKYCPEHEHDGTTRCCSCEMPEPRDTRYIALDD 242  
 Os\_GI-218197709.pro PKCDVCKQFIPTNMNGLIEYRAHPFVWQKYCPSHEVDGTTRCCSCEMPEPRESRYVLLDD 633  
 Os\_GI-115466772.pro PKCDVCKQFIPTNMNGLIEYRAHPFVWQKYCPSHEVDGTTRCCSCEMPEPRESRYVLLDD 241  
 Bd\_GI-357160893.pro PKCDVCKQFIPTNMNGLIEYRAHPFVWQKYCPSHEVDGTTRCCSCEMPEPRESRYVLLDD 267  
 Bd\_GI-357164660.pro PKCDVCKQFIPTNMNGLIEYRAHPFVWQKYCPSHEVDGTTRCCSCEMPEPRESRYVLLDD 249  
 Sb\_GI-242092232.pro PKCDVCKQFIPTNMNGLIEYRAHPFVWQKYCPSHEVDGTTRCCSCEMPEPRESRYVLLDD 241  
 Zm\_GI-212275448.pro PKCDVCKQFIPTNMNGLIEYRAHPFVWQKYCPSHEMDGTTRCCSCEMPEPRESKYVLLDD 264

ES 2 706 499 T3

At\_GI-240256211.pro PKCDVCHNFIP... 307
At\_GI-145360806.pro PKCEVCHHFIP... 279
At\_GI-22326876.pro PNCYVCEKKIP... 1355
At\_GI-30698242.pro RNCYVCQQKIP... 188
At\_GI-30698240.pro -YCYVCKEKK... 457
At\_GI-15240018.pro -YCYVCKEKK... 396
At\_GI-334188680.pro PNCHVCKKFP... 311

\* \* \* : \* \* \* : \* \* \* : \* \* \* : \* \* \* : \* \* \* : \* \* \* : \* \* \*

Si\_GI-514815267.pro GRRLCLECLHTA... 318
Bd\_GI-357157184.pro GRKLCLECLTS... 300
Br\_DAlb.pro GRKLCLECLDSS... 332
Br\_DAla.pro GRKLCLECLDS... 349
At\_GI-15221983.pro GRKLCLECLDS... 349
Tc\_GI-508722773.pro GRKLCLECLDS... 294
Gm\_GI-356564241.pro GRKLCLECLDS... 294
Gm\_GI-356552145.pro GRKLCLECLDS... 298
Vv\_GI-302142429.pro GRKLCLECLDS... 296
Vv\_GI-359492104.pro GRKLCLECLDS... 299
Sl\_GI-460385048.pro GRKLCLECLDS... 302
Os\_GI-218197709.pro GRKLCLECLDS... 693
Os\_GI-115466772.pro GRKLCLECLDS... 301
Bd\_GI-357160893.pro GRKLCLECLDS... 327
Bd\_GI-357164660.pro GRKLCLECLDS... 309
Sb\_GI-242092232.pro GRKLCLECLDS... 301
Zm\_GI-212275448.pro GRKLCLECLDS... 324
At\_GI-240256211.pro GRKLCLECLDS... 367
At\_GI-145360806.pro GRSLCECMETA... 339
At\_GI-22326876.pro FRWLCRECMDS... 1415
At\_GI-30698242.pro FRWLCIECMGS... 248
At\_GI-30698240.pro GRWLCLECG-... 514
At\_GI-15240018.pro GRWLCLECMNS... 456
At\_GI-334188680.pro NRWLCVKMECA... 371

\* \* \* \* : \* : \* \* : : : : : : : : \* \* : \* : \*



Si\_GI-514815267.pro G-HHLP---ETR... 373
Bd\_GI-357157184.pro G-HHLP---ETR... 355
Br\_DAlb.pro GHYHMP---ETR... 385
Br\_DAla.pro GHYHMP---ETR... 405
At\_GI-15221983.pro GHYHMP---ETR... 404
Tc\_GI-508722773.pro GHYHMP---ETR... 350
Gm\_GI-356564241.pro GHYHMP---ETR... 345
Gm\_GI-356552145.pro GHYHMP---ETR... 349
Vv\_GI-302142429.pro GHYHMP---ETR... 352
Vv\_GI-359492104.pro GHYHMP---ETR... 355
Sl\_GI-460385048.pro GHYHMP---ETR... 358
Os\_GI-218197709.pro GHYHMP---ETR... 748
Os\_GI-115466772.pro GHYHMP---ETR... 356
Bd\_GI-357160893.pro GHYHMP---ETR... 382
Bd\_GI-357164660.pro GHYHMP---ETR... 364
Sb\_GI-242092232.pro GHYHMP---ETR... 356
Zm\_GI-212275448.pro GHYHMP---ETR... 378
At\_GI-240256211.pro GHYHMP---ETR... 423
At\_GI-145360806.pro GHYHMP---ETR... 394
At\_GI-22326876.pro DKQGDQCLMV... 1474
At\_GI-30698242.pro DYHR---AAV... 304
At\_GI-30698240.pro DNHY---EVL... 570
At\_GI-15240018.pro DYQY---EVL... 512

ES 2 706 499 T3

```

At_GI-334188680.pro      DNQH---GVVTRGICLSEGCQIVNSVFKKPTM-GPNGELVSLGTEPKQVVGGEVTAILIL 427
                          *  * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Si_GI-514815267.pro      YGLPRLTGSILAHEMMHAYLRLK-----GYRTLSPEV 406
Bd_GI-357157184.pro      YGLPRLTGSILAHEMMHAYLRLK-----GYRSLSPQV 388
Br_Dalb.pro              FGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRK-----GFRPLSQDV 418
Br_DAla.pro              FGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRK-----GFRPLSQDV 438
At_GI-15221983.pro       FGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRK-----GFRPLSQDV 437
Tc_GI-508722773.pro      YGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRQ-----GFRPLSQDV 383
Gm_GI-356564241.pro      YGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRK-----GYRTLSQDV 378
Gm_GI-356552145.pro      YGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRK-----GYRTLSQDV 382
Vv_GI-302142429.pro      YGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRNL-----GYRTLAQDV 385
Vv_GI-359492104.pro      YGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRLN-----GYRTLAQDV 388
Sl_GI-460385048.pro      YGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRLR-----GYRTLSQDV 391
Os_GI-218197709.pro      YGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRK-----GYRTLSQDV 781
Os_GI-115466772.pro      YGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRK-----GYRTLSQDV 389
Bd_GI-357160893.pro      YGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRK-----GYRTLSPEI 415
Bd_GI-357164660.pro      YGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRLK-----GYRTLSPEI 397
Sb_GI-242092232.pro      YGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRLK-----GYRTLSQDV 389
Zm_GI-212275448.pro      YGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRK-----GYRTLSQDV 411
At_GI-240256211.pro      YGLPRLTGSILAHEMMHAWMLRLN-----GYPNLRPEV 456
At_GI-145360806.pro      YGLPRLTGAILAHMLHGWMLRLN-----GFRNLNPEV 427
At_GI-22326876.pro       YGLPRLTGYILAHEMMHAYLRNL-----GYRNLNMLV 1507
At_GI-30698242.pro       YGLPRLTGYILAHEMMHAWMLRLN-----GYRNLNMLV 337
At_GI-30698240.pro       YGLPRLTGYILAHEMMHAWMLRLN-----GHMNLNMLV 603
At_GI-15240018.pro       YGLPRLTGYILAHEMMHAYLRNL-----GHRNLNMLV 545
At_GI-334188680.pro      YGLPRLTGYILAHEMMHAWMLRLNGTSTQFVFANQYGESSLQKLVLEGLITGYRNLKLEL 487
                          : * * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * * :
Si_GI-514815267.pro      EEGICQVLAHLWLESEITSGSGSMATSAASSS----SSTS--SSSKKA-KTEFEKRL 458
Bd_GI-357157184.pro      EEGICQVLSHMWLESEIAGSGNTASTSVSS----SSAP--TSSKKA-KTEFEKRL 440
Br_Dalb.pro              EEGICQVMAHKWLEAELAAGSRNSNAASSSSSS----Y----GGVKKGP-RSQYERKL 467
Br_DAla.pro              EEGICQVMAHKWLEAELAAGSRNSNVASSSSSS----RGVKKGP-RSQYERKL 485
At_GI-15221983.pro       EEGICQVMAHKWLEAELAAGSRNSNAASSSSSS----QGLKKGP-RSQYERKL 485
Tc_GI-508722773.pro      EEGICQVLAHMWLLTQLEYAS-SSNVASASSSA----S----SRLQKGR-RPQFEKRL 431
Gm_GI-356564241.pro      EEGICQVLAHMWLESELSSASGSNFVSASSSSA----S----HTSRKGR-RPQFEKRL 427
Gm_GI-356552145.pro      EEGICQVLSHMWLESELSSASGSNFVSASSSSA----S----HTSRKGR-RPQFEKRL 431
Vv_GI-302142429.pro      EEGICQVLAHMWLESELSSASGSNFVSASSSSA----S----HTSRKGR-RPQFEKRL 415
Vv_GI-359492104.pro      EEGICQVLAHMWLESELSSASGSNFVSASSSSA----S----HTSRKGR-RPQFEKRL 435
Sl_GI-460385048.pro      EEGICQVLAHMWLESELSSASGSNFVSASSSSA----S----HTSRKGR-RPQFEKRL 439
Os_GI-218197709.pro      EEGICQVLAHMWLESEIAGSGSNGASTSSSSS----AS---TSSKKG-RSQFEKRL 831
Os_GI-115466772.pro      EEGICQVLAHMWLESEIAGSGSNGASTSSSSS----AS---TSSKKG-RSQFEKRL 439
Bd_GI-357160893.pro      EEGICQVLAHMWLESEIAGSGSNGASTSSSSS----SS---ISSKKG-RSQFEKRL 465
Bd_GI-357164660.pro      EEGICQVLAHMWLESEIAGSGSNGASTSSSSS----S-----SKKGR-RSQFEKRL 444
Sb_GI-242092232.pro      EEGICQVLAHMWLESEIAGSGSNGASTSSSSS----SS---MSSKAG-RSQFEKRL 439
Zm_GI-212275448.pro      EEGICQVLAHMWLESEIAGSGSNGASTSSSSS----SS---TSSKKG-RSQFEKRL 461
At_GI-240256211.pro      EEGICQVLAHMWLESEIAGSGSNGASTSSSSS----VVS--ASSKGE-RSDFEKL 507
At_GI-145360806.pro      EEGICQVLSYMWLESEVLSDPSTRNLPSSTSSVA----TSSSSSFSNKKGR-KSNVEKRL 481
At_GI-22326876.pro       EEGICQVLAHMWLESEIAGSGSNGASTSSSSS----TATIASSS--SSRTPPLSTTTSSKVD-PSDFEKL 1560
At_GI-30698242.pro       EEGICQVLAHMWLESEIAGSGSNGASTSSSSS----TATIASSS--SSRTPPLSTTTSSKVD-PSDFEKL 397
At_GI-30698240.pro       EEGICQVLAHMWLESEIAGSGSNGASTSSSSS----TATIASSS--SSRTPPLSTTTSSKVD-PSDFEKL 659
At_GI-15240018.pro       EEGICQVLAHMWLESEIAGSGSNGASTSSSSS----TATIASSS--SSRTPPLSTTTSSKVD-PSDFEKL 601
At_GI-334188680.pro      EEGICQVLAHMWLESEIAGSGSNGASTSSSSS----TATIASSS--SSRTPPLSTTTSSKVD-PSDFEKL 538
                          * * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * * :
Si_GI-514815267.pro      GEFFKHQIETDPSVAYGDFRAGMRAVERYG--LRSTLDHIKLTGSFP----- 504
Bd_GI-357157184.pro      GAFIKNQIETDSSVEYGDGFRAGMRAVERYG--LRSTLDHMKITGSFPY---- 487
Br_Dalb.pro              GEFFKHQIESDASPVYGDGFRAGRLAVNKYG--LWRTLEHIQMTGRFPV---- 514
Br_DAla.pro              GEFFKHQIESDASPVYGDGFRAGRLAVNKYG--LPKTLEHIQMTGRFPV---- 532
  
```

ES 2 706 499 T3

At_GI-15221983.pro	GEFFKHQIESDASPVYGDGFRAGRLAVHKYG--LRKTLLEHIQMTGRFPV----	532
Tc_GI-508722773.pro	GEFFKHQIESDTSVPVYGDGFRAGHQAVYKYG--LRRTLEHIRMTGRFPY----	478
Gm_GI-356564241.pro	GEFFKHQIESDISPVYGDGFRAGQKAVRKYG--LQRTLHHIRMTGTFFY----	474
Gm_GI-356552145.pro	GEFFKHQIESDISPVYGGGFRAGQKAVSKYG--LQRTLHHIRMTGTFFY----	478
Vv_GI-302142429.pro	GQFFKHQIESDTSLVYAGGFRAGHQAVLKYG--LPATLKHIHLTGNEFFY----	462
Vv_GI-359492104.pro	GQFFKHQIESDTSLVYAGGFRAGHQAVLKYG--LPATLKHIHLTGNEFFY----	482
Sl_GI-460385048.pro	GDFFKHQIESDTSPIYGNDFRAGNRAVLQYG--LERTLDIRMTGTFFY----	486
Os_GI-218197709.pro	GDFFKHQIESDTSMAYGDGFRAGNRAVLQYG--LKRTLEHIRLRTGTFFP----	878
Os_GI-115466772.pro	GDFFKHQIESDTSMAYGDGFRAGNRAVLQYG--LKRTLEHIRLRTGTFFP----	486
Bd_GI-357160893.pro	GDFFKHQIESDTSVAYGNDFRSGNRAVLQYG--LKRTLEHIWLTGTWPF----	512
Bd_GI-357164660.pro	GDFFKHQIESDTSVAYGDGFRAGNRAVLQYG--LKRTLEHIRLRTGTLPF----	491
Sb_GI-242092232.pro	GDFFKHQIETDTSMAYGEGFRAGNRAVLQYG--LKRTLEHIRLRTGTFFP----	486
Zm_GI-212275448.pro	GDFFKHQIETDTSMAYGDGFRAGNRAVLHYG--LKRTLEHIRLRTGTFFP----	508
At_GI-240256211.pro	GEFFKHQIESDSSAYGDGFRQGNRAVLKHG--LRRTLDHIRLRTGTFFP----	553
At_GI-145360806.pro	GEFFKHQIAHDASPAYGGGFRAANAACKYG--LRRTLDHIRLRTGTFFP----	528
At_GI-22326876.pro	VNFCKHQIETDESPFFGDGFRKVNKMMASNNHSLKDTLKEIISISKTPQYSKL	1613
At_GI-30698242.pro	VEFCMNQIKEDDSPVYGLGFKQVYEMMVSNNYNIKDTLKDIVSASNATPDSTV	450
At_GI-30698240.pro	VEFCKNQIETDESPVYGLGFRTVNEMVTNS--SLQETLKEILRRR-----	702
At_GI-15240018.pro	VEFCKNQIETDSDSPVYGLGFRTVNEMVTNS--SLQETLKEILRQR-----	644
At_GI-334188680.pro	VEFCKDQIETDSDSPVYGVGFRKVNQMVSDS--SLHKILKSIQHWTKPDSNL--	587

\* .\*\* \* \* ;\* \*\*; : \* . :

Tabla 3 Alineamiento de proteínas DA1 (SEQ ID NO: 41-64)

```

Zm_GI-223973923.pro -----MNSS--RQELHYINTGFYTTITESFMDFFEGLYAHA 36
Sb_GI-242042045.pro -----MNSS--RQELHYINTGFYTTITESFMDFFEGLYAHA 36
Zm_GI-226496789.pro -----MTSS--RQELHYINTGFYTTITESFMDFFEGLYAHA 36
Os_GI-222624282.pro MTESHERDTEVTRWQVHPDSEGMNGS--RQELHYINTGFYTTITESFMDFFEGLYAHA 58
Os_GI-115451045.pro -----MNGS--RQELHYINTGFYTTITESFMDFFEGLYAHA 36
Bd_GI-357113826.pro -----MNGS--RQELHYINTGFYTTITESFMDFFEGLYAHA 36
Sl_GI-460410949.pro -----MNWN--QQTEIYYTNGAMPYNSIGSFMDFFGGVYDHY 36
Rc_GI-255582236.pro -----MEVHYINTGFYTTITESFLDFFEGLSHPV 30
Pt_GI-224059640.pro -----MEVHYMNTDFYTTITESFMDFFEGLYTHAPV 30
Gm_GI-356548935.pro -----MNDG--RQMGVHYVDAGFPYAVNDFVDFQGGFTHVPV 36
Gm_GI-356544176.pro -----MNDG--RQMGVNYVDAGFPYAVNDFVDFQGGFTHVPV 36
Vv_GI-359487286.pro -----MNGN--RQMEVHYINTGFYTTITESFMDFFEGLYHVPV 36
Tc_GI-508704801.pro -----MNGN--RQMEVHYIDTGFYTTITESFMDFFEGLYHVPV 36
Pp_GI-462414664.pro -----MNGN--GQMDVHYIDTDFYTTITESFMDFFGGVTHVPM 36
Cr_GI-482561003.pro -----MNGD--RPVEDAHYTEAEFPYAASGSYIDFYGGAPQGGL 37
At_GI-22331928.pro -----MNGDNRPVEDAHYTEETGFYTAATGSYMDFYGGAAQGGL 38
Sl_GI-460370551.pro -----MSGD--QHMEAMHYMNGFPYVNPESFPGLDGVSQAPI 37

```

\* : : \*\* . : . \* \*

```

Zm_GI-223973923.pro DFALTDGFQDQ--GNPYWAMHTNSYKYGYSGGP--NYYSYAHVYDIDDYMRADGGRRI 92
Sb_GI-242042045.pro DFALMDGFQDQ--GNPYWAMHTNSYKYGYSGGP--NYTYAHVYDIDDYMRADGGRV 92
Zm_GI-226496789.pro DFALMDGFQDQ--GNPYWTMHTNSYKYGYSGGP--NYYSYAHAYDIDDYMRADGGRRT 92
Os_GI-222624282.pro DFALADAFHDQ--ANPYWAMHTNSYKYGYSGGP--NYYSYGHVYDMDNDYMRADGGRRI 114
Os_GI-115451045.pro DFALADAFHDQ--ANPYWAMHTNSYKYGYSGGP--NYYSYGHVYDMDNDYMRADGGRRI 92
Bd_GI-357113826.pro DFALADAFQDQ--ANPYWTMHTNSYKYGYSGGP--NYYSYGHVYDMDNDYMRADGGRRI 92
Sl_GI-460410949.pro NYIFADPPYAQ--ES-LYPSISTNPYKFGYSEAGSFSYDYDREYVVDNDVHVSIEEHRH 93
Rc_GI-255582236.pro HYAHTGQVLDQ--VQENAYWSMNMNAYKFGFSGPGST--YYDP---YEVNDNLPMDVSRST 85
Pt_GI-224059640.pro NYAHNGPMHD---QDNAYWSMNMNAYKFGFSGPGSTSYSSP---YEVNDNLPMDVSRMA 84
Gm_GI-356548935.pro NYAFAGSIPDQ---ESVYWSMNMNAYKFGFSGPGSTSYSSP---YEVNGHLPRMEIDRAE 90
Gm_GI-356544176.pro NYAFAGSIPDQ---ESVYWSMNMNAYKFGFSGPGSTSYSSP---YEVNGHLPRMEIDRAE 90
Vv_GI-359487286.pro NYAQAEAMHNSIQENFYWTMNMNSYKFGFSGPGST--YYGP---YDVNEHVPGIEVSRP 92
Tc_GI-508704801.pro NYTHTVPMQDQ---ENIYWSMNMNAYKFGFSGPEST--FYSP---YEVSDHLPRMDVSRRT 89
Pp_GI-462414664.pro NYGHAMPMDQ---ETAYWSMNMHNSYKFGFSGPGSNSYGYNY--YEVNDHLPRMDVSRRT 91
Cr_GI-482561003.pro NYAHAGTM-----DNLYWTMNTNAYKFGFSGSDNPSFYNS---YDMDHLSRMSIGRTN 88
At_GI-22331928.pro NYDHAATMHPQ---DNLYWTMNTNAYKFGFSGSDNASFYGS---YDMNDHLSRMSIGRTN 92
Sl_GI-460370551.pro IQYHNNPVQIQ--DQENAYWSMNMNSYKYEHSNLESTSYHSY---ETGNHVSRRPDSERP 93

```

. : : \*\* : \* : : .

```

Zm_GI-223973923.pro WDNTTPVNNVDSANVVLQGG--EAPHTTTNTINKECIQQ--VHQSPGSPQVWVQDNIEPDNM 150
Sb_GI-242042045.pro WDNTTPANNVDSANVVLQGS--EAPRTTANTTTEECIQQ--VHQSPGSPHVVWQDNIDPDNM 150
Zm_GI-226496789.pro WDNTTPVNNVDSANVVLQGG--EAPRTTANTTSEDICIQQ--VHQSPGSPQVWVQDNIDPDNM 150
Os_GI-222624282.pro WDNATPVNNTESPNVVLQGG--ETPHANTSSSTEECIQQQVHQNSSSPQVIWQDNIDPDNM 173
Os_GI-115451045.pro WDNATPVNNTESPNVVLQGG--ETPHANTSSSTEECIQQQVHQNSSSPQVIWQDNIDPDNM 151
Bd_GI-357113826.pro WDNPTPASNTDSPNVVLQGAEEAPHPRASSTTEECIQQPVHQNSSSPQVWVQDNVDPDNM 152
Sl_GI-460410949.pro LENPSTTTVNVAANVHRE---EISGSNSLTNSVECPRG--QINTRDSEVVWQDNIDPDNM 148
Rc_GI-255582236.pro WEYPSVNMEEA--TTTDTQSEGDAVVGVHASPEECIPN--HT--SGDSPQGVWQDDVDPDNM 142
Pt_GI-224059640.pro WEYPSV-----IKALWQDDVDPDPTM 105
Gm_GI-356548935.pro WEYPSITTTVEEPATTDSPRRDGVTSMTQIPEECSPN--HESNSSSQVIWQDNIDPDNM 149
Gm_GI-356544176.pro WEYPSITTTVEEPATTDSPRRDGVTNMTQIPEECSPN--HESNSSSQVIWQDNIDPDNM 149
Vv_GI-359487286.pro WEYPSM--IVEEPTTIETQPTGNEVMNVHAIPEECSPN--HY--SATSSQAIWQDNVDPDNM 149
Tc_GI-508704801.pro WDYPSTL--NSEEPATIDMQPGGEAVVGIHAIPEECITN--HQ--SNSNSQVWVQDNIDPDNM 146
Pp_GI-462414664.pro WEHPSVM--NSEEPANIDSHPEEDA--EAAPEECIQN--QQ--NTNTSQVWVQEDIDPDNM 147
Cr_GI-482561003.pro WEYHPMVNVDD--PDITLARSVQIGDSDEHSEAEDCIAN--EHPDPSQVSWQDDIDPDPTM 145
At_GI-22331928.pro WDYHPMVNVADDPENTVARSVQIGDTEHSEAEDCIAN--EHPDPSQVSWQDDIDPDPTM 150
Sl_GI-460370551.pro WEYAVPMNVHEG--VSTDVIYEENTVPEVDVGTEECVLS--NQDSDNSHQDILEDEIDLDM 150

```

: : : : \* \*



Zm_GI-223973923.pro	TYEELLDLGEAVGTQSRGLSQERISSLPVTKYKCG-FFSRKKTRRERCVI	QMEYRRGNL	209
Sb_GI-242042045.pro	TYEELLDLGEVVTQSRGLSQERISSLPVTKYKCG-FFSRKKTRRERCVI	QMEYRRGNL	209
Zm_GI-226496789.pro	TYEELLDLGEAVGTQSRGLSQECISLLPITKYKCG-FFSRKKTRRERCVI	QMEYRRGNL	209
Os_GI-222624282.pro	TYEELLDLGEAVGTQSRGLSQERISSLPVTKYKCG-FFSRKKTRRERCVI	QMEYRRGNL	232
Os_GI-115451045.pro	TYEELLDLGEAVGTQSRGLSQERISSLPVTKYKCG-FFSRKKTRRERCVI	QMEYRRGNL	210
Bd_GI-357113826.pro	TYEELLDLGEAVGTQSRGLSQERISSLPVTKYKCG-FFSRKKTRRERCVI	QMEYRRGDL	211
Sl_GI-460410949.pro	TYEELLELGEAVGTQSRGLSQNQISLLPVTKFYKCG-FFSRKKSRRERCVI	QMEYKRKQD	207
Rc_GI-255582236.pro	TYEELLDLGETVGTQSRGLSQELISLLPTSCKCFRSFFLRKKAG-ERCVI	QMYRKGDK	201
Pt_GI-224059640.pro	TYEELVDLGETVGTQSKGLSPELISLLPTSCKCFGSFFSRKRSG-ERCVI	QMYRKGDK	164
Gm_GI-356548935.pro	TYEELLDLGEAVGTQSRGLSQELIDMLPTSKEYKFGSLFKRKNNG-KRCVI	QMYRKGDR	208
Gm_GI-356544176.pro	TYEELLDLGEAVGTQSRGLSQELIDMLPTSKEYKFGNLFKRKNNG-KRCVI	QMYRKGDR	208
Vv_GI-359487286.pro	TYEELLDLGEAVGTQSRGLSQEHINLLPTCRYKSGRLFSRKRSA-ERCVI	QMYRKGDR	208
Tc_GI-508704801.pro	TYEELLDLGETIGSQSRGLSQELIDLLPTSCKCFGSFFSTKR---ERCVI	QMYRKGDR	203
Pp_GI-462414664.pro	TYEELLDLGEAVGTQSRGLSDELISLLPTSKEYKCGSFFSRKKSNG-ERCVI	QMYRKGDR	206
Cr_GI-482561003.pro	TYEELVELGEAVGTESRGLSQELIETLPTKPKFSGSIFSRKRAG-ERCVI	QKLYKIGER	204
At_GI-22331928.pro	TYEELVELGEAVGTESRGLSQELIETLPTKPKFSGSIFSRKRAG-ERCVI	QKLYKIGER	209
Sl_GI-460370551.pro	TYEELLDLGETVGTESRGLSDELINLLPTTKYKNGSIFSRKSE-ERCVI	QMYRKGDR	209

Zm_GI-223973923.pro	QMTLPCKHVVHASCVTRWLGINKVCPVCFAEVPGEDPEAMSQQL	253
Sb_GI-242042045.pro	QMTLPCKHVVHASCVTRWLSINKVCPVCFAEVPGDEPKRQ----	249
Zm_GI-226496789.pro	QITLPCKHVVHASCVTRWLSINKVCPVCFAEVPGEDSLRQ----	249
Os_GI-222624282.pro	QMTLPCKHVVHASCVTRWLSINKVCPVCFAEVPGDEPKRQ----	272
Os_GI-115451045.pro	QMTLPCKHVVHASCVTRWLSINKVCPVCFAEVPGDEPKRQ----	250
Bd_GI-357113826.pro	QMALPCKHVVHASCVTRWLSINKVCPVCFAEVPSEEPSRQ----	251
Sl_GI-460410949.pro	QVTLPCCKHVVHAGCGSRWLSINKACPICKTEVVINTSKR-----	246
Rc_GI-255582236.pro	QMKLPCKHVVHSECISKWLGINKVCPVCNNEVFGEDSRH-----	240
Pt_GI-224059640.pro	QIKLLCKHAYHSECITKWLGINCKVCPVCNDEVFGESRN-----	203
Gm_GI-356548935.pro	QMKLPCSHVYHGECITKWLSINKKCPVCNTEVFGGESTH-----	247
Gm_GI-356544176.pro	QMKLPCSHVYHGECITKWLSINKKCPVCNTEVFGGESTH-----	247
Vv_GI-359487286.pro	QIKLPCKHVVHTDCGTRKWLTIKVCPCVNIIEVFGESRH-----	247
Tc_GI-508704801.pro	QMKLPCKHVVHSCITKWLSINKICPVCNNEVFGESRH-----	242
Pp_GI-462414664.pro	QINLPCKHVVHSECISKWLGINKVCPVCNLEVSFGESRH-----	245
Cr_GI-482561003.pro	QMNLPCKHVVHSECISKWLSINKVCPVCNTEVFGDPSIH-----	243
At_GI-22331928.pro	QMNLPCKHVVHSECISKWLSINKVCPVCNTEVFGEPSIH-----	248
Sl_GI-460370551.pro	QINFPCKHVIYHTECGSKWLSINKRCSLMNEVVQW-----	243

Tabla 4 Alineamiento de proteínas EOD1 (SEQ ID NO: 74-90)

## REIVINDICACIONES

1. Un método de incremento de la masa de semillas por unidad de área, crecimiento y/o biomasa de una planta, que comprende;
- 5 reducir la expresión o la actividad de un polipéptido DA2 dentro de las células de dicha planta, en donde el polipéptido DA2 comprende un dominio RING de SEQ ID NO: 2 y la planta tiene DA1 reducida o expresión o actividad de DA1 y EOD2 reducidas, en donde la expresión o la actividad del polipéptido DA2 se reduce
- 10 (a) introduciendo una mutación en la secuencia de nucleótidos de la célula vegetal que codifica el polipéptido DA2 o que regula su expresión y regenerando la planta a partir de la célula mutada; o  
(b) incorporando un ácido nucleico heterólogo que expresa un ácido nucleico supresor que reduce la expresión del polipéptido DA2 en dicha célula vegetal.
- 15 2. Un método según la reivindicación 1 que comprende reducir la expresión o la actividad de un polipéptido DA1 y/o un polipéptido EOD dentro de las células de dicha planta; en donde la expresión o la actividad del polipéptido DA1 y/o del polipéptido EOD se reduce
- 20 (a) introduciendo una mutación en la secuencia de nucleótidos de la célula vegetal que codifica el polipéptido DA1 y/o el polipéptido EOD o que regula su expresión y regenerando la planta a partir de la célula mutada;  
(b) incorporando un ácido nucleico heterólogo que expresa un ácido nucleico supresor que reduce la expresión del polipéptido DA1 y/o del polipéptido EOD en dicha célula vegetal, o  
(c) expresando un polipéptido DA1 dominante negativo en las células de dicha planta.
- 25 3. Un método según una cualquier de las reivindicaciones 1 o 2 en el que se anula la expresión o la actividad del polipéptido DA2 en las células de la planta.
4. Un método de producción de una planta con una masa incrementada de semillas por unidad de área, crecimiento y/o biomasa, que comprende:
- 30 proporcionar una célula vegetal que es deficiente en la expresión o la actividad de DA1 o tanto DA1 como EOD1, incorporar un ácido nucleico heterólogo que reduce la expresión o la actividad de un polipéptido DA2 que comprende un dominio RING de SEQ ID NO: 2; o introduciendo en la célula vegetal una mutación que reduce la expresión o la actividad de un polipéptido DA2 que comprende un dominio RING de SEQ ID NO: 2, y;
- 35 regenerando la planta a partir de una o más células transformadas.
5. Un método según la reivindicación 4 en el que el ácido nucleico heterólogo expresa un ácido nucleico supresor que reduce la expresión del polipéptido DA2 en dicha célula vegetal y/o en el que el ácido nucleico heterólogo anula la expresión o la actividad de un polipéptido DA2 en la célula de la planta.
- 40 6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la planta ha aumentado el tamaño de la planta, el tamaño de la semilla y/o el tamaño de los órganos en relación con las plantas de tipo silvestre.
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende propagar asexualmente o cultivar la descendencia o descendientes de la planta que tienen expresión o actividad de DA2 reducida.
- 45 8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el polipéptido DA2 comprende un primer dominio consenso de SEQ ID NO: 36; y/o, en el que el polipéptido DA2 comprende un segundo dominio consenso de SEQ ID NO: 37.
- 50 9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el polipéptido DA2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 20 % de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NO: 20 a 35.
- 55 10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la proteína DA1 comprende una secuencia que tiene al menos un 20 % de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NO: 41 a 64.
11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el polipéptido EOD1 comprende una secuencia que tiene al menos un 20 % de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NO: 74 a 90.
- 60 12. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que la planta es una planta superior, opcionalmente en el que la planta es una planta agrícola seleccionada del grupo que consiste en *Lithospermum erythrorhizon*, *Taxus* spp, tabaco, cucurbitáceas, zanahoria, hortalizas de *Brassica*, melones, pimientos, vides, lechuga, fresa, *Brassica* de semilla oleaginosa, remolacha azucarera, trigo, cebada, maíz, arroz, sojas, guisantes,
- 65 sorgo, girasol, tomate, patata, pimienta, crisantemo, clavel, linaza, cáñamo y centeno.

13. Una planta que tiene expresión o actividad reducidas de un polipéptido DA2 que comprende un dominio RING de SEQ ID NO: 2 y expresión o actividad reducidas de un polipéptido DA1 o un polipéptido de DA1 y EOD1, en donde la expresión o la actividad de uno o más de dichos polipéptidos DA2, DA1 y EOD1 se reduce por la incorporación de un ácido nucleico heterólogo en una o más células de la planta,
- 5 en donde el ácido nucleico heterólogo expresa un ácido nucleico supresor que reduce la expresión del uno o más polipéptidos, y
- en donde la planta tiene una masa incrementada de semillas por unidad de área, crecimiento y/o biomasa en relación con el tipo silvestre.

10

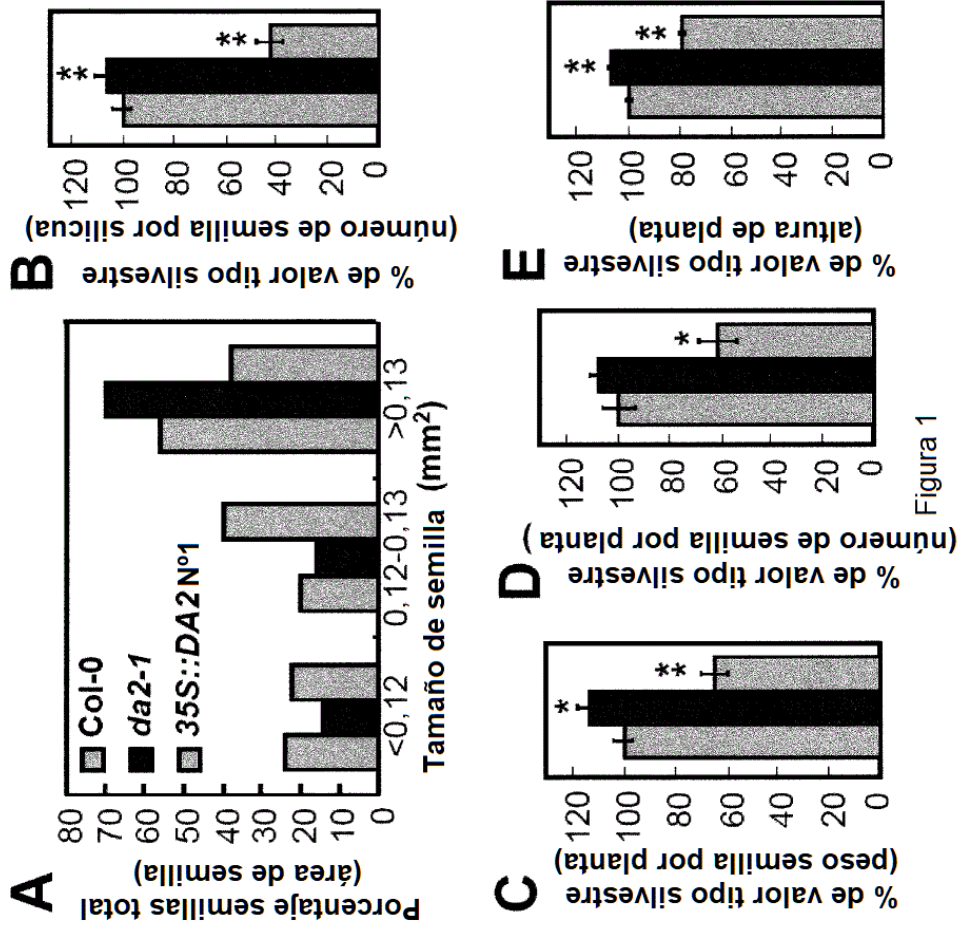


Figura 1

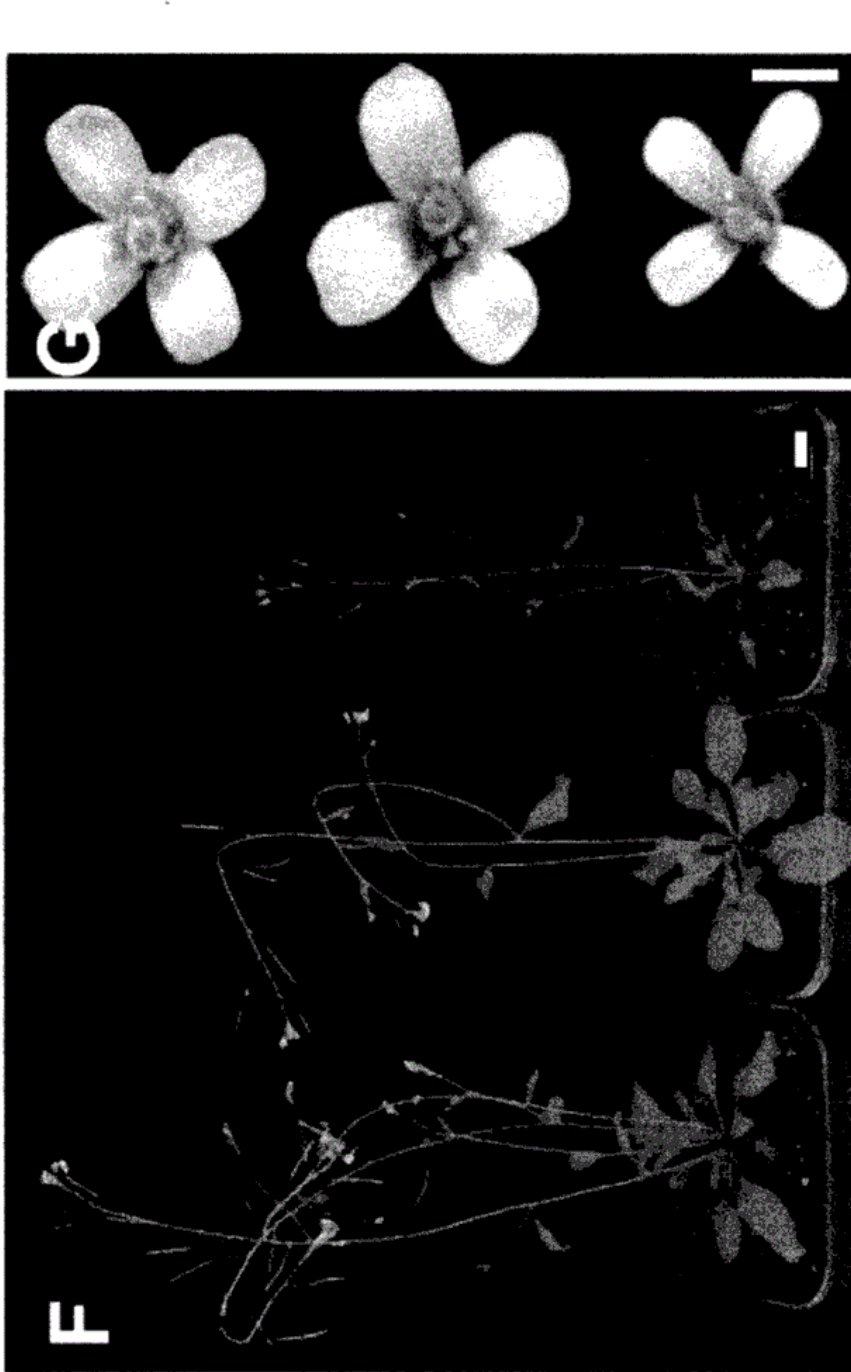


Figura 2

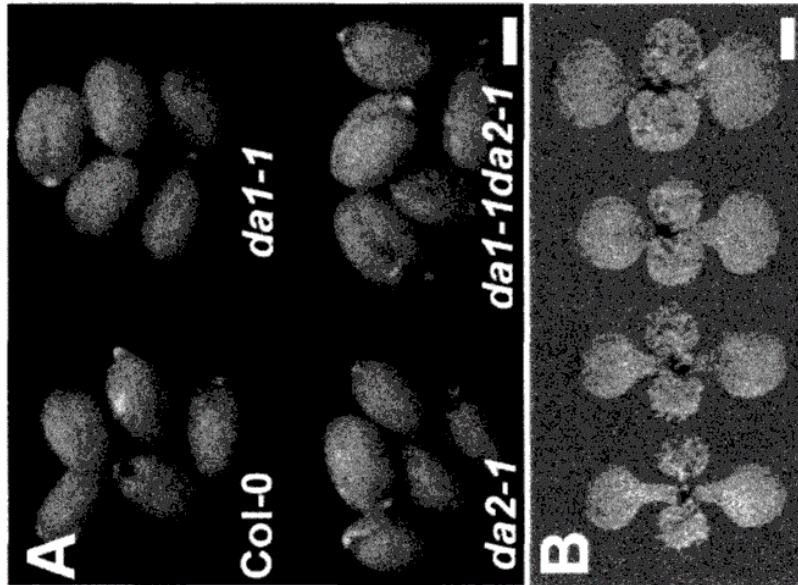
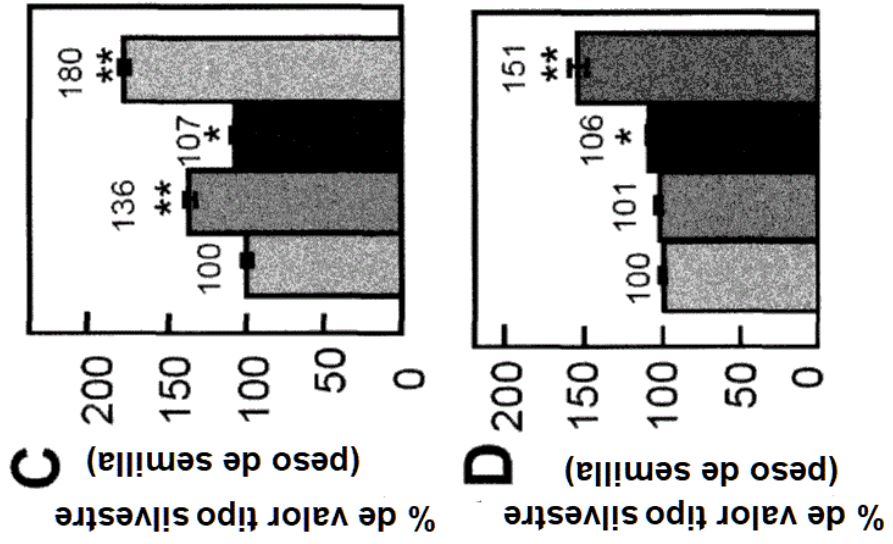


Figura 3

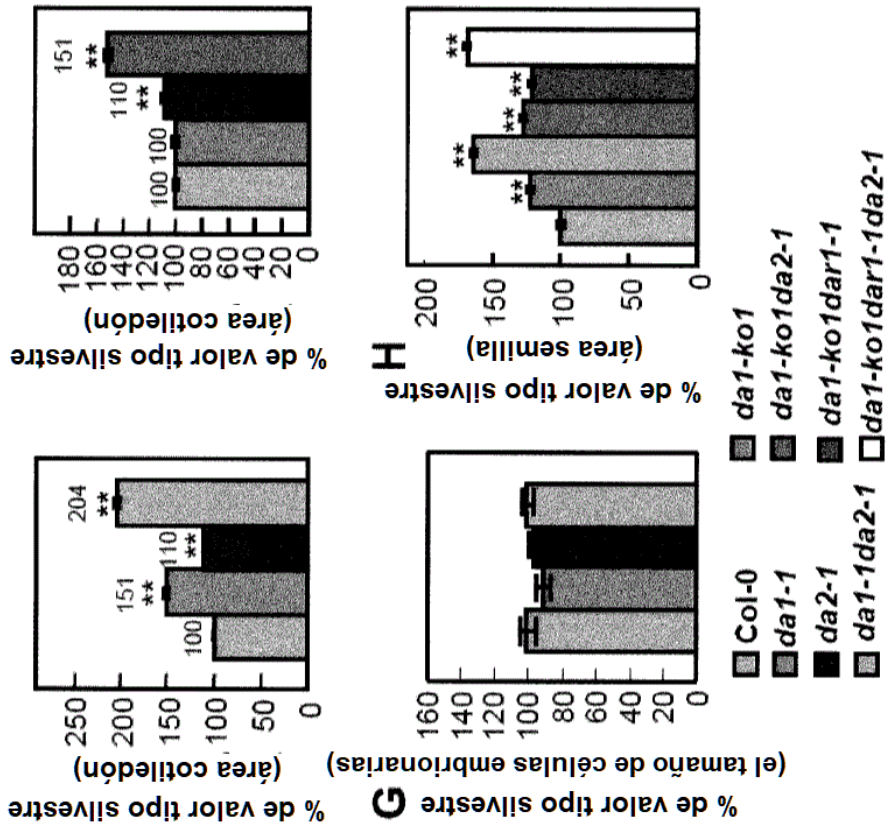


Figura 4

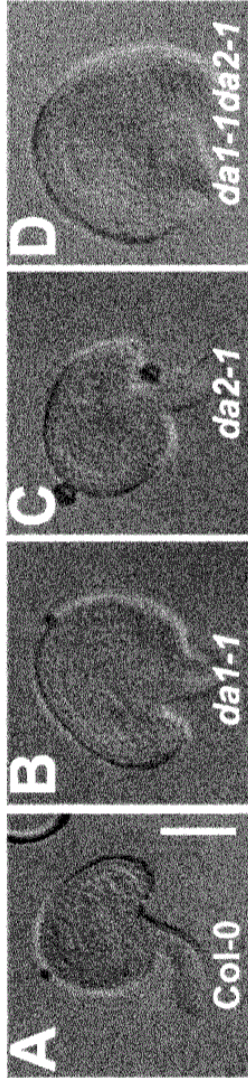


Figura 5

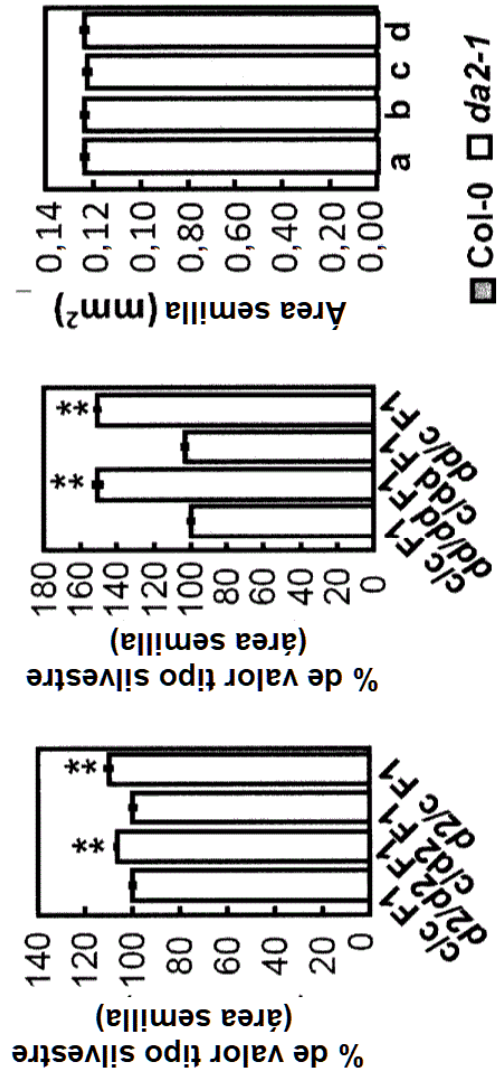


Figura 6



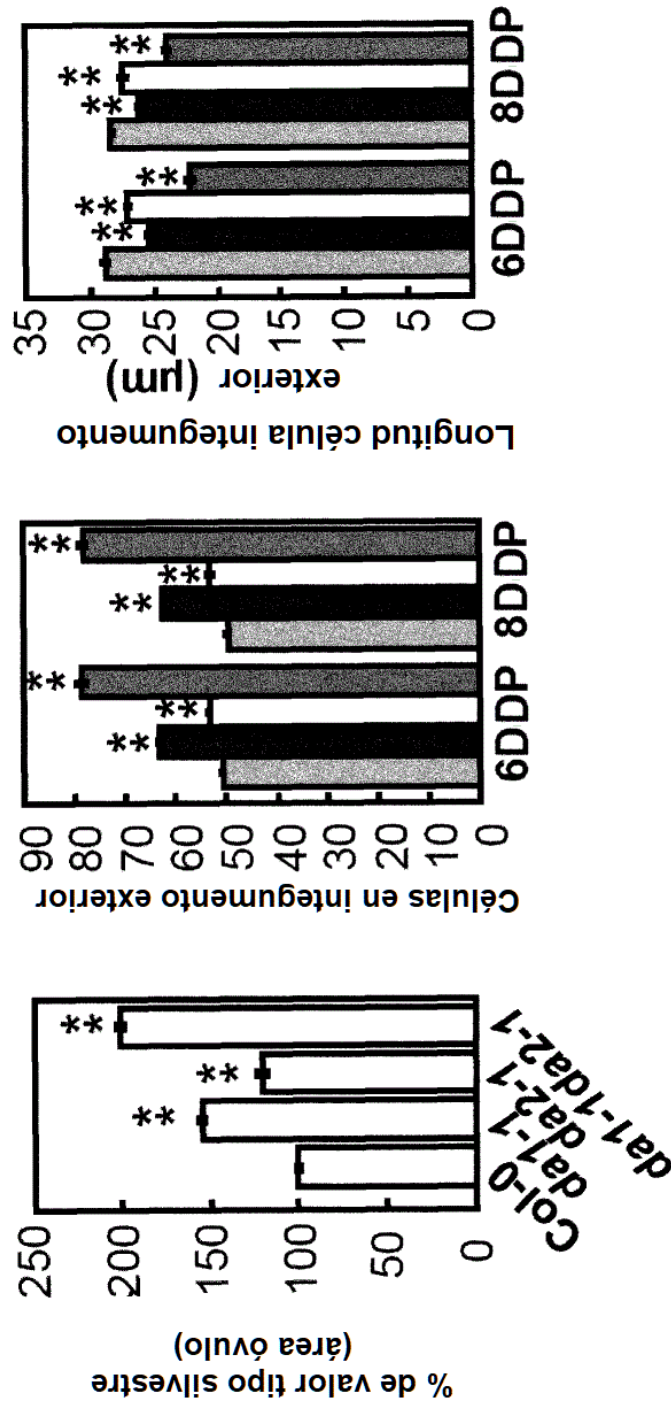


Figura 7

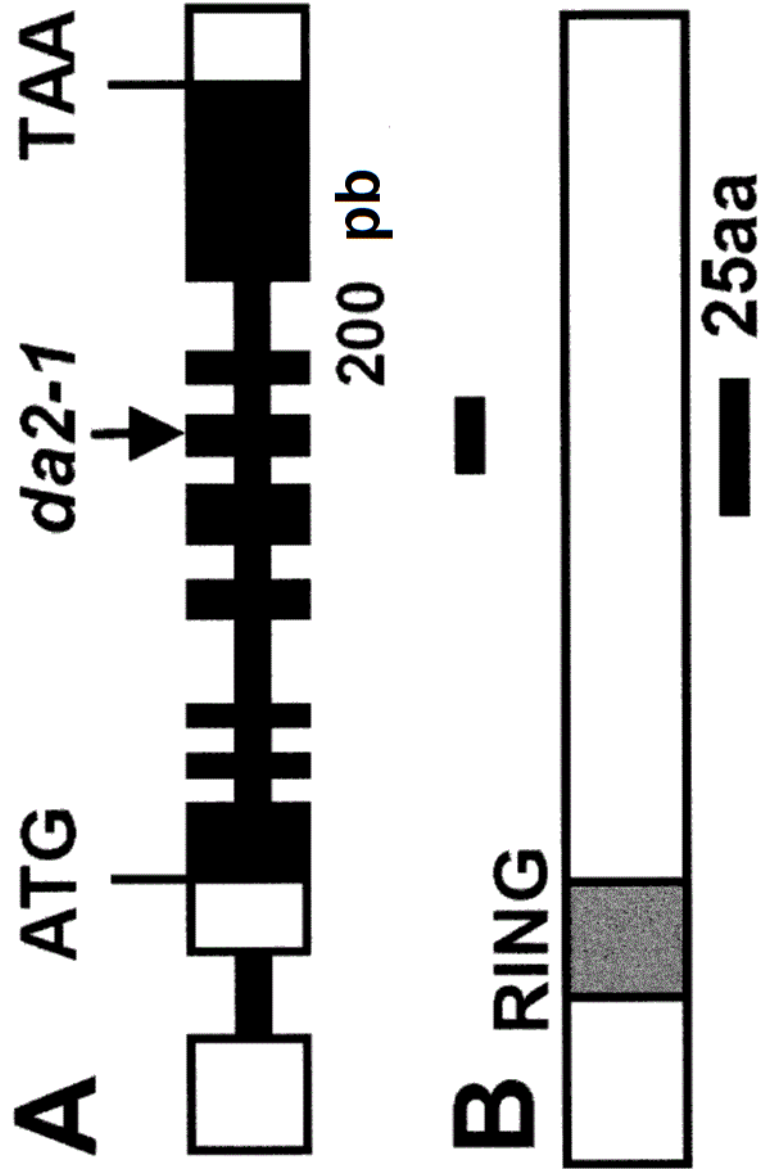


Figura 8

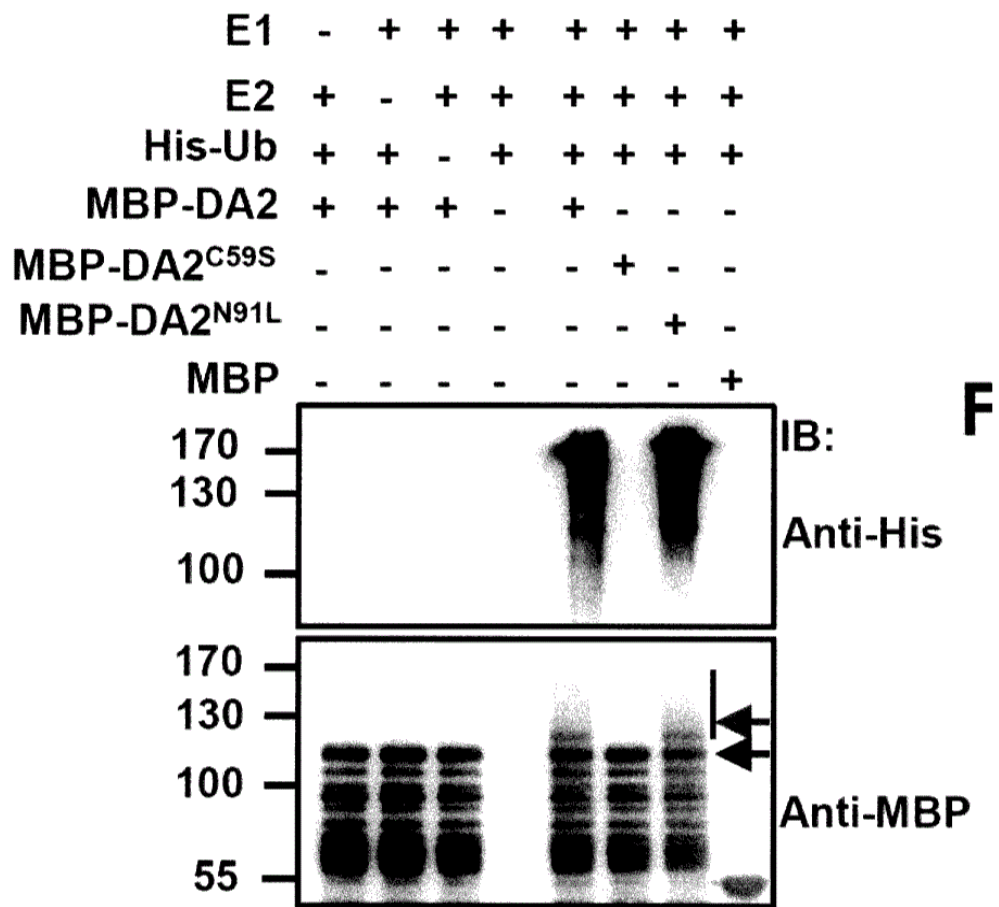


Figura 9

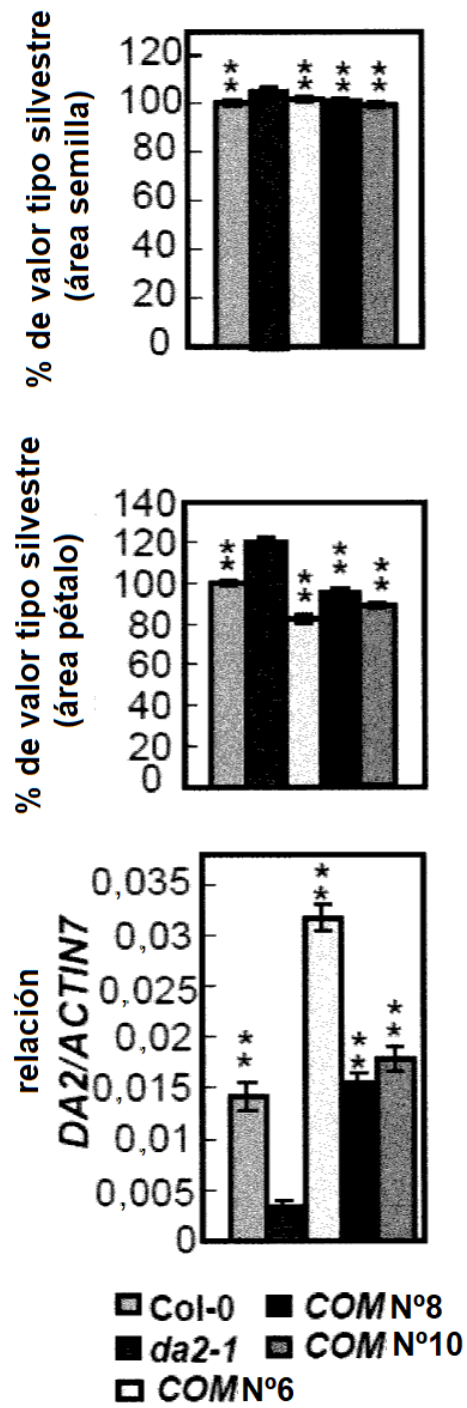


Figura 10

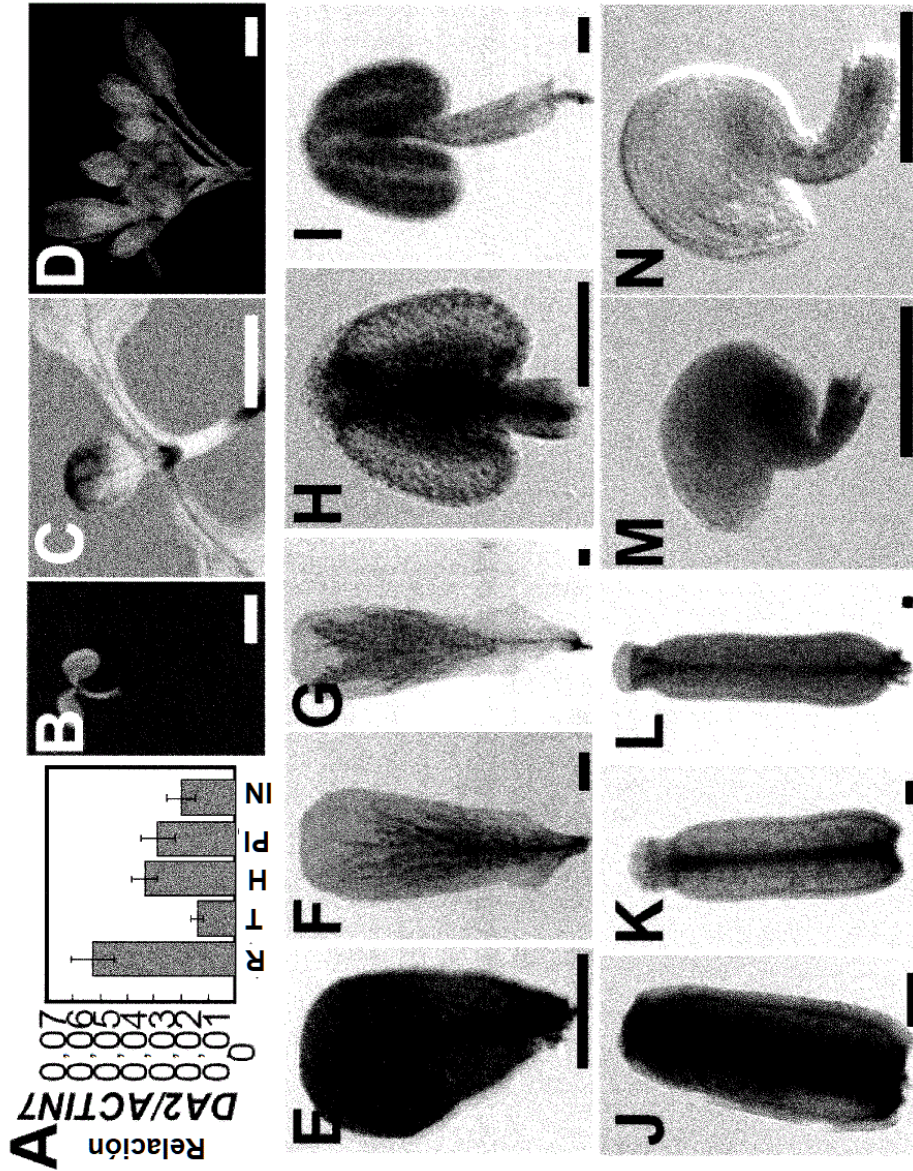


Figura 11

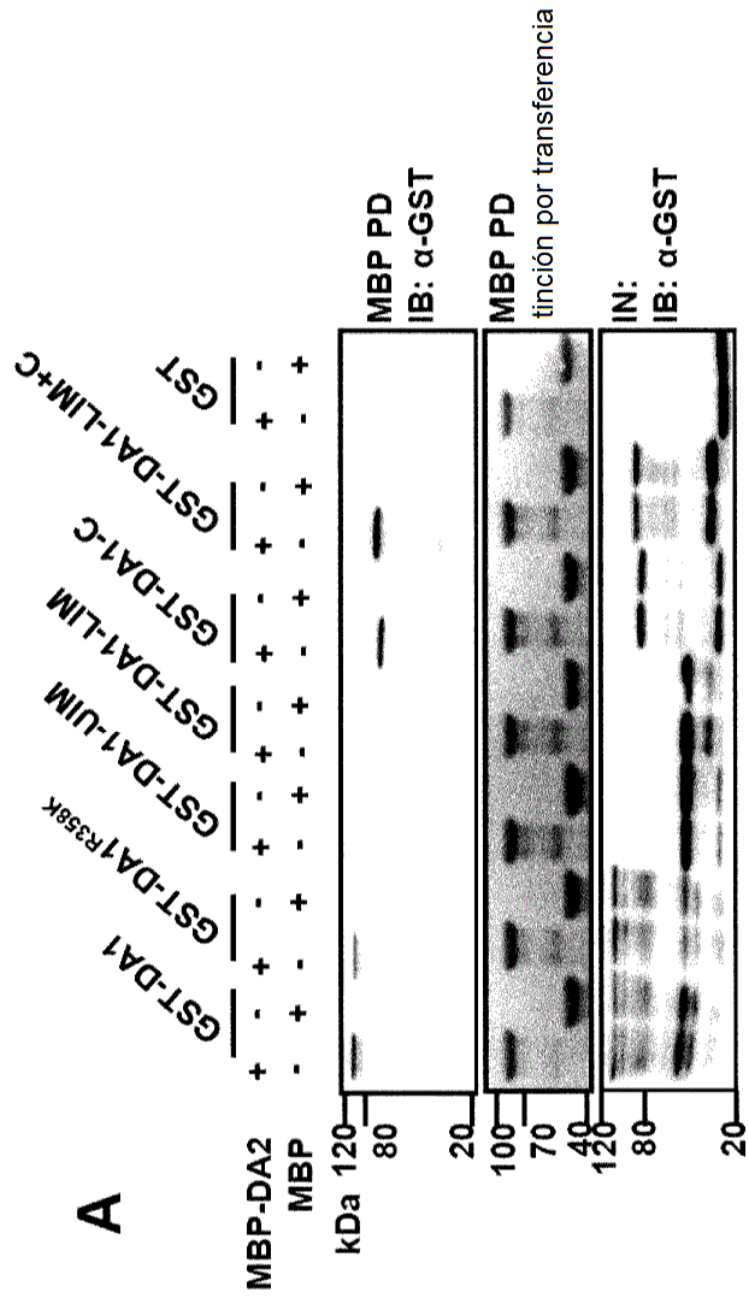


Figura 12

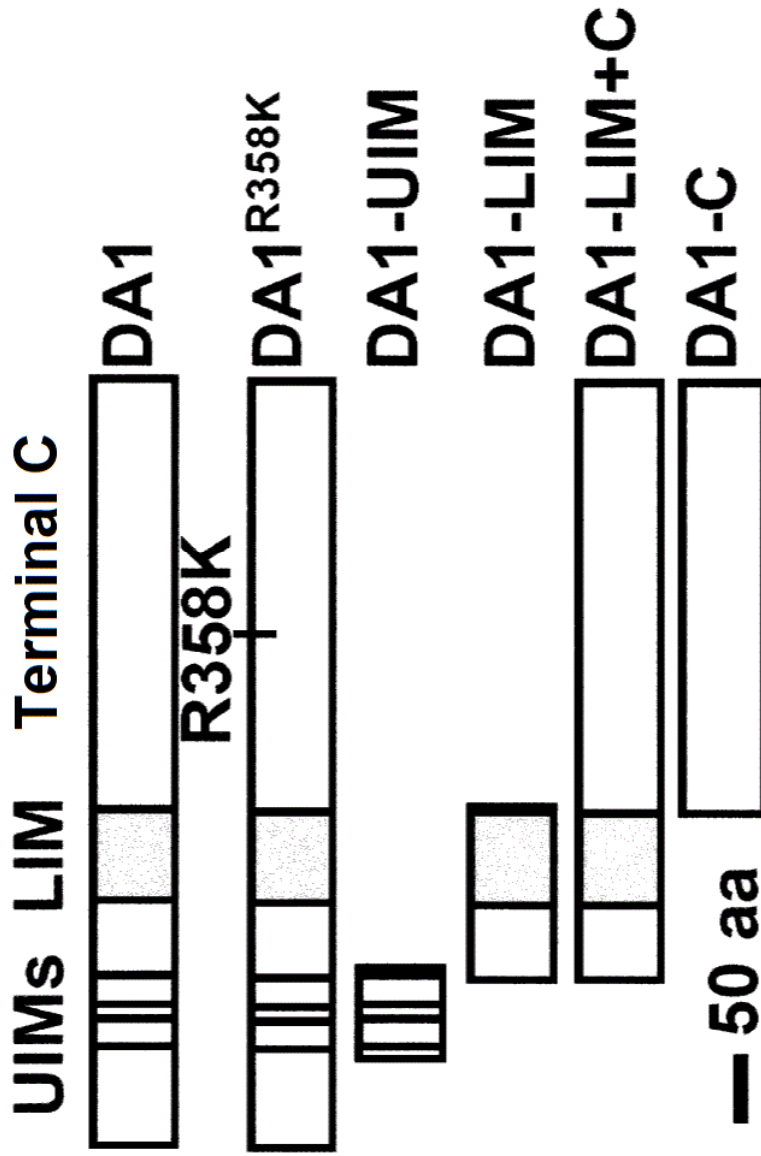


Figure 13

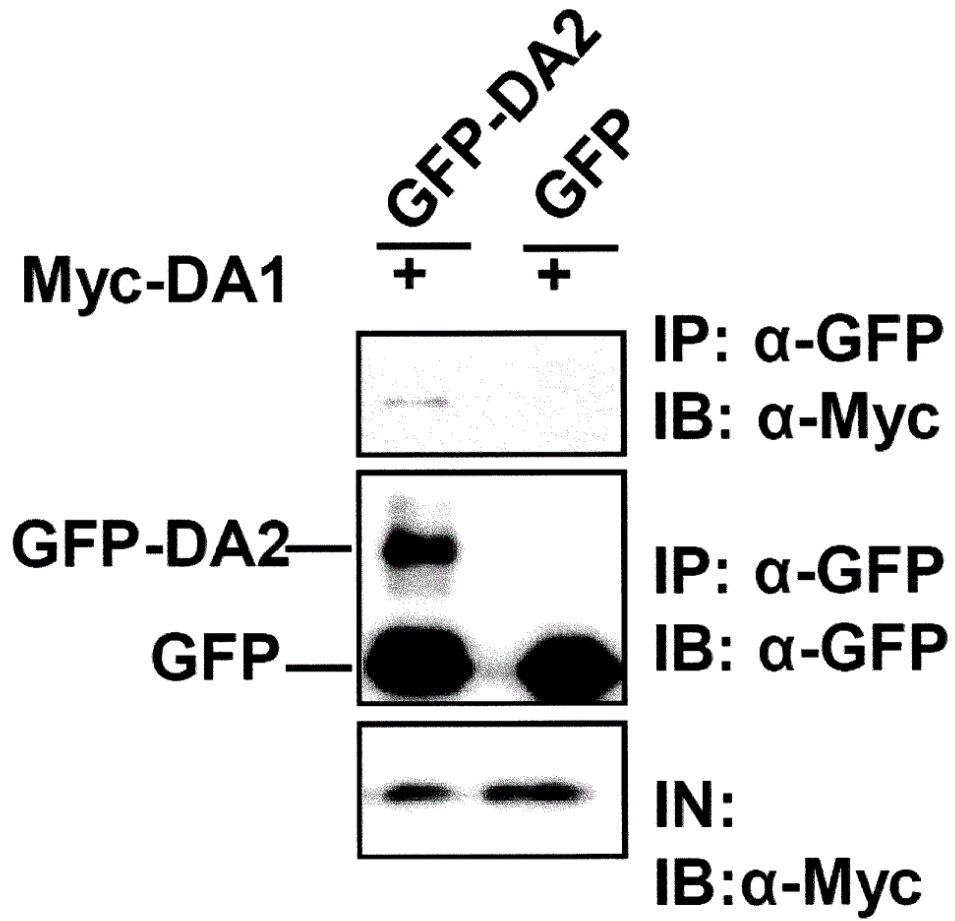


Figura 14



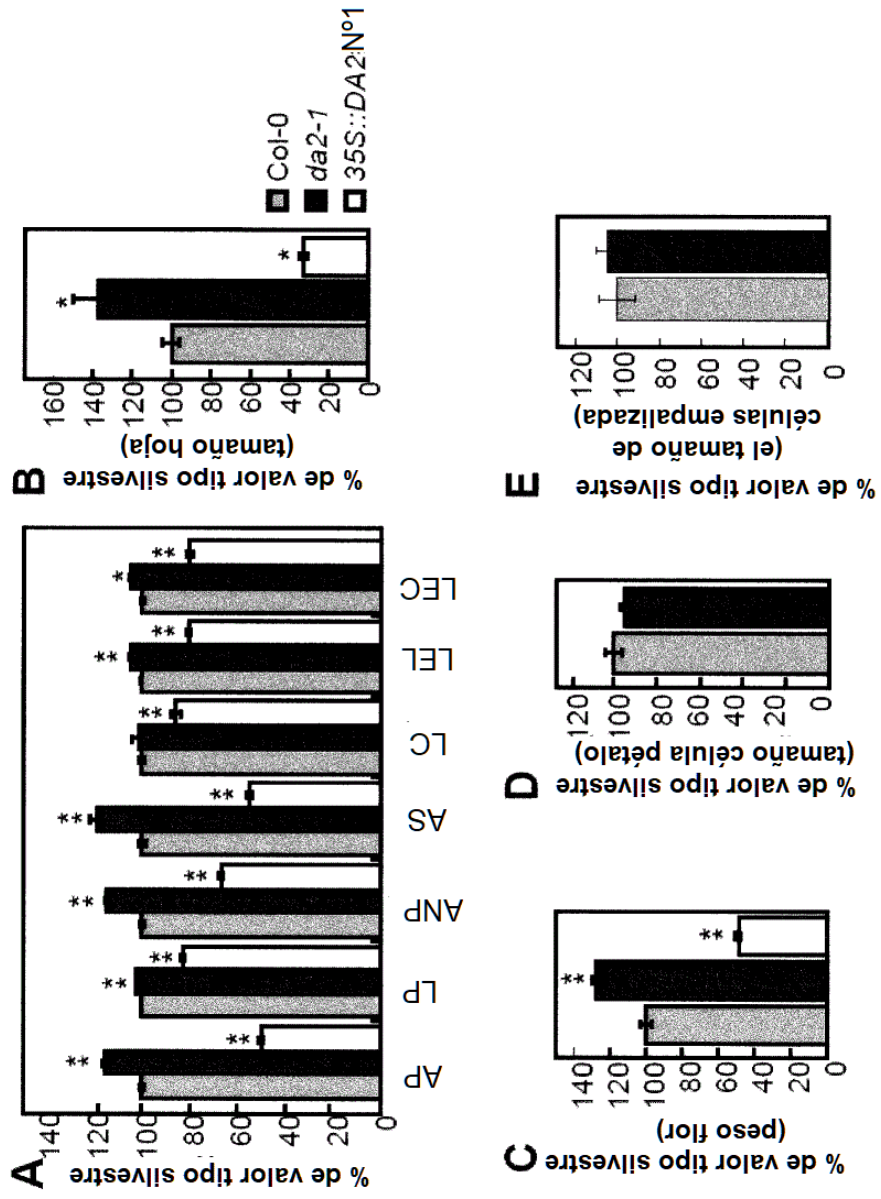


Figura 15

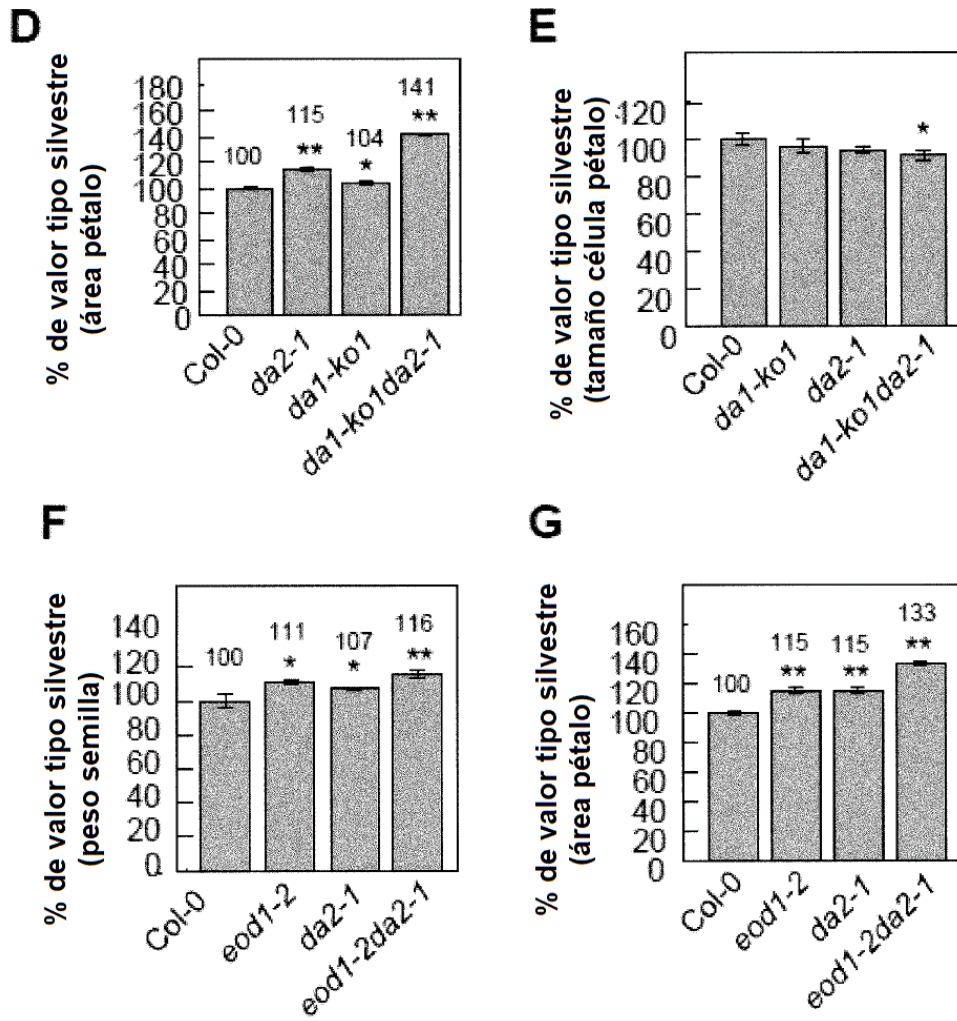


Figura 16

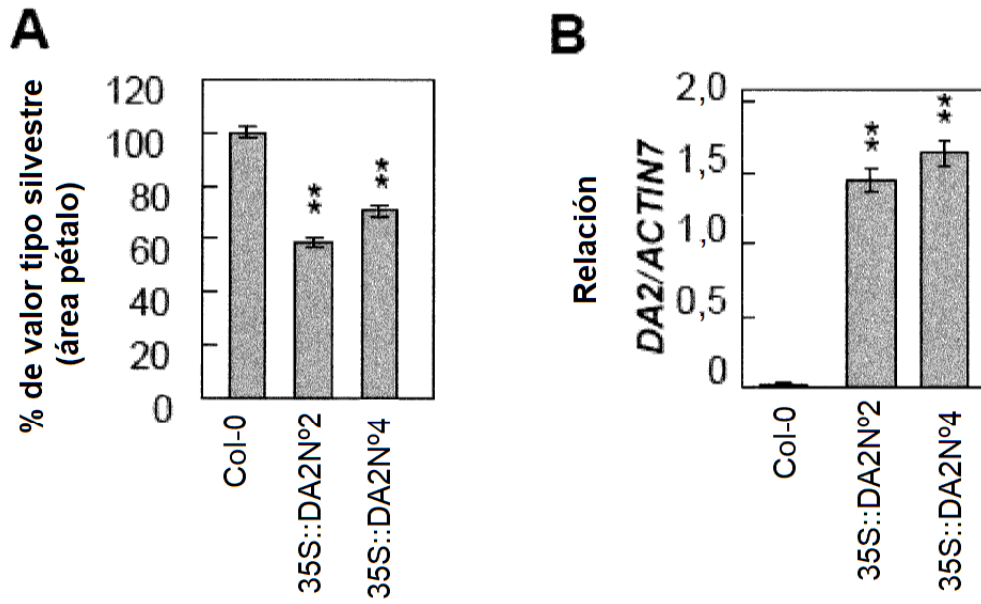
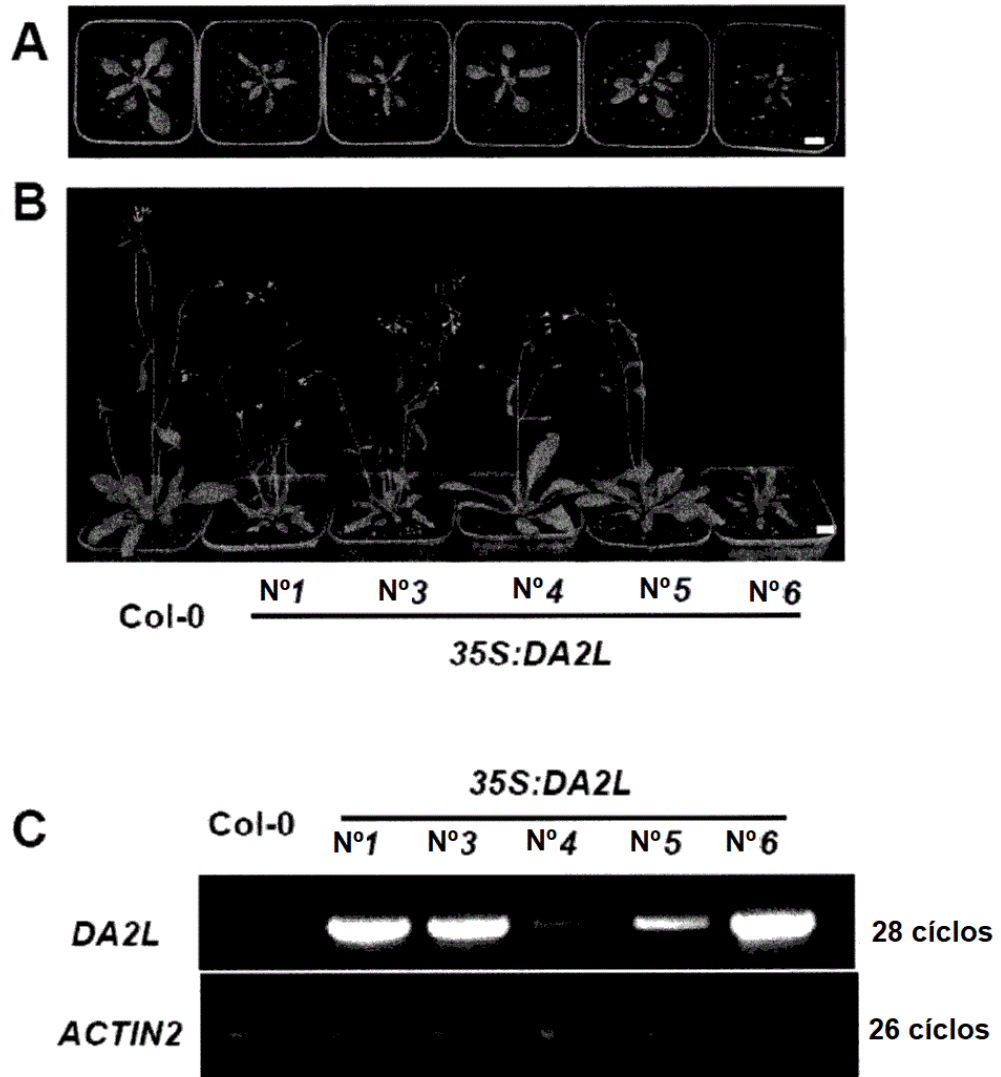


Figura 17



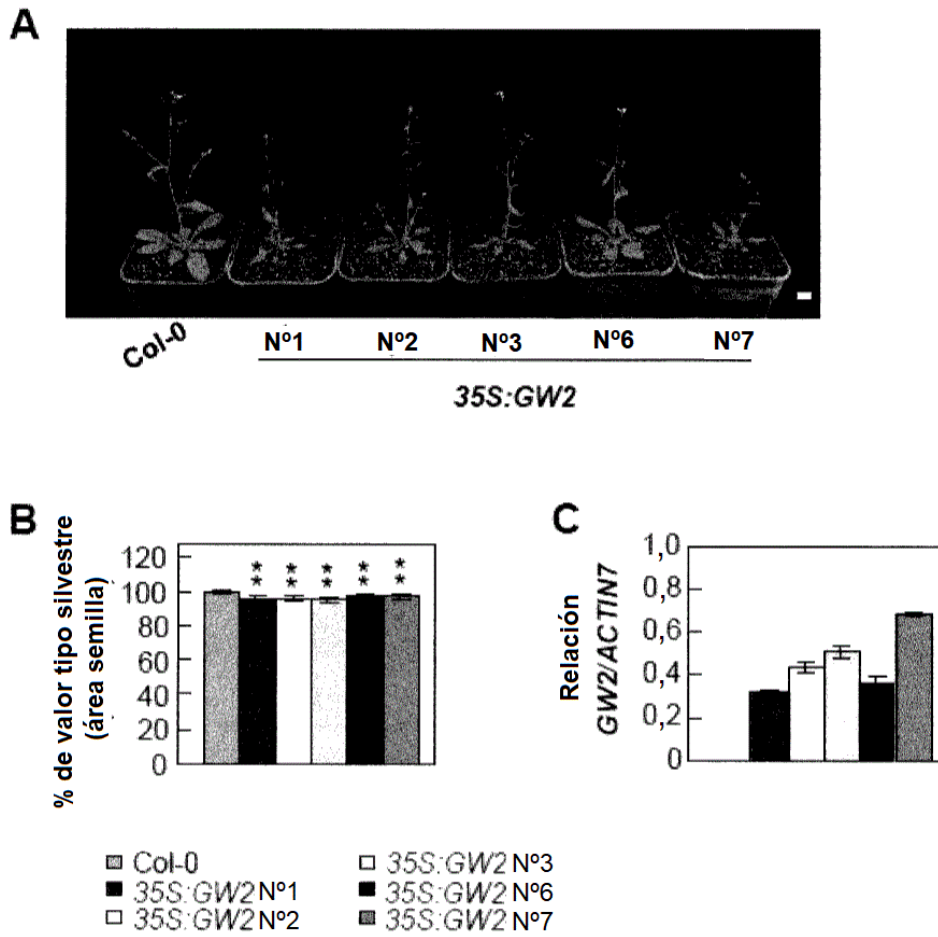


Figura 19