



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 642**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/29** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01929693 .8**  
86 Fecha de presentación : **24.04.2001**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1276870**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.01.2003**

54 Título: **Procedimiento para la obtención de plantas que presentan una resistencia incrementada a un estrés hídrico.**

30 Prioridad: **28.04.2000 FR 00 05534**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2007**

73 Titular/es: **Biogemma**  
**1, rue Edouard Colonne**  
**75001 Paris, FR**  
**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE**  
**AGRONOMIQUE (INRA) y**  
**ARVALIS - INSTITUT DU VEGETAL**

72 Inventor/es: **Zivy, Michel y**  
**Perez, Pascual**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

**ES 2 284 642 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

Procedimiento para la obtención de plantas que presentan una resistencia incrementada a un estrés hídrico.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de plantas que presentan una resistencia incrementada a un estrés hídrico.

10 En las regiones templadas, los periodos de baja pluviometría, de intensidades variables e imprevisibles, son la causa de una baja productividad apreciable en el cultivo de plantas. El déficit hídrico puede afectar severamente el crecimiento y la reproducción de las plantas. Distintas estrategias que recurren a mecanismos fisiológicos (reducción del crecimiento de las partes aéreas, cerramiento de las estomas) y/o celulares (ajuste osmótico) pueden permitir que escapen a este estrés hídrico, o por lo menos tolerarlo. Estos mecanismos, controlados al menos en parte por al ABA (ácido abscísico), fitohormona cuya concentración aumenta en las plantas sometidas a un estrés hídrico (Zeevaart y Creelman, 1988), implican a numerosas proteínas con funciones putativas diferentes: proteínas de tipo canales membranarios, o que se expresan en respuesta a daños causados a la célula (proteasas, inhibidor de proteasas) o también proteínas cuyas funciones no están directamente relacionadas con el estrés pero que se expresan a niveles más elevados en condiciones de estrés hídrico o salino (enzimas de la glicólisis, de la síntesis de la metionina). La respuesta del vegetal depende, por otra parte, de parámetros medioambientales (tipo de obligación, intensidad, duración) y genéticas (especie y genotipo), haciendo difícil la determinación del papel de estas proteínas en los mecanismos de tolerancia a la sequía.

20 Por lo tanto, existe una real necesidad de demostrar la función de genes candidatos en los mecanismos de tolerancia al estrés hídrico para el uso en transgenes que tiene como objetivo la obtención de plantas que presenten una mejor tolerancia al estrés hídrico. Esto es particularmente importante para las especies de grandes cultivos, tal como, por ejemplo, el maíz, que llega a un nivel de sensibilidad máxima a la sequía 15 días antes y 15 días después de la floración de la planta (en Europa julio-agosto), periodo durante el cual la planta absorbe el 45% del total de sus necesidades.

25 Un primer estudio realizado por Riccardi *et al.* (1998), en una línea de maíz llamada Io (Iodent), detectó una veintena de proteínas cuya expresión estaba significativamente aumentada como respuesta a un estrés hídrico, y para las cuales se propusieron funciones putativas.

30 Una de estas proteínas, detectada en la línea Io usada por Riccardi *et al.*, (1998) pero no en la línea F2, presenta homología con una proteína ASR1 de tomate (“ABA-water stress-ripening-induced protein”), la cual está inducida por el ABA, el estrés hídrico y la maduración del fruto, pero cuya función sigue siendo desconocida (Lusem *et al.*, 1993). Se han identificado otros genes que muestran homología con el ASR de tomate, especialmente en la patata (Silhavy *et al.*, 1995), el limón (Canel *et al.*, 1995), el arroz (Thomas *et al.*, 1999), pero ninguna función se ha demostrado claramente para las proteínas codificadas por estos genes. Un estudio QTL (“locus de rasgos cuantitativos”) ha permitido cartografiar el gen *Asr1* en una región que contiene al mismo tiempo el locus que controla la calidad de *Asr1* y los QTL de senescencia foliar y protandria (De Vienne *et al.*, 1999).

35 Ahora, en la presente invención se demuestra el papel de una proteína de ASR recombinante en la respuesta directa de una planta a un estrés hídrico para el uso en la transgénesis. Efectivamente, se consigue desarrollar un procedimiento de obtención de una planta que presenta una cantidad modificada de proteína ASR, proporcionándole una mejor resistencia al estrés hídrico con relación a una planta no transformada.

40 Por lo tanto, la invención tiene por objeto un procedimiento para la obtención de una planta que contiene una cantidad modificada de proteína ASR, proporcionándole una mejor resistencia al estrés hídrico con relación a una planta no transformada, que comprende las etapas que consisten en:

- 45 - transformar al menos una célula de planta mediante un vector que contiene un casete de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína ASR;
- 50 - cultivar la célula así transformada de manera que genere una planta que contenga en su genoma dicho casete de expresión.

55 Mediante la expresión “proteína ASR” se entiende una proteína expresada naturalmente por una planta en respuesta a un estrés hídrico, que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica u homóloga a la secuencia SEC ID n° 2 de maíz.

60 Mediante la expresión “secuencia homóloga” se entiende, preferentemente, una secuencia que presenta al menos 50%, preferentemente 70% de similitud con la secuencia SEC ID n° 2.

65 Están comprendidas en la definición de “proteína ASR”, en el sentido de la invención, todas las proteínas ASR de diversos vegetales, como, por ejemplo, la del arroz, así como las proteínas modificadas, por ejemplo mediante adición, supresión, sustitución, (preferentemente conservativa), de un número reducido de aminoácidos.

Están igualmente comprendidos en la definición de “proteína ASR” los polipéptidos codificados por todo o parte de la secuencia SEC ID n° 1, n° 3, n° 4 o n° 5, o de cualquier secuencia homóloga, entendiéndose que estos polipéptidos conservan la propiedad de resistencia a un estrés hídrico.

## ES 2 284 642 T3

La secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína ASR puede ser, más particularmente, una secuencia de cereal, en particular, una secuencia de maíz.

Dicha secuencia puede ser, de manera ventajosa, una secuencia de ADNc específica del estado de estrés hídrico, aislada a partir de una línea de maíz mediante hibridación diferencial. Tal secuencia se presenta en el listado de secuencia anexo, y se designa SEC ID n° 1. También se puede usar una secuencia de ADN genómico que codifica para una proteína ASR de maíz, tal como se define mediante una de las secuencias SEC ID n° 3, SEC ID n° 4 y SEC ID n° 5, o una secuencia homóloga a éstas, a pesar de que esté expresada en cantidad modificada con relación a la cantidad habitual producida por una planta no transformada.

En el listado de secuencias anexo,

SEC IN n° 3 es una secuencia de ADN genómico aislado a partir de una línea de maíz que expresa altamente la proteína ASR,

SEC ID n° 4 es una secuencia de ADN genómico aislado a partir de una línea A188 de maíz de control, y

SEC ID n° 5 es una secuencia de ADN genómico aislado a partir de una línea F<sub>2</sub> de maíz.

Dicha secuencia puede codificar, en particular, para la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 2 de la proteína ASR de maíz, o una variante de ésta, por ejemplo una variante que tiene la secuencia SEC ID n° 2 con una inserción de un residuo de lisina entre los aminoácidos 55 y 56 de SEC ID n° 2.

Se pueden igualmente usar secuencias nucleotídicas que codifican para ASR de otros vegetales, como por ejemplo las citadas anteriormente.

El ácido nucleico que codifica para una proteína ASR se inserta en una construcción de ácido nucleico, denominado casete de expresión, y está unido de manera eficaz a elementos que permiten su expresión y eventualmente su regulación.

Entre estos elementos, se pueden citar los promotores, los activadores y los terminadores de transcripción.

Se puede usar, preferentemente, un promotor constitutivo tal como el promotor actina de arroz seguido del intrón actina de arroz (PAR-IAR) contenido en el plásmido pAct1-F4 (Mc Elroy *et al.*, 1991) o el promotor 35S (Kay *et al.*, 1987), o un promotor tisular específico. A título de ejemplo, se puede citar el promotor HMGW de trigo o también el promotor PCRU del gen de la cruciferina de rábano, permitiendo ambos una expresión de la proteína de interés en las semillas (Anderson O.D. *et al.*, 1989; Depigny-This *et al.*, 1992). Ventajosamente, se pueden usar secuencias promotoras que inducen la expresión en condiciones de estrés hídrico (Kasuga *et al.*, 1999). Entre los terminadores usables en las construcciones de la invención, se puede citar, especialmente, el extremo 3' del gen de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker *et al.*, 1982). Se puede citar, igualmente, el terminador polyA 35S del virus de la mosaica de la coliflor (CaMV), descrito en el artículo de Franck *et al.* (1980).

La expresión de la proteína ASR puede también regularse mediante el uso de secuencias de tipo señales de direccionamiento peptídico (cloroplástica, vacuolar, de retención endoplásmica, etc), o de tipo secuencias de intrones, secuencias intensificadoras, secuencias líderes.

En la presente invención, la secuencia de interés puede ser una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína ASR, siendo dicha secuencia dispuesta en sentido. Cuando la secuencia que codifica para una proteína ASR está dispuesta en sentido, se obtiene una planta transformada que presenta un aumento de la proteína ASR con relación a una planta no transformada. Esta planta tiene la ventaja de resistir a un estrés hídrico de manera más eficaz que una planta no transformada.

El casete de expresión se inserta en un vector nucleotídico, tal como un plásmido, que puede, además, comprender un gen marcador, por ejemplo, un gen que permite seleccionar una planta transformada de una planta que no contiene ADN extraño transfectedo. Como gen marcador, se puede citar un gen que confiere una resistencia a un antibiótico, por ejemplo, a la higromicina (Herrera-Estrella *et al.*, 1983) o una resistencia a un herbicida como sulfonamida Asulam (documento WO 98/49316).

Este vector o cualquier secuencia que codifica para una proteína ASR, tales como las secuencias SEC ID n° 1, SEC ID n° 3, SEC ID n° 4 y SEC ID n° 5 o secuencias homólogas a éstas, se pueden utilizar para la transformación de las células vegetales según las técnicas conocidas por el experto en la materia, para la obtención de las plantas que presentan una resistencia incrementada a un estrés hídrico.

Según un modo de realización del procedimiento de la invención, las células vegetales se transforman mediante un vector tal como se define anteriormente, se transfiere en un hospedante celular susceptible de infectar dichas células vegetales permitiendo la integración en el genoma de éstas, de las secuencias nucleotídicas de interés inicialmente contenidas en el genoma de dicho vector. Ventajosamente, el hospedante celular usado es una cepa bac-

## ES 2 284 642 T3

teriana, tal como *Agrobacterium tumefaciens*, especialmente según el método descrito en el artículo de An *et al.*, (1986), o también *Agrobacterium rhizogenes*, especialmente según el método descrito en el artículo de Guerche *et al.*, (1987).

5 Por ejemplo, la transformación de las células vegetales se puede realizar mediante la transferencia de la región T del plásmido circular extra cromosómico, indicador de tumores Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, usando un sistema binario (Watson *et al.*, 1994). Para ello, se construyen dos vectores. En uno de estos vectores, la región T ha sido eliminada por supresión, con la excepción de los bordes izquierdo y derecho, insertándose un gen entre ellos para permitir la selección en las células de plantas. La otra pareja del sistema binario es un plásmido Ti auxiliar, plásmido modificado que ya no tiene región T pero que sigue conteniendo todavía los genes de virulencia *vir*, necesarios para la transformación de la célula vegetal.

10 Según un modo preferido, también se puede usar el método descrito por Ishida *et al.* (1996), para la transformación de los monocotiledones.

15 También se pueden citar otros modos de realización del procedimiento de la invención, especialmente los métodos de transferencia directa de genes a las células vegetales, tales como la microinyección directa en embrioides de planta (Neuhaus *et al.*, 1987), la infiltración al vacío (Bechtold *et al.* 1993) o la electroporación (Chupeau *et al.*, 1989) o también la precipitación directa mediante PEG (Schocher *et al.*, 1986) o el bombardeo mediante cañón de partículas recubiertas del ADN plasmídico de interés (Fromm M. *et al.*, 1990).

20 Según otro protocolo, la transformación se realiza según el método descrito por Finer *et al.* (1992), usando el cañón de partículas de tungsteno o de oro.

25 La invención tiene igualmente por objeto una célula hospedante transformada mediante las secuencias nucleicas descritas aquí arriba, así como una planta o parte de planta, especialmente el fruto, semilla, grano, polen, hoja o tubérculo, susceptibles de ser obtenidos mediante uno de los procedimientos expuestos anteriormente.

30 Puede tratarse, por ejemplo, de plantas de grandes cultivos (trigo, colza, girasol, guisante, soja, cebada, en particular el maíz, etc.) o de plantas hortelanas y flores.

Las plantas transgénicas híbridas, obtenidas mediante hibridación de al menos una planta según la invención con otra planta, también forman parte de la invención.

35 La invención se refiere especialmente a una planta que presenta un incremento de la expresión de la proteína ASR con relación a una planta no transformada, por ejemplo, de un factor 2 a 3. Este incremento de la expresión de la proteína ASR confiere a las plantas transformadas una resistencia incrementada a un estrés hídrico.

40 La resistencia al estrés hídrico de las plantas transformadas según la invención, frente a las plantas de control, se puede apreciar a partir de diversos métodos de medición morfológica, fisiológica y/o bioquímica, para condiciones de irrigación particulares. A título de ejemplo, la medición de la tolerancia al estrés se puede realizar mediante observación fenotípica, (i) de la senescencia foliar, mediante mediciones morfológicas y mediante evaluación de la clorofila de los discos foliares, (ii) de la protandria o fecha de floración de las plantas machos y hembras, (iii) del crecimiento de la planta mediante la medición de la longitud y anchura finales de las hojas, así como de la altura final de la planta, y mediante el estudio del enroscamiento de las hojas, o también (iv) del rendimiento en grano, del peso de mil granos, del número de espigas por planta.

45 El estrés sufrido por las plantas también se puede evaluar midiendo el contenido en ABA (método de Quarrie *et al.*, 1998), o midiendo el potencial hídrico, o también, cuando sea apropiado, siguiendo la expresión de la proteína mediante electroforesis bidimensional a partir de una muestra de hoja.

50 Las plantas obtenidas según la invención también se pueden usar en experimentos de complementación de alelos, para validar la función del gen insertado. El uso de los transformantes en experimentos de retrohibridación permite aportar únicamente el gen insertado en el origen genético parental, sin más secuencias que podrían influir sobre el fenotipo del recombinante en cuanto a la tolerancia a la sequía.

55 Preferentemente, se une el gen insertado con un gen marcador de selección, que facilita la monitorización de los retrocruzamientos y, por consiguiente, la monitorización de la inserción del gen de interés en la línea en la que se desea validar el efecto.

60 El principio consiste en cruzar el transformante con la línea parental que no posee el alelo favorable del gen de interés, y comparar los fenotipos de la línea recombinante con las líneas parentales. En estos experimentos complementarios, también se pueden usar transformantes que contienen las secuencias genómicas. Este ensayo complementario permite verificar especialmente que la sobreexpresión del ADNc sentido complementa el efecto del alelo débil (o nulo). Así, por ejemplo, se puede validar que el gen ASR1 es el gen responsable del QTL y del PQL (“Loci de Proteína Cuantitativo”), encontrado en esta posición genética sobre el cromosoma 10 en el maíz. Variando la cantidad de esta proteína entre diferentes líneas, se pueden detectar y explotar para la mejora de las plantas expresiones más fuertes, incluso alelos más favorables. La detección de plantas que presentan alelos favorables se puede realizar mediante de-

terminaciones inmunológicas con anticuerpos específicos de la proteína ASR1 (ensayo ELISA, transferencia Western, etc.).

5 Se integra igualmente en el ámbito de la invención el uso de un ácido nucleico que codifica para una ASR o un fragmento de éste, como sonda o cebador para una amplificación de tipo PCR, para la selección de plantas transformadas, que presentan una mejor resistencia al estrés hídrico.

10 Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican para una ASR, tales como las denominadas SEC ID n° 1, SEC ID n° 3, SEC ID n° 4, SEC ID n° 5, así como cualquier oligonucleótido obtenido a partir de una de estas secuencias, se pueden usar como sondas en programas de selección asistida mediante marcador, por ejemplo, para seguir la introgresión del gen que codifica para la proteína ASR de maíz en una planta. Para ello, se marca al menos una de estas sondas, por ejemplo mediante un isótopo radioactivo, y después se pone en contacto con el ADN genómico de la planta, previamente digerido mediante enzimas de restricción, en condiciones que permiten la hidratación específica de la sonda marcada con el ADN en cuestión. También se pueden usar otras técnicas que usan por ejemplo la PCR  
15 para realizar un genotipado.

Las figuras y los ejemplos siguientes ilustran la invención sin limitarla.

## 20 Leyenda de las figuras

La figura 1 representa un mapa de restricción del plásmido pWP 280 que contiene el promotor pActina intrón~bar-nasa~Nos PolyA.

25 La figura 2 representa un mapa de restricción del vector intermedio pBIOS 308 que contiene el ADNc de ZmASR1 sentido.

La figura 3 representa un mapa de restricción del vector intermedio pBIOS 309 que contiene el ADNc de ZmASR1 antisentido.

30 La figura 4 representa el efecto de cada acontecimiento de transformación “antisentido” o “sentido” con relación a su testigo (sensible al glufosinato de amonio), sobre la senescencia foliar, efecto medido el primer día de anotación después de la floración.

35 La figura 5 representa una cinética del efecto, para el conjunto de los acontecimientos “sentido”, “no transformados” y “antisentidos”, dispuestos o no en condiciones de estrés hídrico, sobre la senescencia foliar.

## 40 Ejemplos

### Ejemplo 1

*Obtención y clonación del ADNc de ZmAsr1 de una línea de maíz que expresa altamente la proteína ASR*

45 a) *Condiciones de cultivo y extracciones para las plantas que sirvieron para aislar el ADNc*

Se clonó el ADNc de ZmAsr1 a partir de líneas de maíz Io (Riccardi *et al.*, 1998) o a partir de líneas de maíz seleccionadas según los mismos criterios que Io.

50 Las plantas de maíz se cultivan en perlita en condiciones controladas en una cámara de cultivo (luz: 450 mmoles  $m^{-2} s^{-1}$ , fotoperíodo: 16 h, temperatura día/noche: 25°C/20°C, humedad relativa del 60%), regadas con una disolución nutritiva. Cuando las plantas llegan a la etapa de “5 hojas” (5ª hoja emergente), o se para el riego de las plantas en condiciones de estrés hídrico, o bien, se siguen regando las plantas de control. Diez días más tarde, se realizan extracciones en la parte envainada del limbo de la 7ª hoja.  
55

b) *Aislamiento de los ADNc específicos del estado de estrés hídrico mediante hibridación diferencial*

60 Se prepara un banco de ADNc a partir de ARNm de hojas de plantas estresadas y del kit de clonación Lambda CAPII cDNA síntesis/Gigapack GoldI (Stratagene, La Jolla, USA), según las indicaciones del fabricante.

Los ARNm preparados a partir de las hojas de plantas estresadas y de las plantas de control se transcriben en ADNc radiomarcado usando 100  $\mu Ci$  de  $^{32}P$ -dATP y hexanucleótidos que sirven de cebadores aleatorios (Sambrook *et al.*, 1989). Los ADNc monocatenarios, que proceden de una planta estresada o bien de la planta de control, se hibridan en una misma proporción sobre los clones de ADNc del banco. La temperatura de hibridación en el sistema tampón fosfato/SDS/EDTA (Church y Gilbert, 1984) es de 68°C, y los lavados finales se realizan con disoluciones que contienen 0,1xSSC 0,05% (peso/volumen) SDS.

## ES 2 284 642 T3

Los clones marcados se recuperan mediante escisión *in vivo* del fagómido según el protocolo de Stratagene usando *E. coli* SOLR, y el fago auxiliar "Exassist". El ADN de estos clones se secuencian y se compara con bancos de secuencias de ácidos nucleicos (BLAST) según el método descrito en Altschul *et al.* (1990). Uno de estos clones presenta una alta homología con *Asr1* de tomate, y se denomina *ZmAsr1* para *Zea mays* *Asr1*.

5

### Ejemplo 2

#### *Secuencias genómicas de ZmASR1*

10

Los cebadores cASR1-1F (5'-TGTCGATCCAATTGTCACCTT-3')= SEC ID n° 6, y cASR1-740R (5'-TGGA GAAACGTAAACAACATA-3')= SEC ID n° 7, definidos en los dos extremos de la secuencia de ADNc de la proteína ASR1, se usan en amplificación de PCR sobre el ADN total de la línea de maíz. Las reacciones de PCR se realizan según las técnicas convencionales.

15

Los productos de PCR se analizan en electroforesis: se recupera una banda de 900 pb para extraerle el ADN y clonarlo según las técnicas convencionales. Después de verificar su tamaño, los injertos se extraen y se secuencian.

### 20 Ejemplo 3

#### *Construcción de genes quiméricos que permiten la expresión constitutiva de la proteína ASR1 o de un antisentido que lleva a su inhibición*

25

En un primer lugar, se realiza la construcción de 2 vectores plasmídicos de base pBIOS 306 y pBIOS 307 que contienen el promotor actina-intrón actina (pAct), el ADNc del gen *Asr1*, sentido y antisentido respectivamente, y el terminador de la nopalina sintasa (terNos) que introduce una señal de poliadenilación funcional en numerosas especies vegetales.

30

Después, se realizan vectores intermedios para la recombinación homóloga con el vector pSB1 de Japan Tobacco (documento EP 672.752) en *Agrobacterium tumefaciens*, cepa LBA 4404 (Hoekema *et al.*, 1993).

35

La transferencia seguida de la expresión de los genes (gen de selección y gen de interés) en el maíz se basa en las propiedades naturales de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambrisky *et al.*, 1989) y en la estrategia del plásmido superbinario (Hiei *et al.*; 1994 y Ishida *et al.*; 1996).

40

Las enzimas de restricción usadas para las clonaciones se suministran por New England Biolabs (New England Biolabs, UK). Las reacciones enzimáticas se realizan siguiendo los protocolos descritos por Sambrook *et al.*, en el manual Molecular cloning (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

#### a) *Construcción de los vectores plasmídicos de base para la expresión constitutiva del gen Asr1 y de su antisentido*

45

Se realizaron las construcciones moleculares que permiten la expresión del gen *Asr1* sentido y antisentido de manera constitutiva tal como se describe a continuación:

- clonación del fragmento I/XhoI de 795 pb (ADNc *Asr1* = SEC ID n° 1) en el vector pBIOS 298 restringido a EcoRV.

50

El vector pBIOS 298 contiene el promotor actina-intrón actina (pAct) (Mc Elroy *et al.* 1991) y el terminador Nos. Este vector se generó mediante supresión del fragmento PstI de 366 pb (gen Barstar) del vector pWP 280, que contiene el casete pActin-intrón~Barstar~Nos polyA (Figura 1).

Esta clonación no orientada permite obtener 2 nuevos vectores:

55

- el vector pBIOS 306 portador del gen pAct-ZmAsr1 sentido-terNos
- el vector pBIOS 307 portador del gen pAct-ZmAsr1 antisentido-terNos

60

La orientación del ADNc con relación al promotor de actina se determinó mediante restricción enzimática sencilla con EagI y doble restricción enzimática HindIII-EcoRV.

#### b) *Construcción de los vectores intermedios para la recombinación homóloga con pSB1 (obtención de plásmidos superbinarios)*

65

Los vectores que sirven para la recombinación homóloga en *Agrobacterium tumefaciens* derivan del vector pBIOS 273.

## ES 2 284 642 T3

### \* Construcción del plásmido pBIOS 273

El vector de base para la recombinación homóloga es el vector pBIOS 273. Este vector se generó en 2 etapas:

- 5 - clonación del fragmento BspDI/XhoI (pAct-Bar-terNos) del vector pDM 302 (Cao *et al.* 1992) en los sitios SmaI y BdspDI del vector pSB12 (Japan Tobacco). El vector que resulta de esta clonación se denomina pBIOS 272.
- 10 - Supresión del sitio XhoI en la posición 3363 del vector pBIOS 272 mediante digestión parcial con XhoI, y acción del ADN polimerasa I, fragmento grande (Klenow). El vector obtenido, que posee un único sitio XhoI, se denomina pBIOS 273.

### \* Generación de los vectores intermedios de recombinación que contienen el ADNc Asr1 sentido o antisentido

15 Estas construcciones se generaron a partir del vector pBIOS 274, que deriva del vector pBIOS 273 mediante clonación del fragmento (ProA9-Barnase-terCaMV) XhoI del vector pWP 128 (Paul *et al.*, 1992) en el vector pBIOS 273 restringido a XhoI.

20 Los vectores intermedios pBIOS308 y pBIOS309 se obtuvieron mediante clonación de los fragmentos Sall/XhoI de 2970 pb de los vectores pBIOS 306 y pBIOS 307 en los sitios BspDI/XhoI del vector pBIOS 274.

Así, estas clonaciones permiten sustituir el gen pA9-Barnase-terCaMV del vector pBIOS 274 por el gen pAct-ZmAsr1 sentido-terNos, denominándose el vector resultante pBIOS 308 (Figura 2), o por el gen pAct-ZmAsr1 anti-sentido-terNos, denominándose el vector resultante pBIOS 309 (Figura 3).

### c) Construcción de los vectores superbinarios de transformación para la expresión del gen Asr1 y de su antisentido en *Agrobacterium tumefaciens* y en las plantas de maíz

30

#### \* Construcción de los vectores superbinarios

Los vectores usados para la transformación del maíz resultan de la recombinación homóloga de los plásmidos pBIOS 308 y pBIOS 309 con el vector pSB1 (documento EP 672.752). El vector pSB1 contiene los genes virB y virG del plásmido Ti pTiBo542 presente en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* A281 (ATCC 37349), el gen de resistencia a la tetraciclina, un origen de replicación funcional en *E. coli* y *Agrobacterium*, y una región homóloga encontrada en los vectores intermedios pBIOS 308 y pBIOS 309. La presencia de esta región homóloga en el plásmido receptor (pSB1) y los plásmidos intermedios (pBIOS 308 y pBIOS 309) es responsable del fenómeno de recombinación homóloga.

40

Los vectores intermedios pBIOS 308 y pBIOS 309 se introducen en las células de *Agrobacterium tumefaciens* que contienen el vector pSB1 mediante electroporación, usando el aparato GIBCO BRL CELL PORATOR Voltaje Booster según el método descrito por Mattanovitch *et al.* (1989) y el protocolo dado por el proveedor (Life Technologies, USA).

45

Las agrobacterias que contienen los vectores superbinarios se seleccionan en un medio YT CaCl<sub>2</sub> en presencia de rifampicina y espectinomicina con una concentración de 50 mg/l. El gen de resistencia a la rifampicina está portado por el cromosoma bacteriano. La resistencia a la espectinomicina, portada por los plásmidos pBIOS 308 y pBIOS 309 (origen de replicación en *E. coli*), se podrá expresar solamente después de la recombinación homóloga con el vector pSB1 (origen de replicación funcional en *Agrobacterium* y *E. coli*).

50

Los plásmidos superbinarios, obtenidos después de la recombinación, se denominan pRec 308 (pBIOS 308 x pSB1) y pRec 309 (pBIOS 309 x pSB1). Estos poseen orígenes de replicación funcionales al mismo tiempo en *E. coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, los genes de resistencia a la tetraciclina y a la espectinomicina, el ADN-T en el que se encuentran los casetes de expresión de los genes Bar y Asr1 (ADNc sentido o antisentido), y los genes de virulencia virB y virG del plásmido pTiBo542.

55

#### • Caracterización de los vectores superbinarios pRec 308 y pRec 309

60

Estos plásmidos superbinarios pRec 308 (gen Asr1 sentido) y pRec 309 (gen Asr1 antisentido) se caracterizan mediante la restricción enzimática con Sall. Después, se realiza un análisis de Southern de los fragmentos de restricción Sall. con la sonda Bar y la sonda del gen Asr1 (correspondiendo esta sonda al fragmento EcoRI/XhoI de 795 pb del vector pHHU516, por lo tanto, al ADNc completo). Los perfiles obtenidos son los esperados.

65

## ES 2 284 642 T3

### Ejemplo 4

#### *Transformación de las plantas de maíz*

5 La transformación de las plantas de maíz se realiza según el protocolo de Ishida *et al.* (1996).

La transformación empieza con un co-cultivo en el que los embriones inmaduros de las plantas de maíz (tamaño que oscila de 1 a 1,2 mm) se ponen en contacto durante 5 minutos con *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 que contiene los vectores superbinarios pRec 308 o pRec 309. Después, los embriones se colocan en un medio de LSAs durante 3 días en la oscuridad y a 25°C.

15 La siguiente etapa consiste en la primera selección de los callos transformados: los “callos de embriones” se transfieren en un medio de LSD 5 que contiene 5 mg/l de fosfotricina y 250 mg/l de cefotaxima (eliminación de *Agrobacterium tumefaciens*). Esta etapa se lleva a cabo durante 2 semanas en la oscuridad y a 25°C.

La segunda etapa de selección se realiza transfiriendo los embriones que se han desarrollado en el medio de LSD 5 en un medio de LSD 10 (10 mg/l de fosfotricina) en presencia de cefotaxima, durante 3 semanas, en las mismas condiciones que en la primera selección (25°C, oscuridad).

20 La tercera etapa de selección consiste en cortar los callos de tipo I (fragmentos de 1 a 2 mm) y ponerlos durante 3 semanas en la oscuridad y a 25°C en un medio de LSD 10 en presencia de cefotaxima.

Después, se realiza la regeneración de las plántulas cortando los callos de tipo I que han proliferado y colocándolos en un medio de LSZ en presencia de 5 mg/l de fosfotricina y cefotaxima durante dos semanas a 22°C y con luz continúa. Las plántulas regeneradas se colocan en un medio de enraizamiento (Ishida *et al.*, 1996) durante dos semanas a 22°C con una iluminación continúa para la etapa de desarrollo.

Entonces, las plantas obtenidas se transfieren al fitotróp para su aclimatación.

### 30 Ejemplo 5

#### *Demostración de la expresión de la proteína ZmASR1 en las plantas transformadas*

35 Las proteínas de las muestras de hojas que proceden de las plantas transformadas se extrajeron según el método de Damerval *et al.* (1986), y después se analizaron mediante electroforesis bidimensional (EBD) siguiendo el protocolo de Riccardi *et al.* (1998).

40 La electroforesis bidimensional consiste en separar los polipéptidos en función de su punto isoeléctrico y en función de su peso molecular (electroforesis en presencia de SDS). Antes de la electroforesis, las proteínas se extraen y se mantienen en condiciones desnaturalizadas: se elimina la estructura cuaternaria. Los distintos polipéptidos que constituyen las proteínas oligoméricas migran independientemente durante las dos electroforesis. Después, los geles se colorean con nitrato de plata.

45 El gel bidimensional así obtenido se compara con aquel realizado a partir de proteínas de hojas de plantas A188 no transformadas.

Los resultados obtenidos de las plantas transformadas con la secuencia codificante “sentido” muestran, mediante simple examen visual de estos dos geles, una expresión más intensa de la proteína ASR1 en las plantas transformadas con relación a las plantas de control A188.

55 Parece todavía detectable el punto de ASR observado en las plantas transformadas con la construcción antisentido, pero con una intensidad más débil, lo que demuestra que los transformantes “antisentidos” expresan menos la proteína que las plantas de control.

Este análisis proteico demuestra, por lo tanto, una expresión de la proteína de ASR1 en las plantas transformadas, en cantidad modificada con relación a las plantas no transformadas.

### 60 Ejemplo 6

#### *Medida de la tolerancia al estrés hídrico de las plantas transgénicas obtenidas según la invención*

65 La resistencia al estrés hídrico de las plantas transformadas según la invención, con relación a las plantas de control, se puede apreciar a partir de diversos métodos de análisis fenotípicos, fisiológicos y/o bioquímicos, para condiciones de irrigación particulares, en condiciones normales (cultivo tradicional con riego), y en condiciones de estrés hídrico.

A título de ejemplo, las condiciones hídricas en el campo pueden ser las siguientes:

## ES 2 284 642 T3

- una irrigación normal en la parte irrigada, basada en 5 mm por día monitorizado mediante tensiómetros dispuestos a 30, 50, 70 cm de profundidad.
- una irrigación restrictiva, sin aportación de agua, si fuera posible hasta 10 días después de la floración. Aproximadamente en esta fecha, se aportará agua cuando el estrés se juzgue demasiado intenso, el ritmo de aportación no deberá exceder 3 mm por día.

Los datos de meteorología y las condiciones de irrigación se monitorizan.

Las anotaciones realizadas en los distintos periodos de floración y de recolecta consisten en medir:

### a) *Medida de la tolerancia al estrés mediante observación fenotípica*

Los análisis genéticos realizados anteriormente han sugerido un papel potencial de ASR1 en la senescencia foliar y la protandria (desfase entre la floración macho y hembra) en condiciones de sequía. Por lo tanto, se estudian preferiblemente estas características.

La senescencia foliar se puede estudiar mediante mediciones morfológicas que consisten en contar el número de hojas desecadas y verdes en 4 fechas espaciadas en 15 días, a partir de la fecha de floración o en las distintas etapas de desarrollo. Cuando se observan comportamientos muy diferentes en cuanto al enrollamiento y el color de las hojas, se realiza una medición según una escala de 0 a 5 (desde la más tolerante hasta la menos tolerante al estrés).

También se puede medir la senescencia mediante evaluación de la clorofila sobre extracciones de discos foliares en la hoja de la espiga hasta la floración.

La protandria o desfase entre las fechas de floración de las plantas machos (presencia de polen) y hembras (salida de los filamentos) se mide así: las fechas de aparición de los filamentos y del polen se anotan individualmente para cada planta, y la dinámica se representa mediante la curva del porcentaje de plantas que hayan florecido en función del tiempo.

Por otra parte, se realizan diferentes mediciones de la recolecta para evaluar el efecto de tolerancia al estrés sobre la producción de granos, especialmente: el porcentaje de fecundación (relación del número de granos por espiga/número de óvulos fecundables), el número de filas por espiga, el número de granos por fila, la humedad de los granos, el peso de 1000 granos, el número de plantas infectadas por Fusarium.

El uso de un ensayo de identificación no destructivo que usa el glufosinato de amonio permite distinguir fácilmente en cada descendencia transgénica las plantas resistentes al glufosinato de amonio de las plantas sensibles, conteniendo las plantas resistentes el gen *Asr* unido genéticamente al gen marcador de selección, salvo evento de recombinación. Este ensayo consiste en aplicar en el extremo de una hoja una disolución de glufosinato de amonio y observar el fenotipo resultante, sin perjudicar al resto de la planta: causa una necrosis en el extremo de la hoja y se deseca cuando la planta es sensible, o sigue siendo verde si la planta es resistente. Esto permite observar en las mediciones de tolerancia al estrés si el transgen de ASR influye positivamente en la respuesta al estrés en función de la expresión del gen sentido o antisentido.

### b) *Evaluación del estrés sufrido por las plantas*

Se realizan extracciones sobre las hojas, con el fin de medir el contenido en ABA (método de Quarrie *et al.*, 1988), y, cuando sea apropiado, la expresión de la proteína mediante electroforesis bidimensional.

El estrés sufrido por las plantas se puede evaluar midiendo el potencial hídrico de base con la ayuda de una cámara a presión portátil sobre plantas no transformadas, en condiciones de control y en condiciones de estrés hídrico. Se pueden igualmente realizar mediciones del contenido relativo de agua de las hojas.

Se midió la senescencia foliar, que permite una reducción de la superficie de evaporación y una nueva movilización de los metabolitos hacia el resto de la planta tal como se describe aquí arriba, sobre plantas adultas, después de la floración, mediante el recuento del número de hojas en las que al menos 50% de la superficie está seca.

Se observa un efecto significativo de la expresión de la proteína ASR en la proporción de hojas secas. Efectivamente, cuando se relacionan con sus controles propios, los acontecimientos “sentido” presentan, en un tiempo dado, una proporción de hojas secas más grande que acontecimientos “antisentido” (Figura 4). Además, en condiciones de estrés hídrico, las medidas de cinética de senescencia foliar muestran que los acontecimientos “sentido” envejecen más rápidamente que los “no transformados”, y que los acontecimientos “antisentido” envejecen más lentamente que los “no transformados” (Figura 5).

Mediante la expresión “acontecimiento “sentido”” se entiende un acontecimiento que procede de una etapa inicial de transformación con un casete de expresión que contiene la secuencia ASR dispuesta en sentido. Mediante la expresión “acontecimiento “antisentido”” se entiende un acontecimiento que procede de una etapa inicial de transformación con un casete que contiene la secuencia ASR dispuesta en antisentido.

## ES 2 284 642 T3

Los acontecimientos “sentido” que envejecen más rápidamente que los “no transformados” en condiciones de estrés hídrico, presentan, por lo tanto, una ventaja selectiva de tolerancia al estrés hídrico, especialmente para el caso de un estrés de larga duración (reducción de la superficie de evaporación y nueva movilización de los metabolitos hacia el resto de la planta).

Los acontecimientos “antisentido” que envejecen más lentamente que los “no transformados” en condiciones de estrés hídrico, presentan igualmente un interés, en particular en el caso de un déficit hídrico de corta duración. Efectivamente, estas plantas habrán conservado una superficie más grande de evaporación y, por lo tanto, se beneficiarán más de una aportación de agua (lluvias o irrigación) posterior.

Por otra parte, las mediciones del estrés sufrido por las plantas (contenido de las hojas en ABA) revelaron un ligero estrés pero altamente significativo: respectivamente 616 y 512 ng de ABA/g de materia seca en las plantas estresadas y de control, o sea un aumento de aproximadamente 100 ng de ABA por gramo de materia seca en las plantas estresadas. Esta respuesta es la misma para los acontecimientos “sentido” y “antisentido”, así como para las plantas no transformadas. Por lo tanto, la transformación no parece tener efecto sobre la acumulación del ABA en las hojas.

Por lo tanto, estos resultados confirman que en presencia de un estrés hídrico ligero y de una expresión de ASR débil en las plantas transformadas, se observan diferencias significativas.

Por otra parte, se midió el efecto de la tolerancia al estrés hídrico sobre la producción de granos en relación con el rendimiento del grano, del peso de mil granos y del número de espigas por planta. Los resultados obtenidos, con un estrés hídrico bajo, muestran medidas de rendimiento del grano comparables entre plantas transformadas (“sentido” y “antisentido”) y plantas no transformadas, tomadas en condiciones de estrés o en condiciones normales.

Por lo tanto, la transformación por un lado, y la tolerancia al estrés hídrico por otro, no parece afectar el rendimiento del grano de las plantas.

Se efectuaron igualmente mediciones del crecimiento de las plantas. Se midieron las longitudes de 3 hojas por debajo y por encima de la espiga en plantas “sentido” y “antisentido” después de la floración, en ausencia de estrés hídrico. Se observó una diferencia altamente significativa para las 3 hojas:

para las hojas	F0,	antisentido = 78,41 cm (p<0,01) sentido = 76,11 cm
	F1,	antisentido = 77,96 cm (p<0,01) sentido = 75,76 cm
	F2,	antisentido = 75,04 cm (p<0,01) sentido = 72,94 cm

Globalmente, se observa por lo tanto una diferencia significativa de 2 cm de longitud para estas 3 hojas, siendo las hojas de las plantas “sentido” más pequeñas que las de “antisentido”. Esta disminución del crecimiento de la hoja observada en los acontecimientos “sentido” se correlaciona, por lo tanto, con un mayor envejecimiento, conllevando los dos fenómenos una superficie de evaporación reducida, que permite a la planta tolerar mejor el estrés hídrico.

### Bibliografía

- **An et al.** (1986), *Plant Physiol.* 81:86-91
- **Altschul et al.** (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-410
- **Anderson O.D. et al.**, (1989), *T.A.G.*, 77:689-700
- **Bechtold et al.** (1993), *Comptes rendus Académie des Sciences Paris Serie 3*, 316:1194-1199
- **Canel C. et al.** (1995), *Plant Physiol.* 108 (1995), 1323-1325.
- **Chupeau et al.** (1989), *Biotechnology*, 7(5):503-508
- **Church Y Gilbert**, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1991-1995
- **Damerval et al.** *Electrophoresis* 7:52-54, 1986
- **Depicker et al.**, (1982), *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 561-573.
- **Depigny-This et al.**, (1992), *Plant Mol. Biol.*, 20:467-479

## ES 2 284 642 T3

- De **Vienne et al.**, (1999), *Journal of Experimental Botany*, 50(332):303-309.
- **Finer et al.** (1992). *Plant Cell Report*, 11:323-328
- 5 - **Franck et al.** (1980), *Cell*, 21:285-294
- **Fromm M. et al.** (1990), *Biotechnology*, 8:833-839
- **Guerche et al.** (1987), *Mol. Gen. Genet.*, 206:382
- 10 - **Herrera-Estrella et al.** (1983), *EMBO J.* 2,987-995
- **Hiel et al.** (1994). *The Plant Journal*, 6, 271-282.
- 15 - **Hoekema et al.** (1983). *Nature*, 303, 179-180.
- **Iusem et al.**, (1993). *Plant Physiol.*, 102:1353-1354
- **Ishida et al.**(1996), *Nature Biotechnology* 14:754-750
- 20 - **Kasuga et al.** (1999), *Nature Biotechnologie*, 17:287-291
- **Kay et al.**, (1987) *Science*, 236:4805
- 25 - **Mattanovitch, et al.**, (1989), *Nucleic Acids Research*, 17(16):6747.
- **Mc Elroy et al.** (1991). *Molecular and General Genetics*, 231(1), 150-160.
- **Neuhaus et al.** (1987), *Theoretical and applied Genet.*, 75(1):30-36
- 30 - **Quarrie et al.** (1988), *Planta* 173:330-339
- **Riccardi et al.** (1998). *Plant Physiol.*, 117:1253-1263,
- 35 - **Sambrook et al.** (1989). *Molecular cloning, A laboratory manual*, 2ª Edición cold spring harbor laboratory press
- **Schocher et al.** (1986). *Biotechnology* 4:1093-1096
- **Silhavy D. et al.** (1995), *Plant. Mol. Biol.* 27 (1995), 587-595.
- 40 - **Thomas et al.**, (1999), *Plant Science* 140, 21-30
- **Watson et al.** (1994), *ADN recombinant*, Ed. De Boeck Université p. 273-292
- 45 - **Zambryski et al.** (1989) *Cell*, 56, 193-201.
- **Zeewart y Creelman** (1988), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 39:439-473
- 50
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

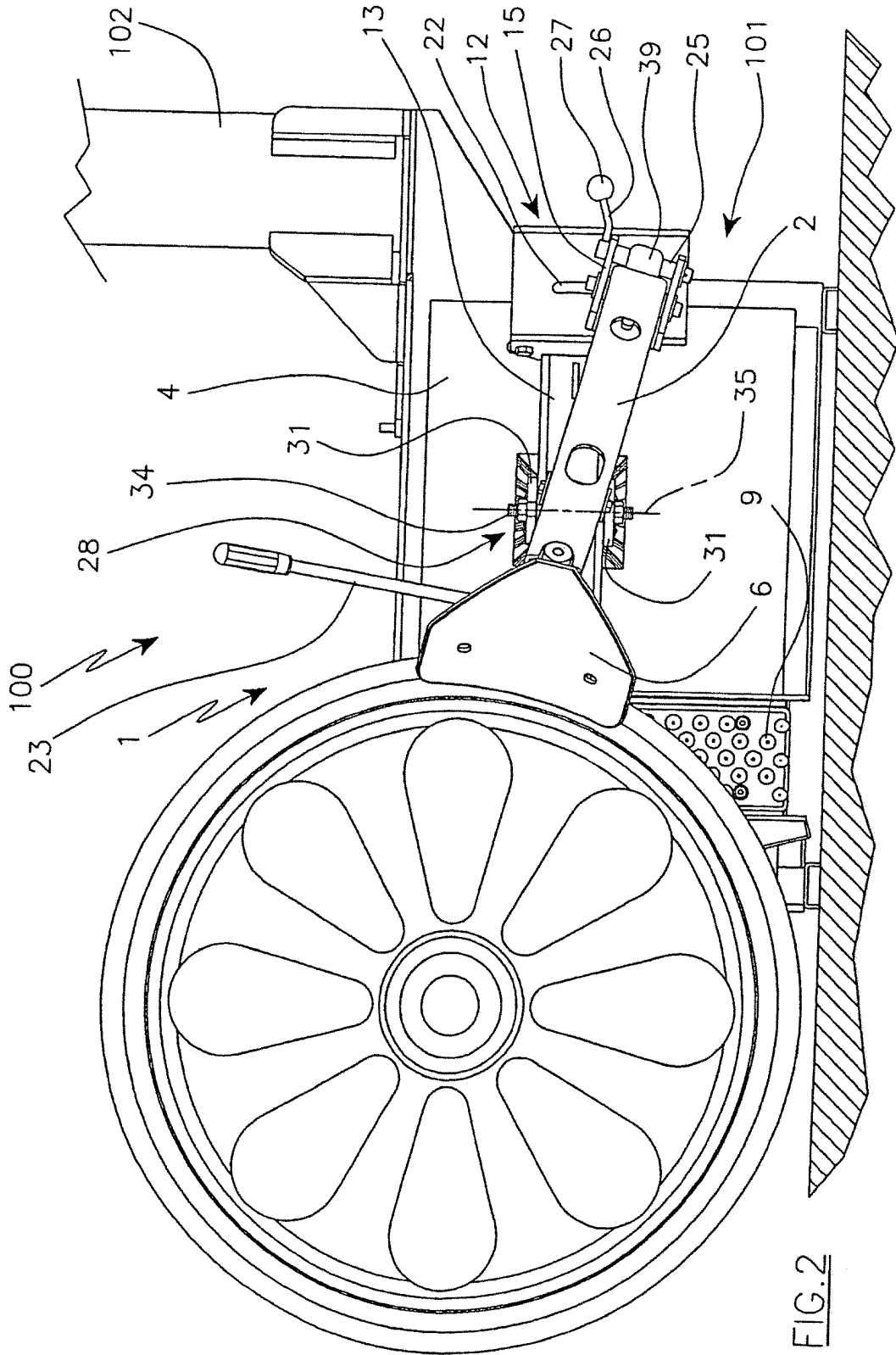
- 5 1. Procedimiento para la obtención de una planta que presenta una cantidad modificada de proteína ASR, que le confiere una mejor resistencia al estrés hídrico con respecto a una planta no transformada, que comprende las etapas que consisten en:
- 10 - transformar al menos una célula de una planta con un vector que contiene un casete de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína ASR que se expresa naturalmente por una planta como respuesta a un estrés hídrico y cuya secuencia de aminoácidos presenta al menos 50% de similitud con SEC ID n° 2, estando dicha secuencia nucleotídica insertada en sentido;
  - cultivar la célula así transformada a fin de generar una planta que contiene en su genoma dicho casete de expresión.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha proteína ASR procede de un cereal, tal como el maíz.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha proteína ASR comprende la secuencia SEC ID n° 2.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el casete de expresión comprende un promotor que permite la expresión constitutiva de la secuencia que codifica para el ASR, por ejemplo, el promotor actina-intrón.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el casete de expresión comprende un promotor que induce la expresión en condiciones de estrés hídrico.
- 25 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el casete de expresión contiene una secuencia seleccionada de entre la SEC ID n° 1, n° 3, n° 4 o n° 5.
7. Planta o parte de planta, susceptible de ser obtenida mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 30 8. Planta o parte de planta según la reivindicación 7, que presenta un aumento de la expresión de la proteína ASR frente a una planta no transformada.
- 35 9. Planta o parte de planta según la reivindicación 7 u 8, **caracterizada** porque se trata de una planta de grandes cultivos seleccionada de entre el maíz, el trigo, la colza, el girasol y el guisante, en particular el maíz.
10. Planta transgénica híbrida susceptible de ser obtenida mediante un procedimiento que comprende:
- 40 a) obtener dos plantas transgénicas según el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y
  - b) hacer crecer estas plantas.
- 45 11. Uso de un ácido nucleico que codifica para una proteína ASR que se expresa naturalmente por una planta como respuesta a un estrés hídrico y cuya secuencia de aminoácidos presenta al menos 50% de similitud con la SEC ID n° 2, para obtener una planta transgénica que presenta una cantidad modificada de proteína ASR, que le confiere una resistencia incrementada al estrés hídrico con respecto a una planta no transformada.
- 50 12. Uso de un ácido nucleico que codifica para una proteína ASR que se expresa naturalmente por una planta como respuesta a un estrés hídrico y cuya secuencia de aminoácidos presenta al menos 50% de similitud con la SEC ID n° 2, o un fragmento de ésta, como sonda o cebador para la amplificación, para la selección de plantas transformadas, según una de las reivindicaciones 7 a 10, que presentan una mejor resistencia al estrés hídrico.

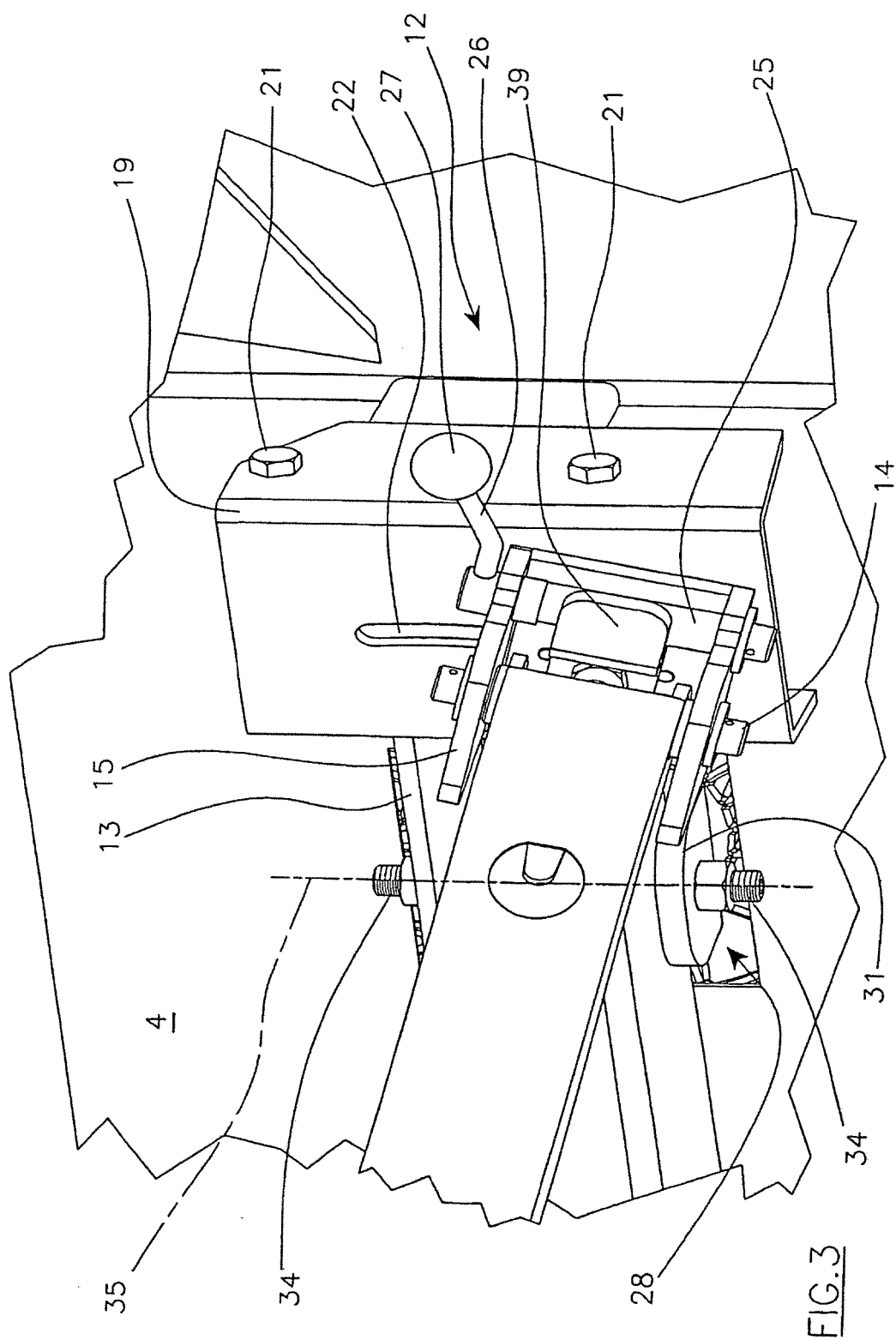
55

60

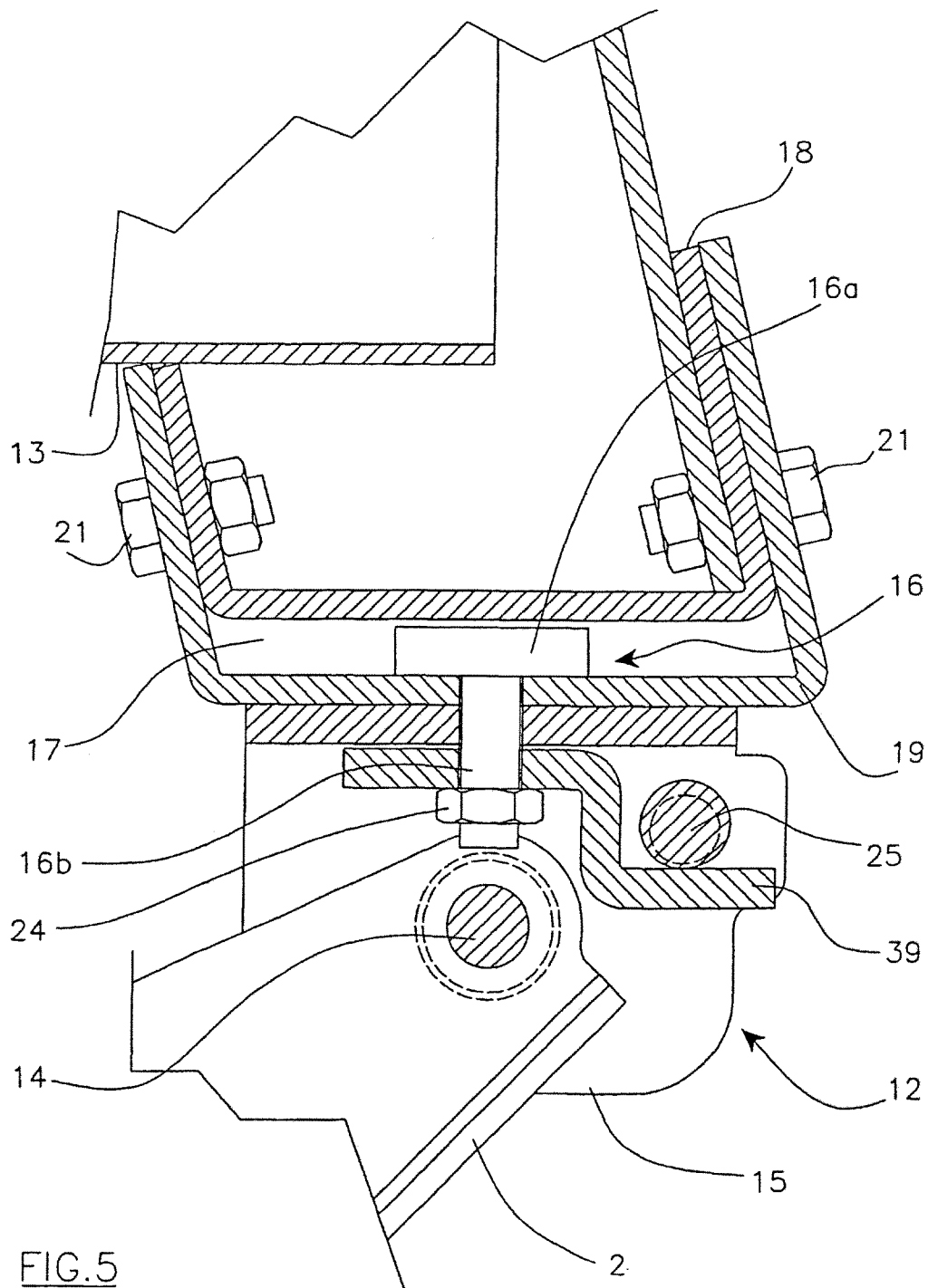
65











# ES 2 284 642 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> BIOGEMMA

5 <120> Procedimiento para la obtención de plantas que presentan una resistencia incrementada a un estrés hídrico

<130> BFF 00/0279

10 <140>  
<141>

<160> 7

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 777  
<212> ADN  
<213> *Zea mays*

25 <220>  
<221> CDS  
<222> (85)..(504)

30 <400> 1

```

tgtcgatcca attgtcactt gctctccctc caacaagcta attaaggccg gtcgtcatcc 60
ctcttctagc tcgttttatt atcc atg gcg gag gag aag cac cac cac cac 111
Met Ala Glu Glu Lys His His His His
1 5
cac ctg ttc cac cat aag aag gac gag gag cag gag gag cag ctc gcc 159
His Leu Phe His His Lys Lys Asp Glu Glu Gln Glu Glu Gln Leu Ala
10 15 20 25
ggc ggc ggg tac ggc gag tcc gcc gag tac acg gag gcc acg gtg acg 207
Gly Gly Gly Tyr Gly Glu Ser Ala Glu Tyr Thr Glu Ala Thr Val Thr
30 35 40
gag gtg gtg tcc acg ggc gag aac gag tac gac gag tac aag gag gag 255
Glu Val Val Ser Thr Gly Glu Asn Glu Tyr Asp Glu Tyr Lys Glu Glu
45 50
aag cag cat aag cac aag cag cac ctc ggc gag gcc ggc gcc atc gcc 303
Lys Gln His Lys His Lys Gln His Leu Gly Glu Ala Gly Ala Ile Ala
60 65 70
gcc ggc gcc ttc gca ctc tac gag aag cac gag gca aag aag gac ccg 351
Ala Gly Ala Phe Ala Leu Tyr Glu Lys His Glu Ala Lys Lys Asp Pro
75 80 85
gag cac gcg cac cgc cac aag atc gag gag gag gtc gcg gcg gcg gcg 399
Glu His Ala His Arg His Lys Ile Glu Glu Glu Val Ala Ala Ala Ala
90 95 100 105
gcc gtc ggc tcc ggc ggc ttc gcc ttc cac gag cac cac gag aag aag 447
Ala Val Gly Ser Gly Gly Phe Ala Phe His Glu His His Glu Lys Lys
110 115 120
aag gac cac aag gac gcc gag gag gcc gcc gcc gag aag aag cac cac 495

```

ES 2 284 642 T3

Lys Asp His Lys Asp Ala Glu Glu Ala Gly Gly Glu Lys Lys His His  
 125 130 135

5     ttc ttc ggc tgattgatcc ctcccgtatc gtcgtccctc cccgtgtgct             544  
       Phe Phe Gly  
           140

10     acgcgtgogt gtgtgagagt gatatcgagc gcccgccgtg ttgtgcgcgc gtacgtatgt 604  
       atgcgctcgt gtgatgcacg aataagcgtg gctacgtaat ctatcgtatg tatacgtgtg 664  
       tgtatgcatg tgcttgtgta tgatcgtggt acgaggaccg aaaaaatgta tgcaactctg 724

15     attracttac atgtttagtt gtttacgtt ctccaaaaaa aaaaaaaaaa aaa             777

<210> 2

20 <211> 140

<212> PRT

<213> *Zea mays*

25 <400> 2

30     Met Ala Glu Glu Lys His His His His His Leu Phe His His Lys Lys  
       1                   5                   10                   15

      Asp Glu Glu Gln Glu Glu Gln Leu Ala Gly Gly Gly Tyr Gly Glu Ser  
                   20                   25                   30

35     Ala Glu Tyr Thr Glu Ala Thr Val Thr Glu Val Val Ser Thr Gly Glu  
                   35                   40                   45

      Asn Glu Tyr Asp Glu Tyr Lys Glu Glu Lys Gln His Lys His Lys Gln  
           50                   55                   60

40     His Leu Gly Glu Ala Gly Ala Ile Ala Ala Gly Ala Phe Ala Leu Tyr  
       65                   70                   75                   80

      Glu Lys His Glu Ala Lys Lys Asp Pro Glu His Ala His Arg His Lys  
                   85                   90                   95

45     Ile Glu Glu Glu Val Ala Ala Ala Ala Val Gly Ser Gly Gly Phe  
                   100                   105                   110

50     Ala Phe His Glu His His Glu Lys Lys Lys Asp His Lys Asp Ala Glu  
           115                   120                   125

      Glu Ala Gly Gly Glu Lys Lys His His Phe Phe Gly  
       130                   135                   140

55 <210> 3

<211> 592

<212> AND

60 <213> *Zea mays*

65

# ES 2 284 642 T3

<400> 3

```

    tgtcgatcca attgtcactt gctctccctc caacaagcta attaaggccg gtcgtcatcc 60
    ctcttctagc tcgttttatt atccatggcg gaggagaagc accaccacca ccacctgttc 120
5   caccataaga aggacgagga gcaggaggag cagctcggcg gcggcgggta cggcgagtc 120
    gccgagtaca cggaggccac ggtgacggag gtggtgtcca cggcgaga caagstacgac 240

    gagtacaagg aggagaagca gcataagcac aagcagcacc tcggcgaggc cggcgccatc 300
    gccgcccggc ccttcgcact cgtacgtagt cctccgatcg atccgatccc ccttgagtag 360
10  tatatacata catgaacgcg ataacgaata atataataat cgaacgaact gaatgatgat 420
    cacggatcac ctctgtgac gtggacatgc acagtacgag aagcacgagg caaagaagga 480
    cccggagcac gcgcaccgcc acaagatcga ggaggaggtc gcggcggcg cggccgtcgg 540
    ctccggcggc ttcgccttcc acgagcacca cgagaagaag aaggaccaca aggacgccga 600
    ggaggccggc ggcgagaaga agcaccactt cttcggctga ttgatccctc ccgtatcgtc 660
15  gtccccccc gtgtactacg cgtgctgtg tgagagtgat atcgagcgcc cggcgtgttg 720
    tgcgcgcgta cgtatgtatg cgtcgtgtg atgcacgaat aagcgtggct acgtaactta 780
    tcgtatgtat acgtgtgtgt atgcatgtgc ttgtgtatga tcgtggtacg aggaccgaaa 840
    aaatgtatgc aactctgatt tacttacatg tttagttgtt tacgtttctc ca 892

```

<210> 4

<211> 890

<212> ADN

<213> *Zea mays*

25

<400> 4

```

    tgtcgatcca attgtcactt gctctccctc caacaagcta attaaggccg gtcctccctc 60
    ttctagctcg tttcattatc catggcggag gagaagcacc accaccacca cctgtccac 120
30  cacaagaagg acgaggagca ggaggagcag ctcccgcg gcgggtacgg caggtccgcc 180
    gagtacacgg aggccacggt gacggagggtg gtgtccacgg gcgagaacga gtacgacgag 240
    tacaagaagg aggagaagca gcacaagcac aagcagcacc tcggcgaggc cggcgccatc 300
    gccgcccggc ccttcgcact cgtacgtagt cctccgatcg atccgatccc ccttgagtag 360
35  tatatacata catgaacgcg ataacgaata atataataat cgaacgaact gaatgatgat 420
    cacggatcac ctctgtgac gtggacatgc acagtacgag aagcacgagg caaagaagga 480
    cccggagcac gcgcaccgcc acaagatcga ggaggaggtc gcggcggcg cggccgtcgg 540
    ctccggcggc ttcgccttcc acgagcacca cgagaagaag aaggaccaca aggacgccga 600
    ggaggccggc ggcgagaaga agcaccactt cttcggctga ttgatccctc ccgtatcgtc 660
    gtccccccc gtgtactacg cgtgctgtg tgagagtgat atcgagcgcc cggcgtgttg 720
40  tgcgcgcgta cgtatgtatg cgtcgtgtg atgcacgaat aagcgtggct acgtaactta 780
    tcgtatgtat acgtgtgtgt atgcatgtgc ttgtgtatga tcgtggtacg aggaccgaaa 840
    aaatgtatgc aactctgatt tacttacatg tttagttgtt tacgtttctc 890

```

45 <210> 5

<211> 814

<212> ADN

<213> *Zea mays*

50

<400> 5

```

    gctaattaag gccggtcgtc atcccccttc tagctcgtt tattatccat ggcggaggag 60
    aagcaccacc accaccacc gtctcccat aagaaggacg aggagcagga ggagcagctc 120
55  gccggcggcg ggtacggcga gtcccgcgag tacacggagg ccacggtgac ggaggtggtg 180
    tccacggggc agaacgagta cgacgagtag aagaaggagg agaagcagca caagcacaag 240
    cagcacctcg gcgaggcgg cgccatcgcc gccggcgcct tcgcactcgt acgtagtcct 300
    ccgatcgatc cgatccctc tgagtatgat atacatacat gaacgcgata acgaataata 360
60  tattaaccga acgaactgaa tgatgatcac ggatcacctc gtgtgacgtg gacatgcaca 420
    gtacgagaag cacgaggcaa agaaggaccc ggagcacgcy caccgccaca agatcgaggga 480
    ggaggtcgcy gcggcggcgg ccgtcggctc cggcggcttc gccttccacg agcaccacga 540
    gaagaagaag gaccacaagg acgcccagga ggcggcggc gagaagaagc accactctct 600
    cggctgattg atctccctc atcgtcgtcc ctccccgtg gctacgcgtg cgtgtgtgag 660
    actgatatcg agcggccgcy gtgtgtgtgc cgcgtacgta tgtatgcgc cgtgtgtatg 720
65  acgaataagc gtcggctacgt aatctatcgt atgtatacgt gtgtgtatgc atgtcctgt 780
    gtatgatcgt ggnacgagga ccgaaaaaat gtat 814

```

# ES 2 284 642 T3

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

5 <213> *Zea mays*

<400> 6

10           tgatgatcca attgtcactt

20

<210> 7

<211> 20

15 <212> ADN

<213> *Zea mays*

<400> 7

20           tggagaaacg taaacaacta

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65