



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 321 349**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/29** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **98929549 .8**

(96) Fecha de presentación : **12.06.1998**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1002085**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **24.05.2000**

(54)

Título: **Procedimiento y medios para el control de la floración de las plantas.**

(30)

Prioridad: **13.06.1997 GB 9712415**

(73)

Titular/es:  
**PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, Inc.**  
**7100 N.W. 62nd Avenue, P.O. Box 1000**  
**Johnston, Iowa 50131-1000, US**

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.06.2009**

(72)

Inventor/es: **Coupland, George, Michael**

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.06.2009**

(74)

Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 321 349 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 y medios para el control de la floración de las plantas.

5 Esta invención se refiere al control genético de la floración en plantas y a la clonación y expresión de genes implicados en la misma. Más particularmente, la invención se refiere a la clonación y expresión del gen temprano de días cortos 4 (en inglés “*EARLY SHORT DAYS 4*”) de *Arabidopsis thaliana* y homólogos de otras especies y a la manipulación y uso de estos genes en plantas.

10 Una floración eficaz en plantas es importante, particularmente cuando el producto deseado es la flor o la semilla producida a partir de la misma. Un aspecto de ésta es el momento de la floración: adelantar o retrasar el comienzo de la floración puede ser útil para agricultores y productores de semillas. La comprensión de los mecanismos genéticos que influyen en la floración proporciona un medio para alterar las características de floración de la planta diana. Son numerosas las especies para las que la floración es importante para la producción de cultivos, esencialmente todos los  
15 cultivos que se cultivan a partir de una semilla, siendo ejemplos importantes los cereales, arroz y maíz, probablemente los más agrícola-mente importantes en zonas climáticas más cálidas, y trigo, cebada, avena y centeno en climas más templados. Son productos de semillas importantes semilla de aceite de colza y canola, remolacha azucarera, maíz, girasol, soja y sorgo. Por supuesto, muchos cultivos que se cosechan por sus raíces u hojas se cultivan anualmente a partir de semillas y la producción de semillas de cualquier clase es muy dependiente de la capacidad de la planta  
20 para florecer, polinizarse y dar semillas. Retrasar la floración es importante para aumentar el rendimiento de plantas de las que se recolectan las raíces y hojas. En la horticultura, el control del momento de la floración es importante. Las plantas de horticultura cuya floración puede controlarse incluyen lechuga, endibia, espinaca y vegetales del género Brassica tales como col, brócoli y coliflor, y claveles y geranios

25 La *Arabidopsis thaliana* es una planta facultativa de días largos que florece temprano en días largos y tarde en días cortos. Debido a que tiene un genoma pequeño bien caracterizado, se transforma y se regenera relativamente fácilmente y tiene un ciclo de crecimiento rápido, *Arabidopsis* es una planta modelo ideal en la que estudiar la floración y su control.

30 Los presentes inventores han descubierto que uno de los genes que regula el momento de la floración en *Arabidopsis* es un gen denominado el gen EARLY SHORT DAYS 4 o ESD4. Los presentes inventores han descubierto que las plantas que llevan una mutación recesiva que afecta al gen ESD4 florecen más temprano que sus tipos salvajes en días largos y cortos. El gen ESD4 se ha clonado y secuenciado ahora y los inventores han demostrado que la mutación es una delección que elimina parte del gen. Esto proporciona indicios de que la reducción o supresión de la función de  
35 ESD4 acelera la floración y, por lo tanto, que el gen ESD4 probablemente codifica un represor de la floración.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con función ESD4. Los expertos en la materia apreciarán que la “función ESD4” puede usarse para referirse a la capacidad para influir en el momento de la floración  
40 fenotípicamente cuando su expresión se reduce como el gen ESD4 de *Arabidopsis thaliana*. Los mutantes de *esd4* presentan una floración temprana en días largos y cortos, no afectándose sustancialmente el momento de la floración por la vernalización.

La presente invención proporciona un aislado de ácido nucleico que codifica un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 1, que puede incluir la secuencia codificante que se muestra en la  
45 Figura 1 que es la del gen ESD4 de *Arabidopsis thaliana*. La Figura 2 muestra una secuencia genómica que incluye nucleótidos que codifican el polipéptido para el que se muestra la secuencia de aminoácidos en la Figura 1.

El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede tener la secuencia de un gen *ESD4* de *Arabidopsis thaliana* o ser un mutante, variante, derivado o alelo o un homólogo de la secuencia proporcionada. Son mutantes,  
50 variantes, derivados y alelos preferidos los que codifican una proteína que conserva una característica funcional de la proteína codificada por el gen de tipo salvaje, especialmente la capacidad para afectar a una característica física de una planta, tal como una característica de floración, especialmente la capacidad para reprimir la floración, como se analiza en este documento.

55 Un mutante, variante, derivado o alelo de acuerdo con la presente invención puede tener la capacidad de afectar a una característica física de una planta, particularmente una característica de floración. En diversas realizaciones, un mutante, variante, derivado o alelo reprime la floración en comparación con el tipo salvaje cuando se expresa en una planta, por ejemplo, en comparación con el efecto obtenido usando una secuencia génica que codifica el polipéptido  
60 de la Figura 1. La “represión” de la floración la retrasa, retarda, inhibe o ralentiza. En otras realizaciones, un mutante, variante, derivado o alelo promueve la floración en comparación con el tipo salvaje cuando se expresa en una planta, por ejemplo, en comparación con el efecto obtenido usando una secuencia génica que codifica el polipéptido de la Figura 1. La “promoción” de la floración la anticipa, acelera o adelanta. La comparación del efecto sobre la floración u otra característica puede realizarse en *Arabidopsis thaliana*, aunque puede usarse un ácido nucleico de acuerdo con  
65 la presente invención en la producción de una amplia diversidad de plantas y para influir en una característica de las mismas.

Como se analiza adicionalmente a continuación, la sobreexpresión de un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede retrasar la floración mientras que una subexpresión puede promover la floración en una planta transgénica.

5 Los cambios en una secuencia para producir un mutante, variante o derivado pueden ser por uno o más de adición, inserción, delección o sustitución de uno o más nucleótidos en el ácido nucleico, conduciendo a la adición, inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos en el polipéptido codificado. Por supuesto, se incluyen los cambios en el ácido nucleico que no generan diferencias en la secuencia de aminoácidos codificada.

10 Una secuencia de ácido nucleico preferida para un gen *ESD4* que incluye una secuencia codificante de acuerdo con la presente invención se muestra en la Figura 1, junto con la secuencia de aminoácidos predicha de un polipéptido de acuerdo con la presente invención que tiene función de ESD4.

15 Una secuencia relacionada con una secuencia descrita específicamente en este documento comparte homología con esa secuencia. La homología puede ser a nivel de la secuencia de nucleótidos y/o secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico y/o aminoácidos comparte homología con la secuencia codificante o la secuencia codificada por la secuencia de nucleótidos de la Figura 1, preferiblemente una homología de al menos aproximadamente el 80%, más preferiblemente una homología de al menos aproximadamente el 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%).

20 Como es bien entendido, la homología a nivel de aminoácidos generalmente es en términos de similitud o identidad de aminoácidos. La similitud permite la “variación conservativa”, es decir, sustitución de un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro o la sustitución de un resto polar por otro, tal como lisina por arginina, ácido aspártico por ácido glutámico o asparagina por glutamina. La similitud puede ser como se define y determina por el programa TBLASTN de Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10, que es de uso convencional en la técnica, o; y puede preferirse, el programa convencional BestFit, que es parte del paquete Wisconsin Versión 8, septiembre de 1994 (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, Estados Unidos, Wisconsin 53711). BestFit realiza un alineamiento óptimo del mejor segmento de similitud entre dos secuencias. Se encuentran alineamientos óptimos por inserción de huecos para maximizar el número de emparejamientos usando el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. (1981) 2: 482-489).

La homología puede ser a lo largo de la longitud completa de la secuencia pertinente que se muestra en este documento o, más preferiblemente, puede ser a lo largo de una secuencia contigua de aproximadamente o superior a aproximadamente 20, 25, 30, 33, 40, 50, 67, 133, 167, 200, 233, 267, 300, 333 o más aminoácidos o codones en comparación con la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos pertinente según el caso.

También se proporciona por un aspecto de la presente invención un ácido nucleico que incluye o consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos complementaria o una secuencia de nucleótidos que puede hibridar con cualquier secuencia codificante proporcionada en este documento. Otra forma de examinar esto sería que un ácido nucleico de acuerdo con este aspecto pudiera hibridar con una secuencia de nucleótidos complementaria con cualquier secuencia codificante proporcionada en este documento. Por supuesto, generalmente el ADN es bicatenario y con frecuencia se realizan técnicas de inmunotransferencia tales como hibridación de Southern después de la separación de las cadenas sin que se realice distinción entre cuál de las cadenas está hibridando. Preferiblemente, el ácido nucleico hibridable o su complementario codifica un producto capaz de influir en una característica física de una planta, particularmente una característica de floración tal como el momento de la floración. Las condiciones preferidas para la hibridación son familiares para los expertos en la materia, pero generalmente son lo bastante rigurosas para que exista una hibridación positiva entre las secuencias de interés frente a la exclusión de otras secuencias.

50 El ácido nucleico, que puede contener, por ejemplo, ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la Figura 1, como genómico (véase, por ejemplo, la Figura 2) o ADNc, puede estar en forma de un vector recombinante y, preferiblemente, replicable, por ejemplo, un plásmido, cósmido, fago o vector binario de *Agrobacterium*. El ácido nucleico puede estar bajo el control de un promotor apropiado u otros elementos reguladores para la expresión en una célula hospedadora tal como una célula microbiana, por ejemplo, bacteriana o vegetal. En el caso de ADN genómico, éste puede contener su propio promotor u otros elementos reguladores y en el caso de ADNc éste puede estar bajo el control de un promotor apropiado u otros elementos reguladores para la expresión en la célula hospedadora.

Un vector que incluye un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención no necesita incluir un promotor u otra secuencia reguladora, particularmente si el vector se va a usar para introducir el ácido nucleico en células para recombinación en el genoma.

60 Los expertos en la materia serán capaces de construir vectores y diseñar protocolos para la expresión génica recombinante. Pueden seleccionarse o construirse vectores adecuados que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, fragmentos de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición. Sambrook *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión de genes y análisis de proteínas se describen en detalle en Current Protocols in Molecular Biology, Segunda Edición, Ausubel *et al.* eds.,

John Wiley & Sons, 1992. Las descripciones de Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.* se incorporan en este documento como referencia. Se describen procedimientos específicos y vectores usados anteriormente con gran éxito en plantas por Bevan (Nucl. Acids Res. 12, 8711-8721 (1984)) y Guerineau y Mullineaux (1993) (Plant transformation and expression vectors. En: Plant Molecular Biology Labfax (Croy RRD ed) Oxford, BIOS Scientific Publishers, págs. 121-148).

Pueden usarse marcadores genéticos de selección que consisten en genes quiméricos que confieren fenotipos seleccionables tales como resistencia a antibióticos tales como kanamicina, higromicina, fosfotricina, clorsulfurón, metotrexato, gentamicina, espectinomycin, imidazolinonas y glifosato.

Las moléculas de ácido nucleico y vectores de acuerdo con la presente invención pueden proporcionarse aislados y/o purificados de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea o libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de las especies de interés o de otro origen distinto de la secuencia que codifica un polipéptido o con la función necesaria. El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede incluir ADNc, ARN, ADN genómico y puede ser completamente o parcialmente sintético. El término "aislado" incluye todas estas posibilidades. Cuando se especifica una secuencia de ADN, por ejemplo, en relación con una figura, a menos que el contexto requiera otra cosa, se incluye el ARN equivalente, con T sustituida por U donde aparezca.

Cuando se introduce una construcción génica seleccionada en una célula, deben tenerse en cuenta en ciertas consideraciones bien conocidas por los expertos en la materia. El ácido nucleico a insertar debería ensamblarse en el interior de una construcción que contenga elementos reguladores eficaces que dirigirán la transcripción. Debe estar disponible un procedimiento de transporte de la construcción hacia el interior de la célula. Una vez que la construcción está en el interior de la membrana celular, la integración en el material cromosómico endógeno se producirá o no. Por último, en lo que se refiere a las plantas, el tipo celular diana debe ser tal que las células puedan regenerarse en plantas completas.

Las plantas transformadas con el segmento de ADN que contiene la secuencia pueden producirse por técnicas convencionales que ya se conocen para la manipulación genética de plantas. El ADN puede usarse para transformar células vegetales usando cualquier tecnología adecuada, tal como un vector plasmídico Ti desarmado llevado por *Agrobacterium* aprovechando su capacidad de transferencia génica natural (documentos EP-A-270355, EP-A-0116718, NAR 12 (22) 8711-87215 1984), bombardeo de partículas o microproyectiles (documentos US 5100792, EP-A-444882, EP-A-434616), microinyección (documentos WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083, EP 175966, Green *et al.* (1987) Plant Tissue and Cell Culture, Academic Press), electroporación (documentos EP 290395, WO 8706614 Gelvin Debeyser -véase adjunto), otras formas de captación directa de ADN (documentos DE 4005152, WO 9012096, US 4684611), captación de ADN mediada por liposomas (por ejemplo, Freeman *et al.* Plant Cell Physiol. 29: 1353 (1984)), o el método de agitación vorticial (por ejemplo, Kindle, PNAS U.S.A. 87: 1228 (1990d)). Los métodos físicos para la transformación de células vegetales se revisan en Oard, 1991, Biotech. Adv. 9: 1-11.

La transformación por *Agrobacterium* se usa mucho por los expertos en la materia para transformar especies dicotiledóneas. Recientemente, ha habido avances importantes hacia la producción de rutina de plantas transgénicas fértiles estables en casi todas las plantas monocotiledóneas económicamente relevantes (Toriyama, *et al.* (1988) Bio/Technology 6, 1072-1074; Zhang, *et al.* (1988) Plant Cell Rep. 7, 379-384; Zhang, *et al.* (1988) Theor Appl Genet 76, 835-840; Shimamoto, *et al.* (1989) Nature 338, 274-276; Datta, *et al.* (1990) Bio/Technology 8, 736-740; Christou, *et al.* (1991) Bio/Technology 9, 957-962; Peng, *et al.* (1991) International Rice Research Institute, Manila, Filipinas 563-574; Cao, *et al.* (1992) Plant Cell Rep. 11, 585-591; Li, *et al.* (1993) Plant Cell Rep. 12, 250-255; Rathore, *et al.* (1993) Plant Molecular Biology 21, 871-884; Fromm, *et al.* (1990) Bio/Technology 8, 833-839; Gordon-Kamm, *et al.* (1990) Plant Cell 2, 603-618; D'Halluin, *et al.* (1992) Plant Cell 4, 1495-1505; Walters, *et al.* (1992) Plant Molecular Biology 18, 189-200; Koziel, *et al.* (1993) Biotechnology 11, 194-200; Vasil, I. K. (1994) Plant Molecular Biology 25, 925-937; Weeks, *et al.* (1993) Plant Physiology 102, 1077-1084; Somers, *et al.* (1992) Bio/Technology 10, 1589-1594; documento WO92/14828). En particular, la transformación mediada por *Agrobacterium* está surgiendo ahora también como un procedimiento de transformación alternativo altamente eficaz en monocotiledóneas (Hiei *et al.* (1994) The Plant Journal 6, 271-282).

La generación de plantas transgénicas fértiles se ha conseguido en los cereales arroz, maíz, trigo, avena y cebada (revisado en Shimamoto, K. (1994) Current Opinion in Biotechnology 5, 158-162'; Vasil, *et al.* (1992) Bio/Technology 10, 667-674; Vain *et al.*, 1995, Biotechnology Advances 13 (4): 653-671; Vasil, 1996, Nature Biotechnology 14 página 702).

Se prefiere bombardeo de microproyectiles, electroporación y captación directa de ADN cuando el *Agrobacterium* es ineficiente o ineficaz. Como alternativa, puede emplearse una combinación de técnicas diferentes para aumentar la eficacia del proceso de transformación, por ejemplo, bombardeo con micropartículas recubiertas con *Agrobacterium* (documento EP-A-486234) o bombardeo de microproyectiles para inducir lesiones seguido de cocultivo con *Agrobacterium* (EP-A-486233).

Después de la transformación, una planta puede regenerarse, por ejemplo, a partir de células individuales, tejido de callo o discos de hojas, como es convencional en la técnica. Casi cualquier planta puede regenerarse completamente a partir de células, tejidos y órganos de la planta. Se revisan técnicas disponibles en Vasil *et al.*, Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol 1, II y III, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press, 1984 y Weissbach y Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989.

La selección particular de una tecnología de transformación se determinará por su eficacia para transformar ciertas especies vegetales así como la experiencia y preferencia de la persona que realice la invención con una metodología particular de elección. Será evidente para el experto que la elección particular de un sistema de transformación para introducir un ácido nucleico en células vegetales no es esencia para ni una limitación de la invención, ni lo es la elección de la técnica para la regeneración de plantas.

Puede usarse un gen *ESD4* y versiones modificadas del mismo (alelos, mutantes, variantes y derivados del mismo) y otro ácido nucleico proporcionado en este documento, incluyendo especies homólogas, para afectar a una característica física, tal como una característica de floración, que puede incluir el momento de la floración, en plantas. Con este fin puede usarse un ácido nucleico, tal como un vector como se describe en este documento, para la producción de una planta transgénica. Dicha planta puede poseer un fenotipo de floración alterado, particularmente en términos de momento de la floración, en comparación con el tipo salvaje (es decir, una planta que sea de tipo salvaje para *ESD4* o el homólogo pertinente del mismo).

La invención incluye además una célula hospedadora transformada con ácido nucleico o un vector de acuerdo con la presente invención, especialmente una planta o célula microbiana. Por lo tanto, se proporciona una célula hospedadora, tal como una célula vegetal, incluyendo un ácido nucleico heterólogo de acuerdo con la presente invención. Dentro de la célula, el ácido nucleico puede incorporarse en el interior del cromosoma. Puede haber más de una secuencia de nucleótidos heteróloga por genoma haploide.

Además, de acuerdo con la invención, se proporciona una célula vegetal que tiene incorporado en su genoma un ácido nucleico, particularmente, un ácido nucleico heterólogo, como se proporciona en la presente invención, bajo el control operativo de una secuencia reguladora para el control de la expresión. La secuencia codificante puede estar unida operativamente a una o más secuencias reguladoras que pueden ser heterólogas o extrañas para el gen, tal como no asociadas naturalmente con el gen para su expresión. El ácido nucleico de acuerdo con la invención puede situarse bajo el control de un promotor génico inducible externamente para situar la expresión bajo el control del usuario.

Un promotor inducible adecuado es el promotor del gen GST-II-27 que se ha demostrado que se induce por ciertos compuestos químicos que pueden aplicarse a plantas en crecimiento. El promotor es funcional tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas. Por lo tanto, puede usarse para controlar la expresión génica en una diversidad de plantas modificadas genéticamente, incluyendo cultivos de campo tales como colza, girasol, tabaco, remolacha azucarera, algodón; cereales tales como trigo, cebada, arroz, maíz, sorgo; fruta tal como tomates, mangos, melocotones, manzanas, peras, fresas, bananas y melones; y vegetales tales como zanahoria, lechuga, col y cebolla. El promotor GST-II-27 también es adecuado para el uso en una diversidad de tejidos, incluyendo raíces, hojas, tallos y tejidos reproductores. Otro ejemplo de un promotor inducible es el interruptor génico inducible por etanol descrito en Caddick *et al* (1998) Nature Biotechnology 16: 177-180. Los expertos en la materia conocen muchos otros ejemplos.

Otros promotores adecuados pueden incluir el promotor génico 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV 35S) que se expresa a un alto nivel en prácticamente todos los tejidos vegetales (Benfey *et al*, (1990a) EMBO J 9: 1677-1684); el meri 5 de la coliflor que se expresa en el meristemo apical vegetativo, así como en varias ubicaciones bien localizadas en el cuerpo de la planta, por ejemplo, el floema interno, primordio de la flor, puntos de ramificación en raíces y vástagos (Medford, J. I. (1992) Plant Cell 4, 1029-1039; Medford *et al.*, (1991) Plant Cell 3, 359-370) y el promotor LEAFY de *Arabidopsis thaliana*, que se expresa muy temprano en el desarrollo de la flor (Weigel *et al*, (1992) Cell 69, 843-859).

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un procedimiento de generación de dicha célula vegetal que implica la introducción de un ácido nucleico o de un vector adecuado que incluya la secuencia de nucleótidos en una célula vegetal y causar o permitir la recombinación entre el vector y el genoma de la célula vegetal, para introducir la secuencia de nucleótidos en el genoma. La invención abarca células vegetales que contienen un ácido nucleico de acuerdo con la invención como resultado de la introducción del ácido nucleico en una célula antecesora.

El término "heterólogo" puede usarse para indicar que el gen/secuencia de nucleótidos en cuestión se ha introducido en dichas células de la planta o un antecesor de la misma, usando ingeniería genética, es decir, mediante intervención humana. Puede proporcionarse una célula vegetal transgénica, es decir, transgénica para el ácido nucleico en cuestión. El transgén puede estar en un vector extragenómico o incorporado, preferiblemente de forma estable, en el genoma. Un gen heterólogo puede sustituir a un gen equivalente endógeno, es decir, uno que normalmente realiza la misma o una función similar, o la secuencia insertada puede ser adicional al gen endógeno u otra secuencia. Una ventaja de la introducción de un gen heterólogo es la capacidad para situar la expresión de una secuencia bajo el control de un promotor de elección, para ser capaces de influir en la expresión de acuerdo con la preferencia. Además, pueden usarse mutantes, variantes y derivados del gen de tipo salvaje, por ejemplo, con mayor o menor actividad que el tipo salvaje en lugar del gen endógeno. Los ácidos nucleicos heterólogos, o exógenos o extraños para una célula vegetal pueden ser de origen no natural en células de ese tipo, variedad o especie. Por lo tanto, el ácido nucleico puede incluir una secuencia codificante de o derivada de un tipo particular de célula vegetal o especie o variedad de planta, situada en el contexto de una célula vegetal de un tipo o especie o variedad de planta diferente. Una posibilidad adicional es que una secuencia de ácido nucleico se sitúe en el interior de una célula en la que la misma o un homólogo se encuentre de forma natural, pero en la que la secuencia de ácido nucleico esté unida y/o adyacente a un ácido nucleico que no aparece de forma natural en el interior de la célula o células de ese tipo o especie o variedad de planta, tal como unida operativamente a una o más secuencias reguladoras, tales como una secuencia promotora, para el control

de la expresión. Una secuencia en el interior de una planta u otra célula hospedadora puede ser heteróloga, exógena o extraña de forma identificable.

También se proporcionan plantas que incluyen una célula vegetal de acuerdo con la invención junto con cualquier parte o propágulo de la misma, semilla, progenie autopolinizada o híbrida y descendientes. Una planta de acuerdo con la presente invención puede ser una que no sea una línea pura en una o más propiedades. Pueden excluirse variedades vegetales, particularmente variedades vegetales registrables de acuerdo con los Derechos de Criadores de Plantas. Se señala que una planta no debe considerarse “variedad vegetal” simplemente porque contenga un transgén de forma estable en el interior de su genoma, introducido en una célula de la planta o un antecesor de la misma.

Además de una planta, la presente invención proporciona cualquier clon de dicha planta, semilla, progenie autopolinizada o híbrida y descendientes y cualquier parte de cualquiera de estos, tales como esquejes y semillas. La invención proporciona cualquier propágulo de planta, que es cualquier parte que pueda usarse en la reproducción o propagación, sexual o asexual, incluyendo esquejes, semillas y etc. También se incluye en la presente invención una planta que sea prole, clon o descendiente propagado sexualmente o asexualmente de dicha planta, o cualquier parte o propágulo de dicha planta, prole, clon o descendiente.

La invención proporciona además un procedimiento para influir o afectar a una característica física, por ejemplo, floración, tal como el momento de la floración de una planta, incluyendo causar o permitir la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, como se ha analizado, en el interior de células de la planta.

La invención proporciona además un procedimiento para incluir la expresión de un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la Figura 1 o un mutante, variantes, alelo o derivado de la secuencia, en el interior de células de una planta (produciendo de este modo el polipéptido codificado), después de una etapa más temprana de introducción del ácido nucleico en una célula de la planta o un antecesor de la misma. Dicho procedimiento puede influir o afectar a una característica de floración de la planta, tal como el momento de la floración. Esto puede usarse en combinación con cualquier otro gen, tal como transgenes implicados en la floración u otros rasgos fenotípicos o propiedades deseables.

La presente invención también incluye el producto de expresión de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas y procedimientos de generación del producto de expresión por expresión por lo tanto del ácido nucleico en condiciones adecuadas, que pueden ser en células hospedadoras adecuadas. Después de la expresión, el producto puede aislarse del sistema de expresión y puede usarse como se desee, por ejemplo, en la formulación de una composición que incluye al menos un componente adicional.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un procedimiento para identificar y clonar homólogos de *ESD4* de especies vegetales distintas de *Arabidopsis thaliana*, empleando dicho procedimiento una secuencia de nucleótidos derivada de la que se muestra en la Figura 1. Las secuencias derivadas de éstas pueden usarse por sí mismas en la identificación y en la clonación de otras secuencias. La información de secuencia de nucleótidos proporcionada en este documento o cualquier parte de la misma puede usarse en una búsqueda en bases de datos para encontrar secuencias homólogas, cuyos productos de expresión pueden ensayarse para determinar su capacidad para influir en una característica de floración. Estos pueden tener función de *ESD4* o la capacidad para reprimir la floración. Como alternativa, pueden explorarse genotecas de ácidos nucleicos usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia y después ensayarse las secuencias homólogas identificadas de este modo.

Un ácido nucleico diana o candidato puede comprender, por ejemplo, ADN genómico, ADNc o ARN (o una mezcla de cualquiera de estos, preferiblemente como una genoteca) que puede obtenerse de un organismo que se sepa que contiene o que se sospecha que contiene dicho ácido nucleico, ya sea una monocotiledónea o dicotiledónea. Antes de cualquier PCR que se vaya a realizar, la complejidad de una genoteca de ácido nucleico puede reducirse por generación de una genoteca de ADNc, por ejemplo, usando RT-PCR o mediante el uso de la técnica de reasociación de emulsión de fenol (Clarke *et al* (1992) NAR 20, 1289-1292) en una genoteca genómica. Puede identificarse la hibridación con éxito y/o aislarse un ácido nucleico diana/candidato para una investigación/uso adicional.

La hibridación de una molécula de ácido nucleico con un gen *ESD4* u homólogo puede determinarse o identificarse indirectamente, por ejemplo, usando una reacción de amplificación de ácido nucleico, particularmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR requiere el uso de dos cebadores para amplificar específicamente un ácido nucleico diana, de modo que se emplean preferiblemente dos moléculas de ácido nucleico con secuencias características de *ESD4*. Sin embargo, si se usa RACE puede ser necesario solamente uno de dichos cebadores. También puede determinarse la hibridación (opcionalmente junto con una técnica de amplificación tal como PCR) por sondaje con ácido nucleico e identificación de hibridación positiva en condiciones convenientemente rigurosas (de acuerdo con técnicas conocidas). Para el sondaje, son condiciones preferidas las que son lo bastante rigurosas para que exista un patrón simple con un número pequeño de hibridaciones identificadas como positivas que pueden investigarse adicionalmente. Se conoce bien en la técnica cómo aumentar gradualmente la rigurosidad de hibridación hasta que sólo queden unos pocos clones positivos.

La unión de una sonda a un ácido nucleico diana (por ejemplo, ADN) puede medirse usando cualquiera de una diversidad de técnicas a disposición de los expertos en la materia. Por ejemplo, las sondas pueden marcarse radiativamente, fluorescentemente o enzimáticamente. Otros procedimientos que no emplean marcaje de sondas incluyen el

examen de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, amplificación usando PCR, escisión con ARNasa y sondaje con oligonucleótidos específicos de alelo.

El sondaje puede emplear la técnica de transferencia de Southern convencional. Por ejemplo, el ADN puede extraerse de células y digerirse con diferentes enzimas de restricción. Después, los fragmentos de restricción pueden separarse por electroforesis en un gel de agarosa antes de la desnaturalización y transferencia a un filtro de nitrocelulosa. La sonda marcada puede hibridarse con los fragmentos de ADN sobre el filtro y determinarse la unión. El ADN para sondaje puede prepararse a partir de preparaciones de ARN de células por técnicas tales como transcripción inversa-PCR.

Pueden realizarse experimentos preliminares por hibridación en condiciones de baja rigurosidad de diversas sondas con transferencias de Southern de ADN digerido con enzimas de restricción. Para el sondaje, son condiciones preferidas las que son lo bastante rigurosas para que exista un patrón simple con un número pequeño de hibridaciones identificadas como positivas que pueden investigarse adicionalmente. Se conoce bien en la técnica cómo aumentar la rigurosidad de la hibridación gradualmente hasta que sólo queden unos pocos clones positivos. Se conseguirían condiciones adecuadas cuando se obtuviera un gran número de fragmentos de hibridación mientras que la hibridación de fondo fuera reducida. Usando estas condiciones, pueden realizarse búsquedas en genotecas de ácidos nucleicos, por ejemplo, genotecas de ADNc representativas de secuencias expresadas. Los expertos en la materia son bien capaces de emplear condiciones adecuadas de la rigurosidad deseada para una hibridación selectiva, teniendo en cuenta factores tales como la longitud de los oligonucleótidos y la composición de bases, temperatura y etcétera.

Por ejemplo, la exploración puede llevarse a cabo inicialmente en condiciones que comprenden una temperatura de aproximadamente 37°C o más, una concentración de formamida de menos de aproximadamente el 50% y una concentración de sal de moderada a baja (por ejemplo, Solución Salina Citrato Convencional ("SSC") = cloruro de sodio 0,15 M; citrato de sodio 0,15 M, pH 7).

Como alternativa, una temperatura de aproximadamente 50°C o más y una alta concentración de sal (por ejemplo, "SSPE" = cloruro de sodio 0,180 mM, hidrogenofosfato disódico 9 mM; dihidrogenofosfato de sodio 9 mM; EDTA sódico 1 mM; pH 7,4). Preferiblemente, la exploración se lleva a cabo a aproximadamente 37°C, una concentración de formamida de aproximadamente el 20% y una concentración de sal de aproximadamente SSC 5X, o una temperatura de aproximadamente 50°C y una concentración de sal de aproximadamente SSPE 2 X. Estas condiciones permitirán la identificación de secuencias que tengan un grado sustancial de homología (similitud, identidad) con la secuencia de sonda sin que sea necesaria una homología perfecta para la identificación de un híbrido estable.

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

Se describen técnicas de PCR para la amplificación de ácidos nucleicos en la Patente de Estados Unidos N° 4.683.195 y Saiki *et al.* Science 239: 487-491 (1988). La PCR incluye etapas de desnaturalización del ácido nucleico molde (si bicatenario), hibridación del cebador a la diana y polimerización. El ácido nucleico sondado o usado como molde en la reacción de amplificación puede ser ADN genómico, ADNc o ARN. Puede usarse PCR para amplificar secuencias específicas a partir de ADN genómico, secuencias de ARN específicas y ADNc transcrito a partir de ARNm. Las referencias para el uso general de técnicas de PCR incluyen Mullis *et al.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263 (1987), Ehrlich (ed.) PCR technology, Stockton Press, NY, 1989, Ehrlich *et al.*, Science, 252: 1643-1650, (1991), "PCR protocols: A Guide to Methods and Applications", Eds. Innis *et al.*, Academia Press, Nueva York, (1990).

La evaluación de si un producto de PCR se corresponde o no con un gen capaz de alterar una característica de una planta, particularmente una característica de floración, puede realizarse de varias formas, como se ha analizado, y una banda de PCR puede contener una mezcla compleja de productos. Pueden clonarse productos individuales y cada uno explorarse para determinar la relación con dichos genes conocidos que están segregando en la progenie que mostraba un polimorfismo para esta sonda. Como alternativa, el producto de PCR puede tratarse de una forma que permita visualizar el polimorfismo en un gel de secuenciación de ADN de poliacrilamida desnaturalizante, seleccionándose previamente bandas específicas que estén relacionadas con el gen antes de la clonación. Una vez que se ha clonado una banda PCR candidata y se ha demostrado que está relacionada con un gen de floración conocido, puede usarse para aislar clones que pueden examinarse para determinar otras características y homologías con *ESD4/ESD4* u otro gen relacionado. Posteriormente, puede analizarse por transformación para evaluar su función cuando se introduce en una planta de interés. Como alternativa, la banda de PCR o secuencias derivadas mediante su análisis pueden usarse para ayudar a los criadores de plantas en el control de la segregación de un gen de utilidad.

Las secuencias de aminoácidos preferidas adecuadas para el uso en el diseño de sondas o cebadores de PCR son secuencias conservadas (completamente, sustancialmente o parcialmente) entre al menos dos péptidos o polipéptidos *ESD4* codificados por genes implicados en el control de la floración en una planta. Pueden identificarse secuencias de nucleótidos conservadas a partir de la información de secuencia de nucleótidos contenida en este documento.

Basándose en la información de secuencia de aminoácidos o información de secuencia de nucleótidos, pueden diseñarse sondas o cebadores oligonucleotídicos (cuando se trabaja a partir de una información de secuencia de aminoácidos, teniendo en cuenta la degeneración del código genético y, cuando sea apropiado, el uso de codones del organismo).

Un gen o fragmento del mismo identificado como aquel con el que hibrida dicha molécula de ácido nucleico, que puede ser un producto de PCR amplificado, puede aislarse y/o purificarse y posteriormente puede investigarse para determinar su capacidad para alterar una característica de floración de una planta. Si el ácido nucleico identificado es un fragmento de un gen, el fragmento puede usarse (por ejemplo, por sondaje y/o PCR) en la posterior clonación del gen de longitud completa, que puede ser una secuencia codificante de longitud completa. Pueden prepararse insertos a partir de clones de ADNc parciales y usarse para explorar genotecas de ADNc. Los clones de longitud completa aislados pueden subclonarse en vectores de expresión y ensayarse su actividad por introducción en células hospedadoras adecuadas y/o secuenciarse. Puede ser necesario que uno o más fragmentos génicos se ligen para generar una secuencia codificante de longitud completa.

Las moléculas que se ha descubierto que manipulan genes con capacidad para modificar las características de floración de una planta pueden usarse como tales, es decir, para alterar una característica de floración de una planta. Se proporciona ácido nucleico obtenido y que puede obtenerse usando un procedimiento como se describe en este documento en diversos aspectos de la presente invención.

La presente solicitud también proporciona oligonucleótidos basados en una secuencia de nucleótidos de *ESD4* como se proporciona en este documento o una secuencia de nucleótidos de *ESD4* que puede obtenerse de acuerdo con las descripciones y sugerencias de este documento. Los oligonucleótidos pueden ser de una longitud adecuada para el uso como cebadores en una reacción de amplificación o pueden ser adecuados para el uso como sondas para hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Preferiblemente, un oligonucleótido de acuerdo con la invención, por ejemplo, para el uso en la amplificación de ácido nucleico, tiene aproximadamente 10 o menos codones (por ejemplo, 6, 7 u 8), es decir, es de aproximadamente 30 o menos nucleótidos de longitud (por ejemplo, 18, 21 ó 24).

La presente invención también abarca ácidos nucleicos que codifican un homólogo de *ESD4* obtenido usando una secuencia de nucleótidos derivada de la que se muestra en la Figura 1.

El suministro de información de secuencia para el gen *ESD4* de *Arabidopsis thaliana* permite la obtención de secuencias homólogas de otras especies vegetales. En particular, debería ser posible aislar fácilmente homólogos de *ESD4* a partir de especies de Brassica relacionadas comercialmente importantes (por ejemplo, *Brassica nigra*, *Brassica napus* y *Brassica oleraceae*), como se ha realizado para otros genes de tiempo de floración aislados de *Arabidopsis* (por ejemplo, CO; documento WO 96/14414).

Por lo tanto, se incluyen en el alcance de la presente invención moléculas de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos que son homólogas de *ESD4* de *Arabidopsis thaliana*. La homología puede ser a nivel de la secuencia de nucleótidos y/o secuencia de aminoácidos, como ya se ha analizado anteriormente. Un homólogo de una especie distinta de *Arabidopsis thaliana* codifica un producto que causa un fenotipo similar al causado por el gen *ESD4* de *Arabidopsis thaliana*, incluyendo generalmente la capacidad para influir en una característica de floración tal como el momento de la floración. Además, mutantes, derivados o alelos de estos genes pueden promover o retrasar la floración en comparación con el tipo salvaje.

También pueden identificarse homólogos del gen *ESD4* a partir de plantas de cultivo monocotiledóneas económicamente importantes tales como arroz y maíz. Aunque los genes que codifican la misma proteína en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas muestran una homología relativamente escasa a nivel de nucleótidos, las secuencias de aminoácidos están conservadas. Por lo tanto, es posible usar bases de datos de secuencias públicas para identificar secuencias de clones de ADNc de *Arabidopsis*, arroz o maíz que se obtuvieron en programas de secuenciación aleatoria y que comparten homología con el gen de interés, como se ha realizado para otros genes de tiempo de floración aislados de *Arabidopsis* (por ejemplo, CO; documento WO 96/14414). Se ha aislado un gen relacionado con *ESD4* a partir del arroz como un marcador de secuencia expresada (Figura 3). Por supuesto, se incluyen mutante, derivados y alelos de estas secuencias en el alcance de la presente invención en los mismos términos que se han analizado anteriormente para el gen *EDS4* de *Arabidopsis thaliana*.

El ácido nucleico de acuerdo con la invención puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un producto cuya función de tipo salvaje es reprimir la floración. Puede usarse la reducción del nivel de expresión, como en el mutante de *esd4*, para acelerar la floración, al tiempo que el aumento del nivel de expresión puede usarse para retrasar la floración. El producto génico de *ESD4* es un represor activo de la floración, mientras que genes tales como CO y LD codifican proteínas que promueven la floración. La sobreexpresión del gen LHY retrasa la floración.

La característica física principal, actualmente una característica de floración, que puede alterarse usando la presente invención es el momento de la floración. La reducción en la expresión del producto génico del gen *ESD4* puede usarse para promover una floración temprana (de acuerdo con el fenotipo mutante de *esd4*) y la sobreexpresión puede usarse para retrasar la floración. Este grado de control es útil para asegurar una floración sincronizada de líneas parentales masculinas y femeninas en la producción de híbridos, por ejemplo. Otro uso consiste en adelantar o retrasar la floración

de acuerdo con los dictados del clima para prolongar o reducir la estación de crecimiento. Esto puede implicar el uso de regulación antisentido o con sentido, que se analiza adicionalmente a continuación.

Como se indica a continuación, pueden afectarse otras características físicas de plantas por medios de expresión de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

El ácido nucleico de acuerdo con la invención, tal como un gen *ESD4* u homólogo, puede situarse bajo el control de un promotor génico externamente inducible para situar el momento de la floración bajo el control del usuario. Una ventaja de la introducción de un gen heterólogo en una célula vegetal, particularmente cuando la célula está incluida en una planta, es la capacidad para situar la expresión del gen bajo el control de un promotor de elección, para ser capaces de influir en la expresión del gen y, por lo tanto, en la floración de acuerdo con la preferencia. Además, pueden usarse mutantes y derivados del gen de tipo salvaje, por ejemplo, con mayor o menor actividad que el de tipo salvaje, en lugar del gen endógeno.

En la presente invención, la sobreexpresión puede conseguirse por introducción de la secuencia de nucleótidos en una orientación con sentido. Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento de influir en una característica física, por ejemplo, floración, de una planta, incluyendo el procedimiento causar o permitir la expresión del producto (polipéptido o transcrito de ácido nucleico) codificado por un ácido nucleico heterólogo de acuerdo con la invención a partir de ese ácido nucleico en el interior de células de la planta.

La regulación negativa de la expresión de un gen diana puede conseguirse usando tecnología antisentido o “regulación con sentido” (“cosupresión”).

En el uso de genes antisentido o secuencias génicas parciales para regular negativamente la expresión génica, una secuencia de nucleótidos se sitúa bajo el control de un promotor en una “orientación inversa” de modo que la transcripción produce un ARN que es complementario a un ARNm normal transcrito a partir de la cadena “con sentido” del gen diana. Véase, por ejemplo, Rothstein *et al.*, 1987; Smith *et al.*, (1988) Nature 334, 724-726; Zhang *et al.*, (1992) The Plant Cell 4, 1575-1588, English *et al.*, (1996) The Plant Cell 8, 179-188. También se revisa la tecnología antisentido en Bourque, (1995), Plant Science 105, 125-149, y Flavell, (1994) PNAS USA 91, 3490-3496.

Una alternativa es usar una copia de todo o parte del gen diana insertado en un sentido que es la misma orientación que el gen diana para conseguir la reducción de la expresión del gen diana por cosupresión. Véase, por ejemplo, van der Krol *et al.*, (1990) The Plant Cell 2, 291-299; Napoli *et al.*, (1990) The Plant Cell 2, 279-289; Zhang *et al.*, (1992) The Plant Cell 4, 1575-1588 y el documento US-A-5.231.020. Pueden encontrarse perfeccionamientos adicionales de la tecnología de silenciamiento génico o cosupresión en el documento WO95/34668 (Biosource); Angell y Baulcombe (1997) The EMBO Journal 16, 12: 3675-3684; y Voinnet y Baulcombe (1997) Nature 389: pág. 553.

No es necesario usar la secuencia completa que se corresponde con la secuencia codificante (en orientación inversa para antisentido). Por ejemplo, pueden usarse fragmentos de una longitud suficiente. Es una cuestión de rutina para el experto en la materia explorar fragmentos de diversos tamaños y diversas partes de la secuencia codificante para optimizar el nivel de inhibición antisentido. Puede ser ventajoso incluir el codón ATG de la metionina de inicio y quizá uno o más nucleótidos cadena arriba del codón de inicio. Una posibilidad adicional es fijar como objetivo una secuencia conservada de un gen, por ejemplo, una secuencia que sea característica de uno o más genes, tal como una secuencia reguladora.

La secuencia empleada puede ser de aproximadamente 500 nucleótidos o menos, posiblemente de aproximadamente 400 nucleótidos, de aproximadamente 300 nucleótidos, de aproximadamente 200 nucleótidos o de aproximadamente 100 nucleótidos. Puede ser posible usar oligonucleótidos de longitudes mucho más cortas, 14-23 nucleótidos, aunque cuando es posible son preferibles fragmentos más largos y generalmente incluso más largos que aproximadamente 500 nucleótidos, tal como más largos que aproximadamente 600 nucleótidos, que aproximadamente 700 nucleótidos, que aproximadamente 800 nucleótidos, que aproximadamente 1000 nucleótidos o más.

Puede ser preferible que exista una identidad de secuencia completa en la secuencia usada para la regulación negativa de la expresión de una secuencia diana y la secuencia diana, aunque no es esencial una complementariedad o similitud de secuencia total. Pueden diferir uno o más nucleótidos en la secuencia usada del gen diana. Por lo tanto, una secuencia empleada en una regulación negativa de la expresión génica de acuerdo con la presente invención puede ser una secuencia de tipo salvaje (por ejemplo, un gen) seleccionada de las disponibles o un mutante, derivado, variante o alelo, a modo de inserción, adición, delección o sustitución de uno o más nucleótidos de dicha secuencia. No es necesario que la secuencia incluya una fase de lectura abierta o especificar un ARN que podría traducirse. Puede preferirse que exista una homología suficiente para que hibriden las moléculas de ARN antisentido y con sentido respectivas. Puede existir una regulación negativa de la expresión génica incluso cuando exista un emparejamiento erróneo de aproximadamente el 5%, 10%, 15% o 20% o más entre la secuencia usada y el gen diana.

Generalmente, el ácido nucleico transcrito puede representar un fragmento de un gen *ESD4*, tal como que incluye una secuencia de nucleótidos que se muestra en la Figura 1 o Figura 2, o la complementaria de la misma, o puede ser una mutante, derivado, variante o alelo del mismo en términos similares a los analizados anteriormente en relación con modificaciones que se realizan en una secuencia codificante de *ESD4* y la homología de la secuencia modificada. La homología puede ser suficiente para que el ARN antisentido transcrito hibride con ácido nucleico en el interior

de células de la planta, aunque independiente de dónde tiene lugar la hibridación el efecto deseado es la regulación negativa de la expresión génica.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un procedimiento para influir en una característica de floración de una planta, incluyendo el procedimiento causar o permitir la transcripción antisentido a partir de un ácido nucleico heterólogo de acuerdo con la invención en el interior de células de planta.

La presente proporciona además el uso de la secuencia de nucleótidos de la Figura 1 o Figura 2 o un fragmento, mutante, derivado, alelo, variante u homólogo de la misma para la regulación negativa de la expresión génica, particularmente la regulación negativa de la expresión de un gen *ESD4* u homólogo del mismo, preferiblemente para influir en una característica física de una planta, especialmente una característica de floración tal como el momento de la floración.

Cuando se insertan copias adicionales del gen diana en un sentido que es la misma orientación que el gen diana, se producen una variedad de fenotipos que incluyen individuos en los que se produce una sobreexpresión y algunos en los que se produce una subexpresión de proteína a partir del gen diana. Cuando el gen insertado es solamente parte del gen endógeno, el número de individuos que presentan subexpresión en la población transgénica aumenta. El mecanismo por que el se produce la regulación con sentido, particularmente la regulación negativa, no se entiende bien. Sin embargo, esta técnica también está bien descrita en bibliografía científica y de patentes y se usa de forma rutinaria para el control de genes. Véase, por ejemplo, van der Krol *et al.*, (1990) *The Plant Cell* 2, 291-229; Napoli *et al.*, (1990) *The Plant Cell* 2, 279-289; Zhang *et al.*, 1992 *The Plant Cell* 4, 1575-1588.

De nuevo, pueden usarse fragmentos, mutantes y etc., en términos similares a los descritos anteriormente para el uso en la regulación antisentido.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un procedimiento para influir en una característica de floración de una planta, incluyendo el procedimiento causar o permitir la expresión de un ácido nucleico de acuerdo con la invención en el interior de células de la planta. Esto puede usarse para suprimir la actividad de un producto con capacidad para influir en una característica de floración. Aquí la actividad del producto se suprime preferiblemente como resultado de la subexpresión en el interior de las células vegetales.

La reducción de la actividad génica también puede conseguirse mediante el uso de ribozimas, tales como ribozimas de replicación, por ejemplo, de la clase de cabeza de martillo (Haseloff y Gerlach, 1988, *Nature* 334: 585-591; Feyter *et al.* *Mol.*, 1996, *Gen. Genet.* 250: 329-338).

Otra forma de reducir la actividad génica en una planta emplea mutagénesis por transposones (revisada por Osborne *et al.*, (1995) *Current Opinion in Cell Biology* 7, 406-413). La inactivación de genes se ha demostrado mediante una estrategia de "marcaje dirigido" usando elementos móviles endógenos o transposones heterólogos clonados que conservan su movilidad en genomas extraños. Los alelos que llevan cualquier inserción de secuencia conocida pueden identificarse mediante el uso de cebadores de PCR con especificidades de unión tanto en la secuencia de inserción como en la homóloga. Pueden usarse "sistemas de dos elementos" para estabilizar el transposón en el interior de alelos inactivados. En la estrategia de dos elementos, se construye un ADN-T que lleva un transposón no autónomo que contiene un gen marcador de selección o de exploración insertado en un marcador de escisión. Las plantas que llevan estos ADN-T se cruzan con plantas que llevan un segundo ADN-T que expresa una función transposasa. Los híbridos se seleccionan doblemente por escisión y por el marcador dentro del transposón dando plantas F<sub>2</sub> con elementos transpuestos.

#### *Floración temprana causada por una expresión reducida del gen ESD4*

Como se describe en el Ejemplo 1, la mutación *esd4* causa una floración temprana en condiciones de días largos y cortos y está causada por una delección que disminuye la expresión del gen. El Ejemplo 2 demuestra que la introducción del gen *ESD4* en el mutante es suficiente para corregir el defecto causado por la mutación. Esto proporciona indicios de que la función del gen *ESD4* es reprimir la floración y que la reducción en su función causa que la planta florezca temprano.

*Causar una floración tardía por aumento de la actividad de ESD4.* La observación de que una expresión reducida del gen *ESD4* acelera la floración proporciona indicios de que la función normal de *ESD4* es retrasar la floración. El aumento de la expresión del gen *ESD4* está indicado para el uso para causar una floración tardía. Esto se confirma por la observación de que en plantas de tipo salvaje el ARNm de *ESD4* es raro; sólo se detectó por RT-PCR y estaba ausente de genotecas de ADNc secuenciados aleatoriamente. El aumento del nivel del ARNm de *ESD4* por expresión del gen a partir de promotores fuertes de plantas tales como el promotor CaMV 35S puede usarse para causar una floración tardía.

A continuación se ilustrarán aspectos y realizaciones de la presente invención, a modo de ejemplo, en relación con las Figuras adjuntas. Serán evidentes para los expertos en la materia aspectos y realizaciones adicionales. Todos los documentos mencionados en este texto se incorporan en este documento como referencia.

En las Figuras:

La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos de acuerdo con una realización de la invención, siendo la secuencia de la ORF de *ESD4*, obtenida de *Arabidopsis thaliana*, mostrándose la secuencia de aminoácidos predicha a continuación de dicha secuencia de nucleótidos. Ésta es la secuencia de ADNc obtenida del ecotipo Columbia.

La Figura 2 muestra la secuencia genómica del gen *ESD4*. Esta incluye la secuencia codificante, los intrones, la región promotora probable que se prolonga cadena arriba del inicio de la traducción y la secuencia que se prolonga aproximadamente 4,0 kb después de la terminación de la traducción. Los codones de inicio y terminación de la traducción están doblemente subrayados. La secuencia que se muestra en cursiva y en minúsculas está deletada en el mutante de *esd4*. La secuencia subrayada estaba ausente en la secuencia del ESSA original. La secuencia subrayada es del ecotipo Landsberg erecta y se usó para reparar la secuencia del ESSA mientras que el resto de las secuencias son del ecotipo Columbia.

La Figura 3 muestra una comparación de la secuencia proteica de *ESD4* de la Figura 1 con productos de traducción predichos a partir de EST de arroz y mamíferos. Los restos idénticos se muestran en recuadros negros, los relacionados en cuadros sombreados. La secuencia proteica de *ESD4* que se muestra comienza en el resto 231 y se prolonga hasta al final de la proteína.

La Figura 4a muestra la secuencia de nucleótidos del EST del arroz para el que se muestra la secuencia de aminoácidos codificada predicha en la Figura 3.

La Figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos del EST humano para el que se muestra la secuencia de aminoácidos codificada predicha en la Figura 3.

## Ejemplo 1

### Clonación y análisis de un gen *esd4*

#### Identificación del mutante de *esd4* en una población de plantas mutadas por radiación gamma

Semillas secas de *Arabidopsis thaliana* se expusieron a 90 krad de rayos gamma. Se germinaron en el suelo, germinaron y las plantas M1 se cultivaron hasta la madurez. Estas plantas se autopolinizaron y se recolectaron las semillas M2. Éstas se germinaron en el suelo y las plantas se cultivaron en días cortos de 10 horas de luz. Las plantas de tipo salvaje florecen tarde en estas condiciones y, por lo tanto, pueden reconocerse fácilmente los mutantes de floración temprana. El mutante de *esd4* era la planta de floración más temprana recuperada en esta población. El mutante se autopolinizó y su progenie se cultivó para confirmar el fenotipo mutante. Después, el mutante se retrocruzó dos veces con el tipo salvaje para reducir la posibilidad de que también estuvieran presentes mutaciones distintas de *esd4*.

#### Descripción del fenotipo mutante de *esd4*

El mutante de *esd4* florece significativamente más temprano que el tipo salvaje en días largos y cortos, aunque la diferencia es más espectacular en días cortos (Tabla 1). El mutante de *esd4* conserva la sensibilidad a la duración del día, floreciendo más temprano en días largos que cortos.

Además de su efecto sobre el tiempo de floración, el mutante de *esd4* muestra algunos efectos pleiotrópicos. Los mutantes son más cortos que los de tipo salvaje y producen menos flores. Además, el mutante forma flores o estructuras florales en posiciones ectópicas sobre el vástago. Estas estructuras florales ectópicas aparecen de dos formas. En primer lugar, el meristemo del vástago se convierte tarde en el desarrollo en una estructura carpeloide, de modo que el vástago está determinado y termina con esta estructura. En segundo lugar, se forman flores extra en los laterales del vástago. Con frecuencia se forman una o varias flores muy próximas a la posición de la última hoja caulinar, donde nunca hay flores en plantas de tipo salvaje, o en el primer nudo, en el que se forman flores desarrollándose varias flores en lugar de solamente una. Estos fenotipos indican que el *ESD4* tiene un papel para asegurar que las flores se formen en sus posiciones correctas.

La mutación de *esd4* también tiene un efecto sobre la forma de la vaina. Las silicuas de plantas mutantes tienen una forma sensiblemente en forma de basto, siendo estrechas en la base y anchas en la punta, mientras que en plantas de tipo salvaje son similares en anchura a lo largo de toda su longitud.

#### Localización de *ESD4* en el genoma de *Arabidopsis*

La localización del gen *ESD4* se determinó por ensayo para determinar la relación genética entre la mutación y marcadores de ADN que son polimórficos entre los ecotipos de *Arabidopsis* Landsberg erecta y Columbia. El mutante de *esd4* se cruzó con el ecotipo Columbia y las plantas F1 se cultivaron hasta la madurez. Las plantas F1 se

autopolinizaron y se cultivó la progenie F2 en el invernadero en días cortos. Las plantas F2 que mostraban el fenotipo de *esd4* homocigoto se identificaron y se extrajo el ADN de 30 de estos individuos. Se ensayaron marcadores de RFLP y CAPS publicados de posición conocida para determinar su relación genética con *esd4*. Se detectó una relación laxa con los marcadores m448 y nga8, que se localizan en el cromosoma 4, y se descubrió una relación más estrecha con AG, que se sitúa más abajo en el cromosoma 4. El número de plantas mutantes de *esd4* ensayadas se aumentó después hasta 250 y se ensayaron más marcadores localizados entre nga8 y AG. Esto demostraba que *esd4* se localiza en el cromosoma 4 entre los marcadores m326 y SC5, en un intervalo de aproximadamente 3 cM.

#### Mapeo fino de *ESD4*

Con el objetivo de identificar el gen *ESD4* se decidió aumentar la resolución del mapeo e identificar clones de cósmidos que contenían *ESD4*. Se introdujo ADN cosmidico en el mutante de *esd4* para tratar de demostrar la localización exacta del gen *ESD4*. Se recuperaron un total de 891 plantas que eran homocigotas para *esd4* en la F2 de un cruce entre Columbia y el mutante de *esd4* original. Se extrajo el ADN de estas plantas y todas se puntuaron con los marcadores SC5 y m326 que se ha demostrado que flanquean el gen. Se encontraron un total de aproximadamente 43 cromosomas recombinantes con puntos de recombinación que mapeaban entre m326 y *ESD4*, y se encontraron 10 con puntos de recombinación que mapeaban entre SC5 y *ESD4*. Después, las plantas recombinantes se ensayaron con marcadores localizados entre SC5 y m326. Se identificaron marcadores en esta región por exploración del mapa físico de la región. Se empleó un cóntigo cosmidico no publicado que incluía SC5 y se prolongaba hasta aproximadamente 250 kb de m326. Se seleccionaron a partir de este cóntigo cósmidos en posiciones definidas y se usaron éstos como marcadores de RFLP. En última instancia, este cóntigo, así como información de secuencia no publicada obtenida en confianza a partir de los cósmidos por el programa financiado por la CE European Sequencers Sequencing Arabidopsis (ESSA), un programa puramente de secuenciación, permitió localizar *esd4* entre polimorfismos detectados con los cósmidos G5945 y G14587. Estos cósmidos solapan, es decir, contienen algo de ADN en común. La región entre los polimorfismos era solamente de aproximadamente 35 kb de longitud y se definió por una planta que llevaba un entrecruzamiento de recombinación entre *esd4* y el marcador de CAPS G14 (cebadores G14F [GACTACCTGAGAAGTTGGAATG] y G14R [GCCACTGGTCCAAGGATTCAG]) en un extremo de G14587 y 3 plantas que llevaban entrecruzamientos entre *esd4* y el marcador de CAPS G32 (cebadores G32F [GCAAGATGCACTAAGTATGAG] y G32R [GAGTGG TACTTAGTGATGC]), que está en el otro extremo de G14587.

#### Identificación del gen *ESD4* por complementación y secuenciación del alelo mutante

Los experimentos genéticos descritos en la sección anterior localizaron el *ESD4* en una región de aproximadamente 35 kb de longitud. Con el objetivo de localizar el gen con mayor precisión se decidió introducir fragmentos solapantes de ADN de dentro de esta región en plantas mutantes de *esd4* para determinar cuáles eran capaces de corregir el fenotipo mutante de *esd4*.

Los experimentos de complementación no pudieron realizarse con los cósmidos G5945 y G14587 porque éstos no se habían generado en un vector cosmidico que pudiera usarse para la transformación de plantas. Se usó el vector cosmidico 04541, que también es un vector binario que podría usarse para la transformación de plantas. Con el objetivo de identificar cósmidos basados en 04541 que contenían el ADN pertinente se usó una genoteca de cósmidos basada en 04541 generada a partir del YAC YUP5B11. Este YAC abarca la región completa que se ha demostrado que contiene el gen *ESD4*. La genoteca de cósmidos se exploró con sondas generadas a partir de los cósmidos G5945 y G14587. Después los clones que hibridaban positivamente se mapearon con las enzimas de restricción HindIII y SalI y a partir de estas digestiones pudieron determinarse las posiciones de unos clones con respecto a otros.

Después, se usó una serie de cuatro clones solapantes (G8, P9, P7 y P14) para estudios de complementación por introducción de los mismos en plantas mutantes de *esd4*. Los clones G8 y P7 complementaban la mutación (Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4) indicando el que el gen se localiza en las aproximadamente 10 kb de ADN compartidas por estos cósmidos. La complementación era casi completa, pero no completa, especialmente en días cortos. Esto podría ser debido a los efectos de la posición del transgén o debido a que el transgén es de Columbia y la mutación en Landsberg erecta, o debido a que existe otra mutación en el fondo de *esd4* además de *esd4* que también causa una floración temprana. La secuencia de la región compartida por los dos cósmidos se obtuvo en confianza del programa financiado por la CE European Sequencers Sequencing Arabidopsis (ESSA), pero no se ha hecho disponible al público.

La comparación de la secuencia del ESSA con el mapa de restricción de HindIII del cósmido reveló una anomalía. Se descubrió que un fragmento de restricción de HindIII en el cósmido tenía una longitud de 4,4 kb, pero a partir de la secuencia se predijo que era solamente de 4,0 kb. Para ensayar esto adicionalmente se amplificó por PCR la región anómala (usando los cebadores SMR [CGTAGTCCATCTCCTGACAG] y SMF [GAAGTTGTCACTGCTGCGTCAG]) y se secuenció el fragmento amplificado a partir de ADN de Landsberg erecta (Figura 2).

Esto demostró que la secuencia del ESSA no era correcta en esta región crítica y que había 424 pb de ADN delecionadas de la secuencia. La secuencia corregida se muestra en la Figura 2.

El análisis informático no detectó homología con ningún gen de plantas publicado anteriormente en la región de solapamiento de los dos cósmidos de complementación. Sin embargo, el uso de los programas GENEFINDER y

GRAIL sí predijo que era probable que esa región codificara un gen basándose en la presencia de fases de lectura abiertas dentro de la secuencia genómica y de uniones probables de corte y empalme/intrones. Parecía probable que éste fuera el gen ESD4.

- 5 Se obtuvieron pruebas adicionales para esto por análisis de ADN aislado del mutante de *esd4*. El uso de la reacción cadena de la polimerasa y los cebadores A (GTCTCATAGGCGTCTTTG) y P2 (CATACCAGAGCATTTCAGAATC) demostró que el mutante de *esd4* había sufrido una delección de 762 pb en la región del gen ESD4 predicho. El análisis informático de la región ESD4 predijo que esta delección había eliminado 10 codones de la secuencia codificante de proteína y parte de la región promotora. El ADN delecionado está marcado en la Figura 2. La presencia de esta  
10 delección en el mutante de *esd4* sugiere fuertemente que esta región codifica el gen ESD4.

### *Estructura génica*

- 15 Para confirmar la estructura del gen ESD4 que se predijo a partir del análisis informático, se exploraron genotecas de ADNc en busca de un ADNc. La genoteca de partes aéreas y una genoteca de plántulas se exploraron por PCR usando cebadores que hibridaban con el vector. Se amplificaron fragmentos pequeños a partir de estas genotecas y se secuenciaron. Después la genotecas volvieron explorarse usando cebadores que hibridaban con la secuencia de ESD4 y que se habían diseñado a partir de la secuencia genómica o de la secuencia de ADNc que se había obtenido  
20 previamente. Los fragmentos se secuenciaron por secuenciación cíclica.

Esta combinación de estrategias producía una secuencia de ADNc completa que se muestra en la Figura 1 y es la secuencia de la fase de lectura abierta de ESD4 producida a partir de Columbia.

- 25 Se sintetizaron cebadores que hibridaban próximos a la secuencia de terminación de la traducción predicha (C3 new [CACAGGATCCTTCAATCAGCTCGTAG]) y a la secuencia de inicio de la traducción predicha (C5 [GCGCCCCG GATTGATTACTCAATCTCT]) para usar para RT-PCR y confirmar de este modo que el transcrito estaba presente en plantas de tipo salvaje. Después, éstos se usaron en una PCR para amplificar ADN a partir de ADNc de primera cadena. El ADNc se había sintetizado previamente a partir de ARNm extraído de plántulas de *Arabidopsis* en la fase  
30 de 2 hojas. Se obtuvo un fragmento amplificado del tamaño predicho (aproximadamente 1,5 kb) y se hibridó con el ADNc de ESD4.

- Los intentos para clonar el ADNc completo en el plásmido Bluescript de *E. coli* fracasaron inicialmente. Sin embargo, se subclonó en dos fragmentos. Los cebadores (1SO [CTCAATCTCTAGAGTTTAGTGG] y 2SO [GCA TCATACTAGTATCCTCAAC]) se usaron para amplificar el extremo 5' del gen y se clonó en los sitios XbaI y SpeI  
35 de Bluescript. El extremo 3' se clonó usando cebadores (3SO [GTTGAGGATACTAGTATGATGC] y c3new) y éste se clonó después en los sitios de SpeI y BamHI de Bluescript. Después, los dos fragmentos se unieron entre sí por ligación de los fragmentos en el sitio SpeI común por inserción del fragmento 3' en los sitios SpeI y BamHI del clon  
40 5'.

### *Comparación de ESD4 con otras secuencias en las bases de datos*

- El ADNc de ESD4 y la secuencia proteica predicha se usaron para buscar homología con genes en las bases de  
45 datos públicas. Usando una búsqueda BLAST de GenBank se descubrió homología en la región carboxi-terminal de ESD4 con genes de arroz, *C. elegans*, seres humanos y ratón (Figura 3). Los restos compartidos por estas proteínas puede suponerse que definen un dominio funcional de la proteína.

### *Métodos*

#### *Condiciones de cultivo y medición del tiempo de floración*

- El tiempo floración se midió en condiciones definidas por cultivo de plantas en Salas de Entorno Controlado de  
55 Sanyo Gallenkamp a 20°C.

- Los días cortos comprendían un fotoperiodo de 10 horas de luz con lámparas Power Star de haluro de metal de 400 Watt complementado con lámparas de haluro de tungsteno de 100 Watt. Esto proporciona un nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 113,7 moles fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una relación de luz roja:rojo lejano de 2,41. Se usó  
60 una vitrina y lámparas similares para el día largo. El fotoperiodo era de 10 horas en las mismas condiciones usadas para días cortos y se prolongaba 8 horas adicionales usando solamente las lámparas de haluro de tungsteno. En esta vitrina la combinación de lámparas usadas durante el periodo de 10 horas proporcionaba una PAR de 92,9 moles fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una relación de rojo:rojo lejano de 1,49. La prolongación de 8 horas producía una PAR de 14,27 moles  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una relación de rojo:rojo lejano de 0,66.

- 65 Los tiempos de floración de grandes poblaciones de plantas se midieron en el invernadero. En el verano las plantas se cultivaron simplemente a la luz del sol. En invierno se suministró luz complementaria de modo que la duración mínima del día era de 16 horas.

## ES 2 321 349 T3

Para medir el tiempo de floración, las semillas se situaron a 4°C en papel de filtro húmedo durante 4 días para romper la latencia y después se cultivaron en el suelo. Las plántulas en germinación se cubrieron habitualmente con película adherente o tapas para propagación durante las primeras 1-2 semanas para evitar la deshidratación. El tiempo de floración se midió por recuento del número de hojas, excluyendo los cotiledones, en la roseta en el momento en que era visible la yema de la flor. Los números de hojas se muestran con la desviación típica a límites de confianza del 95%. También se registró el número de días desde la siembra hasta la aparición de la yema de la flor, pero no se muestra.

### 10 *Material vegetal*

El genotipo de tipo salvaje convencional usado era *Arabidopsis thaliana* Landsberg erecta.

### 15 *Aislamiento de ADN genómico de planta*

Se aisló ADN genómico de planta a partir de plantas cultivadas en invernadero esencialmente como se describe por Tai y Tanksley; *Plant Mol. Biol. Rep.* 8: 297-303 (1991), excepto porque el tejido se molió en nitrógeno líquido y se omitió la etapa de ARNasa. Se preparó ADN a gran escala (2,5-5 g de hojas) y de minipreparaciones (3-4 hojas) usando este procedimiento.

### *Condiciones de transferencia de gel e hibridación*

25 La transferencia de gel a Hybond-N, hibridación y condiciones lavado fueron de acuerdo con las instrucciones del fabricante excepto porque el ADN se fijó a los filtros por tratamiento con UV Stratalinker (1200 uJ x 100; Stratagene) y/o se horneó a 80°C durante 2 h. Se preparó ADN radiomarcado por marcaje con hexámeros aleatorio.

### 30 *Marcadores de RFLP y CAPS*

Toda la información con respecto a los marcadores de RFLP y marcadores de CAPS que se describen en el texto pero que se recibieron de otros laboratorios se describe en Arabidopsis thaliana Database o Arabidopsis Management Information Service en Internet ([<http://genome-www.stanford.edu/Arabidopsis/>] o [<http://aims.cps.msu.edu/aims/menu/catalog.html>]).

Los marcadores de CAPS cruciales G14 y G32 que flanquean más estrechamente ESD4 y se usaron para situar el gen con mayor precisión se describen en el texto y se proporcionan las secuencias de los cebadores usados. En cada caso se detectó un polimorfismo entre Landsberg erecta y Columbia: con el fragmento G14 con ClaI y con el fragmento G32 con EcoRV.

### *Extracciones de ARN*

45 El ARN se extrajo usando un procedimiento que es una versión modificada del descrito por Stiekema *et al.*, (1988) *Plant Molecular Biology* 11, 255-269. Se molieron aproximadamente 5 g de tejido congelado en nitrógeno líquido en un molinillo de café y se extrajo con una mezcla de 15 ml de fenol y 15 ml de tampón de extracción (Tris 50 mM pH 8, EDTA 1 mM, SDS al 1%). La mezcla se agitó, se centrifugó y se recuperaron 25 ml de la fase acuosa. Después esto se agitó enérgicamente con una mezcla de 0,7 ml de cloruro de sodio 4 M, 10 ml de fenol y 10 ml de cloroformo. 50 La fase acuosa se recuperó después de la centrifugación y se extrajo con 25 ml de cloroformo. Después se precipitó el ARN a partir de 25 ml de la fase acuosa mediante la adición de 2 ml de LiCl 10 M y el precipitado se recuperó por centrifugación. El sedimento se disolvió en 2 ml de agua DEPC y el ARN se precipitó por adición de 0,2 ml de cloruro de sodio 4 M y 4 ml de etanol. Después de la centrifugación el sedimento se disolvió en 0,5 ml de agua DEPC y se determinó la concentración de ARN.

### *Extracciones de ADN*

Se obtuvo ADN de *Arabidopsis* mediante un procedimiento de extracción de CTAB descrito por Dean, *et al.* 60 (1992), *Plant Journal*, 2: 69-82.

### *Aislamiento de ADNc por RT-PCR*

65 Se aisló el ARN total a partir de plántulas completas en la fase de 2-3 hojas cultivadas en días largos en el invernadero. Para la síntesis de ADNc de primera cadena, se calentaron 10 µg de ARN en un volumen de 10 µl hasta 65°C durante 3 minutos y después se enfrió rápidamente en hielo. Se prepararon 10 µl de mezcla de reacción que contenía 1 µl de RNasin, 1 µl de cebador adaptador dT<sub>17</sub> convencional (1 µg/µl; Forman *et al.*, 1988), 4 µl de tampón

de transcriptasa inversa 5x (Tris HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2  $\mu$ l de DTT (100 mM) 1  $\mu$ l de dNTP (20 mM), 1  $\mu$ l de transcriptasa inversa (200 unidades, M-MLV Gibco). Después, esta mezcla de reacción se añadió al ARN generando un volumen final de 20  $\mu$ l. La mezcla se incubó a 42°C durante 2 horas y después se diluyó hasta 200  $\mu$ l con agua. El ADNc de primera cadena se usó después para PCR usando los cebadores C3new y C5, 1SO y 2SO o 3SO y 4SO que se han descrito anteriormente y las reacciones se llevaron a cabo a 94°C durante 1 minuto, 34 ciclos de 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos y después finalmente 72°C durante 10 minutos.

Se separaron 20  $\mu$ l de la reacción mediante un gel de agarosa y se demostró la presencia de un fragmento del tamaño esperado después de la tinción con bromuro etidio. El ADN se transfirió a un filtro y se demostró que el fragmento de interés hibridaba con un fragmento de ADN corto procedente del gen *ESD4*.

#### Transformación de *Arabidopsis*

Los cósmidos que contenían ADN de la proximidad de LHY se movilizaron en *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 y el ADN-T se introdujo en plantas de *Arabidopsis* como se describe por Valvekens, *et al*, (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. EE UU 87: 5536-5540. Se aislaron raíces de plantas cultivadas *in vitro* y se cultivaron en medio de inducción de callos (Valvekens *et al*, 1988) durante 2 días. Después, las raíces se cortaron en segmentos cortos y se cocultivaron con *Agrobacterium tumefaciens* que llevaba el plásmido de interés. Los explantes de raíces se secaron sobre papel de transferencia y se colocaron sobre medio de inducción de callos durante 2-3 días. El *Agrobacterium* se retiró por lavado, las raíces se secaron y se colocaron en medio de inducción de vástagos (Valvekens, *et al*, 1988) que contenía vancomicina para destruir el *Agrobacterium* y kanamicina para seleccionar las células vegetales transformadas. Después de aproximadamente 6 semanas los callos verdes en las raíces comenzaron a producir vástagos. Éstos se extirparon y se colocaron en placas de petri o recipientes magenta que contenían medio de germinación (Valvekens, *et al*, 1988). Estas plantas producían semillas en los recipientes magenta. Después, éstas se sembraron en medio de germinación que contenía kanamicina para identificar las plántulas transformadas que contenían el transgén (Valvekens, *et al*, 1988) y para evaluar el número de loci en los que se insertaba un transgén.

Las plantas resistentes se cultivaron después hasta la madurez y se autopolinizaron. Las plantas homocigotas para el ADN-T se identificaron por siembra de las semillas de cada planta en medio que contenía kanamicina y selección de aquellas en las que toda la progenie era resistente a kanamicina. Después, se midieron los tiempos de floración de plantas de estas familias por siembra de las semillas apropiadas directamente en el suelo.

TABLA 1

Tiempo de floración de mutante de *esd4* y plantas de tipo salvaje en días largos y cortos. Las heterocigotas se comportan como las de tipo salvaje, indicando que la mutación de *esd4* es recesiva

| Genotipo                | Días Largos     |                  | Días Cortos     |                  |
|-------------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
|                         | Hojas de roseta | Hojas caulinares | Hojas de roseta | Hojas caulinares |
| Landsberg <i>erecta</i> | 5,4 $\pm$ 0,5   | 3,1 $\pm$ 0,2    | 29,7 $\pm$ 2,2  | 6,6 $\pm$ 1,2    |
| <i>eds4</i>             | 2,0 $\pm$ 0,0   | 2,0 $\pm$ 0,0    | 3,2 $\pm$ 0,5   | 2,0 $\pm$ 0,0    |
| <i>eds4/+</i>           | 5,0 $\pm$ 0,4   | 3,1 $\pm$ 0,7    | 28,9 $\pm$ 2,0  | 7,5 $\pm$ 1,7    |

En los experimentos para los que se aportan los resultados en las Tablas 2 y 3, las plantas puntuadas eran la progenie de los transformantes primarios. Se sembró un lote de semillas en medio de kanamicina y las plántulas se puntuaron por resistencia a kanamicina, mostrándose la proporción de plántulas sensibles con respecto a resistentes. Se sembró un segundo lote de semillas en el suelo y se puntuó por el tiempo de floración mediante el recuento del número de hojas. Debido a que el transgén estaba segregando, algunas plantas se parecían a *esd4* puesto que no habían heredado el transgén. La proporción de plantas de tipo natural con respecto al número total de plantas en la población se muestra en la columna final.

# ES 2 321 349 T3

TABLA 2

*Tiempos de floración de plantas mutantes de eds4 transgénicas que llevan una copia transgénica del gen ESD4 (YUP5B11.IB3C12) en el cósmido G8 cultivadas en días largos*

| Transformante           | Resistentes a kanamicina | Sensibles a kanamicina | Hojas de roseta | Hojas caulinares | N     |
|-------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------|------------------|-------|
| <i>eds4</i> control     | 0                        | 14                     | 2,1 ± 0,4       | 2,7 ± 0,5        | 27/27 |
| Landsberg <i>erecta</i> | 0                        | 23                     | 6,7 ± 0,8       | 3,3 ± 0,5        | 32/32 |
| G8:1-7                  | 30                       | 7                      | 6,2 ± 0,7       | 2,9 ± 0,5        | 33/36 |
| G8:1-9                  | 38                       | 16                     | 5,9 ± 0,6       | 2,8 ± 0,5        | 29/33 |
| G8:1-10                 | 33                       | 15                     | ND              | ND               | ND    |
| G8:1-12                 | 19                       | 5                      | 5,5 ± 0,7       | 2,7 ± 0,7        | 21/27 |
| G8:1-16                 | ND                       | ND                     | 4,5 ± 0,7       | 2,0 ± 0,0        | 2/28  |
| G8:1-18                 | 3                        | 32                     | 4,0 ± 0,0       | 2,0 ± 0,0        | 1/39  |
| G8:1-20                 | 22                       | 5                      | 4,7 ± 0,6       | 2,3 ± 0,7        | 26/28 |
| G8:1-21                 | 47                       | 16                     | 6,0 ± 0,5       | 2,7 ± 0,5        | 31/39 |
| G8:1-23                 | 41                       | 17                     | 5,5 ± 0,6       | 2,6 ± 0,5        | 33/38 |
| G8:1-24                 | 27                       | 10                     | ND              | ND               | ND    |
| G8:1-25                 | 35                       | 10                     | 6,3 ± 0,8       | 2,3 ± 0,7        | 26/33 |
| G8:1-34                 | 43                       | 8                      | 5,6 ± 0,5       | 2,5 ± 0,5        | 14/22 |
| G8:2-21                 | 33                       | 10                     | 5,7 ± 0,7       | 2,8 ± 0,6        | 28/34 |
| G8:2-22                 | 50                       | 11                     | 5,6 ± 0,6       | 2,7 ± 0,5        | 31/39 |
| G8:2-23                 | 23                       | 9                      | 5,4 ± 0,5       | 2,5 ± 0,7        | 17/23 |

TABLA 3

*Tiempos de floración de plantas mutantes de eds4 transgénicas que llevan una copia transgénica del gen ESD4 (YUP5B11.IB1E13) en el cósmido P7 cultivadas en días largos*

| Transformante           | Resistentes a kanamicina | Sensibles a kanamicina | Hojas de roseta | Hojas caulinares | N     |
|-------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------|------------------|-------|
| <i>eds4</i> control     | -                        | -                      | 2,5 ± 0,6       | 2,4 ± 0,6        | 29/29 |
| Landsberg <i>erecta</i> | -                        | -                      | 6,3 ± 0,6       | 3,1 ± 0,6        | 28/28 |
| P7:16-1                 | 32                       | 6                      | 4,7 ± 0,5       | 2,3 ± 0,5        | 29/38 |
| P7:16-2                 | 88                       | 4                      | 5,8 ± 0,9       | 3,2 ± 0,5        | 38/39 |
| P7:16-3                 | 42                       | 6                      | 5,2 ± 0,5       | 3,1 ± 0,3        | 38/40 |
| P7:16-4                 | 65                       | 2                      | 5,0 ± 0,3       | 2,7 ± 0,5        | 30/40 |
| P7:16-7                 | 86                       | 10                     | 5,5 ± 0,6       | 2,7 ± 0,5        | 38/39 |
| P7:16-8                 | 43                       | 14                     | 5,7 ± 0,9       | 2,0 ± 0,6        | 34/40 |
| P7:16-16                | 58                       | 13                     | 5,3 ± 0,6       | 2,8 ± 0,5        | 31/37 |
| P7:16-17                | 70                       | 15                     | 5,2 ± 0,6       | 2,9 ± 0,4        | 35/38 |
| P7:16-18                | 24                       | 11                     | 5,5 ± 0,6       | 3,2 ± 0,5        | 39/40 |
| P7:18-6                 | 60                       | 11                     | 5,2 ± 0,5       | 3,0 ± 0,4        | 33/38 |
| P7:18-12                | 48                       | 12                     | 5,0 ± 0,3       | 2,9 ± 0,4        | 34/30 |
| P7:18-13                | 43                       | 2                      | 5,1 ± 0,5       | 2,9 ± 0,4        | 38/40 |
| P7:18-15                | 55                       | 9                      | ND              | ND               | 38/40 |

TABLA 4

*Tiempos de floración de plantas mutantes de eds4 transgénicas homocigotas para una copia del gen ESD4 (YUP5B11.IB3C12) en el cósmido G8 y cultivadas en días largos y cortos. Las plantas homocigotas para el transgén se identificaron entre la progenie de las transformantes iniciales. La progenie de estas plantas homocigotas se usó para el experimento*

| Transformante           | Días Largos     |                  | Días Cortos     |                  |
|-------------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
|                         | Hojas de roseta | Hojas caulinares | Hojas de roseta | Hojas caulinares |
| Landsberg <i>erecta</i> | 5,4 ± 0,5       | 3,1 ± 0,2        | 29,7 ± 2,2      | 6,6 ± 1,2        |
| <i>eds4</i>             | 2,0 ± 0,0       | 2,0 ± 0,0        | 3,2 ± 0,5       | 2,0 ± 0,0        |
| G8:1-7                  | 4,1 ± 0,3       | 2,6 ± 0,5        | 16,9 ± 1,2      | 4,3 ± 1,3        |
| G8:1-9                  | 4,6 ± 0,5       | 2,7 ± 0,5        | 19,9 ± 1,9      | 6,9 ± 1,4        |
| G8:12                   | 4,2 ± 0,4       | 2,4 ± 0,6        | 15,3 ± 1,2      | 4,6 ± 1,0        |
| G8:1-20                 | 4,4 ± 0,5       | 2,8 ± 0,4        | 17,4 ± 1,8      | 4,9 ± 0,8        |
| G8:1-21                 | 4,2 ± 0,4       | 2,8 ± 0,6        | 17,1 ± 2,2      | 5,6 ± 0,7        |
| G8:1-25                 | 4,2 ± 0,4       | 3,1 ± 0,4        | 19,9 ± 1,5      | 6,7 ± 0,7        |
| G8:1-34                 | 4,1 ± 0,3       | 2,8 ± 0,4        | 17,0 ± 1,6      | 5,2 ± 0,9        |
| G8:2-23                 | 4,0 ± 0,0       | 2,3 ± 0,6        | 14,7 ± 1,9      | 4,9 ± 0,9        |

#### Referencias citadas en la descripción

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.*

#### Documentos de patentes citados en la descripción

- EP 270355 A [0022]
- DE 4005152 [0022]
- EP 0116718 A [0022]
- WO 9012096 A [0022]
- US 5100792 A [0022]
- US 4684611 A [0022]
- EP 444882 A [0022]
- WO 9214828 A [0023]
- EP 434616 A [0022]
- EP 486234 A [0025]
- WO 9209696 A [0022]
- EP 486233 A [0025]
- WO 9400583 A [0022]
- US 4683195 A [0049]
- EP 331083 A [0022]
- WO 9614414 A [0057] [0059]
- EP 175966 A [0022]
- US 5231020 A [0067]
- EP 290395 A [0022]
- WO 9534668 A [0067]
- WO 8706614 A, Gelvin Debeyser [0022]

#### Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- ALTSCHUL *et al.* *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-10 [0013]
- SMITH; WATERMAN. *Adv. Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 482-489 [0013]

## ES 2 321 349 T3

- **SAMBROOK** *et al.* Molecular Cloning: a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0018]
- Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons*, 1992 [0018]
- 5 • **BEVAN**. *Nucl. Acids Res.*, 1984, vol. 12, 8711-8721 [00181]
- Plant transformation and expression vectors. **GUERINEAU; MULUNEAUX**. Plant Molecular Biology Labtax. *BIOS Scientific Publishers*, 1993, 121-148 [0018]
- 10 • **NAR**, 1984, vol. 12 (22), 8711-87215 [0022]
- **GREEN** *et al.* Plant Tissue and Cell Culture. *Academic Press*, 1987 [0022]
- 15 • **FREEMAN** *et al.* *Plant Cell Physiol*, 1984, vol. 29, 1353 [0022]
- **KINDLE**. *PNAS U.S.A.*, 1990, vol. 87, 1228 [0022]
- **OARD**. *Biotech. Adv.*, 1991, vol. 9, 1-11 [0022]
- 20 • **TORIYAMA** *et al.* *Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 1072-1074 [0023]
- **ZHANG** *et al.* *Plant Cell Rep.*, 1988, vol. 7, 379-384 [0023]
- 25 • **ZHANG** *et al.* *Theor Appl Genet*, 1988, vol. 76, 835-840 [0023]
- **SHIMAMOTO** *et al.* *Nature*, 1989, vol. 338, 274-276 [0023]
- **DATTA** *et al.* *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 736-740 [0023]
- 30 • **CHRISTOU** *et al.* *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 957-962 [0023]
- **PENG** *et al.* *International Rice Research Institute*, 1991, 563-574 [0023]
- 35 • **CAO** *et al.* *Plant Cell Rep.*, 1992, vol. 11, 585-591 [0023]
- **LI** *et al.* *Plant Cell Rep.*, 1993, vol. 12, 250-255 [0023]
- **RATHORE** *et al.* *Plant Molecular Biology*, 1993, vol. 21, 871-884 [0023]
- 40 • **FROMM** *et al.* *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 833-839 [0023]
- **GORDON-KAMM** *et al.* *Plant Cell*, 1990, vol. 2, 603-618[0023]
- 45 • **D'HALLUIN** *et al.* *Plant Cell*, 1992, vol.4, 1495-1505 [0023]
- **WALTERS** *et al.* *Plant Molecular Biology*, 1992, vol. 18, 189-200 [0023]
- **KOZIEL** *et al.* *Biotechnology*, 1993, vol. 11, 194-200 [0023]
- 50 • **VASIL**, I. K. *Plant Molecular Biology*, 1994, vol. 25, 925-937 [0023]
- **WEEKS** *et al.* *Plant Physiology*, 1993, vol. 102, 1077-1084 [0023]
- 55 • **SOMERS** *et al.* *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 1589-1594 [0023]
- **HIEI** *et al.* *The Plant Journal*, 1994, vol. 6, 271-282 [0023]
- **SHIMAMOTO**, K. *Current Opinion in Biotechnology*, 1994, vol. 5, 158-182 [0024]
- 60 • **VASIL** *et al.* *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 667-674 [0024]
- **VAIN** *et al.* *Biotechnology Advances*, 1995, vol. 13 (4), 653-671 [0024]
- 65 • **VASIL** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 702 [0024]
- Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. **VASIL** *et al.* Laboratory Procedures and Their Applications. *Academic Press*, 1984, vol. I, II, I [0026]

## ES 2 321 349 T3

- **WEISSBACH; WEISSBACH.** Methods for Plant Molecular Biology. *Academic Press*, 1989 [0026]
- **CADDJCK et al.** *Nature Biotechnology*, 1998, vol. 16, 177-180 [0031]
- 5 • **BENFEY et al.** *EMBO J*, 1990, vol. 9, 1677-1684 [0032]
- **MEDFORD, J.I.** *Plant Cell*, 1992, vol. 4, 1029-1039 [0032]
- **MEDFORD et al.** *Plant Cell*, 1991, vol. 3, 359-370 [0032]
- 10 • **WEIGEL et al.** *Cell*, 1992, vol. 69, 843-859 [0032]
- **CLARKE et al.** *NAR*, 1992, vol. 20, 1289-1292 [0041]
- 15 • **SAIKI et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 487-491 [0049]
- **MULLIS et al.** *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1987, vol. 51, 263 [0049]
- PCR technology. *Stockton Press*, 1989 [0049]
- 20 • **EHRlich et al.** *Science*, 1991, vol. 252, 1643-1650 [0049]
- PCR protocols; AGuideto Methods and Applications. *Academic Press*, 1990 [0049]
- 25 • **SMITH et al.** *Nature*, 1988, vol. 334, 724-726 [0066]
- **ZHANG et al.** *The Plant Cell*, 1992, vol. 4, 1575-1588 [0066] [0067] [0074]
- **ENGLISH et al.** *The Plant Cell*, 1996, vol. 8, 179-188 [0066]
- 30 • **BOURQUE** *Plant Science*, 1995, vol. 105, 125-149 [0066]
- **FLAVELL** *PNAS USA*, 1994, vol. 91, 3490-3496 [0066]
- 35 • **VAN DER KROL et al.** *The Plant Cell*, 1990, vol. 2, 291-299 [0067]
- **NAPOLI et al.** *The Plant Cell*, 1990, vol. 2, 279-289 [0067] [0074]
- **ANGELL; BAULCOMBE.** *The EMBO Journal*, 1997, vol. 16 (12), 3675-3684 [0067]
- 40 • **VOINNET; BAULCOMBE.** *Nature*, 1997, vol. 389, 553 [0067]
- **VAN DER KROL et al.** *The Plant Cell*, 1990, vol. 2, 291-229 [0074]
- 45 • **HASELOFF; GERLACH.** *Nature*, 1988, vol. 334, 585-591 [0077]
- **FEYTER et al.** *Gen. Genet.*, 1996, vol. 250, 329-338 [0077]
- **OSBORNE et al** *Current Opinion in Cell Biology*, 1995, vol. 7, 406-413 [0078]
- 50 • **STIEKEMA et al.** *Plant Molecular Biology*, 1988, vol. 11, 255-269 [0110]
- **DEAN et al.** *Plant Journal*, 1992, vol. 2, 69-82 [0111]
- 55 • **VALVEKENS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 87, 5536-5540 [0114]

# REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comparte una similitud de secuencia de aminoácidos de al menos el 80% con la secuencia de aminoácidos de la Figura 1, en el que la expresión de dicho polipéptido en una planta transgénica influye en una característica de floración de dicha planta.
2. Ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 1.
3. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la secuencia codificante es la secuencia codificante que se muestra en la Figura 1.
4. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, que codifica dicho polipéptido en el que la secuencia codificante difiere de la secuencia codificante que se muestra en la Figura 1 pero codifica el aminoácido que se muestra en la Figura 1.
5. Ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha característica de floración es el momento de la floración.
6. Ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, unido operativamente a una secuencia reguladora para la expresión de dicho polipéptido.
7. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la secuencia reguladora incluye un promotor inducible.
8. Ácido nucleico aislado que es un fragmento de una secuencia codificante de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, está unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción y que es adecuado para el uso en la regulación en sentido de la expresión para influir en una característica de floración de una planta.
9. Ácido nucleico aislado que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia codificante de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o a un fragmento de dicha secuencia codificante, siendo dicho fragmento adecuado para el uso en la regulación antisentido de la expresión para influir en las características de floración de una planta; en el que dicha secuencia de nucleótidos complementaria a dicha secuencia codificante o un fragmento de la misma está bajo el control de una secuencia reguladora para la transcripción antisentido.
10. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que la secuencia reguladora incluye un promotor inducible.
11. Vector de ácido nucleico adecuado para la transformación de una célula plana y que incluye un ácido nucleico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.
12. Célula hospedadora que contiene un ácido nucleico heterólogo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.
13. Célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 12, que es una célula microbiana.
14. Célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 12, que es una célula vegetal.
15. Célula vegetal de acuerdo con la reivindicación 14, que tiene dicho ácido nucleico heterólogo en el interior de su genoma.
16. Célula vegetal de acuerdo con la reivindicación 15, que tiene más de una de dichas secuencias de nucleótidos por genoma haploide.
17. Planta que comprende una célula vegetal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16.
18. Planta de acuerdo con la reivindicación 17, que no es una línea pura.
19. Autoprogenie o progenie híbrida o un descendiente de una planta de acuerdo con la reivindicación 17 o la reivindicación 18, o cualquier parte o propágulo de dicha planta, progenie o descendiente, tal como una semilla, en la que dicha progenie descendiente, parte o propágulo comprende una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16.

20. Procedimiento para influir en una característica de floración de una planta, comprendiendo el procedimiento causar o permitir la expresión de un producto codificado por un ácido nucleico heterólogo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el interior de células de la planta.

5 21. Procedimiento para influir en una característica de floración de una planta, comprendiendo el procedimiento causar o permitir la transcripción de un ácido nucleico heterólogo de acuerdo con la reivindicación 8 en el interior de células de la planta.

10 22. Procedimiento para influir en una característica de floración de una planta, comprendiendo el procedimiento causar o permitir la transcripción de un ácido nucleico heterólogo de acuerdo con la reivindicación 9 en el interior de células de la planta.

15 23. Procedimiento para influir en una característica de floración de una planta, incluyendo el procedimiento causar en las células de la planta una regulación negativa de la expresión, de un gen que incluye un ácido nucleico que tiene una secuencia de acuerdo con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

24. Procedimiento de generación de una célula vegetal de acuerdo con la reivindicación 15, incluyendo el procedimiento:

20 (i) introducir un vector de ácido de nucleico adecuado para la transformación de una célula vegetal e incluir un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la célula vegetal, y,

(ii) causar o permitir la recombinación entre el vector y el genoma de la célula vegetal para introducir un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el genoma.

25

25. Procedimiento de generación de una planta, incluyendo el procedimiento:

30 (i) generar células vegetales de acuerdo con la reivindicación 24;

(ii) regenerar una planta a partir de dichas células vegetales o descendientes de las mismas.

35 26. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25 que incluye además clonar o propagar dicha planta o un descendiente de la misma que contiene un ácido nucleico heterólogo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 dentro de su genoma.

40 27. Uso de un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para influir en una característica de floración de una planta.

28. Uso de un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8 para influir en una característica de floración de una planta.

45 29. Uso de un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 para influir en una característica de floración de una planta.

50

55

60

65

Figura 1

```

1  AGAACCCCTAATTTTCATGTTCTAGGTGTCTCTCGAATGGTTCTCATCTCATTGATTACTCA  60
61 ATCTCTAGGGTTTAGTGGTTCATCCAAATTCGTACCCTAATGGGTGCCGTAGCGATCAAT  120
    M G A V A I N
121 CGTAAACGCGAGCGACGAATCCTTCAATTTTCATTAATCAACAATCAACCAACCCTTTACGA  180
    R K R S D E S F N F I N Q Q S T N P L R
181 AATTCACCGTATTTCCAAGCTTCCAAGAAACGAAGATTCTCATTCGCTATGTCTGAAGAT  240
    N S P Y F Q A S K K R R F S F A M S E D
241 TCTGGTAAGCCAGCGTCTTCAAACCCAACAATTTGAGGATTTCAAGGTACCTGATGCT  300
    S G K P A S S N P T I S R I S R Y P D A
301 AAAGCTCCTCTTAGACGAGAGATTTCATGCTCCTAGTAGAGGAATTCTTAGATATGGAAAG  360
    K A P L R R E I H A P S R G I L R Y G K
361 GCAAAATCTAATGATTACTGCGAAAAGGACGCAAATTTCTTTGTTTCGTAAAGTATGATGAT  420
    A K S N D Y C E K D A N F F V R K Y D D
421 GCAAAGAGATCAGCTTTGGAAGCTTTGAGATTTCGTTAATAAAGGTAAGACTTTGTTGAT  480
    A K R S A L E A L R F V N K G K D F V D
481 TTGGGTGATGAGGTTGAAAAGGAGGAAGTTGTTTCTGATGATTCAAGTGTTCAGCAATT  540
    L G D E V E K E E V V S D D S S V Q A I
541 GAAGTTATTGATTGTGATGATGATGAGGAGAAGAATCTTCAGCCTTCGTTTTCTTCT  600
    E V I D C D D D E E K K N L Q P S F S S
601 GGTGTTACTGATGTTAAGAAAGGGGAGAACTTTAGAGTTGAGGATACTAGTATGATGCTG  660
    G V T D V K K G E N F R V E D T S M M L
661 GATTCGTGTGCTTAGATAGAGATGTCGATAATGATGCTTCGAGCCTCGAAGCTTATAGA  720
    D S L S L D R D V D N D A S S L E A Y R
721 AAGCTTATGCAAAGTGCAGGAGAAGGAATTCAAAGTTGGAAGCTTTGGGTTTGTGAGATT  780
    K L M Q S A E K R N S K L E A L G F E I
781 GTTGTGAATGAGAAGAGTTGTCACTGCTGCGTCAGTCTCGCCCAAAGACTGCGAAAAG  840
    V L N E K K L S L L R Q S R P K T V E K
841 CGTGTGAGGTGCCTCGTGAACCTTTTATTCCTCTCAGAGAAGATGAAGAGGCTGAAGTC  900
    R V E V P R E P F I P L T E D E E A E V
901 TACCGTGCCTTTTCTGGGAGAAATAGAAGGAAGGCTTTGGCTACTCATGAAAACCTCAAAC  960
    Y R A F S G R N R R K V L A T H E N S N
961 ATTGATATTACTGGAGAAGTTCTGCAATGCCTTACACCATCTGCATGGCTAAACGACGAG  1020
    I D I T G E V L Q C L T P S A W L N D E
1021 GTTATCAATGTCTACCTTGAACCTACTCAAAGAAAGAGAACTAGAGAGCCCCCAAAGTAT  1080
    V I N V Y L E L L K E R E T R E P P K Y
1081 TTGAAGTGTCTCTACTTCAATACCTTTTTCTACAAAAGCTGGTAAGCGATTCTGGTTAT  1140
    L K C L Y F N T F F Y K K L V S D S G Y
1141 AATTTTAAAGCTGTCAGGAGATGGACTACGCAGAGAAAGTTGGGATATGCTCTTATTGAC  1200
    N F K A V R R W T T Q R K L G Y A L I D
1201 TGTGACATGATATTTGTTCCCATCCACAGGGGTGTGCATTTGGACCTTGGCAGTAATTAAC  1260
    C D M I F V P I H R G V H W T L A V I N
1261 AACAGGGAAAGCAAGCTCTTGTATCTTGAATTCAGTGAATGGAGTTGATCCTATGATTCTG  1320
    N R E S K L L Y L D S L N G V D P M I L
1321 AATGCTCTGCGCAAAATACATGGGTGATGAAGCAAAATGAAAAAAGTGAAAAAAGATTGAT  1380
    N A L A K Y M G D E A N E K S G K K I D
1381 GCTAATTCGTGGGACATGGAATTTGTGGAAGACCTTCCCCAACAAAAGATGGGTATGAC  1440
    A N S W D M E F V E D L P Q K N G Y D
1441 TGTGGAATGTTTATGCTTAAGTACATCGATTTTTTCAGCAGAGGCCCTGGGGCTATGTTTC  1500
    C G M F M L K Y I D F F S R G L G L C F
1501 AGCCAGGAACACATGCCATACCTCCGACTCAGAACAGCTAAAGAGATTCTGAGGCTACGA  1560
    S Q E H M P Y F R L R T A K E I L R L R
1561 GCTGATTGA 1569
    A D *

```

Figura 2

Secuencia genómica de ESD4

|      |                                                                   |      |
|------|-------------------------------------------------------------------|------|
| 1    | ACCAAAAAAATTACCTATGATCTATTATATATGAAACCATATTTCTAGAAAAATTGA         | 60   |
| 61   | TTTCTTAATGTTTTGTGTTTCATATATTTTATGATTTTACATAGATATTAAGAAATAGAC      | 120  |
| 121  | AGAATAAATATATTTAGTCACGTAAAGTATTGGAATAATTAATGTATTTGATTTTCACTTA     | 180  |
| 181  | GGATCTCTAATCTATTTTCACTAGGATTTTCTTTTCATGGTTGGGTTGGCACTGGCCCTTGA    | 240  |
| 241  | GATAAGATACGCATTTCGTGTTTGGATGATGTTACCTTTCCACGCATTGAACAAGAGCTGC     | 300  |
| 301  | AACCTCAGAAACATTACCGTATCTATCACAGGTGTCATCAACAAGGGTGAAGACTGTGTT      | 360  |
| 361  | GATCTTAGCTAGTGAAACTCTCCCAAGTGAAAAATTGTGGCTCGAAATATATCAATTATGC     | 420  |
| 421  | AAATAAATAGCATTTCGATCAATCTATCCCTGAAGTAAGGTGGGAGTTTAGATGCAAGGTC     | 480  |
| 481  | TTGTGCTTCCACCATCTGCAAAACATGTCAATGACTATTGTCAACTTGTATCGCAAAAA       | 540  |
| 541  | ACATATAGCTAGAAGCACGAAAAATCTAGAGTATAGTACTTGGTCAGAGTTTTCAATTCT      | 600  |
| 601  | TGAATCCAATTTAGCTGCAAAAACTTGAAATTGATCTTGGCAATCTAAGTAGCATCTTG       | 660  |
| 661  | TTGTGATCTTCTTCTTGTTCATAGAAAGAAATGTATTCCTCGCGAATATCAATTTCGGCA      | 720  |
| 721  | TGTCAATGTTGAGGCATGCAAGAGCATTTGCTATACGCATTAAAGATATGGGAGAACTT       | 780  |
| 781  | CTCCAGCTCTAGCTAACGACTCCAAGTTTCTTGTAGTGAAGCTTAACGCTTCTCTCAAG       | 840  |
| 841  | ATATCTTCTCTTGTGTCCTTAAGTGAGCAGCTTCATACAACTCACCATGCCCTTGACA        | 900  |
| 901  | TCACTGGTTATAGATTCCATAAACTTTTCATTCTCCCTTTGAACTCTCTTGAAAAATCT       | 960  |
| 961  | ATTGTCATAAGGAGAATCTTGTTAATACATATGAATCGATTACAAAAAATGTACTGGT        | 1020 |
| 1021 | AGATAACTTTTACCGGTAGACATGTTGTAACCGTATGTCCTGAAAAACCAAAACATGATG      | 1080 |
| 1081 | GAAATCGTGTACAAATCATCTTCACCGGTATCATCTCCTGTATCTTTTCAAAACCCCTCT      | 1140 |
| 1141 | TCTAGACTCTGCTCAATCTCATCTTCAAAGTGAAACGCTACACCAAGGCTCACAAGCATA      | 1200 |
| 1201 | TATATGAAAGAAATCCTCTTCTTGGTCGACTCAATGCTTTTCGAAGAAACATGAGCATC       | 1260 |
| 1261 | TCCTCTACTTCCGGCTTTAGTCTCTCAATCTCTTGGGCAAGGGCATTCAATTCCTAACAA      | 1320 |
| 1321 | TAATATCATATGTTTCATACCCGTACATCGATCTTTTACATTTATTATATATATGTTGT       | 1380 |
| 1381 | CAGTGTGTATATAGACTCACCGAGACATCAACTTGAGCAGAGAGGAAATGGTGACCCCA       | 1440 |
| 1441 | TTTGAAGCGCGCAGTCTCTTGAACCTTGGGATTACTTTCTTGATCATGACAGGCCCGAGT      | 1500 |
| 1501 | AGGGGTGGCCTTCATGCGAACAGCTTTCCATGCTGACCTGAAAAATGACTTGTGGGGAAA      | 1560 |
| 1561 | GCTAGAGAGTTTTCTTACCGAAAAATAAATTGGAACGTAAAGGAAGAGAGATATAGATCC      | 1620 |
| 1621 | ATAAGCTGATATGCATTGCGATGTTTACTACTAGTGATATGGAATACATTTTCCACCACA      | 1680 |
| 1681 | ATTTATAGGCAAAACATAAGCGTTTTTCATTAAAGTCATCTTTTGAAAGTTTTGGAAGAAT     | 1740 |
| 1741 | GTATATTAATACCCCATATTTATCTTCTTCAGTGTATAATACAACCTATGTTGGGACCA       | 1800 |
| 1801 | TGATATTTTCTGAATTTATAGTGATATTAGTTTATCTTTAAATTGATATTTATTAATCTA      | 1860 |
| 1861 | TATAGATCTTTTAAATTTATTTAATTTTAAAGAAATACGAGTTGACACAATTCAATAT        | 1920 |
| 1921 | ACATCAAAATTAATGACTTGATGTTGAAATTTGTGTAGTATTAGAATTGAAAAATTAATA      | 1980 |
| 1981 | TTTCAAAAACTCATTTGACAATAAATCACAATGACTATAACTGAATTCATTATATAAT        | 2040 |
| 2041 | AGATATACATACATCTAAGTTTATGATTAATACCTCAACTATCAGATTTTAAATGTAG        | 2100 |
| 2101 | TAGACTATTGAAATGAAATAATGCAGATTAAAGAGTTGTATCTTATAAAAACTTATGA        | 2160 |
| 2161 | CTAATTGTATTAGGAAGTTATAAACGATACATAATATGATGTTTAAACCAACAACATA        | 2220 |
| 2221 | ATTTAATGAAATTAGAGACAAAATCATTTGTGATGTAATAATAGTTCAAGACAAAATC        | 2280 |
| 2281 | TAACAAACATTCAATAGTTCAAAAAATATTTAACTATAGATTATATATATTATCGTATA       | 2340 |
| 2341 | TATATTATATTTTGTGGTTATTAAATTATGATGTTATTAAAAATCATATTTTATATAG        | 2400 |
| 2401 | GGTTTTAAAAAATTGTTAACTTATTATTTTATCAAATTATGTTAAATTTTACATTACAC       | 2460 |
| 2461 | GACTTGAACCTAATATAATATTATCTCTTGTATTTTATTAATTTATCAAAAAATTTTGT       | 2520 |
| 2521 | TAGAGGTTTTACTGTAAAAACATGTTTAGTTTTTCATTTTTTAAAAAACCTCCAAGTGGCA     | 2580 |
| 2581 | AAAAATAGATCCATCTCCATCTAAAAAGTGCAAAACAAATCTCCATCATTTAAAAATCAA      | 2640 |
| 2641 | CGTTAACATCCATATCTATTGTTGTTGTTTTTACTTCTTTTTCTCTTGGTCAAACTCTA       | 2700 |
| 2701 | CGTTAGTTTGATCAATAAATATGACAAGAATTTTGCAGTCTCATAGGCGTCTTGT taaa      | 2760 |
| 2761 | ggttaggttagcgtotacataaattttccgaagataaattttcttgagatcacaggttaact    | 2820 |
| 2821 | caattactgaaatgtataaactttctaaaagtgtggtctattaaaacaaattgtgaaaaa      | 2880 |
| 2881 | atttaaaacaaaagccacttcaaaaacaaagaaaaccataaccattaatcaaaattcttt      | 2940 |
| 2941 | tttttttggtaaacagtagttagtgcattaaattgtaaacata tgggtggtgtgtata tctg  | 3000 |
| 3001 | tttgatcaaaagaacgtatataaaacaaaggctgttgggga tagtgca tctgcccattatt   | 3060 |
| 3061 | tcctttccgattgacatgtccatagatgagtgatgtagcttcaaca tccaata tctgata    | 3120 |
| 3121 | ccaccnaagactgaagagtagtaccagaatatttca tataata tttattttatttttca     | 3180 |
| 3181 | ttttggttaaggagaa ttttata tcatgataccaccatactttaa tctgtatgaaaaat    | 3240 |
| 3241 | ttcaatttggatttttcaaaatttttagtttagttaaagta caaaaacaaatctttttt      | 3300 |
| 3301 | tttcaaatatttatttttggagaaaaccccaaat ttaaaaggyaaagagaaaaaatcaaat    | 3360 |
| 3361 | cattcatctttagagctttcttttcttctacagaaacctaat tcaatggttctagggtgtctc  | 3420 |
| 3421 | ccgaattggtttctcatcttca ttgattactcaatctcttagggttttagtggtccatccaaat | 3480 |
| 3481 | cgtaccctaaatgggtgcccgtatcgatcaatcgtaaacgcagcgcgaatccttcaatttc     | 3540 |
| 3541 | ATTAATCAACAATCAACCAACCTTTACGAATTCACCGTATTTCCAAGCTTCCAAGAAA        | 3600 |
| 3601 | CGAAGATTCTCATTCGCTATGCTGAAGATTCTGGTAAGCCAGCGTCTTCAAAACCCAA        | 3660 |
| 3661 | ATTTGAGGATTTCAAGGTACCCTGATGCTAAAGCTCCTCTTAGACGAGAGATTCATGCT       | 3720 |
| 3721 | CCTAGTAGAGGAATTTCTAGTATGGAAGGCCAAATCTAATGATTACTGCGAAAAGGAC        | 3780 |
| 3781 | GCAAAATTTCTTTGTTTCGTAAGTATGATGATGCAAGAGATCAGCTTTGGAAGCTTTGAGA     | 3840 |

Figura 2 (Continuación)

|      |                                                                      |      |
|------|----------------------------------------------------------------------|------|
| 3841 | TTCGTTAATAAAGGTAAAGACTTTGTTGATTGGGTGATGAGGTTGAAAAGGAGGAAGTT          | 3900 |
| 3901 | GTTTCTGATGATTCAAGTGTTCAAGCAATTGAAGTTATTGATTGTGATGATGATGAGGAG         | 3960 |
| 3961 | AAGAAGAAATCTTCAGCCTTCGTTTCTTCTGGTGTACTGATGTTAAGAAAGGGGAGAAC          | 4020 |
| 4021 | TTTAGAGTTGAGGATACTAGTATGATGCTGGATTCGTTGTGCTTAGATAGAGATGTCGAT         | 4080 |
| 4081 | AATGATGCTTCGAGCCTCGAAGCTTATAGAAAGCTTATGCAAGTGCGGAGAAGAGGAAT          | 4140 |
| 4141 | TCAAAGTTGGAAGCTTTGGGTTTGAGATTGTGTTGAATGAGAAGAAGTTGTCACTGCTG          | 4200 |
| 4201 | CGTCAGTCTCGCCCAAAGACTGTGGAAAAGCGTGTGAGGTGATGAGATTTATACTAATC          | 4260 |
| 4261 | TTTCTTGAATTGGATATAATTAATGACATTGCTTTGTTTGGATTGTTTCTCTAAAATGCA         | 4320 |
| 4321 | TATGATGTTATCGCCTACTGTTTGTGTAGTGTAGACTGAAGATAGTACAATACTTGTGGC         | 4380 |
| 4381 | TTTATTGGTTATTAAAGCTGCAGTTATTACTTATGCAACAGAGTCAAAGTCTCTACTT           | 4440 |
| 4441 | ATTAGAGTATATTGTAATCTTAGCGTTGAGATCGTTAGTGTGTTTCTATGTTTATTGTTG         | 4500 |
| 4501 | TTGTTAACACTATGTTTGTGTTGATATAATGAAGGTGCCCTCGTGAACCTTTTATTCTCT         | 4560 |
| 4561 | <u>TCACAGAAGATGAAGAGGCTGAAGTCTACCGTGCCTTTCTGGGAGAAATAGGTATGTT</u>    | 4620 |
| 4621 | <u>CTTAAGACCTCTAGCATGTTGAGTGATTTTTATTAGCTTAACCAAAAACCAATGTCTCC</u>   | 4680 |
| 4681 | <u>CATTTCAGAAAGGAAGGTCTTGGCTACTCATGAAAACCTCAAACATTGATATTACTGGAGA</u> | 4740 |
| 4741 | <u>ACTTCTGCAATGCCTTACCCATCTGCATGGCTAAACACAACTACACTTGTCCATAATATC</u>  | 4800 |
| 4801 | <u>TACACATAAACTCTAAACCATTTCTTGTGATTCTTGTTCGTTTATAGGTTATCAAT</u>      | 4860 |
| 4861 | <u>GTCTACCTTGAACTACTCRAAGAAAGAGAACTAGAGAGCCCAAAAAGTATTGAAGTGT</u>    | 4920 |
| 4921 | <u>CACTACTTCAATACCTTTTCTACAAAAGGTTTGTCTCTCTCTGCTCAGATGATTTT</u>      | 4980 |
| 4981 | AACAAAAATTTGATCCTTTTTCCTCATGTCAGTTCGACTGAGTAGCTGCTACTTGCTTC          | 5040 |
| 5041 | CATAAAAATGATAAGCAGTATGTTTAAAGTGATCTTTATGATAAGATTATGATATATTG          | 5100 |
| 5101 | GCCTTGTTTCTCCCATGGTACTCAGTTGTCTCTGGCTCTGTATCCCATGGAATGGCAG           | 5160 |
| 5161 | TGAGTAACCAAGACAAGCTGTGGCCTCTTATACGTTGATGAATCCTCTGGCACTTAAAT          | 5220 |
| 5221 | CTGCTCTTCTTTAATTATTTTTTTCAGCTGGTAAGCGATTCTGGTTATAATTTAAAGCT          | 5280 |
| 5281 | GTCCAGGATGGACTACGCAGAGAAAGTTGGGATATGCTCTTATTGACTGTGACATGGTA          | 5340 |
| 5341 | ATTTTGTGCAAGAACCTGAATTTGAAGATTCTCTGTTAATATTACGCATGTAGTCCAAT          | 5400 |
| 5401 | TTATTTATGTTTAACTTAGTCTGTGCCCTCTGCAGATATTGTTCCCATCCACAGGGGTG          | 5460 |
| 5461 | TGCATTGGACCTTGGCAGTAATTAACAACAGGGAAGCAAGCTCTGTATCTTGATTAC            | 5520 |
| 5521 | TGAATGGAGTTGATCCTATGATTCTGAATGCTCTGGTATGATTAAATTTCTAATCTTAT          | 5580 |
| 5581 | TCGCTTTATTTAGTCTATTAACTGACATGTTGGATGCATTAAAGATATTAGATGCT             | 5640 |
| 5641 | GATAAATCTTTATCATCATTTCTTGATTCTGAAATCTGTTTGGAGACATTATGGAGATGC         | 5700 |
| 5701 | CAGAAGCTGTTATTGCTTTTAAATCGGACACTACTGTGAAAGTGTCTAACCATATATA           | 5760 |
| 5761 | CTAGTCGTTATAGCTAATGCCAGATCTGATATTCTGCTTCAGGCAAAATACATGGGTGAT         | 5820 |
| 5821 | GAAGCAAATGAAAAAGTGGAAAAAGATTGATGCTAATTCGTGGGACATGGAATTTGTG           | 5880 |
| 5881 | GAAGACCTTCCCCAACAAAAGATGGGTATGTAACCTATGCTTGAACCTGTGATGATCCAT         | 5940 |
| 5941 | GATCATGTGAAGGAACCTCTTGTAAAGAGATAACCTCTGTAGAAATCAGATACTGTGTC          | 6000 |
| 6001 | TTCTGATGTGGGAATATGGGTTTTTAAAGCAAGGATAGATCTGGTTTGAAGTTGATTAG          | 6060 |
| 6061 | GAGAAATTCACCTGATATAAATTTTGATAATGGAATCAACAAGGGTATAACTTAAGTGT          | 6120 |
| 6121 | CTTATGCTCTTTAGCACTCTGGTTAAGCTCTCTGCTAACTCTATATTGTTTCTTTGTTGC         | 6180 |
| 6181 | AATCTTTTATATTCTCAGGTATGCTGTGGAAATGTTTATGCTTAAGTACATCGATTTTT          | 6240 |
| 6241 | CAGCAGAGGCTTGGGCTATGTTTCAAGCCAGGTAAGCTATCAGAAATCCAAATCTCTGAAT        | 6300 |
| 6301 | GCCTCAAGAAACTGTAGTTTGAAGATAAAACTGTGTCTTGAACAATATGGAATTAGT            | 6360 |
| 6361 | ATATCCCCCTAGCAGTTTATGTAACCTTGTAAGTTTAGGCATTAGCGTAATAACATTGT          | 6420 |
| 6421 | ATTACTTTGCAGGAACACATGCCATACTTCCGACTCAGAACAGCTAAAGAGATTCTGAGG         | 6480 |
| 6481 | CTACGAGCTGATTGAAGTTGCTTGTGCTAATGTTTTTTCGGCTATTAGGAATACATTTTT         | 6540 |
| 6541 | TGGTTGCCATTGTTGATTGTTCAAACCTTTAAATCCCACTCCTTTTAGGCAGTGAAGCAC         | 6600 |
| 6601 | TCGGCTTTAAAGCAGAGGTAAAACTGAGTCAAGCCAGAGCTCTTAGCTCGTTCCGTT            | 6660 |
| 6661 | ATTGTATTTTTTCTTCTCTTGTTTTAAATGTAGATGAAGCGTTTGGATCTCTATG              | 6720 |
| 6721 | TTGGTTAGTCTAGCTGAAGATATATGAGATGTTGAAAACCTTATTTATTTCTCTCCGGTC         | 6780 |
| 6781 | TTGACCAGTGGGAACGCAATTTAAAGTTTCCATCTAGTATCGGTTGATATATTTCTCTC          | 6840 |
| 6841 | TGTTCAATAGCCAAATTTCCATGAATAATCTCTTGAAAGCAATGTTTTTCGATATACAA          | 6900 |
| 6901 | TGTTCTGCACAATTTCCCCAATACATACAGGAATATGTTACAAATATACAACAACTGCT          | 6960 |
| 6961 | GTTTGTGAGTACAAATGTTGACAAGGACACAGAAAAACAAATCCCAATGTAACATTG            | 7020 |
| 7021 | ACATATTAACAACTCTCCCAAAACAAAACAAATTTCCCAATTCATAAAACACGAGAG            | 7080 |
| 7081 | GAAGGAAGACTTGTGTGATCTCCTAACAAAACCTGACTGGAAGGCAAACTAACTTCCAC          | 7140 |
| 7141 | TGCCTTTCTTAGCGCGGAACCTCTTCCGGCTAAGTATCTCCTGTTCTTTCAGACGGTGT          | 7200 |
| 7201 | TGGAACCGAGCAAGACGGGCTTGAAGACTTACAAGACCAGCTGCTTTACGGGACAACACA         | 7260 |
| 7261 | AAGCTCAGCTGTGTAACATAGTTGTCAATCATGCTCCCTGGCCGATCCACCTTCGCTAGT         | 7320 |
| 7321 | AATTTCAATTTCTTACAAAAAACAATGAATAATGTTAAACAATCACAAGACATATGA            | 7380 |
| 7381 | GCCATAACCTCGTGAATATTCCATGATATCTCGATCTCTTTCTGTGTGCTGTAATT             | 7440 |
| 7441 | AAGGTCTCTTCTTCTGCCAGAGTTTAAACAAAATAATTACCATATTACAGGTTTCTAA           | 7500 |
| 7501 | GTTTATTCGTGAGCGATATTCTATAAAATCCCTCACGCTCATAGCATAATTAGAGATAT          | 7560 |
| 7561 | AGAAGGGTCAAATGGCTCTTACCTCAAGCAATGCATCAATGTTTTTCATCAAGAGAAGGC         | 7620 |
| 7621 | TCCGTTGTTTCTACTGCTTGAAGATGTATCGCTTGTGTTCTGACTGCTAGCCATATT            | 7680 |
| 7681 | TGTTGTCTAGAAATTGTCATGGCAGGGACATCAGTCTTGAGAATAAGATGAGTGAATCCT         | 7740 |
| 7741 | TTGACTAGTGGAGCGCCAAAAGAAGATTTTAAATGTTAAGCATAAATCATATTCTTAA           | 7800 |
| 7801 | AATGTTAAGTGAATCTTTGACTAGTATAGTATAGTGTCTGGTTTTCTATTAGACTTTCT          | 7860 |
| 7861 | GAGATGAGAGGTATTTCTATTAAAACTTAAAGTTGAAGTTTAAATGAATCAGCCAAA            | 7920 |
| 7921 | CTGCAGGGTTTGTTCATTAAAAATCCCAAAATGTTTTCGTATACATCATATTACCCACTG         | 7980 |

Figura 2 (Continuación)

|       |                                                                |       |
|-------|----------------------------------------------------------------|-------|
| 7981  | AGGACTCTGCTCTTTGTGGAAATGCTAAATTAGCCCCAAACCTTTTTCTAAGTCCCACTT   | 8040  |
| 8041  | TGAATTTCTAATAAGAACGAACAGATCGCGGGAATCCAAAATGATTTGAAACCTTTTCAC   | 8100  |
| 8101  | CTGAATTTCTGTGAAATCCAAAATCTCTCTCTATCAGTAGAGAATCGCCATGGATGAAG    | 8160  |
| 8161  | AGCTTCTGCTCACTAGAAATCTTGCAGGAATCGAAGGAGGAGACGATGAATCTGACTATC   | 8220  |
| 8221  | ATGAACCTGTCACGGATCTCAAATCTCTACTTGATACAGACGATGATGAAATTTCTCAATC  | 8280  |
| 8281  | GATTCTACGGTAGTCTCTCCTCAATGGCTTCTTCGTTCTCCGCTGTATCTCCGCCGCCA    | 8340  |
| 8341  | TGGATTCTCCGGTTGAATCAGGCCGCTTTGCTATTTAGCCTCCGACGCTTATCTCAGTC    | 8400  |
| 8401  | TGCTTCTTTCCACGAATTGCCCGCTTTTCACCTTCTCTCTCCGATTGCGTTTCTTTCTC    | 8460  |
| 8461  | TACTTGGCTCAATTCGCCGCTACCTCAAACGCCGTGATGATTCGCCCGGTCAAGGGAGTA   | 8520  |
| 8521  | ATTCGCAGCGAGAGAAAAGGGAATAAGAAGAAGAGAGGACGTTGGTAAGAGGAATTTAGGGT | 8580  |
| 8581  | ATGAAGATGGGGAAGAGACTGAAGAAGGTGGATTGATGCGAAATTGATGTTTATAGTGT    | 8640  |
| 8641  | TAGAGAAGCTTGGCTCGGTTCTGAGTTTTGTTCAATTTAGATAGATTCTCTGATAGTTGA   | 8700  |
| 8701  | AATCTTTGGTACAACTGTGAGTGAGATTCTTTATTTGGCGTTGGAGCACTCTGGAGTTT    | 8760  |
| 8761  | TGAATTATGATCGATTGATGGAAATGTGTGGGAAGATTCTGGGAGGAGTGTGTAATTCG    | 8820  |
| 8821  | ACCATGGAGATATGGCACTCACTGCTGCTGAGATTTCAAAGTCTTTGACACCGTTGCTTC   | 8880  |
| 8881  | TTATGGGGAACATCAAGCGAGAAGTTTTGCGTTGGGATTTGTGTCAAGGAAATTGATGA    | 8940  |
| 8941  | GTTTGGCTAAAGATAACCTGAAATGAAAAAGTTGTGTCTAATTTGCCAAGTTTCTGG      | 9000  |
| 9001  | TTCAAGGCACCTGAGAAGGCCGAGCCGCTGGATTGCAAGTGAGGCGGTACTGGAGA       | 9060  |
| 9061  | TTGTAAAGGCAATGGAGGTTGAGGGCCAATCAGAGTTTGTGATTTTGTAAATGAAGATGT   | 9120  |
| 9121  | GTCAAGGGGAAGTCTAATTTTAGAGTATTAGCTGTGATATTATACCTCTGTTGATAAGCT   | 9180  |
| 9181  | CATTAGGAAACCCCTCTAGGAGATATTAGTTTCAGAGAATGGGTTGAAAGATTCGTGGGGCT | 9240  |
| 9241  | TGGGTTGTATTGATGCTTTAGTTTCAGCGGTGTTTCAGACACGAGCGCTTTGATTAGAGCTC | 9300  |
| 9301  | GAGCTTTGTCCAACCTTGGCTCAAGTTGTGGAGTTCTTGTCTGGTGATGAAAGGAGTAGGT  | 9360  |
| 9361  | CGATCCTGAAACAAGCCCTTGGGTTTAAACGGTGAGACTTCAGAGGGAAAAGGTGCAGTAA  | 9420  |
| 9421  | CTGACCTTTTGAAGAAAAGATGTGTGGATGAGAAGGCCGCTGTAAAGGAGAGCAGCTCTTC  | 9480  |
| 9481  | TTCTGGTGACAAAATTGACATCGCTTATGGGTGGTTGCTTTGATGGTAGTATCCTAAAGA   | 9540  |
| 9541  | CAATGGGTACATCTTGTCTGATCCGCTAATAAGTATAAGAAAGGCTGCAGTTTCAGCTA    | 9600  |
| 9601  | TTCCGAGGTATGTTTTCTGTAACCTAGTTTCTTCTTTCTCATTTACCCGATGGTAATAT    | 9660  |
| 9661  | GTGTAGAGTTAGTATAATTTATACGGGTTTGCTTTGACCTTAATTAGCTCAAAGTTAAAG   | 9720  |
| 9721  | AGACCAAATGTGCAAGCCAAAATGTTTTTAGATGAATGAATGGGAAATTACATAGCAAC    | 9780  |
| 9781  | TGCTTCCGTCGGTTTCTACTAAAATCAGATAATCTTTTACTTTAACTTATCCCTGAAT     | 9840  |
| 9841  | ATAGGTCAGGCACTCAGGCTAATGACTTGTATCATATTTCTCTGATGATGCAAGTTCAT    | 9900  |
| 9901  | TGCTTCTGTCTCACTGTAGGCATTGAGAATATGTACAGATGAAATTGTGACCCTGAATG    | 9960  |
| 9961  | GTTACATTCGTTCCTCGGATGATCATGGACAATGAACTAGCATCCAGAAGAATGCGA      | 10020 |
| 10021 | GAATGTCTTTCTATGAATTAGTTCTGGAGAGAATATTACGAGCTGGAAATGTGCTTTCTCC  | 10080 |
| 10081 | AGACAGTGCTTCTCTCCCTAACACCGGAACACTACTTCAAAGATCTAGACAGAGACAT     | 10140 |
| 10141 | TGAAGCCTTGTTTCCAGAAGGAGTTTGGTTCTCTTAAGGGAGCTTTGCCAACAGTGAGGT   | 10200 |
| 10201 | TTCTCCTTGGGTTACGAAAATATGTGGAAGTTTGGGAAAGAAGAAGCGACTAAAACCAAG   | 10260 |
| 10261 | AGTTGCCCTTGGCGCTTCAGTGTATCATAAAGGAATCTGAATCACTGTGGTTGAGTCTTC   | 10320 |
| 10321 | AATGCCAATAAATAGATGGACAGCTCCTGCTGGTGCTTGGTTCTTCTATCAGAGGTTTC    | 10380 |
| 10381 | AGTTTATCTTTCAAAGCTGTGCAATGGGAATTTCTTCACCATCATTTGGCAGTTGCTTGA   | 10440 |
| 10441 | CAAGAATGACGTACAAGGTTTGTGAGAATTCGTGTTAT                         | 10478 |

[illegible]

Figura 4A

|     |                                                               |     |
|-----|---------------------------------------------------------------|-----|
| 1   | GCCGCCTCGGCTTTGAGCAGCTCGCCGATGTCCTCCACGGTTCGGGCCCCGGAAGGAGG   | 60  |
| 61  | ATGAACCTTTTGTTCCTTTACGGATGAGGATGAGGATAGTGTGATCATGCTCTTGGTG    | 120 |
| 121 | GCCGTAACAGACGTGAAAGGCTAGTGGTACATGAATCATCAAATATTGTCATAACAAGAG  | 180 |
| 181 | AGACCTTGCACTGCTTGAACGAAACGGAGTGNCTAAATGATGAGGTCATAAATTTGTATC  | 240 |
| 241 | TTGAGCTGCTGAAAGAGAGGGAACTGAGAGAACCTAACAAAGTTTTTGAAATGCCACTTCT | 300 |
| 301 | TCAATACCTTTTTCTACAAAAAGCTCATTACTGGTGGGTATGATTATAAGTCTGTCAGAA  | 360 |
| 361 | GATGGACAACTAAAAGGAAGTTAGGTTACAGCCTACTTGAATGTGATAAGATCTTTGTTC  | 420 |
| 421 | CTATACACAAGGAAGTGCATTGGTGTCTTAGCAGTCATAAACATAAGGGACAAAAAGTTTC | 480 |
| 481 | AATTTCTGGATTCACTTGGCAGCATGGACATGAAGGCATTGAGAACTTTAGCAAGGTATC  | 540 |
| 541 | TTGTAGATGAGGTGAAAGATAAGAGTGGCCAACATATTGATGCTCTTCATGGNAGCAGG   | 600 |
| 601 | AGGGTGTAAAAAACCTTCCTTTGCAAGAGAA                               | 631 |

Figura 4B

|     |                                                              |     |
|-----|--------------------------------------------------------------|-----|
| 1   | GCACCTCATGTATTCACTACTTTCTTCTATCCTAAATTAAGTCTGGGGGTTACCAAGCA  | 60  |
| 61  | GTGAAACGANTGGACCAAAGGGTAAATCTCTTTGAACAAGAAATTTCTGGTGCCTAT    | 120 |
| 121 | TCATCGGAAGGTACATTGGAGCCTGGTGGTGATTGACCTAAGAAAAAGTGTCTTAATA   | 180 |
| 181 | TCTGGATTCTATGGGACAAAAGGGCCACAGGATCTGTGAGATTCTCCTTCAGTATTTACA | 240 |
| 241 | GGATGAAAGTAAGACCAAAGAAATAGTGATCTGAATCTTTAGAGTGGACCCATCACAG   | 300 |
| 301 | CATGAAACCACACGAGATTCTCAACAGCTGAATGGGAGTGATTGTGGAATGTTTACTTG  | 360 |
| 361 | TAAATATGCAGATTATATTTCTAGGGACAAACCTATCACATTTACTCAGCACCAGATGCC | 420 |
| 421 | TCTCTTCCGGAAGAAGATGGTGTGGGAAATCCTTCATCAGCAGTTGCTGTGAGAAAACCT | 480 |
| 481 | TGCCTGGTCCTCTAGCTGCTGGTGGTTCTTTACAGACATTTCCATATANCCTCATGCAT  | 540 |
| 541 | GTGGGTAAAAAGTCCCTGCATCACTTCTGTTCTCACAGGTACTGAGCTGTCAA        | 595 |