(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 332 314**

(51) Int. Cl.:
***C12N 15/82*** (2006.01)
***C07K 14/415*** (2006.01)
***C12N 15/29*** (2006.01)
***A01H 5/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04718952 .7**
(96) Fecha de presentación : **10.03.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1604029**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **14.12.2005**

(54) Título: **Método para incrementar la resistencia frente a factores de estrés en los vegetales.**

(30) Prioridad: **12.03.2003 DE 103 11 118**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
**02.02.2010**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
**02.02.2010**

(73) Titular/es: **BASF Plant Science GmbH**
**67056 Ludwigshafen, DE**

(72) Inventor/es: **Frank, Markus;**
**Kogel, Karl-Heinz y**
**Hückelhoven, Ralph**

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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).



Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

## DESCRIPCIÓN

Método para incrementar la resistencia frente a factores de estrés en los vegetales.

La invención se refiere a métodos para generar o incrementar la resistencia frente a, al menos, un factor de estrés biótico o abiótico en los vegetales, preferiblemente frente a plantas patógenas, mediante el incremento de la expresión de, al menos, una proteína inhibidora Bax 1 (BI1) en al menos un tejido vegetal, con la condición de que la expresión en la epidermis de la hoja permanece esencialmente inmodificada.

Un objetivo de los trabajos biotecnológicos en vegetales es la producción de vegetales con propiedades novedosas y ventajosas, por ejemplo para el incremento de la productividad agrícola, para el incremento de la calidad en los productos alimenticios o para la producción de determinados productos químicos o farmacéuticos. Con frecuencia son insuficientes los mecanismos de defensa naturales del vegetal frente a patógenos. Las solas enfermedades por hongos conducen a pérdidas anuales en cosechas de muchos millardos de US$. La introducción de genes ajenos a partir de fuentes vegetales, animales o microbianas puede incrementar las defensas. Ejemplos son la protección de tabaco frente al daño por comida de insectos mediante expresión de endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (Vaeck *et al*. (1987) Nature 328:33-37) o la protección del tabaco frente a la infestación de hongos mediante expresión de una quitinasa de frijol (Broglie *et al*. (1991) Science 254:1194-1197). Sin embargo, la mayoría de los planteamientos descritos solo ofrecen resistencia a un patógeno individual o a un espectro estrecho de patógenos.

Existen solo unos pocos planteamientos que confieren resistencia a los vegetales frente a un espectro más amplio de patógenos, en particular frente a hongos patógenos. La resistencia sistémica adquirida ("systemic acquired resistance"; SAR) - un mecanismo de defensa en una variedad de interacciones de vegetal/patógeno - puede conferirse mediante aplicación de sustancias mensajeras endógenas, tales como ácido jasmónico (JA) o ácido salicílico (SA) (Ward *et al*. (1991) Plant Cell 3:1085-1094; Uknes *et al*. (1992) Plant Cell 4(6):645-656). Efectos similares también pueden alcanzarse mediante compuestos sintéticos tales como ácido 2,6-dicloroisonicotínico (DCINA) o éster S-metílico de ácido benzo(1,2,3)tiadiazol-7-tiocarboxílico (BTH; Bion®) (Friedrich *et al*. (1996) Plant J 10(1):61-70; Lawton *et al*. (1996) Plant J 10:71-82). La expresión de las proteínas relacionadas con patogénesis ("pathogenesis related" (PR)), que están altamente reguladas en el caso de SAR, también puede provocar parcialmente resistencia patógena.

En cebada, el locus Mlo se describe como un regulador negativo de defensa patógena. La pérdida o la pérdida de función ("loss-of-function") del gene Mlo ocasiona una resistencia aumentada resistencia no específica con respecto a la raza frente a un gran número de aislados de mildiu (Büschges R *et al*. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjaer MF *et al*. (1995) Plant Pathol 44:786-790). El gen de Mlo está descrito (Büschges R *et al*. (1997) Cell 88:695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends Plant Sci. 5:343-348). Se aislaron diversos homólogos de Mlo de otras especies de cereales. Se han descrito métodos usando estos genes para lograr una resistencia patógena (WO.98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552). La desventaja es que las plantas con deficiencia de Mlo también inician los mecanismos de defensa arriba mencionados en ausencia de un patógeno que se manifiesta en una mortandad espontánea de células de la hoja. (Weiter M *et al*. (1993) Mol Gen Genet 239:122-128). Por esto las plantas resistentes a mlo sufren un menoscabo de rendimiento de alrededor de 5% (Jörgensen JH (1992) Euphytica 63: 141-152). La muerta espontánea de las células de hoja implica además una hiper-susceptibilidad desventajosa frente a patógenos necrotrofos y hemibiotrofos tales como Magnaporte grisea (M. grisea) o *Cochliobolus sativus* (*Bipolaris sorokiniana*) (Jarosch B *et al*. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J *et al*. (2001) Phytopathology 91: 127-133).

Los factores que inducen un efecto comparable de resistencia mlo frente a hongos necrotrofos, no han podido identificarse hasta ahora. La razón para esto puede ser el mecanismo de infección específico de los hongos necrotrofos: en lugar de una penetración facilitada por appressoria, primero liberan micotoxinas y enzimas dentro de las células huésped de la planta, lo cual conduce a la muerte de la célula. Sólo entonces la célula es penetrada (Shirasu K and Schulze-Lefert P (2000) Plant Mol Biol 44:371-385). Estrategias similares de infección se emplean por patógenos bacterianos tales como Erwinina carotovora (Whitehead NA *et al*. (2002) Antonie van Leeuwenhoek 81: 223-231). Una resistencia a la penetración con la ayuda de la formación de papilas no representa una estrategia eficiente de defensa.

La apoptosis, también denominada muerte celular programada, es un mecanismo esencial para mantener la homeostasis de tejido y, de esta manera, constituye un mecanismo negativamente regulador que contrarresta la división celular. En organismos multicelulares, la apoptosis es una parte natural de la ontogénesis e involucra, entre otros, el desarrollo de los órganos y la remoción de células envejecidas, infectadas o mutadas. La apoptosis permite que tenga lugar una eliminación eficiente de células indeseadas. Una interferencia o inhibición de la apoptosis contribuye a la patogénesis de un rango de enfermedades, entre otras de la carcinogénesis. Los efectores principales de la apoptosis son proteasas de cisteína específicas a aspartato, las llamadas caspasas. Estas pueden activarse por medio de, al menos, dos rutas de señales de apoptosis: primero, la activación de la familia receptora de TNF (Tumor Necrosis Factor); segundo, el papel central desempeñado por las micondrias. La activación de las rutas de señal apoptótica de las mitocondria está regulada por proteínas de la familia Bcl-2. Esta familia de proteínas consiste en proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas tales como, por ejemplo, Bax. En el caso de un estímulo apoptótico, tiene lugar un cambio conformacional alostérico de la proteína Bax sufre el cual conduce a un anclaje de la proteína en la membrana externa de la mitocondria y a su oligomerización. El resultado de estos oligómeros es que se liberan moléculas pro-

apoptóticas desde la mitocondria hacia el zitosol y estas moléculas ocasionan una cascada de señal apoptóticas y, finalmente, la degradación de sustratos celulares específicos, lo cual tiene la muerte celular como consecuencia. El inhibidor Bax 1 BI1 se aisló por su propiedad de inhibir el efecto proapoptótico de BAX (Xu Q & Reed JC (1998) Mol Cell 1(3): 337-346). BI1 representa una proteína altamente conservada. Se encuentra predominantemente como componente integral de membranas intracelulares. BI1 interactúa con bcl-2 y bcl-x1. La sobreexpresión de BI1 en células de mamíferos suprime el efecto proapoptótico de BAX, etoposido y staurosporina, pero no de antígeno Fas (Roth W and Reed JC (2002) Nat Med 8: 216-218). La inhibición de BI1 por ARN antisense, por el contrario induce apoptosis (Xu Q & Reed JC (1998) Mol Cell 1(3):337-346). Los primeros homólogos vegetales de BI1 han sido aislados de arroz y Arabidopsis (Kawai *et al*. (1999) FEBS Lett 464:143-147; Sanchez *et al* (2000) Plant J 21:393-399). Estas proteínas vegetales suprimen la muerte celular inducida por BAX en levadura. La homología de secuencia de aminoácido con BI1 es de cerca del 45%. El homólogo de Arabidopsis AtBI1 es capaz de suprimir, en vegetales recombinantes, el efecto pro-apoptótico de BAX de ratón (Kawai-Yamada *et al*. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98 (21):12295-12300). El homólogo BI1 de arroz (*Oryza sativa*) se expresa en todos los tejidos vegetales (Kawai *et al*. (1999) FEBS Lett 464: 143-147). Además, se encuentran descritos genes BI1 de cebada (*Hordeum vulgare*; GenBank Acc.-No.: AJ290421), arroz (GenBank Acc.-No.: AB025926), Arabidopsis (GenBank Acc.-No.: AB025927), tabaco (GenBank Acc.-No.: AF390556) y colza (GenBank Acc.-No.: AF390555, Bolduc N *et al*. (2003) Planta 216:377-386). La expresión de BI1 en cebada en altamente regulada como consecuencia de una infección con mildiu (Hückelhoven R *et al*. (2001) Plant Mol Biol 47(6):739-748). WO 00/26391 describe la sobreexpresión de los genes antiapoptóticos Ced-9 de *C. elegans*, sfIAP de *Spodoptera frugiperda*, bcl-2 del ser humano y bcl-xl de gallina en vegetales para elevar la resistencia frente a hongos necrotrofos o hemibiotrofos. Los homólogos de BI1 vegetales no han sido divulgados. La expresión se realiza bajo el control de promotores constitutivos. Además se describe la expresión de proteína BI1 de Arabidopsis bajo el fuerte promotor constitutivo 35S CaMV en células de arroz y una resistencia, inducida por ésta, contra las sustancias que inducen a muerte celular a partir de Magnaporthe grisea (Matsumura H *et al*. (2003) Plant J 33:425-434).

De manera sorprendente se ha encontrado en el marco de esta invención que si bien una expresión constitutiva de una proteína BI1 causa una resistencia frente a hongos necrotrofos, esto tiene como consecuencia, sin embargo, una ruptura de la resistencia mediada por mlo frente a mildiu polvoriento obligado-biotrófico (véase experimento comparativo 1). Esto cuestiona la utilidad económica de los métodos descritos en el estado de la técnica.

La tarea consistió en suministrar métodos de defensa patógena vegetal que hicieran posible una defensa efectiva contra patógenos vegetales (preferiblemente patógenos necrotrofos) sin romper ninguna resistencia existente frente a otros patógenos (tales como, por ejemplo, patógenos biotrofos). Esta tarea se resuelve mediante el método de acuerdo con la invención.

Un primer objeto de la invención se refiere a métodos para generar o incrementar la resistencia en vegetales a al menos un factor de estrés biótico o abiótico, el cual comprende los siguientes pasos:

a) incremento de la cantidad de proteína de al menos una proteína de inhibidor BAX 1 (BI1) en al menos un tejido vegetal con la condición de que la expresión en la epidermis de la hoja se mantenga esencialmente inmodificada o se reduzca, y

b) selección de los vegetales en los que, en comparación con los vegetales de partida, exista, o se incremente, una resistencia frente a al menos un factor de estrés biótico o abiótico.

El factor de estrés biótico preferido es un patógeno, preferiblemente un patógeno seleccionado del grupo de patógenos necrotrofos y hemibiotrofos.

Por epidermis, la persona técnica en la materia entiende el tejido epidermal predominante de las partes del vegetal primarias superficiales (encima de la tierra), por ejemplo del tallo, de las hojas, de las flores, frutas y semillas. Las células epidermales secretan hacia afuera una capa repelente al agua, la cutícula. Las raíces están rodeadas por rizodermis que en muchos casos se asemeja a la epidermis pero también muestra diferencias pronunciadas. La epidermis se genera de la capa más externa del meristema apical. Por el contrario, la formación de rizodermis es menos clara. Dependiendo de las especies puede considerarse, en términos de evolución, o bien como parte de la piloriza (caliptra) o bien como parte de la corteza primaria. La epidermis tiene numerosas funciones: protege la planta contra la desecación y regula la velocidad de transpiración. Protege la planta frente a las más diversas influencias químicas y físicas externas, frente a ser devorados por animales y frente al ataque de parásitos. Participa en el intercambio de gas, en la secreción de determinados productos metabólicos y en la absorción de agua. Comprende receptores para la luz y los estímulos mecánicos. De esta manera actúa como transformador de señal entre el medio ambiente y la planta. De acuerdo con sus diversas funciones, la epidermis comprende un número de células diferenciadas de manera diferente. A esto deben añadirse variantes específicas por especies y organizaciones diferentes epidérmicas en las partes individuales de una planta. Esencialmente consiste en tres categorías de células: las “propias” células de epidermis, las células de los estomas y los trichomas (del griego: trichoma, pelo), apéndices de la epidermis de forma, estructura y función diferentes. Las “propias” células de la epidermis, es decir, las menos especializadas constituyen la masa principal de las células del tejido final. Desde una vista superior, éstas son o bien poligonales (de forma plana o de plato) o alongadas. Las paredes entre ellas son frecuentemente onduladas o sinuosas. No se conoce qué induce a esta forma durante el desarrollo; las hipótesis existentes solo ofrecen explicaciones insatisfactorias para esto. Pueden encontrarse células epidérmicas alongadas en órganos o partes de órganos que son ellos mismos alongados como, por ejemplo en

los tallos, peciolos, venas de hojas y en las hojas de la mayoría de los monocotiledóneas. La parte superior e inferior de los limbos pueden cubrirse con diferentes estructuras de epidermis y es posible que pueda variar tanto la forma de las células, el grosor de las paredes como también la distribución y el número de las células especializadas (estomas y/o trichomas) por unidad de superficie. También se encuentran grandes variaciones dentro de familias individuales, por ejemplo las Crassulaceas. En la mayoría de los casos, la epidermis consiste en una capa individual aunque se han encontrado epidermis multicapas que almacenan agua en especies de varias familias (Moraceae: aquí, la mayoría de las especies de ficus, Piperaceae: peperonia [Peperonie], Begoniaceae, Malvaceae, entre otras). Sin embargo, las células epidérmicas secretan una cutícula en la parte de afuera que cubre todas las superficies epidérmicas como una película ininterrumpida. Puede ser tersa o estructurada por turgencias, cordeles, arrugas o surcos. Sin embargo, no siempre las arrugas de la cutícula, que pueden observarse al inspeccionar la superficie, son ocasionadas por la formación de cordeles cuticulares. En realidad existen casos cuando las arrugas cuticulares son tan solo la expresión de bultos subyacentes de la pared celular. Los apéndices epidérmicos de diversa forma, estructura y función se denominan trichomas y, en el presente contexto, también se entienden por el término de "epidermis". Aparecen en forma de pelos protectores, pelos de soporte y pelos de glándulas, en la forma de escamas, de diversas papilas y en las raíces como pelos absorbentes. Se forman exclusivamente por células epidérmicas. Con frecuencia, un trichoma se forma sólo por una célula así, aunque ocasionalmente más de una célula participa en dicha formación. Así mismo, bajo el término "epidermis" están comprendidas las papilas. Las papilas son protuberancias de la superficie epidérmica. El ejemplo de libro de texto son las papilas sobre las superficies de flor pensamiento (viola tricolor) así como las superficies de hojas de muchas especies en los bosques lluviosos tropicales. Confieren a la superficie una consistencia aterciopelada. Algunas células de la epidermis pueden formarse como almacenamientos de agua. Un ejemplo típico representan las células vesiculares en las superficies de muchas especies de margaritas y otras plantas suculentas. En el caso de algunas plantas, por ejemplo en flores campanilla (campanula persicifolia) las paredes externas de la epidermis se espesan como lentes.

La masa principal de todos los tejidos forma el tejido fundamental o parénquima. Los tejidos de parénquima incluyen el mesófilo que puede estar diferenciado en el parénquima de empalizada y parénquima de espuma.

Por consiguiente, la persona técnica en la materia entiende por mesófilo un tejido de parénquima. Las células de parénquima están vivas sin excepción, la mayoría isodiamétricas, rara vez alongadas. La médula de las yemas, los tejidos de almacenamiento de los frutos, las semillas, la raíz y otros órganos que se ubican bajo tierra deben considerarse así mismo como parénquimas, como el mesófilo.

El mesófilo se subdivide en las hojas de la mayoría de los helechos y fanerógamos, de manera particularmente marcada en las dicotiledóneas y muchas monocotiledóneas, en parénquimas de empalizada y de esponja. Una hoja "típica" está estructurada de manera dorsiventral. El parénquima dorsiventral se encuentra en tal caso, la mayoría de las veces, en el lado superior de la hoja, inmediatamente debajo de la epidermis. El parénquima esponjoso llena el espacio subyacente. Se intercala por un sistema intercelular voluminoso cuyo espacio gaseoso se encuentra en contacto directo con el mundo exterior por medio de las estomas. El parénquima de empalizada está compuesto de células cilíndricas alongadas. En algunas especies, las células son irregulares, ocasionalmente bifurcadas (en forma de Y: parénquima de empalizada de brazo). Tales variantes se encuentran en helechos, coníferas y unas pocas angioespermas (por ejemplo en algunas especies Ranunculaceae y Caprifoliaceae [ejemplo: saúco]). Junto a las formas de organización más ampliamente difundidas acabadas de describir, se han detectado las siguientes variantes:

parénquima de empalizada en el lado inferior de la hoja. Particularmente ostensible en las hojas escamosas. Ejemplo: la tuya (Thuja), así como en las hojas de ajo silvestre o de oso (*Allium ursinum*).

Parénquima de empalizada en ambos lados de la hoja (lado superior e inferior). Con frecuencia en plantas de lugares secos (xerophytos). Ejemplo: lechuga espinosa (*Lactuca serriola*);

parénquima de empalizada cerrada con forma de anillo: en hojas organizadas de manera cilíndrica y en las agujas de las coníferas

La variabilidad de las células de la parénquima esponjosa y la organización de parénquima esponjosa misma son incluso más variadas que aquella de la parénquima de empalizada. La mayoría de las veces se denomina tejido de aireación puesto que comprende un gran número de espacios intercelulares enlazados unos con otros. El mesófilo puede comprender el llamado tejido de asimilación, pero los términos mesófilo y tejido de asimilación son deben usarse como sinónimos. Existen hojas libres de cloroplastos cuya organización difiere sólo en menor grado de hojas verdes comparables. Como consecuencia, comprenden mesófilo, pero no tiene lugar una asimilación; viceversa, la asimilación tiene lugar en, por ejemplo, secciones del vástago. La persona técnica en la materia puede encontrar otras ayudas en la caracterización de epidermis y mesófilo, por ejemplo en v. GUTTENBERG, H.: Lehrbuch der Allgemeinen Botanik (Manual de botánica general). Berlin: Akademie-Verlag (editorial), 1955 (5. edición), HABERLANDT, G.: Physiologische Pflanzenanatomie (Anatomía fisiológica de los vegetales). Leipzig: W. Engelmann 1924 (6. Edición); TROLL, W.: Morphologie der Pflanzen (Morfología de los vegetales). Volumen 1: órganos de los vegetales. Berlin: Gebr. Borntraeger, 1937; TROLL, W.: Praktische Einführung in die Pflanzenmorphologie (Introducción práctica a la morfología de los vegetales). Jena: VEB G. Thieme Verlag (editorial) 1954/1957; TROLL, W., HÖHN, K.: Allgemeine Botanik (Botánica general). Stuttgart: F. Enke Verlag (editorial), 1973 (4. edición.).

En una modalidad la epidermis se caracteriza bioquímicamente. En una modalidad, la epidermis puede caracterizarse por la actividad de uno o más de los siguientes promotores:

- WIR5 (=GstA1), acc. X56012, Dudler & Schweizer, no publicado.

- GLP4, acc. AJ310534; Wei, Y.; Zhang, Z.; Andersen, C.H.; Schmelzer, E.; Gregersen, P.L.; Collinge, D.B.; Smedegaard-Petersen, V.; Thordal-Christensen, H. (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. Plant Molecular Biology 36, 101-112.

- GLP2a, acc. AJ237942, Schweizer, P., Christoffel, A. and Dudler, R. (1999). Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance, Plant J 20, 541-552.

- Prx7, acc. AJ003141, Kristensen BK, Ammitzböll H, Rasmussen SK & Nielsen KA. 2001. Transient expression of a vacuolar peroxidase increases susceptibility of epidermal barley cells to powdery mildew. Molecular Plant Pathology, 2(6), 311-317

- GerA, acc. AF250933; Wu S, Druka A, Horvath H, Kleinhofs A, Kannangara G & von Wettstein D, 2000. Functional characterization of seed coat-specific members of the barley germin gene family. Plant Phys Biochem 38, 685-698

- OsR0C1, acc. AP004656

- RTBV, acc. AAV62708, AAV62707; Klöti, A, Henrich C, Bieri S, He X, Chen G, Burkhardt PK, Wünn J, Lucca, P, Hohn, T, Potrykus I & Fütterer J, 1999, Upstream and downstream sequence elements determine the specificity of the rice tungro bacilliform virus promotor and influence RNA production after transcription initiation. PMB 40, 249-266

En una modalidad la epidermis se distingue porque todos los promotores mencionados son activos en el tejido o en la célula. En otra modalidad la epidermis se distingue porque sólo una parte de los promotores es activa, por ejemplo 2, 3, 5 ó 7 ó más, aunque al menos uno de los arriba enumerados.

En una modalidad el mesófilo se caracteriza bioquímicamente. El mesófilo puede distinguirse en una modalidad por la actividad de uno o más de los siguientes promotores:

- PPCZm1 (=PEPC); Kausch, A.P., Owen, T.P., Zachwieja, S.J., Flynn, A.R. and Sheen, J. (2001) Mesophill-specific, light and metabolic regulation of the C(4) PPCZm1 promotor in transgenic maize. Plant Mol. Biol. 45, 1-15

- OsrbcS, Kyozuka *et al* PlaNT Phys: 1993 102: Kyozuka J, NcElroy D, Hayakawa T, Xie Y, Wu R & Shimamoto K. 1993. Light-regulated and cell-specific expression of tomato rbcs-gusA and rice rbcs-gusA fusion genes in transgenic rice. Plant Phys 102, 991-1000

- OsPPDK, acc. AC099041, no publicado

- TaGF-2.8, acc. M63223; Schweizer, P., Christoffel, A. and Dudler, R. (1999). Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance, Plant J 20, 541-552.

- TaFBPase, acc. X53957; no publicado

- TaWIS1, acc. AF467542; US 200220115849

- HvBIS1, acc. AF467539; US 200220115849

- ZmMIS1, acc. AF467514; US 200220115849

- HvPR1a, acc. X74939; Bryngelsson *et al*. Molecular Plant-Microbe Interactions (1994)

- HvPR1b, acc. X74940; Bryngelsson *et al*. Molecular Plant-Microbe Interactions (1994)

- HvB1, 3gluc; acc. AF479647; no publicado

- HvPrx8, acc. AJ276227; Kristensen *et al* MPP 2001 (véase arriba)

- HvPAL, acc. X97313; Wei, Y.; Zhang, Z.; Andersen,C.H.; Schmelzer,E.; Gregersen, P.L.; Collinge, D.B.; Smedegaard-Petersen, V.; Thordal-Christensen,H. (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. Plant Molecular Biology 36, 101-112.

En una modalidad el mesófilo se distingue porque todos los promotores mencionados están activos en el tejido o en la célula. En otra modalidad el mesófilo se distingue porque solo una parte de los promotores es activa, por ejemplo 2, 3, 5 ó 7 o más, aunque por lo menos uno de los arriba enumerados.

En una modalidad en un vegetal usado o producido de acuerdo con la invención o en un vegetal de acuerdo con la invención en la epidermis y en el mesófilo todos los promotores mencionados son activos. En una modalidad solo una parte de los promotores mencionados son activos, por ejemplo 2, 5, 7 o más, aunque al menos uno de los promotores arriba enumerados es respectivamente activo.

En una modalidad preferida el incremento de la cantidad de proteína de la proteína BI1 se realiza de manera específica para la raíz, el tubérculo o el mesófilo, de manera particularmente preferida específica para mesófilo, por ejemplo mediante expresión recombinante de una secuencia de ácido nucleico que codifica para dicha proteína BI1 bajo el control de un promotor específico para raíz, tubérculo o mesófilo, preferiblemente bajo el control de un promotor específico para mesófilo.

En una modalidad, tal como se describe aquí, se incrementa la expresión o función de la proteína según la invención o de su BI1 en el mesófilo de un vegetal. Un incremento de la expresión puede lograrse tal como se describe abajo. Por incremento de la expresión se entiende aquí tanto la activación como el aumento de la expresión de la proteína endógena, incluyendo una expresión de novo como también un incremento o aumento mediante la expresión de una proteína o factor transgénicos.

En una modalidad particularmente preferida, el incremento de la cantidad de proteína de al menos una proteína vegetal BI1 puede combinarse con un fenotipo resistente a mlo o con la inhibición o reducción, en comparación con una planta de control, de la expresión de MLO, RacB y/o NaOx en la planta o en una parte de la misma, por ejemplo en un tejido, aunque de manera particularmente ventajosa en la epidermis o en una parte esencial de las células de la epidermis y/o con el incremento de la expresión de PEN2 y/o PEN1 en la planta, por ejemplo de manera constitutiva, o en una parte de la misma, por ejemplo en un tejido, aunque de manera particularmente ventajosa al menos en la epidermis o en una parte esencial de las células de epidermis, con la condición de que la expresión de una proteína vegetal BI1 en la epidermis de la hoja permanece esencialmente inmodificada o se reduce y de esa manera se logra una resistencia combinada contra patógenos tanto necrotróficos como también biotróficos.

El locus Mlo ha sido descrito en cebada como regulador negativo de defensa patógena. La pérdia, o pérdida de función ("loss-of-function"), del gen Mlo condiciona una resistencia elevada, no específica para raza, frente a una cantidad de aislados de mildiu (Büschges R *et al*. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjaer MF *et al*. (1995) Plant Pathol 44:786-790). El gen Mlo está descrito (Büschges R *et al*. (1997) Cell 88:695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends Plant Sci. 5:343-348). Se han aislado diversos homólogos de Mlo-Homologe de otras especies de cereales. Un fenotipo resistente a mlo puede obtenerse tal como se describe en el estado de la técnica. Los métodos en los que se usan estos genes para lograr una resistencia patógena se describen, entre otros, en WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552.

Ventajosamente, en una modalidad de la presente invención, puede inhibirse la actividad o la expresión de MLO, RacB y/o NaOx en la planta o en una parte de la misma, por ejemplo en un tejido, aunque de manera particularmente ventajosa al menos en la epidermis o en una parte esencial de las células de la epidermis o reducirse en comparación con una planta de control o una parte de la misma. Reduciendo la actividad de MLO, RacB y/o NaOx en la planta o en una parte de la misma, por ejemplo en un tejido, aunque de manera particularmente ventajosa al menos en la epidermis o en una parte esencial de las células de la epidermis, se eleva preferiblemente la resistencia o la fuerza de resistencia frente a patógenos biotróficos en las plantas producidas de acuerdo con la invención. En combinación con una reducción o supresión de la muerte celular necrótica esto es particularmente ventajoso. La actividad de MLO, RacB y/o NaOX puede reducirse o inhibirse de manera análoga a lo que se ha descrito para MLO en WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552 y las otras publicaciones mencionadas más abajo, en particular para describir la actividad e inhibición de MLO. La descripción de las publicaciones mencionadas describe proceso, métodos y modalidades particularmente preferidas para disminuir o inhibir la actividad o la función de MLO, los ejemplos indican concretamente cómo puede llevarse esto a cabo. La reducción de la actividad, opcionalmente de la expresión de RacB se describe detalladamente en la WO 2003020939. La descripción de la publicación mencionada describe procesos y métodos para disminuir o inhibir la actividad de BI-1, los ejemplos indican concretamente cómo puede llevarse a cabo esto. Particularmente se prefiere llevar a cabo la reducción o inhibición de la actividad o función de RacB según las modalidades y los ejemplos particularmente preferidos en la WO 2003020939 y los organismos allí representados como particularmente preferibles, en particular en una planta o en una parte de la misma, por ejemplo un tejido, aunque de manera particularmente ventajosa al menos en la epidermis o en una parte esencial de las células de epidermis. La reducción de la actividad, opcionalmente de la expresión de RacB se describe detalladamente en la WO 2003020939. La persona técnica en la materia encuentra en la WO 2003020939 las secuencias que codifican para proteínas de RacB y también pueden identificar RacB por medio del método puesto a disposición en la WO 2003020939. La reducción de la actividad, opcionalmente de la expresión de NaOX se describe detalladamente en la PCT/EP/03/07589. La des-

cripción del paso mencionado describe procesos y métodos para la reducción o inhibición de la actividad de NaOx, los ejemplo indican concretamente cómo puede llevarse a cabo esto. Particularmente se prefiere realizar la reducción o inhibición de la actividad de NaOx según las modalidades particularmente preferidas en la PCT/EP/03/07589 y en los ejemplos y en los organismos allí representados como particularmente preferidos, en especial en una planta o en una parte de la misma, por ejemplo en un tejido, aunque de manera particularmente ventajosa al menos en la epidermis o en una parte esencial de las células de epidermis. La persona técnica en la materia encuentra en la PCT/EP/03/07589 las secuencias que codifican para proteína NaOx y puede también identificas NaOx con el método puesto a disposición en la PCT/EP/03/07589.

Ventajosamente, en una modalidad de la presente invención puede elevarse la actividad, expresión de PEN1, PEN2 y/o SNAP34 en la planta, por ejemplo de manera constitutiva, o en una parte de la misma, por ejemplo en un tejido, aunque de manera particularmente ventajosa en la epidermis o en una parte esencial de las células de epidermis. El incremento de la actividad, que también comprende una expresión de novo, de PEN1, PEN2 y/o SNAP 34 en la planta, por ejemplo de manera constitutiva, o en una parte de la misma, por ejemplo en un tejido, aunque de manera particularmente ventajosa al menos en la epidermis o una parte esencial de las células de epidermis también elevará preferiblemente la resistencia o la fuerza de resistencia frente a los patógenos biotróficos en las plantas producidas según la invención. En combinación con una reducción o una supresión de la muerte celular necrótica, esto es particularmente ventajoso. El incremento de la actividad, opcionalmente la expresión de PEN2 está descrita detalladamente en la WO03074688. La descripción de la publicación mencionada describe procesos y métodos para la disminución o inhibición de PEN2, los ejemplos indican de manera concreta cómo se puede realizar esto. Particularmente se prefiere realizar la reducción o inhibición de la actividad o función de PEN2 según las modalidades particularmente preferidas y los ejemplos y los organismos representados en WO03074688 como particularmente preferidos, en especial en plantas, por ejemplo de manera constitutiva o en una parte de las mismas, por ejemplo en un tejido, aunque de manera particularmente ventajosa al menos en la epidermis o en una parte esencial de las células de epidermis. La persona técnica en la materia encuentra en la WO03074688 las secuencias que codifican para PEN2 y también puede identificar PEN2 con el método puesto a disposición en la WO03074688. La expresión de PEN1 y SNAP34 puede elevarse de manera análoga a los métodos descritos en la WO03074688. Con base en su conocimiento técnico general y al estado de la técnica conocido para ella, la persona técnica puede aislar y sobreexpresar secuencias de ácido nucleico y secuencias de proteína de PEN1 y SNAP34. Seq ID NO.: 39 describe la secuencia de ácido nucleico que codifica para PEN1 de cebada, la secuencia de proteína está descrita en Seq ID No.: 40. Seq ID NO.: 41 describe la secuencia de ácido nucleico que codifica para PEN1 de *Arabidopsis thaliana*, la secuencia de proteína se describe en Seq ID No.: 42. PEN1 de *Arabidopsis thaliana* se divulga bajo los (números de acceso) NM 202559 y NM 112015. El homólogo de cebada se divulga como ROR2 en números de acceso AY246907 y AY246906. Se trata de miembros de la familia bastante grande de las proteínas syntaxina. La persona técnica en la materia puede identificar de esta manera, mediante simple homología, a otras proteínas syntaxina, las cuales se expresan como genes de resistencia potenciales en el proceso de acuerdo con la invención.

Seq ID NO.: 43 describe la secuencia de ácido nucleico que codifica para SNAP34 de cebada, la secuencia de proteína está descrita en Seq ID No.: 44. El homólogo SNAP-34 de cebada también está divulgado bajo AY 247208 (SNAP-34). Se encuentran divulgados homólogos de función desconocida que pueden desempeñar un papel en la resistencia bajo AY 247209 (SNAP-28) y AY 247210 (SNAP-25). Los siguientes genes de arabidopsis muestran una homología superior con la cebada SNAP34 que las cebadas SNAP-28 o SNAP-25 con SNAP-34 y de esta manera pueden co-sobreexpresarse ventajosamente como genes potenciales que inducen resistencia:

AAM 62553 - Arabidopsis SNAP25a

NP 200929 - Arabidopsis SNAP33b

NP 172842 - Arabidopsis SNAP30

NP 196405 - Arabidopsis SNAP29

Por consiguiente, la invención también se refiere a una planta en la que, en la epidermis, se sobre-expresa al menos adicionalmente un polipéptido que se codifica por una molécula de ácido nucleico que comprende las secuencias de aminoácido mostradas en Seq. ID No.: 39, 41 o 43 o una de las secuencias mostradas en las publicaciones de banco de datos mencionadas o que comprende las secuencias mostradas en Seq. ID No.: 40, 42 o 44 o una de las secuencias mostradas en las publicaciones mencionadas de banco de datos, o que comprende un equivalente funcional de la misma o que tiene una homología de al menos 50%, preferible 70%, más preferible 80%, aún más preferible 90% o más con las secuencias nombradas al nivel de la molécula codificante de ácido nucleico o preferible a nivel de aminoácido, o una planta en la que, de manera constitutiva o en una parte, por ejemplo un tejido, aunque de manera particularmente ventajosa al menos en la epidermis o en una parte esencial de las células de epidermis, se activa el polipéptido caracterizado previamente o se eleva su actividad.

Puede efectuarse una reducción de la expresión o actividad mediante métodos corrientes para la persona técnica en la materia, por ejemplo mutagénesis, por ejemplo EMS, opcionalmente Tilling, iRNA; ribozymas, silencing, knockout, etc. En especial se describen métodos para la reducción en WO 2003020939, cuyos métodos pueden fácilmente ajustarse a las secuencias aquí descritas.

La reducción o disminución de la expresión de una proteína BI-1 o de la actividad BI-1 puede realizarse de un tipo y una forma variados.

"Reducción", "reducir", "disminución" o "disminuir" debe entenderse en el sentido amplio en conexión con una proteína BI-1 o una actividad BI-1 y comprende la prevención o bloqueo parcial o esencialmente completa de la funcionalidad de una proteína BI-1 como resultado de diferentes mecanismos biológicos de la célula. Una disminución en el sentido de la invención también comprende una reducción cuantitativa de una proteína BI-1 hasta una ausencia esencialmente completa de la proteína BI-1 (es decir, la falta de capacidad de detección de actividad de BI-1 o función de BI-1 o falta de capacidad de detección inmunológica de la proteína BI-1). En este contexto, la expresión de una determinada proteína BI-1 o de la actividad BI-1 en una célula o un organismo se reduce en más de 50%, particularmente preferible en más de 80%, muy particularmente preferible en más de 90%.

De acuerdo con la invención están comprendidas diversas estrategias para la reducción de la expresión de una proteína BI-1 o de la actividad BI-1. La persona técnica en la materia reconoce que hay disponibles una serie de diversos métodos para influir la expresión de una proteína BI-1 o la actividad de BI-1 de una manera deseada.

Una disminución de la actividad BI-1 se logra preferiblemente mediante una expresión reducida de una proteína endógena BI-1.

Una disminución de la cantidad de proteína BI-1, o de la actividad BI-1 puede realizarse usando los siguientes métodos:

a) introducción de una secuencia de aminoácido de ARN BI-1 bicatenaria (BI-1-dsRNA) o de uno o unos casetes de expresión que asegura(n) la expresión de la misma;

b) introducción de una secuencia de ácido nucleico antisense BI-1 o de un casete de expresión que garantice la expresión de la misma. Están comprendidos aquellos métodos en los que la secuencia de ácido nucleico antisense está dirigida contra un gen BI-1 (es decir, secuencias de ADN genómicas) o un transcripto de gen de BI-1 (es decir, secuencias de ARN). También están comprendidas secuencias de ácido nucleico $\alpha$-anoméricas.

c) Introducción de una secuencia de ácido nucleico antisense BI-1 combinada con una ribozima o un casete de expresión que garantice su expresión.

d) introducción de secuencias de ácido nucleico sense BI-1 para la inducción de una co-supresión o de un casete de expresión que garantice su expresión.

e) introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifique para proteína BI-1 dominante-negativa o de un casete de expresión que garantice su expresión.

f) Introducción de factores enlazantes de ADN o de proteína contra genes, ARNs o proteínas de BI-1 o un casete de expresión que asegura su expresión.

g) Introducción de las secuencia de ácido nucleico virales que provocan la degradación de ARN de BI-1 y constructos de expresión o de un casete de expresión que asegura su expresión.

h) Introducción de constructos para la inducción de una recombinación homóloga en genes endógenes de BI-1, por ejemplo para la generación de mutantes knockout.

i) Introducción de mutantes en genes endógenos de BI-1 para la generación de una pérdida de función (por ejemplo, generación de codones stop, translaciones en el marco de lectura, etc.)

y cada uno de los métodos nombrados debe ser realizado de manera específica para la epidermis; es decir, la expresión en el tejido de epidermis permanece sin modificar o se reduce. En tal caso, cada uno de esto métodos individuales puede provocar una reducción de la expresión de BI-1 o de la actividad de BI-1 en el sentido de la invención. También es concebible una aplicación combinada. Otros métodos son conocidos para la persona técnica en la materia y pueden comprender el bloqueo o prevención del procesamiento de la proteína BI-1, del transporte de la proteína BI-1 o de su mRNPr, inhibición de la adhesión a ribosomas, inhibición de empalme de ARN, inducción de una enzima que degrada ARN BI-1 y/o inhibición de la elongación o terminación de la translación.

La reducción específica para epidermis puede efectuarse, por ejemplo, mediante una aplicación transitoria de los métodos nombrados en las células de epidermis o mediante una transformación específica de esencialmente solo células de epidermis o mediante control de expresión de los constructos descritos bajo un promotor específico de epidermis u otro elemento de control específico para epidermis.

Los métodos individuales preferidos se describirán brevemente a continuación:

a) *Introducción de una molécula de ácido nucleico ARN BI-1 bicatenaria (BI-1-dsRNA)*

El método de la regulación de genes por medio de ARN bicatenario ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ha sido descrito repetidamente en organismos animales y vegetales (por ejemplo, Matzke MA *et al*. (2000) Plant Mol Biol 43: 401-415; Fire A. *et al* (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Los procesos y métodos descritos en las citas de arriba se toman expresamente como referencia. Una supresión de genes eficiente también puede mostrarse en el caso de una expresión transitoria o después de una expresión transitoria como resultado de una transformación biolística (Schweizer P *et al*. (2000) Plant J 2000 24: 895-903). Los métodos dsRNAi se basan en el fenómeno de que una introducción simultánea de una cadena y contra-cadena complementarias de un transcripto génico provoca una supresión altamente eficiente de la expresión del gen correspondiente. El fenotipo originado es muy similar a un correspondiente mutante knock-out (Waterhouse PM *et al*. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95: 13959-64). El método de dsRNAi ha demostrado se especialmente eficiente y ventajoso para reducir expresión. Tal como se describe, entre otros, en WO 99/32619, los planteamientos de dsRNAi sobrepasan de manera significativa los planteamientos antisense clásicos. Otro objeto de la invención se refiere por lo tanto a moléculas de ARN bicatenarias (moléculas de dsRNA) que provocan la reducción de una BI-1 al introducir en una planta (o en una célula derivada de la misma, un tejido, órganos, especialmente epidermis de la hoja). La molécula de ARN bicatenaria para la reducción de la expresión de una proteína BI-1 se caracteriza porque

a) una de las dos cadenas de ARN es esencialmente idéntica a al menos una parte de una secuencia de ácido nucleico BI-1, y

b) la otra cadena respectiva de ARN es esencialmente idéntica a al menos una parte de la cadena complementaria de una secuencia de ácido nucleico BI-1.

En otra modalidad preferida, la molécula de ARN bicatenaria para la reducción de la expresión de una proteína BI-1 comprende

a) una cadena de ARN "sense" que comprende al menos una secuencia de ribonucleótido que en esencia es idéntica a al menos una parte del transcripto de ARN "sense" de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína BI-1, y

b) una cadena de ARN "antisense" que es esencialmente - preferiblemente completamente - complementaria a la cadena de ARN sense de a).

Con respecto a la molécula de ARN bicatenaria, la molécula de ARN bicatenaria se refiere a una secuencia de ácido nucleico BI-1, preferible a una secuencia según SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 ó 38 o un equivalente funcional de las mismas.

"Esencialmente idéntico" significa que la secuencia de dsRNA también puede presentar inserciones, deleciones, así como mutaciones individuales puntuales en comparación con la secuencia destino BI-1 y, no obstante, provocar una reducción eficiente de la expresión. Según la definición de arriba, la homología es preferiblemente de al menos 50% ó 75%, preferible de al menos 80%, muy particularmente preferible de al menos 90%, lo más preferible 100% entre la cadena "sense" de un dsARN inhibitorio y un segmento parcial de una secuencia de ácido nucleico BI-1 (o entre la cadena "antisense" de la cadena complementaria de una secuencia de ácido nucleico BI-1). La longitud del segmento parcial es de al menos 10 bases, preferiblemente de al menos 256 bases, particularmente preferible de al menos 50 bases, muy particularmente preferible de al menos 100 bases, lo más preferible de al menos 200 bases o al menos 300 bases. De manera alternativa, un dsARN "esencialmente idéntico" también puede definirse como secuencia de ácido nucleico que es capaz de hibridar con una parte de un transcripto génico BI-1 (por ejemplo en NaCl de 400 mM, PIPES de 40 mM, pH 6,4, EDTA de 1 mM a 50ºC o 70ºC durante 12 a 16 h).

"Esencialmente complementario" significa que la cadena de ARN antisense también puede presentar inserciones, deleciones, así como mutaciones individuales de punto en comparación con el complemento de la cadena de ARN "sense". La homología es preferiblemente de al menos 80%, preferiblemente de al menos de 90%, muy particularmente preferible de al menos 95%, lo más preferible 100% entre la cadena de ARN "antisense" y el complemento de la cadena de ARN "sense".

"Parte del trancripto "sense"de ARN" de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína BI-1 o un equivalente funcional de la misma significan fragmentos de un ARN o mARN transcrito de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína BI-1 o un equivalente funcionales de la misma, preferible de un gen BI-1. En tal caso los fragmentos tienen preferiblemente una longitud de secuencia de al menos 20 bases, preferiblemente de al menos 50 bases, particularmente preferible de al menos 100 bases, muy particularmente preferible de al menos 200 bases, lo más preferible de al menos 500 bases. También está comprendido ARN o mARN totalmente transcrito. También está comprendido el uso de las moléculas de dsARN de acuerdo con la invención en los procesos de la invención para la generación de una resistencia patógena en las plantas. EL dsARN puede componerse de una o más cadenas de ribonucleótidos polimerizados. Además, pueden estar presentes modificaciones tanto de la estructura de

azúcar -fosfato como también de los nucleósidos. Por ejemplo, los compuestos fosforo-diestéricos del ARN natural pueden estar modificados en tal sentido que comprendan al menos un heteroátomo de nitrógeno o de azufre.

Las bases pueden modificarse de tal manera que se restrinja la actividad de adenosindeaminasa, por ejemplo. Tales y otras modificaciones se describen más aún en lo sucesivo en el método para estabilizar ARN-antisense. Para lograr el mismo propósito, por supuesto también pueden introducirse a las células o al organismo varias moléculas individuales de dsARN que comprenden respectivamente uno de los fragmentos de secuencia de ribonucleotido arriba definidos.

El dsARN puede prepararse de manera enzemática o por síntesis química, total o parcialmente.

La estructura bicatenaria de dsARN puede formarse a partir de dos cadenas de ARN complementarias, separadas o, preferiblemente, a partir de una cadena individual de ARN auto-complementaria. La estructura bicatenaria puede formarse a partir de una cadena individual auto complementaria o a partir de dos cadenas complementarias. En el caso de una cadena individual autocomplementaria, pueden ligarse una secuencia "sense" y una "antisense" por medio de una secuencia enlazante ("linker") y formar, por ejemplo, una estructura de horquilla para pelo. La secuencia enlazante puede ser un intron que se empalma hacia afuera después de la síntesis del dsARN. La secuencia de ácido nucleico que codifica para un dsRNA puede contener otros elementos como, por ejemplo, señales de terminación de transcripción o señales de poliadenilación. Si las dos cadenas del dsARN deben combinarse en una célula o planta, esto puede suceder de maneras diferentes:

La secuencia de ácido nucleico que codifica para un dsRNA puede contener otros elementos, como por ejemplo señales de terminación de transcripción o señales de poliadenilación.

Si las dos cadenas del dsRNA deben combinarse en una célula o una planta, esto puede suceder de diferentes maneras:

a) Transformación de la célula o planta con un vector que comprende ambos casetes de expresión,

b) Cotransformación de la célula o de la planta con dos vectores donde uno comprende los casetes de expresión con la cadena "sense", el otro comprende los casetes de expresión con la cadena "antisense".

c) Cruce de dos plantas que han sido transformadas respectivamente con un vector donde uno comprende los casetes de expresión con la cadena "sense" y el otro comprende los casetes de expresión con la cadena "antisense".

La formación del dúplex ARN puede iniciarse o bien fuera de la célula o bien dentro de la misma. Como en la WO 99/53050, el dsRNA también puede comprender una estructura de horquilla de pelo enlazándose las cadenas "sense" y "antisense" mediante un "linker" (por ejemplo un intron). Las estructuras de dsARN autocomplementarias se prefieren por cuanto solo requieren la expresión de un constructo y siempre comprenden las cadenas complementarias en una proporción de equimolar.

Los casetes de expresión que codifican para la cadena "antisense" o "sense" de un dsRNA o para la cadena auto-complementaria del dsARN se insertan preferiblemente a un vector y se insertan establemente en el genoma de una planta con el método descrito abajo (usando, por ejemplo, marcadores de selección) bajo el control de un promotor específico para epidermis tal como se ilustra en la presente, con el fin de asegurar una expresión duradera del dsARN en la epidermis. El dsARN puede introducirse usando una cantidad que haga posible al menos una copia por célula. Cantidades superiores (por ejemplo, al menos 5, 10, 100, 500 o 1000 copias por célula) pueden opcionalmente provocar una reducción eficiente.

Como ya se ha descrito, una identidad de secuencia del 100% entre dsARN y un transcripto génico BI-1 o el transcripto génico de un gen funcional equivalente no es obligatoriamente necesario para provocar una reducción eficiente de la expresión de BI-1. Por lo tanto, la ventaja consiste en que el método es tolerante frente a desviaciones de secuencia, como pueden presentarse a causa de mutaciones genéticas, polimorfismos o divergencias evolutivas. Así, es posible que con el dsRNA, que ha sido generado a partir de la secuencia de BI-1 de un organismo, que se suprima la expresión de BI-1 en el otro organismo. La alta homología de secuencia entre las secuencias BI-1 de arroz, maíz y cebada permite concluir que esta proteína se conserva en un alto grado dentro de las plantas de modo que la expresión de un dsARN derivado de una de las secuencias divulgadas de BI-1 tal como se muestra en SEQ ID No: 1, 3 ó 5 parezca tener también un efecto ventajoso en otras especies de plantas. También es posible que debido a la alta homología entre las proteínas BI-1 y sus equivalentes funcionales con un único dsARN que se haya generado a partir de una secuencia BI-1 determinada de un organismo, se suprima la expresión de otras proteínas BI-1 homólogas y/o sus equivalentes funcionales del mismo organismo aunque también la expresión de proteínas BI-1 en otros tipos similares.

Para este propósito el dsARN comprende preferiblemente la región de secuencia de transcriptos génicos BI-1 que corresponden a las regiones conservadas. Dichas regiones conservadas pueden fácilmente derivarse de comparaciones de secuencias. El dsARN puede sintetizarse o bien *in vivo*, o *in vitro*. Para esto, puede introducirse una secuencia de ADN que codifica para un dsARN en un casete de expresión bajo control de al menos un elemento genético de control (como, por ejemplo, promotor, enhancer, silencer, donador o aceptador splice (de empalme)); se desea una ex-

presión específica de epidermis del dsARN. De manera correspondiente, abajo se siguen describiendo construcciones ventajosas. No se requiere poliadenilación ni tampoco deben estar presentes elementos para iniciar una translación.

Un dsARN puede sintetizarse química o enzimáticamente. Para este propósito pueden usarse polimerasas celulares de ARN o polimerasas bacteriófagas de ARN (como, por ejemplo, polimerasa de ARN T3, T7 o SP6). Se describen métodos correspondientes para la expresión *in vitro* de ARN (WO 97/32016; US 5,593,874; US 5,698,425, US 5,712,135, US 5,789,214, US 5,804,693). Un dsARN sintetizado *in vitro* química o enzimáticamente puede purificarse total o parcialmente antes de la introducción a una célula, tejido u organismo, por ejemplo mediante extracción, precipitación, electroforesis, cromatografía o combinaciones de estos métodos. El dsARN puede introducirse directamente a la célula o también puede aplicarse extracelularmente (por ejemplo, en el espacio intersticial). Aunque preferiblemente se transforma la planta de manera estable con una construcción de expresión que realiza la expresión del dsARN en la epidermis. Debajo se siguen describiendo los métodos correspondientes.

b) *Introducción de una molécula de ácido nucleico BI-1 antisense*

Los métodos para la supresión de una proteína específica mediante la prevención de la acumulación de su mARN por tecnología "antisense", también en plantas, se describen copiosamente (Sheehy *et al*. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN *et al*. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). La molécula de ácido nucleico antisense hibrida o enlaza con el mARN celular y/o ADN genómico que codifica para la proteína destino BI-1 a suprimirse. De esta manera se suprime la transcripción y/o translación de la proteína destino. La hibridación puede originarse de manera convencional por la formación de un dúplex estable o - en el caso de ADN genómico - por el enlace de la molécula de ácido nucleico anti-sense con el dúplex del ADN genómico mediante interacción específica en el gran surco de la hélice de ADN. La introducción se efectúa de tal manera que se reduce la cantidad o función específicamente en la epidermis, por ejemplo mediante transformación transitoria de la epidermis o transformación estable bajo control de la expresión de una construcción correspondiente con un promotor específico de epidermis. Una secuencia de ácido nucleico antisense adecuada para la reducción de una proteína BI-1 puede derivarse usando la secuencia de ácido nucleico que codifica para esta proteína, por ejemplo la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 o 38 o que codifica para un equivalente funcional del mismo según las reglas de pares de bases de Watson y Crick. La secuencia de ácido nucleico antisense puede ser complementaria a todo el mARN transcrito de la dicha proteína, limitarse a la región codificante o componerse solo de un oligonucleótido, que es complementario parcialmente a la secuencia codificante o no codificante del mARN. Así, el oligonucleótido puede ser complementario, por ejemplo, a la región que comprende el inicio de traslación para la proteína dicha. Las secuencias de ácido nucleico antisense pueden tener, por ejemplo, una longitud de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos, pero también pueden ser más largas y comprender al menos 100, 200, 500, 1000, 2000 o 5000 nucleótidos. Las secuencias de ácido nucleico antisense pueden expresarse de manera recombinante o sintetizarse química o enzimáticamente usando métodos conocidos por la persona técnica en la materia. En la síntesis química pueden usarse nucleótidos naturales o modificados. Los nucleótidos modificados pueden dar una estabilidad bioquímica elevada a la secuencia de ácido nucleico antisense y conducir a una estabilidad física elevada del dúplex formado a partir de secuencia de ácido nucleico antisense y secuencia destino de ácido nucleico sense. Pueden usarse, por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos acridina-sustituidos tales como 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxilmetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, $\beta$-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, $\beta$-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosine, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, 5-metil-2-tiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo y 2,6-diaminopurina. En otra modalidad preferida, la expresión de una proteína BI-1 puede inhibirse por secuencias de nucleótidos que son complementarias a la región regulatoria de un gen BI-1 (por ejemplo, a un promotor BI-1 y/o enhancer) y forman estructuras de triple hélice con el ADN de hélice doble de allí, de tal modo que se reduce la transcripción del gen BI-1. Se describen métodos correspondientes (Helene C (1991) Anticancer Drug Res 6(6):569-84; Helene C *et al*. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12): 807-815). En otra modalidad la molécula de ácido nucleico puede ser un ácido nucleico $\alpha$-anomérico. Moléculas de ácido nucleico $\alpha$-anomérico de tal tipo forman híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en los cuales las dos cadenas corren paralelas una hacia a la otra, a diferencia de los ácidos $\beta$-nucleicos convencionales. (Gautier C *et al*. (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641). La molécula antisense de ácido nucleico también puede contener además 2'-O-metilribonucleótidos (Inoue *et al*. (1987) Nucleic Acids Res 15:6131-6148) o análogos quiméricos de ARN-ADN (Inoue *et al*. (1987) FEBS Lett 215:327-330).

c) *Introducción de una molécula antisense de ácido nucleico BI-1 combinada con una ribozima*

La estrategia antisense arriba descrita puede acoplarse ventajosamente con un método de ribozima. Las moléculas de ARN catalíticas o ribozimas pueden ajustarse a cualquier ARN destino y partir el esqueleto del fosfodiéster en posiciones específicas, por lo cual el ARN destino se desactiva funcionalmente (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). El ribozima no se modifica por sí mismo de esta manera sino que es capaz de partir otras moléculas de ARN destino de manera análoga, por lo cual obtiene las propiedades de una enzima. La incorporación de secuencias de ribozima en ARNs "antisense" les confiere a estos ARNs "antisense" esta propiedad enzimática que parte ARN y aumenta así su eficiencia en la inactivación del ARN destino. La preparación y uso de moléculas correspondiente de

ribozima - ARN "antisense" se describe, por ejemplo en Haseloff *et al*. (1988) Nature 334: 585-591. De este modo los ribozimas (por ejemplo, ribozimas "Hammerhead" (cabeza de martillo); Haselhoff y Gerlach (1988) Nature 334:585-591) pueden usarse para partir el mARN de una enzima a suprimirse - por ejemplo de manera catalítica BI-1 e impedir la traslación. La tecnología de ribozima puede elevar la eficiencia de una estrategia antisense. En EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257 se describen métodos para la expresión de ribozomas para la reducción de determinadas proteínas. En células vegetales también se describe una expresión de ribozima (Steinecke P *et al*. (1992) EMBO J 11 (4):1525-1530; de Feyter R *et al*. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Secuencias destino y ribozimas adecuadas pueden determinarse, por ejemplo, tal como se describe en "Steinecke P, Ribozyme, Methods in Cell Biology 50, Galbraith *et al*. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460", mediante cálculos estructurales secundarios de ARN de ribozima y destino, así como su interacción (Bailey CC *et al*. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW *et al*. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). A manera de ejemplo pueden construirse derivados de la tetrahimena L-19 IVS RNA que presentan regiones complementarias al mARN de la proteína BI-1 a suprimirse (véase también US 4,987,071 y US 5,116,742). De manera alterna, tales ribozimas también pueden identificarse por un proceso de selección a partir de una biblioteca de diversos ribozimas (Bartel D y Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418). La expresión se realiza, por ejemplo, bajo el control de un promotor específico de epidermis.

d) *Introducción de una molécula de ácido nucleico sense BI-1 para la inducción de una co-supresión*

La expresión específica de epidermis de una molécula de ácido nucleico BI-1 en orientación sense puede conducir a una co-supresión del gen endógeno homólogo correspondiente en las células de epidermis. La expresión de ARN sense con homología hacia un gen endógeno puede reducir o eliminar la expresión del mismo de manera similar a como se ha descrito para planteamientos antisense (Jorgensen *et al*. (1996) Plant Mol Biol 31(5):957-973; Goring *et al*. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith *et al*. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli *et al*. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol *et al*. (1990) Plant Cell 2:291-99). En tal caso, la construcción introducida puede representar total o sólo parcialmente al gen a reducir. La posibilidad de traslación no es indispensable. La aplicación de esta tecnología en plantas se describe, por ejemplo, en Napoli *et al*. (1990) The Plant Cell 2: 279-289 y en US 5,034,323. Se prefiere la co-supresión usando una secuencia que es esencialmente idéntica a al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína BI-1 o un equivalente funcional de la misma, a manera de ejemplo de la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 o 38 o de la secuencia de ácido nucleico que codifica para un equivalente funcional de la misma.

e) *Introducción de moléculas de ácido nucleico que codifican para una proteína BI-1 dominante-negativa*

La función o actividad de una proteína BI-1 también puede reducirse de manera efectiva mediante expresión epidermis - específica de una variante dominante negativa de esta proteína BI-1 en células de epidermis. Para la persona técnica en la materia son conocidos los métodos para reducción de la función o de la actividad de una proteína mediante la co-expresión de su forma dominante - negativa (Lagna G y Hemmati-Brivanlou A (1998) Current Topics in Developmental Biology 36:75-98; Perlmutter RM y Alberola-Ila J (1996) Current Opinion in Immunology 8(2):285-90; Sheppard D (1994) American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology. 11(1):1-6; Herskowitz I (1987) Nature 329(6136):219-22). El aminoácido a mutarse preferiblemente en homólogos BI-1 de otros tipos puede determinarse, por ejemplo, mediante comparación apoyada en ordenador ("alignment"). Estas mutaciones para alcanzar una variante BI-1 dominante-negativa se llevan a cabo, preferiblemente, al nivel de la secuencia de ácido nucleico que codifica para proteínas BI-1. Una mutación correspondiente puede realizarse por ejemplo mediante mutagénesis *in vitro* determinada por PCR usando primer de oligonucleótido a través del cual se introduce la mutación deseada. Para este propósito se usan métodos corrientes para la persona versada en la materia. Por ejemplo, para este propósito puede usarse el "LA PCR *in vitro* Mutagenesis Kit" (Takara Shuzo, Kyoto). Un método para la preparación de una variante dominante-negativa de una proteína RacB-Proteins de maíz se describe también en WO 00/15815 (ejemplo 4, pág. 69). La expresión de un mutante así puede realizarse entonces, por ejemplo, bajo el control de un promotor específico de epidermis.

f) *Introducción de factores enlazantes de ADN o proteína frente a genes BI-1, ARNs BI-1 o proteínas BI-1*

También es posible una reducción de una expresión de gen BI-1 en la epidermis con factores específicos que enlazan ADN, por ejemplo con factores del tipo de factores de transcripción de dedo de cinc. Estos factores se alojan en la secuencia genómica del gen endógeno de destino, preferible en las regiones regulatorias y provocan una represión del gen endógeno. El uso de un método así hace posible la reducción de la expresión de un gen endógeno BI-1 sin que su secuencia deba manipularse mediante ingeniería genética. Los métodos correspondientes para la preparación de los factores correspondientes se han descrito (Dreier B *et al*. (2001) J Biol Chem 276(31):29466-78; Dreier B *et al*. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR *et al*. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR *et al*. (2000) J Biol Chem 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR *et al*. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95 (25): 14628- 14633; Kim JS *et al*. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94 (8):3616 -3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293 (2):215-218; Tsai SY *et al*. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK *et al*. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD *et al*. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L *et al*. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).

La selección de estos factores puede realizarse usando cualquier porción deseada de un gen BI-1. Este segmento se localiza preferiblemente en la región de promotor. Para supresión de gen, sin embargo, también puede estar en

la región de los exones o intrones que codifican. Los segmentos correspondientes pueden obtenerse por parte de la persona técnica en la materia por medio de búsqueda en el banco de datos o del banco génico o a partir de un cADN BI-1 cuyo gen no está presente en el banco de genes, mediante inspección sistemática de una biblioteca genómica para hallar clones genómicos correspondientes. Los métodos requeridos para este propósito son corrientes para la persona técnica, por ejemplo estos factores pueden expresarse bajo el control de un promotor epidermis-específico u otros factores que median en la expresión epidermis-específico. Además, es posible introducir a la célula factores que inhiben la célula BI-1 de destino misma. Los factores que enlazan proteína pueden ser, por ejemplo, aptámeros (Famulok M y Mayer G (1999) Curr Top Microbiol Immunol 243:123-36) o anticuerpos o fragmentos de anticuerpos o anticuerpos de cadena única. La obtención de estos factores está descrita y son conocidos por la persona técnica en la materia. Por ejemplo, se empleó un anticuerpo scFv citoplasmático para modular la actividad de la proteína fitocroma A en plantas de tabaco modificadas (Owen M *et al*. (1992) Biotechnology (N Y) 10(7):790-794; Franken E *et al*. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; Whitelam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).

La expresión del gen también puede suprimirse mediante compuestos sintéticos de bajo peso molecular, diseñados a la medida, como por ejemplo del tipo poliamida (Dervan PB y Bürli RW (1999) Current Opinion in Chemical Biology 3:688-693; Gottesfeld JM *et al*. (2000) Gene Expr 9(1-2):77-91). Estos oligómeros se componen de unidades estructurales de 3-(dimetilamino)-propilamina, N-metil-3-hidroxipirrol, N-metilimidazol y N-metilpirroles y pueden ajustarse a cada pieza del ADN bicatenario de modo que se enlacen en secuencia específica con el gran surco y bloqueen la expresión de las secuencias génicas de allí. Se describen métodos correspondientes (véanse, entre otros, Bremer RE *et al*. (2001) Bioorg Med Chem. 9(8):2093-103; Ansari AZ *et al*. (2001) Chem Biol. 8(6):583-92; Gottesfeld JM *et al*. (2001) J Mol Biol. 309(3):615-29; Wurtz NR *et al*. (2001) Org Lett 3(8):1201-3; Wang CC *et al*. (2001) Bioorg Med Chem 9(3): 653-7; Urbach AR y Dervan PB (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(8):4343-8; Chiang SY *et al*. (2000) J Biol Chem. 275(32):24246-54).

Todos los factores mencionados se introducen de manera específica a la epidermis para asegurar una reducción de la actividad BI-1sólo en las células de epidermis, por ejemplo mediante la expresión bajo el control de un promotor específico de epidermis, tal como se nombran arriba, por ejemplo.

g) *Introducción de moléculas de ácido nucleico virales que provocan la descomposición de ARN BI-1, y de los constructos de expresión correspondientes*

La expresión BI-1 en la epidermis también puede realizarse efectivamente mediante inducción de la descomposición específica de ARN BI-1 en las células de epidermis con ayuda de un sistema viral de expresión (Amplikon) (Angell, SM *et al*. (1999) Plant J. 20(3): 357-362). Estos sistemas - denominados también como “VIGS” (viral induced gene silencing) - introducen a la planta moléculas de ácido nucleico con homología hacia los transcriptos a suprimirse por medio de vectores virales. La transcripción se interrumpe luego, supuestamente mediada por mecanismos de defensa de la planta contra virus. Se describen técnicas y métodos correspondientes (Ratcliff F *et al*. (2001) Plant J 25(2): 237-45; Fagard M y Vaucheret H (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R *et al*. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) Plant Cell 10(6): 937-46).

h) *Introducción de constructos para la inducción de una recombinación homóloga en genes endógenos BI-1, por ejemplo para originar mutantes knock-out*

Para la producción de un organismo recombinante homólogo con actividad BI-1 reducida en las células de epidermis se utiliza, por ejemplo, un constructo de ácido nucleico que contiene al menos una parte de un gen BI-1 endógeno, el cual se modifica por una deleción, adición o sustitución de al menos un nucleótido, de tal modo que reduzca la funcionalidad o se anule totalmente. La modificación también puede referirse a elementos regulatorios (por ejemplo, al promotor) del gen, de tal modo que quede sin modificar la secuencia codificante, aunque no tenga lugar una expresión (transcripción y/o traslación) y se reduzca. En la recombinación homóloga convencional, la región modificada se flanquea en sus extremos 5’ y 3’ con otras secuencias de ácidos nucleicos que deben tener una longitud suficiente para hacer posible la recombinación. La longitud se encuentra normalmente en un rango de algunos cientos de bases hasta varios kilobases (Thomas KR y Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp *et al*. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):43368-4373). Para la recombinación homóloga se transforma el organismo huésped, por ejemplo una planta, con el constructo de recombinación usando los métodos descritos abajo y se seleccionan exitosamente los clones recombinados usando, por ejemplo, una resistencia a antibióticos o a herbicidas.

La recombinación homóloga es un evento relativamente raro en las eucariotas superiores, especialmente en las plantas. Predominan las integraciones casuales con el genoma huésped. Una posibilidad de eliminar las secuencias integradas casualmente y así incrementar el número de clones de célula con una recombinación homóloga correcta es el uso de un sistema de recombinación específico de secuencia tal como se describe en US 6,110,736, por el cual pueden volverse a deletar secuencias integradas de manera no específica, lo cual facilita la selección de eventos que se han integrado exitosamente. Puede usarse un gran número de sistemas de recombinación secuencia-específica; como ejemplos se mencionan el sistema Cre/lox del bacteriofago P1, el sistema FLP/FRT de la levadura, la recombinasa Gin del fago Mu, la recombinasa Pin de *E. coli* y el sistema R/RS del plásmido pSR1. Se prefieren los sistemas de bacteriófagos P1 Cre/lox y de levadura FLP/FRT. Los sistemas recombinantes FLP/FRT y cre/lox se habían aplicado ya en sistemas vegetales (Odell *et al*. (1990) Mol Gen Genet 223: 369-378). La recombinación específica de epidermis puede asegurarse, por ejemplo, por el hecho de que la expresión de los sistemas y enzimas que inducen la recombinación se realiza bajo control de un promotor específico de epidermis.

i) *Introducción de mutaciones en genes BI-1 endógenos para generar una pérdida de función (por ejemplo, generación de stop-codón, desplazamientos en la trama de lectura, etc.)*

Otros métodos adecuados para la reducción de la actividad BI-1 son introducir mutaciones nonsense en genes BI-1 endógenos, por ejemplo mediante la introducción de oligonucleótidos ARN/ADN en las células de epidermis (Zhu *et al*. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) así como la generación de mutantes de knock-out con ayuda de, por ejemplo, mutagénesis TADN (Koncz *et al*. (1992) Plant Mol Biol 20(5):963-976), mutagénesis de ENU-(N-etil-N-nitrosourea) o recombinación homóloga (Hohn B y Puchta (1999) H Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323.). También pueden generarse mutaciones puntuales por medio de híbridos de ADN-ARN, los cuales se conocen también como "chimeraplasty" (Cole-Strauss *et al*. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3): 240-247).

Los métodos de dsARNi, de la co-supresión mediante ARN sense y de "VIGS" ("virus induced gene silencing") también se denomina como "post-transcriptional gene silencing" (PTGS). Los métodos de PTGS, como también la reducción de la función BI-1 o actividad con variantes BI-1 dominante-negativa, son especialmente ventajosas porque los requerimientos de homología entre el gen endógeno a suprimirse y la secuencia de ácido nucleico sense o de dsARN expresada transgénicamente (o bien entre el gen endógeno y su variante dominante -negativa) son más bajos que, por ejemplo, en un planteamiento antisense. En la descripción del método dsARNI se mencionan criterios de homología correspondientes y en general pueden aplicarse a métodos de PTGS o a planteamientos dominantes-negativos. Así, usando las secuencias de ácido nucleico BI-1, probablemente también es posible suprimir de manera efectiva la expresión de proteínas BI-1 homólogas en otras especies sin que sean necesarios obligatoriamente el aislamiento y elucidación de la estructura de los homólogos BI-1 existentes. Esto aligera considerablemente el trabajo empleado. De manera análoga probablemente también pueden reducirse o suprimirse de manera efectiva la función/actividad de su homólogo en otras especies de vegetales usando variantes dominantes-negativas de una proteína BI-1.

Todas las sustancias y compuestos que provocan, directa o indirectamente, una reducción de la cantidad de proteína, cantidad de ARN, actividad de gen o actividad de proteína de una proteína BI-1, estarían comprendidos por consiguiente bajo la denominación de compuestos "anti-BI-1". El término compuesto "anti-BI-1" incluye explícitamente las secuencias de ácido nucleico, péptidos, proteínas u otros factores empleados en los métodos arriba descritos.

En el marco de la invención, "introducción" comprende todos los métodos que son adecuados para introducir, directa o indirectamente, un compuesto "anti-BI-1" en la epidermis o una parte esencial de las células de epidermis, el compartimiento o tejido de la misma o generarlo allí. Están comprendidos métodos directos e indirectos. La introducción puede conducir a una presencia temporal (transitoria) de un compuesto "anti-BI-1" (por ejemplo, de un dsARN) o también a una duradera (estable).

Según la diferente naturaleza de los planteamientos arriba descritos, el compuesto "anti-BI-1" puede ejercer su función directamente (por ejemplo, mediante inserción en un gen BI-1 endógeno). Pero la función también puede ejercerse indirectamente después de la transcripción en un ARN (por ejemplo, en planteamientos antisense) o después de transcripción y traslación en una proteína (por ejemplo, en factores de enlace). De acuerdo con la invención, también están comprendidos compuestos que actúan "anti-BI-1" tanto directamente como indirectamente.

Introducir comprende, por ejemplo, métodos tales como transfección, transducción o transformación.

El término compuestos "anti-BI-1" también comprende de esta manera, por ejemplo, constructos recombinantes que ocasionan una expresión (es decir, transcripción y opcionalmente traslación), por ejemplo de un dsRNA BI-1 o de una ARN "antisense" BI-1 específico para epidermis.

En dichos constructos de expresión se encuentra una molécula de ácido nucleico cuya expresión (transcripción y opcionalmente traslación) genera un compuesto "anti-BI-1", preferible en conexión funcional con al menos un elemento de control genético (por ejemplo, un promotor), que asegura una expresión en una organismo, preferiblemente en plantas, preferentemente epidermis-específico. Si el constructo de expresión debe introducirse en la planta y el compuesto "anti-BI-1" (por ejemplo, el asARN BI-1) debe generarse allí en plantas, entonces se prefieren los elementos de control genéticos específicos para plantas (por ejemplo, promotores); como resultado de lo dicho previamente, la actividad específica para epidermis del promotor es obligatoria en la mayoría de modalidades para una reducción específica para epidermis de BI-1, tal como se describió arriba. Aunque el compuesto "anti-BI-1" también puede generarse en otros organismos o *in vitro* e introducirse después en la planta. En estas se prefieren todos los elementos de control genéticos procarióticos o eucarióticos (por ejemplo, promotores) que permiten la expresión en el organismo seleccionado respectivamente para la preparación.

Por conexión funcional se entiende, por ejemplo, la disposición secuencial de un promotor con la secuencia de ácido nucleico a expresar (por ejemplo, de un compuesto "anti-BI-1") y opcionalmente de otros elementos regulatorios, como por ejemplo un terminados de tal modo que cada elemento regulatorio pueda desempeñar su función en la expresión transgénica de la secuencia de ácido nucleico, según la disposición de las secuencias de ácido nucleico en relación con ARN sense o antisense. Para este propósito no es obligatorio un enlace directo en el sentido químico. Las secuencias genéticas de control, como por ejemplo secuencias - enhancer, también pueden desempeñar su función sobre la secuencia destino desde otras posiciones alejadas o incluso desde otras moléculas de ADN (translocalización cis o trans). Se prefieren disposiciones en las que la secuencia a expresarse transgénicamente se posiciona detrás de

la secuencia que actúa como promotor de modo que ambas secuencias se enlazan una a otra de manera covalente. En tal caso se prefiere que la distancia entre la secuencia de promotor y la secuencia de ácido nucleico a expresarse de manera transgénica sea menor que 300 pares de bases, particularmente preferible menor que 100 pares de bases, muy particularmente menos que 50 pares de bases.

La preparación de una conexión funcional como también la preparación de un casete de expresión puede realizarse por medio de técnicas corrientes de recombinación y clonación, tal como se describen, por ejemplo, en Maniatis T, Fritsch EF y Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML y Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM *et al*. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience y bei Gelvin *et al*. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual. No obstante, entre ambas secuencias también pueden posicionarse otras secuencias que tienen, por ejemplo, la función de un linker (enlazador) con intersecciones determinadas de enzima de restricción o la de un péptido de señal. La inserción de secuencias también puede conducir a la expresión de proteínas de fusión. El casete de expresión, que se compone de una conexión de promotor y de secuencia de ácido nuclecio a expresar, puede estar presente preferiblemente integrado en un vector e insertarse en un genoma vegetal a través de transformación, por ejemplo. Los elementos de control facilitan preferiblemente una expresión específica para epidermis.

Los métodos arriba mencionados (a) hasta (i) también pueden aplicarse para la reducción de la actividad o función, en especial de la expresión, de las otras proteínas aquí nombradas, en especial para la reducción de MLO, RacB y NaOx.

La proteína BI1 de cebada (hvBI1) se expresa de manera predominante en el mesófilo (Ejemplo 6) y se regula de modo superior a causa de una infección con *Blumeria (syn. Erysiphe) graminis f. sp.hordei hochreguliert* (ejemplo 2). La sobreexpresión recombinante específica para mesófilo en cebada resistente a mlo conduce, junto a la resistencia contra patógenos particularmente necrotóficos y hemibiotróficos, hacia una planta resistente a la *Blumeria (syn. Erysiphe) graminis f. sp.hordei*, la cual no muestra manchas necróticas ("manchas-mlo"; efectos laterales negativos de la resistencia a mlo). Utilizando este efecto, los efectos secundarios negativos de la resistencia proporcionada por mlo (pérdida de cosecha de aproximadamente 5%, Jörgensen JH (1992) Euphitica 63: 141-152); Hipersusceptibilidad frente a hongos necrotróficos, Jarosch B *et al*. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J *et al*. (2001) Phitopathology 91:127-133) pueden suprimirse sin afectar adversamente la resistencia misma al mlo.

Más aún, puede demostrarse de manera sorprendente que una sobreexpresión de BI1 da lugar a resistencia frente a factores de estrés como los agentes que provocan necrosis (aislados por ejemplo de hongos patógenos necrotróficos; ejemplo 2).

El método de acuerdo con la invención ofrece, por consiguiente, una estrategia biotecnológica eficiente para la resistencia a la formación de necrosis como resultado de estrés endógeno, abiótico y biótico, por ejemplo manchas de mlo, daños por ozono, organismos dañinos necrotróficos y hemibiotróficos.

Las proteínas BI1 parecen ser reguladores cruciales de la resistencia fúngica no específica para raza en plantas. Esto hace posible una amplia capacidad de aplicación en estrategias biotecnológicas para elevar la resistencia a patógenos en plantas, en especial la resistencia a hongos. Por principio, el método de acuerdo con la invención puede aplicarse a a todas la especies vegetales. Proteínas BI1 han sido identificadas en numerosas plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (véase arriba).

En el marco de esta invención "aproximadamente" significa en referencia a números o tamaños un rango de números o tamaños alrededor del valor enunciado del número o tamaño. En general, el término aproximadamente significa un rango respectivo de 20% por encima o por debajo del valor enunciado.

En el marco de la invención, el término "planta" significa todos los géneros y especies de vegetales superiores e inferiores del reino vegetal. El término incluye las plantas maduras, semillas, brotes y embriones (plántulas), así como las partes derivadas de los mismos, material de reproducción, órganos de la planta, tejidos, protoplastos, callos y otros cultivos, por ejemplo cultivos celulares, y otros tipos de agrupaciones de células vegetales para dar unidades funcionales o estructurales. El término plantas maduras se refiere a plantas en cualquier etapa deseada de desarrollo más allá de la de los brotes. Los brotes se refieren a una planta joven inmadura en una etapa temprana de desarrollo.

"Planta" comprende todas las plantas anuales y perennes, mono- y di-cotiledóneas e incluye, por ejemplo, aunque no se limita a, los géneros Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hioscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Ciahorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panieum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browaalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea y Populus.

El concepto "planta" comprende preferiblemente plantas de cultivo monocotiledóneas, tales como por ejemplo especies de cereales como trigo, cebada, mijo, centeno, tritical, maíz, arroz, sorgo o avena, así como caña de azúcar.

El término comprende, además, plantas de cultivo dicotiledóneas tales como, por ejemplo,

- Brassicáceas tales como colza, nabina, berro, arabidopsis, especies de coles,
- Leguminosas como soya, alfalfa, guisantes, arvejas, frijoles o maní
- Solanáceas como patata, tabaco, tomate, berenjena o pimiento,
- Asteráceas como girasol, tagetes, lechuga o caléndula,
- Cucurbitáceas como melón, calabaza o calabacín,

así como linaza (lino), algodón, cáñamo, trébol, espinaca, pimienta roja, zanahoria, remolacha, rábano, remolacha de azúcar, patata dulce, pepino, achicoria, coliflor, brócoli, espárragos, cebolla, ajo, apio, fresas, frambuesas, moras, piña, aguacate y las diversas especies de árboles, arbustos, nogales y vides. Las especies de árboles comprenden preferiblemente ciruelo, cerezo, durazno, nectarina, melocotón, banano, papaya, mango, manzano, pera, membrillo.

En el contexto de la invención se prefieren tales vegetales que se emplean como alimento para humanos o animales, se prefieren muy particularmente especies y géneros monocotiledóneos com importancia agrícola tales como trigo, avena, mijo, cebada, centeno, maíz, arroz, alforfón, sorgo, tritical, espelta, semillas de lino o caña de azúcar.

El término "factor de estrés" comprende en el contexto de la invención factores bióticos de estrés (como en particular los patógenos listados abajo).

"Resistencia al estrés" significa la reducción o el alivio de los síntomas de una planta a causa del estrés. Los síntomas pueden ser múltiples pero preferiblemente abarcan aquellos que directa o indirectamente afectan de manera adversa a la calidad de la planta, la cantidad de la cosecha, su idoneidad para el uso como alimento de humano o animales, o también que dificultan la siembra, cultivo, cosechamiento o procesamiento del producto cosechado.

"Resistencia a patógenos" significa la reducción o alivio de los síntomas de enfermedad de una planta a consecuencia de la infestación por al menos un patógeno. Los síntomas puede ser múltiples pero abarcan preferiblemente aquellos que conducen directa o indirectamente a perjudicar la calidad de la planta, la cantidad de la cosecha, la aptitud para usarla como alimento de animales o humanos o que también dificultan la siembra, cultivo, recolección de cosecha o procesamiento de los productos cosechados.

"Conferir", "mantener", "generar" o "elevar" una resistencia a estrés o a patógenos significa que los mecanismos de defensa de una especie o variedad determinada de plantas presentan una resistencia elevada frente a uno o más tipos de estrés o de patógeno mediante la aplicación del método de la invención en comparación con la variedad silvestre de la planta ("planta de partida"), a la cual no se ha aplicado el método de la invención, en condiciones por lo demás iguales (como por ejemplo, condiciones de clima y cultivo, tipo de estrés o de patógeno, etc.). La elevada resistencia se manifiesta preferiblemente en una manifestación reducida de los síntomas de estrés o enfermedad, y los síntomas de enfermedad abarcan, en adición a los efectos adversos mencionados arriba, por ejemplo también la eficiencia de penetración de un patógeno en la planta o células de la planta o la eficiencia de proliferación en o sobre las mismas. En este caso, los síntomas del estrés o de la enfermedad se reducen preferiblemente en al menos 10% o al menos 20%, particularmente preferible en al menos 40% o 60%, muy particularmente preferible en al menos 70% o 80%, lo más preferible en al menos 90% o 95%.

"Selección" significa, en referencia a las plantas en las que, a diferencia o en comparación con la planta de partida, existe o se eleva la resistencia frente al menos un factor de estrés o patógeno, todos los métodos que son adecuados para reconocer una resistencia existente o incremetada al estrés o a los patógenos. Estos pueden ser, por ejemplo, síntomas de infección patógena (por ejemplo, el desarrollo de necrosis en el caso de infección fúngica), pero también abarca los síntomas descritos arriba que se refieren a la calidad de la planta, la cantidad de la cosecha, la aptitud para usar como material de alimento a animales o humanos.

"Patógeno" significa, en el contexto de la invención y a manera de ejemplo, aunque no limitando, virus o viroides, bacterias, hongos, pestes animales tales como, por ejemplo insectos o nematodos. Preferiblemente son hongos, en particular hongos necrotróficos o hemibiotrófico. Sin embargo, puede suponerse que la expresión específica para mesófilo de una proteína a BI1 también produzca una resistencia contra otros patógenos puesto que se genera una resistencia total hacia los factores de estrés.

Por ejemplo, aunque sin limitar, se mencionarían los siguientes patógenos:

1. *Patógenos fúngicos o patógenos similares a los fúngicos*

Patógenos fúngicos o patógenos similares a los fúngicos (como por ejemplo chromista) provienen preferiblemente del grupo que comprende plasmodioforamycota, oomycota, ascomycota, quitridiomicetos, zigomicetos, basidiomy-

cota y deuteromicetos (*fungi imperfecti*). Sin embargo, a manera de ejemplo sin estar limitando, se mencionarían los patógenos nombrados en las tablas 1 a 4 y las enfermedades asociadas con éstos. Los siguientes términos ingleses y alemanes pueden usarse alternativamente:

| | | |
|---|---|---|
| Ährenfäule (podredumbre de granzas) | - | ear rot / head blight |
| Stengelfäule (podredumbre de tallo) | - | stalk rot |
| Wurzelfäule (podredumbre de raíz) | - | root rot |
| Rost (orín) | - | rust |
| Falscher Mehltau (falso mildiú) | - | downy mildew |

Otras traduccionnes pueden encontrarse, por ejemplo en http://www.bba.de/english/da.tabase/psmengl/pilz.htm.

TABLA 1

*Enfermedades provocadas por hongos biotróficos, fitopatógenos*

| **Enfermedad** | **Patógeno** |
|---|---|
| Orín pardo | Puccinia recondita |
| Orín amarillo | P. striiformis |
| Mildiú auténtico | Erysiphe graminis / Blumeria graminis |
| Orín (maíz común) | Puccinia sorghi |
| Orín (maíz sureño) | Puccinia polysora |
| Manchas de hoja de tabaco | Cercospora nicotianae |
| Orín (maíz tropical) | Physopella pallescens, P. zeae = Angiopsora zeae |

TABLA 2

*Enfermedades provocadas por hongos y oomicetos necrotróficos y/o hemibiotróficos*

| **Enfermedad** | **Patógeno** |
|---|---|
| Mancha de septoriosis | Septoria (Stagonospora) nodorum |
| Sequedad de hoja | Septoria tritici |
| Fusariosis de granzas | Fusarium spp. |
| Enfermedad ruptura de tallo | Pseudocercosporella herpotrichoides |
| Carbón del trigo | Ustilago spp. |
| Podredumbre de hierba y tubérculo | Phytohpthora infestans |
| Caries del trigo | Tilletia caries |
| Pie negro | Gaeumannomyces graminis |
| Anthrocnose leaf marchitez (marchitez de hoja por antracnosis) Anthracnose stalk rot (podredumbre de tallo | Colletotrichum graminicola (teleomorph: Glomerella graminicola Politis); Glomerella tucumanensis (anamorph: Glomerella falcatum Went) |

| Enfermedad | Patógeno |
|---|---|
| por antracnosis) | |
| Aspergillus ear and kernel rot (podredumbre de granza y grano por aspergilo) | Aspergillus flavus |
| Banded leaf and sheath spot (mancha de hoja y vaina unida) ("mal vinoso") | Rhizoctonia solani Kuhn = Rhizoctonia microsclerotia J. Matz (telomorph: Thanatephorus cucumeris) |
| Black bundle disease (enfermedad de haz negro) | Acremonium strictum W. Gams = Cephalosporium acremonium Auct. non Corda |
| Black kernel rot (podredumbre de grano negra) | Lasiodiplodia theobromae = Botryodiplodia theobromae |
| Borde blanco | Marasmiellus sp. |
| Brown spot (black spot, stalk rot) Mancha parda (mancha negra, mancha de tallo | Physoderma maydis |
| Cephalosporium kernel rot (podredumbre de grano por cefalosporium | Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium |
| Charcoal rot (podredumbre de carbonillo) | Macrophomina phaseolina |
| Corticium ear rot (podredumbre de granza) | Thanatephorus cucumeris = Corticium sasakii |
| Curvularia leaf spot (mancha de hoja) | Curvularia clavata, C. eragrostidis, = C. maculans (teleomorph: Cochliobolus eragrostidis), Curvularia inaequalis, C. intermedia (teleomorph: Cochliobolus intermedius), Curvularia lunata (teleomorph: Cochliobolus lunatus), Curvularia pallescens (teleomorph: Cochliobolus pallescens), Curvularia senegalensis, C. tuberculata (teleomorph: Cochliobolus tuberculatus) |
| Didymella leaf spot (mancha de hoja) | Didymella exitalis |
| Podredumbre de granza y de tallo por Diplodia | Diplodia frumenti (teleomorph: Botryosphaeria festucae) |
| Podredumbre de granza y de tallo por Diplodia seed rot and seedling marchitez (podredumbre de semilla y marchitez de plántula) | Diplodia maydis = Stenocarpella maydis |
| Diplodia leaf spot or streak (mancha de hoja o pica por diplodia) | Stenocarpella macrospora = Diplodialeaf macrospora |
| Brown stripe downy mildew (raya parda por moho mildiú) | Sclerophthora rayssiae var. zeae |
| Crazy top downy mildew (mildiú) | Sclerophthora macrospora = Sclerospora macrospora |
| Green ear downy mildew (graminicola downy mildew) Granza verde por mildiú | Sclerospora graminicola |
| Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot) | Nigrospora oryzae (teleomorph: Khuskia oryzae) |

| Enfermedad | Patógeno |
|---|---|
| (podredumbre de granza seca: mazorca, grano y tallo) | |
| Podredumbre de granza (minor) | Alternaria alternata = A. tenuis, Aspergillus glaucus, A. niger, Aspergillus spp., Botrytis cinerea (teleomorph: Botryotinia fuckeliana), Cunninghamella sp., Curvularia pallescens, Doratomyces stemonitis = Cephalotrichum stemonitis, Fusarium culmorum, Gonatobotrys simplex, Pithomyces maydicus, Rhizopus microsporus Tiegh., R. stolonifer = R. nigricans, Scopulariopsis brumptii |
| Ergot (horse's tooth) – cornezuelo (diente de caballo) | Claviceps gigantea (anamorph: Sphacelia sp.) |
| Eyespot - cercoesporelosis o mal de pie de cereales | Aureobasidium zeae = Kabatiella zeae |
| Fusarium podredumbre de granzas y de tallo F. | Fusarium subglutinans = moniliforme var.subglutinans |
| Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling marchitez (podredumbre de grano, raíz y marchitez de plántula) | Fusarium moniliforme (teleomorph: Gibberella fujikuroi) |
| Fusarium Podredumbre de tallo, seedling root rot (podredumbre de raíz y plántula) | Fusarium avenaceum (teleomorph: Gibberella avenacea) |
| Gibberella Podredumbre de tallo y plántula | Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum) |
| Podredumbre gris de granzas | Botryosphaeria zeae = Physalospora zeae (anamorph: Macrophoma zeae) |
| Gray leaf spot (Cercospora leaf spot) Mancha gris de hoja (mancha de hoja) | Cercospora sorghi = C. sorghi var. maydis, C. zeae-_ maydis |
| Helminthosporium root rot (podredumbre de raíz por Helminthosporium) | Exserohilum pedicellatum = Helminthosporium pedicellatum (teleomorph: Setosphaeria pedicellata |
| Hormodendrum Podredumbre de granzas (podredumbre por cladosporium) | Cladosporium cladosporioides = Hormodendrum cladosporioides, C. herbarum (teleomorph: Mycosphaerella tassiana |
| Leaf spots, minor (manchas en hojas) | Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victoriae = Helminthosporium victoriae (teleomorph: Cochliobolus victoriae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorph: Setosphaeria prolata) |

| Enfermedad | Patógeno |
|---|---|
| | Graphium penicillioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiosphaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporiella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zeae, S. zeicola, S. zeina |
| Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe) marchitez en hoja de maíz (ráfaga blanca, podredumbre de corona en tallo, raya) | Setosphaeria turcica (anarnorph: Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum) |
| Northern corn leaf spot Helminthosporium ear rot (race 1) mancha de hoja de maíz del norte, podredumbre de granza | Cochliobolus carbonum (anamorph: Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum) |
| Penicillium Podredumbre de granzas (blue eye, blue mold) (ojo azul, moho azul) | Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum |
| Podredumbre de tallo y raíces por Phaeocytostroma | Phaeocytostroma ambiguum, = Phaeocytosporella zeae |
| Phaeosphaeria leaf spot (mancha de hojas por Phaeosphaeria) | Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis |
| Podredumbre de granzas por Physalospora (Podredumbre de granzas por Botryosphaeria) | Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola (anamorph: Diplodia frumenti) |
| Purple leaf sheath (vaina hoja púrpura) | Hemiparasitic bacteria and fungi |
| Podredumbre de tallo y raíz por Pyrenochaeta | Phoma terrestris = Pyrenochaeta terrestris |
| Podredumbre de raíz por Pythium | Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola |
| Podredumbre de tallo por Pythium | Pythium aphanidermatum = P. butleri L. |
| Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot) enfermedad de grano rojo (moho de granza, podredumbre de hoja y semilla) | Epicoccum nigrum |
| Podredumbre de granzas por Rhizoctonia (sclerotial rot) (podredumbre esclerocial) | Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea circinata) |
| Podredumbre de tallo y raíz por Rhizoctonia | Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae |
| Podredumbre de raíz (minor) | Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictochaeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus |
| Rostratum leaf spot (Helminthosporium leaf | Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum |

| Enfermedad | Patógeno |
|---|---|
| disease, ear and stalk rot) Mancha de hoja (enfermedad de hoja por Helminthosporium, podredumbre de granza y tallo) | rostratum = He/_minthosporium rostratum) |
| Falscher Java Mehltau (Mildiú falso de Java) | Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis |
| Falscher Philippinen Mehltau (mildiú falso de Filipinas) | Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis |
| Falscher Sorghum Mehltau (mildiú falso de sorgo) | Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi |
| Spontaneum downy mildew (mildiú espontáneo) | Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea |
| Falscher Zuckerrohr-Mehltau (mildiú falso de caña de azúcar) | Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari |
| Podredumbre de granzas por Sclerotium (southern blight o marchitez del sur) | Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii) |
| Seed rot-_seedling marchitez | Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicillatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zeae (anamorph: F. graminearum), Macrophomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zeae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp. |
| leaf spot (mancha de hoja por Selenophoma) | Selenophoma sp. |
| Sheath rot (podredumbre de vaina) | Gaeumannomyces graminis |
| Shuck rot (podredumbre de cáscara) | Myrothecium gramineum |
| Silage mold (moho de silaje) | Monascus purpureus, M ruber |
| Carbón del trigo (Smut, common) (carbón, común) | Ustilago zeae = U. maydis |
| Smut, false (carbón, falso) | Ustilaginoidea virens |
| Kolbenbrand (Smut, head) | Sphacelotheca reiliana = Sporisorium holcisorghi |
| Southern corn leaf blight and stalk rot marchitezde hoja de maíz sureño y podredumbre de tallo | Cochliobolus heterostrophus (anamorph: Bipolaris maydis = Helminthosporium maydis) |
| Southern leaf spot | Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora |
| Podredumbre de tallo (minor | ) Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria |

| Enfermedad | Patógeno |
|---|---|
| | haematococca),<br>F. tricinctum, Mariannaea elegans, Mucor sp.,<br>Rhopographus zeae, Spicaria sp. |
| Podredumbre de almacenamiento (storage rots) | Aspergillus spp., Penicillium spp. und weitere Pilze |
| Tar spot (mancha de alquitrán) | Phyllachora maydis |
| Trichoderma ear rot and root rot (podredumbre de granza y de raíz por Trichodema) | Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocrea<br>sp |
| White ear rot, root and stalk rot (podredumbre de granza blanca, podredumbre de raíz y tallo) | Stenocarpella maydis = Diplodia zeae |
| Yellow leaf blight (marchitez de hoja amarilla) | Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zeae-_maydis) |
| Zonate leaf spot (mancha de hoja zonal) | Gloeocercospora sorghi |

TABLA 4

*Enfermedades provocadas por hongos y oomicetos con clasificación que no es clara con respecto a comportamiento biotrófico, hemibiotrófico o necrotrófico*

| Enfermedad | Patógeno |
|---|---|
| Hyalothyridium leaf spot (mancha de hoja por Hyalothyridium) | Hyalothyridium maydis |
| Late wilt (marchitamiento tardío | Cephalosporium maydis |

Particularmente se prefieren

- Plasmodioforomycota como *plasmodiofora brassicae (Kohlhernie), Spongospora subterranea, Polymyxa graminis*,

- Oomycota como *Bremia lactucae* (moho mildiú en lechuga), *Peronospora* (moho mildiú) en boca de dragón o antirrino *(P. antirrhini)*, cebolla *(P. destructor)*, espinaca *(P. effusa)*, soya *(P. manchurica)*, tabaco (mildiú algodonoso; *P. tabacina*) Alfalfa y trébol *(P. trifolium)*, *pseudoperonospora humuli* (moho mildiú en lúpulo), *plasmopara* (moho mildiú en uvas) *(P. viticola)* y girasoles *(P. halstedii)*, *sclerophtohra macrospora* (moho mildiú en cereales y gramíneas), *pythium* (por ejemplo podredumbre de semilleros en remolacha a través de *P. debaryanum*), *phitophthora infestans* (mildiú de hierba y tubérculos, podredumbre parda en el tomate, etc.), Albugo spec.

- Ascomycota como *Microdochium nivale* (moho de la nieve en centeno y trigo), *Fusarium graminearum, Fusarium culmorum* (Podredumbre de espiga especialmente en trigo), *fusarium oxisporum* (marchitamiento por fusarium en tomate), *Blumeria graminis* (mildiú genuino en cebada *(f.sp. hordei)* y trigo *(f.sp. tritici)), Erysiphe pisi* (mildiú de guisantes), *Nectria galligena* (chancro de árbol frutal), unicnula necator (Mildiú genuino de la vid), *pseudopeziza tracheiphila* (clavo rojo de la vid), *Claviceps purpurea* (cornezuelo en centeno y gramíneas, por ejemplo), *gaeumannomyces graminis* (mal del pie negro en trigo, centeno entre otras gramíneas), *Magnaporthe grisea, Pyrenofora graminea* (rayado de la cebada), *pyrenofora teres* (enfermedad de manchas de red en cebada), *Pyrenofora tritici-repentis* (enfermedad de manchas en hoja (resequedad) en trigo), *Venturia inaequalis* (roña del manzano), *Sclerotinia sclerotium* (podredumbre del tallo, cáncer de colza), *Pseudopeziza medicaginis* (moho verde de los agrios en alfalfa, trébol blanco y rojo).

- *Basidiomicetos wie Typhula incarnata* (podredumbre por typhula en cebada, centeno, trigo), *Ustilago maydis* (carbón del maíz), *Ustilago nuda* (carbón del trigo en cebada), *Ustilago tritici* (carbón del trigo, escanda), *Ustilago avenae* (Carbón del trigo en avena), *Rhizoctonia solani* (mal vinoso en patatas), *Sphacelotheca spp.* (carbón de la

mazorca en sorgo), *Melampsora lini* (orín en lino), *Puccinia graminis* (orín negro en trigo, cebada, centeno, avena), *Puccinia recondita* (orín pardo en trigo), *Puccinia dispersa* (orín pardo en centeno), *Puccinia hordei* (orín pardo en Cebada), *Puccinia coronata* (orín de corona en avena), *Puccinia striiformis* (orín amarillo en trigo, cebada, centeno así como en numerosas gramíneas), *Uromyces appendiculatus* (orín de frijol), *Sclerotium rolfsii* (podredumbre de raíz y tallo en numerosas plantas).

- Deuteromicetos *(Fungi imperfecti)* tales como *Septoria (Stagonospora) nodorum* (manchas de la pluma del trigo) en trigo *(Septoria tritici), Pseudocercosporella herpotrichoides* (mal de pie en trigo, cebada, centeno), *Rynchosporium secalis* (enfermedad de mancha de hoja o septoriosis en centeno y cebada), *Alternaria solani* (negrón, tizón o alternariosis en patata y tomate), *Foma betae* (carbón de raíz en remolacha), *Cercospora beticola* (cercospora-septoriosis en remolacha), *Alternaria brassicae* (negro de colza en colza, col, entre otras crucíferas), *Verticillium dahliae* (marchitamiento y podredumbre de tallo de colza), *Colletotrichum lindemuthianum* (antracnosis (manchas quemadas) en fríjol), *Foma lingam* - caída de almaciga (pie negro en col; podredumbre en el cuello de la raíz o del tallo en colza), *Botrytis cinerea* (moho gris en la vid, fresa, tomate, lúpulo, etc.).

Los más preferible son *Phitophthora infestans* (podredumbre de hierba y tubérculo, podredumbre parda en tomate, etc), *Microdochium nivale* (antes *Fusarium nivale*; moho de nieve en centeno y trigo), *Fusarium graminearum, Fusarium culmorum, Fusarium avenaceum* y *Fusarium poae* (podredumbre de espiga en trigo), *Fusarium oxisporum* (marchitamiento por fusarium en tomate), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease o enfermedad de tizón del arroz), *Sclerotinia sclerotium* (podredumbre de tallo, cáncer de colza), *Septoria (Stagonospora) nodorum* y *Septoria tritici* (septoriosis en trigo), *Alternaria brassicae* (negro de colza en colza, coles, entre otras crucíferas), *Foma lingam* (caída de almaciga, pie negro en col; podredumbre de cuello de raíz o de tallo en colza).

2. *Patógenos bacterianos*

A manera de ejemplo aunque no limitante se mencionan los patógenos nombrados en la tabla 5 y las enfermedades a éstas asociadas.

TABLA 5

*Enfermedades bacterianas*

| **Enfermedad** | **Patógeno** |
|---|---|
| Bacterial leaf blight and stalk rot (marchitez de hoja por bacterias y podredumbre de tallo | Pseudomonas avenae subsp. avenae |
| Bacterial leaf spot (mancha bacteriana de hojas) | Xanthomonas campestris pv. holcicola |
| Podredumbre bacterianade tallo | Enterobacter dissolvens = Erwinia dissolvens |
| Schwarzbeinigkeit ("Bacterial stalk and top rot") Pie negro ("podredumbre bacteriana de tallo y copa") | Erwinia carotovora subsp. carotovora, Erwinia chrysanthemi pv. zeae |
| Bacterial stripe (raya bacteriana) | Pseudomonas andropogonis |
| Chocolate spot (mancha de chocolate) | Pseudomonas syringae pv. coronafaciens |
| Goss's bacterial wilt and blight (leaf freckles and wilt) marchitez bacteriana (pecas de hoja y marchitamiento) | Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis = Corynebacterium michiganense pv.andnebraskense |
| Holcus spot (mancha en heno) | Pseudomonas syringae pv. syringae |
| Purple leaf sheath (vaina hoja púrpura) | Hemiparasitic bacteria |
| Seed rot-seedling blight (marchitez de plántula – podredumbre de semilla) | Bacillus subtilis |
| Stewart's disease (bacterial wilt) Enfermedad de Stewart (marchitamiento bacteriano) | Pantoea stewartii = Erwinia stewartii |
| Corn stunt (achapparramiento, del maíz, Mesa Central or Rio Grande maize stunt) | Spiroplasma kunkelii |

Muy particularmente preferibles las siguientes bacterias patógenas: *Corynebacterium sepedonicum* (podredumbre de anillo de bacterias en patata), *Erwinia carotovora* (pie negro en patata), *Erwinia amilovora* (fuego bacteriano en pera, manzana, membrillo), *Streptomyces scabies* (roña de patata), *Pseudomonas syringae pv. tabaci* (mancha angular en la hoja de tabaco), *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* (enfermedad de manchas grasosas en poroto (judía) enano), *Pseudomonas syringae pv. tomato* ("bacterial speck" (motas bacterianas) en tomate), *Xanthomonas campestris pv. malvacearum* (septoriosis en algodón) y *Xanthomonas campestris pv. oryzae* (podredumbre bacteriana en arroz y otras gramíneas).

3. *Patógenos virales*

El término "patógenos virales" incluye todos los virus vegetales tales como, por ejemplo, virus mosaico de tabaco o pepino, virus de mancha anular, virus de necrosis, virus mosaico enano de maíz, etc.

Los patógenos y enfermedades asociados a éstos se mencionan en la tabla 6 a manera de ejemplo, pero sin limitar.

TABLA 6

*Enfermedades virales*

| **Enfermedad** | **Patógeno** |
|---|---|
| American wheat striate (wheat striate mosaic) estriamiento de trigo | American wheat striate mosaic virus (AWSMV) |
| Barley stripe mosaic (mosaico de raya en cebada) | Barley stripe mosaic virus (BSMV) |
| Barley yellow dwarf (enano amarillo de cebada) | Barley yellow dwarf virus (BYDV) |
| Brome mosaic (mosaico de bromo) | Brome mosaic virus (BMV) |
| Cereal chlorotic mottle (jaspeado clorótico de | Cereal chlorotic mottle virus (CCMV) |

| Enfermedad | Patógeno |
|---|---|
| cereal) | |
| Corn chlorotic vein banding (Braizilian maize mosaic) marcado de vena clorótica en maíz | Corn chlorotic vein banding virus (CCVBV) |
| Corn lethal necrosis (necrosis letal de maíz | Viruskomplex aus Maize chlorotic mottle virus (MCMV) und Maize dwarf mosaic virus (MDMV) A oder B oder Wheat streak mosaic virus (WSMV) |
| Cucumber mosaic (mosaico de pepinillo) | Cucumber mosaic virus (CMV) |
| Cynodon chlorotic streak (pica clorótica de cynodon) | Cynodon chlorotic streak virus (CCSV) |
| Johnsongrass mosaic (mosaico de sorgo halepense) | Johnsongrass mosaic virus (JGMV) |
| Maize bushy stunt (achaparramiento de arbusto de maíz) | Mycoplasma-_like organism (MLO) associated |
| Maize chlorotic dwarf (enano clorótico de maíz) | Maize chlorotic dwarf virus (MCDV) |
| Maize chlorotic mottle (jaspeado clorótico) | Maize chlorotic mottle virus (MCMV) |
| Maize dwarf mosaic (mosaico enano) | Maize dwarf mosaic virus (MDMV) strains A, D, E and F |
| Maize leaf fleck (mancha de hoja de maíz) | Maize leaf fleck virus (MLFV) |
| Maize line | Maize line virus (MLV) |
| Maize mosaic (corn leaf stripe (raya de hoja de maíz), enanismo rayado) | Maize mosaic virus (MMV) |
| Maize mottle and chlorotic stunt (jaspeado y achaparramiento clorótico) | Maize mottle and chlorotic stunt virus |
| Maize pellucid ringspot (mancha anular trslúcida) | Maize pellucid ringspot virus (MPRV) |
| Maize raya gruesa | Maize raya gruesa virus (MRGV) |
| maize rayado fino (fine striping disease) | Maize rayado fino virus (MRFV) |
| Maize red leaf and red stripe (hoja roja y raya roja) | Mollicute |
| Maize red stripe (raya roja) | Maize red stripe virus (MRSV) |
| Maize ring mottle (jaspeado anular) | Maize ring mottle virus (MRMV) |
| Maize rio IV | Maize rio cuarto virus (MRCV) |
| Maize rough dwarf (nanismo ruvido) enano áspero | Maize rough dwarf virus (MRDV) (Cereal tillering disease virus) |
| Maize sterile stunt (achaparramiento estéril) | Maize sterile stunt virus (strains of barley yellow sériate virus) |
| Maize streak (pica) | Maize streak virus (MSV) |
| Maize stripe (maize chlorotic stripe, maize hoja blanca) raya clorótica de maíz) | Maize stripe virus |
| Maize stunting (achaparramiento) | Maize stunting virus |
| Maize tassel abortion (aborto de bellota) | Maize tassel abortion virus (MTAV) |

| Enfermedad | Patógeno |
|---|---|
| Maize vein enation (enación de vena) | Maize vein enation virus (MVEV) |
| Maize wallaby ear (granza de wallaby) | Maize wallaby ear virus (MWEV) |
| Maize white leaf (hoja blanca) | Maize white leaf virus |
| Maize white line mosaic (mosaico línea blanca) | Maize white line mosaic virus (MWLMV) |
| Millet red leaf (hoja roja) | Millet red leaf virus (MRLV) |
| Northern cereal mosaic (mosaico de cereal norteño) | Northern cereal mosaic virus (NCMV) |
| Oat pseudorosette (zakuklivanie) | Oat pseudorosette virus |
| Oat sterile dwarf (enano estéril de avena) | Oat sterile dwarf virus (OSDV) |
| Rice black-streaked (arroz picado de negro) | dwarf Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV) |
| Rice stripe (raya de arroz) | Rice stripe virus (RSV) |
| Sorghum mosaic (mosaico de sorgo) | Sorghum mosaic virus (SrMV) (auch: sugarcane mosaic virus (SCMV) Stämme H, I and M) |
| Sugarcane Fiji disease (enfermedad de Fiji de caña de azúcar) | Sugarcane Fiji disease virus (FDV) |
| Sugarcane mosaic (mosaico de caña de azúcar) | Sugarcane mosaic virus (SCMV) strains A, B, D, E, SC, BC, Sabi and MB (formerly MDMV-B) |
| Wheat spot mosaic (mosaico de mancha de trigo) | Wheat spot mosaic virus (WSMV) |

4. *Pestes animales*

4.1 *Patógenos insectos*

Los siguientes pueden mencionarse a manera de ejemplo sin ser limitantes: escarabajos, orugas, áfidos o ácaros. Los insectos preferidos son aquellos de los géneros Coleoptera, Diptera, Himenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thisanoptera. Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Sifonaptera, Trichoptera, etc.. Particularmente se prefieren insectos coleopteros y lepidopteros, como por ejemplo el barrenador de maíz (European Corn Borer), *Diabrotica barberi, Diabrotica undecimpunctata, Diabrotica virgifera, Agrotis ipsilon, Crymodes devastator, Feltia ducens, Agrotis gladiaria, Melanotus spp., Aeolus mellillus, Aeolus mancus, Horistonotus uhlerii, Sphenoforus maidis, Sphenoforus zeae, Sphenoforus parvulus, Sphenoforus callosus, Phillogphaga spp., Anuraphis maidiradicis, Delia platura, Colaspis brunnea, Stenolophus lecontei* y *Clivinia impressifrons*.

Otros a mencionarse son: el criocero de los cereales *(Oulema melanopus)*, la mosca frit *(Oscinella frit)*, el gusano de alambre *(Agrotis lineatus)* y áfidos de hoja (como, por ejemplo, áfido de hoja de avena *Rhopalosiphum padi*, áfidos grandes de cereales *Sitobion avenae*).

(Tabla pasa a página siguiente)

4.2 *Nemátodos*

Los patógenos y las enfermedades asociados con éstos se mencionan en la tabla 7 a manera de ejemplo, pero sin limitación

TABLA 7

*Nemátodos parasitarios*

| **Lesión** | **Nemátodos Patógenos** |
|---|---|
| Awl (lezna) | Dolichodorus spp., D. heterocephalus |
| Nemátodos de tallo o de cepa, nematodo de cuello de remolacha | Ditylenchus dipsaci |
| Burrowing (anguílula) | Radopholus similis |
| Nematodos quísticos de avena | Heterodera avenae, H. zeae, Punctodera chalcoensis |
| Dagger (daga) | Xiphinema spp., X. americanum, X. mediterraneum |
| False root-knot | Nacobbus dorsalis |
| Lance (lanza), Columbia | Hoplolaimus columbus |
| Lance (lanza) | Hoplolaimus spp., H. galeatus |
| Lesion | Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. zeae |
| Needle (aguja) | Longidorus spp., L. breviannulatus |
| Ring (anillo) | Criconemella spp., C. ornata |
| Nemátodos de agalla de raíz | Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M. incognita, M. javanica |
| Espiral | Helicotylenchus spp. |
| Sting (aguijón) | Belonolaimus spp., B. longicaudatus |
| Nemátodos Stubby-root | Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp. |
| Stunt (achaparramiento) | Tylenchorhynchus dubius |

Muy particularmente se prefieren *Globoa rostochiensis* y *G. pallida* (nematodos de las raíces en patata, tomate entre otras solanáceas), *Heteroa schachtii* (nematodos de raíces de remolacha en remolacha de azúcar y para alimento animal, colza, col, etc.), *Heteroa avenae* (nematodos de raíces de avena en avena entre otras especies de cereales), *Ditilenchus dipsaci* (nematodos de tallo o bulbo, nematodos de cabeza de remolacha en centeno, avena, maíz, trébol, tabaco, remolacha), *Anguina tritici* (nematodos de trigo, enfermedad de berberecho en trigo (escanda, centeno), *Meloidogyne hapla* (nematodos de la raíz en zanahoria, pepino, lechuga, tomate, patata, remolacha de azúcar, alfalfa).

Para variedades individuales pueden nombrarse como ejemplos de hongos o virus patógenos:

1. *Cebada*

Patógenos fúngicos, bacterianos y virales: *Puccinia graminis f.sp. hordei, Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. hordei*, barley yellow dwarf virus (BYDV) (Virus enano amarillo de cebada.

Insectos/nemátodos patógenos: *Ostrinia nubilalis* (European corn borer o barrenador europeo de maíz); *Agrotis ipsilon*; *Schizaphis graminum*; *Blissus leucopterus*; *Acrosternum hilare*; *Euschistus servus*; *Deliaplatura*; *Mayetiola destructor*; *Petrobia latens*.

2. *Haba de soja*

Patógenos fúngicos, bacterianos o virales: *Phitophthora megasperma fsp.glycinea, Macrofomina phaseolina, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum, Fusarium oxisporum, Diaporthe phaseolorum var. sojae (Fomopsis sojae), Diaporthe phaseolorum var. caulivora*, *Sclerotium rolfsii, Cercospora kikuchii, Cercospora sojina, Peronospora manshurica, Colletotrichum dematium (Colletotrichum truncatum)*, *Corynespora cassiicola, Septoria glycines, Phillosticta sojicola, Alternaria alternata, Pseudomonas syringae p.v. glycinea, Xanthomonas campestris p.v. phaseoli, Microsphaera diffussa, Fusarium semitectum, Phialofora gregata*, virus mosaico de haba de soja, *Glomerella glycines, Tobacco Ring spot virus* (virus de mancha anular en el tabaco), Tobacco Streak virus (virus de pica en tabaco), *Phakopsorapachirhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*, *Tomato spotted wilt virus* (virus de marchitamiento de tomate manchado), *Heteroa glycines Fusarium solani*.

Insectos/nemátodos patógenos: *Pseudoplusia includens; Anticarsia gemmatalis; Plathipena scabra; Ostrinia nubilalis; Agrotis ipsilon; Spodoptera exigua; Heliothis virescens; Helicoverpa zea; Epilachna varivestis; Myzus persicae; Empoasca fabae; Acrosternum hilare; Melanoplus femurrubrum; Melanoplus differentialis; Hilemya platura; Sericothrips variabilis; Thrips tabaci; Tetranychus turkestani; Tetranychus urticae;*

3. *Colza*

Patógenos fúngicos, bacterianos o virales: *Albugo candida, Alternaria brassicae, Leptosphaeria maculans, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum, Mycosphaerella brassiccola, Pythium ultimum, Peronospora parasitica, Fusarium roseum, Alternaria alternata.*

4. *Alfalfa*

Patógenos fúngicos, bacterianos o virales: *Clavibater michiganese subsp. insidiosum, Pythium ultimum, Pythium irregulare, Pythium splendens, Pythium debaryanum, Pythium aphanidermatum, Phitophthora megasperma, Peronospora trifoliorum, Foma medicaginis var. medicaginis, Cercospora medicaginis, Pseudopeziza medicaginis, Leptotrochila medicaginis, Fusarium, Xanthomonas campestris p.v. alfalfae, Aphanomyces euteiches, Stemphilium herbarum, Stemphilium alfalfae.*

5. *Trigo*

Patógenos fúngicos, bacterianos o virales: *Pseudomonas syringae p.v. atrofaciens, Urocystis agropyri, Xanthomonas campestris p.v. translucens, Pseudomonas syringae p.v. syringae, Alternaria alternata, Cladosporium herbarum, Fusarium graminearum, Fusarium avenaceum, Fusarium culmorum, Ustilago tritici, Ascochita tritici, Cephalosporium gramineum, Collotetrichum graminicola, Erysiphe graminis f.sp. tritici, Puccinia graminis f.sp. tritici, Puccinia recóndita f.sp. tritici, Puccinia striiformis, Pyrenofora tritici-repentis, Septoria (Stagonospora) nodorum, Septoria tritici, Septoria avenae, Pseudocercosporella herpotrichoides, Rhizoctonia solani, Rhizoctonia cerealis, Gaeumannomyces graminis var. tritici, Pythium aphanidermatum, Pythium arrhenomanes, Pythium ultimum, Bipolaris sorokiniana*, Barley Yellow Dwarf Virus (virus enano Amarillo de cebada), Brome Mosaic Virus (virus mosaico de bromo), Soil Borne Wheat Mosaic Virus (virus mosaico de trigo llevao en suelo), Wheat Streak Mosaic Virus (virus mosaico de pica en trigo), Wheat Spindle Streak Virus (virus de pica en eje de trigo), American Wheat Striate Virus (virus estriado de trigo americano), *Claviceps purpurea, Tilletia tritici, Tilletia laevis, Ustilago tritici, Tilletia indica, Rhizoctonia solani, Pythium arrhenomannes, Pythium gramicola, Pythium aphanidermatum, High Plains Virus* (virus de llanuras altas), European Wheat Striate Virus (virus estriado de trigo europeo), *Puccinia graminis f.sp. tritici* (Wheat stem rust u orín de tallo de trigo), *Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. tritici* (Wheat Powdery Mildew o mildiú polvoroso de trigo).

Insectos/nemátodos patógenos: *Pseudaletia unipunctata; Spodoptera,frugiperda; Elasmopalpus lignosellus; Agrotis orthogonia; Elasmopalpus Zignosellus; Oulema melanopus; Hipera punctata; Diabrotica undecimpunctata howardi; Russian wheat aphid* (pulgón de trigo ruso); *Schizaphis graminum; Macrosiphum avenae; Melanoplus femurrubrum; Melanoplus differentialis; Melanoplus sanguinipes; Mayetiola destructor; Sitodiplosis mosellana; Meromyza americana; Hilemya coarctata; Frankliniella fusca; Cephus cinctus; Aceria tulipae;*

6. *Girasol*

Patógenos fúngicos, bacterianos o virales: *Plasmofora halstedii, Sclerotinia sclerotiorum, Aster Yellows, Septoria helianthi, Fomopsis helianthi, Alternaria helianthi, Alternaria zinniae, Botrytis cinerea, Foma macdonaldii, Macrofomina phaseolina, Erysiphe cichoracearum, Rhizopus oryzae, Rhizopus arrhizus, Rhizopus stolonifer, Puccinia helianthi, Verticillium dahliae, Erwinia carotovorum p.v. Carotovora, Cephalosporium acremonium, Phitophthora cryptogea, Albugo tragopogonis.*

Insectos/nemátodos patógenos: *Suleima helianthana; Homoeosoma electellum; zygogramma exclamationis; Bothirus gibbosus; Neolasioptera murtfeldtiana;*

7. *Maíz*

Patógenos fúngicos, bacterianos o virales: *Fusarium moniliforme var. subglutinans, Erwinia stewartii, Fusarium moniliforme, Gibberella zeae (Fusarium graminearum), Stenocarpella maydi (Diplodia maydis), Pythium irregulare, Pythium debaryanum, Pythium graminicola, Pythium splendens, Pythium ultimum, Pythium aphanidermatum, Aspergillus flavus, Bipolaris maydis* 0, T *(Cochliobolus heterostrophus), Helminthosporium carbonum* I, II & III *(Cochliobolus carbonum), Exserohilum turcicum* I, II & III, *Helminthosporium pedicellatum, Phisoma maydis, Phillosticta maydis, Kabatiella maydis, Cercospora sorghi, Ustilago maydis, Puccinia sorghi, Puccinia polysora, Macrofomina phaseolina, Penicillium oxalicum, Nigrospora oryzae, Cladosporium herbarum, Curvularia lunata, Curvularia inaequalis, Curvularia pallescens, Clavibacter michiganese subsp. nebraskense, Trichoma viride*, Maize Dwarf Mosaic Virus A & B (virus mosaico enano de maíz), Wheat Streak Mosaic Virus (virus mosaico de pica en trigo), Maize Chlorotic Dwarf Virus (virus enano clorótico de maíz), *Claviceps sorghi, Pseudonomas avenae, Erwinia chrysanthemi p.v. Zea, Erwinia corotovora, Cornstunt spiroplasma, Diplodia macrospora, Sclerophthora macrospora, Peronosclerospora sorghi, Peronosclerospora philippinesis, Peronosclerospora maydis, Peronosclerospora sacchari, Spacelotheca reiliana, Phisopella zeae, Cephalosporium maydis, Caphalosporium acremonium*, Maize Chlorotic Mottle Virus (virus jaspeado clorótico de maíz), High Plains Virus (virus de las llanuras altas), Maize Mosaic Virus (virus mosaico de maíz), Maize Rayado Fino Virus, Maize Streak Virus (MSV, Maízstrichel-Virus, virus pica de maíz), Maize Stripe Virus (virus raya de maíz), Maize Rough Dwarf Virus (virus enano rugoso de maíz).

Insectos/nemátodos patógenos: *Ostrinia nubilalis; Agrotis ipsilon; Helicoverpa zea; Spodoptera frugiperda; Diatraea grandiosella; Elasmopalpus lignosellus; Diatraea saccharalis; Diabrotica virgifera; Diabrotica longicornis barberi; Diabrotica yecimpunctata howardi; Melanotus spp.; Cyclocephala borealis; Cyclocephala immaculata; Popillia japonica; Chaetocnema pulicaria; Sphenoforus maidis; Rhopalosiphum maidis; Anuraphis maidiradicis; Blissus leucopterus; Melanoplus femurrubrum; Melanoplus sanguinipes; Hilemva platura; Agromyza parvicornis; Anafothrips obscrurus; Solenopsis milesta; Tetranychus urticae.*

8. *Sorgo*

Patógenos fúngicos, bacterianos o virales: *Exserohilum turcicum, Colletotrichum graminicola (Glomerella graminicola), Cercospora sorghi, Gloeocercospora sorghi, Ascochita sorghina, Pseudomonas syringae p.v. syringae, Xanthomonas campestris p.v. holcicola, Pseudomonas andropogonis, Puccinia purpurea, Macrofomina phaseolina, Perconia circinata, Fusarium monilifonne, Alternaria alternate, Bipolaris sorghicola, Helminthosporium sorghicola, Curvularia lunata, Foma insidiosa, Pseudomonas avenae (Pseudomonas alboprecipitans), Ramulispora sorghi, Ramulispora sorghicola, Phillachara sacchari, Sporisorium reilianum (Sphacelotheca reiliana), Sphacelotheca cruenta, Sporisorium sorghi, Sugarcane mosaic H,* Maize Dwarf Mosaic Virus A & B*, Claviceps sorghi, Rhizoctonia solani, Acremonium strictum, Sclerophthona macrospora, Peronosclerospora sorghi, Peronosclerospora philippinensis, Sclerospora graminicola, Fusarium graminearum, Fusarium oxisporum, Pythium arrhenomanes, Pythium graminicola.*

Insectos/nemátodos patógenos: *Chilo partellus; Spodoptera frugiperda; Helicoverpa zea; Elasmopalpus lignosellus; Feltia subterranea; Phvllophaga crinita; Eleodes, Conous y Aeolus spp.; Oulema melanopus; Chaetocnema pulicaria; Sphenoforus maidis; Rhopalosiphum maidis; Siphaflava; Blissus leucopterus leucopterus; Contarinia sorghicola; Tetranychus cinnabarinus; Tetranychus urticae.*

9. *Algodón*

Insectos/nemátodos patógenos: *Heliothis virescens; Helicoverpa zea; Spodoptera exigua; Pectinofora gossypiella; Anthonomus grandis grandis; Aphis gossypii; Pseudatomoscelis seriatus; Trialeurodes abutilonea; Lygus lineolaris; Melanoplus femurrubrum; Melanoplus differentialis; Thrips tabaci (onion thrips); Franklinkiella fusca; Tetranychus cinnabarinus; Tetranychus urticae.*

10. *Arroz*

Insectos/nemátodos patógenos: *Diatraea saccharalis; Spodoptera frugiperda; Helicoverpa zea; Colaspis brunnea; Lissorhoptrus oryzophilus; Sitophilus oryzae; Nefotettix nigropictus; Blissus Ieucopterus leucopterus; Acrosternum hilare.*

11. *Colza*

Insectos/nemátodos patógenos: *Brevicoryne brassicae; Phiilotreta cruciferae; Mamestra conjgurata; Plutella xilostella; Delia ssp..*

En el contexto de la invención el término “proteína BI1” significa polipéptidos que tienen al menos una secuencia con una homología de al menos 50%, preferible al menos 80%, particularmente preferible al menos 90%, muy particularmente preferible 100% hacia un motivo de consenso BI1 seleccionado del grupo compuesto de

a) H(L/I)KXVY

b) AXGA(Y/F)XH

c) NIGG

d) P(V/P)(Y/F)E(E/Q)(R/Q)KR

e) (E/Q)G(A/S)S(V/I)GPL

f) DP(S/G)(L/I)(I/L)

g) V(G/A)T(A/S)(L/I)AF(A/G)CF(S/T)

h) IL(Y/F)LGG, preferiblemente EILILGG

i) L(L/V)SS(G/W)L(S/T)(I/M)L(L/M)W

j) DTGX(I/V) (I/V)E

Particularmente se prefiere en este caso el motivo de consenso BI f) IL(Y/F)LGG, muy particularmente preferible (EILILGG).

Este motivo es característico para proteínas vegetales BI1.

Particularmente preferible tienen lugar secuencias con homología hacia al menos 2 ó 3 de estos motivos (a hasta g) en una proteína BI1, muy particularmente preferible al menos 4 ó 5, lo más preferible todos los motivos de a hasta j. Otros motivos de secuencia típicos pueden derivarse por parte de la persona técnica sin dificultad a partir de la comparación de secuencias de proteína BI1, tal como se representa en las figuras 1 ó 6.

Especialmente se prefieren proteínas BI que se codifican a través de un polipéptido que comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo compuesto de:

a) las secuencias según SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 38, y

b) Secuencias que tienen una identidad de al menos 50%, preferible de al menos 70%, particularmente preferible de al menos 90%, muy particularmente preferible de al menos 95% hacia una de las secuencias según SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 38,

c) Secuencias que comprenden al menos una secuencia parcial de al menos 10, preferible 20, particularmente preferible 50 residuos de aminoácidos relacionados contiguos de una de las secuencias según SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 38.

De acuerdo con la invención, el término proteína BI comprende especialmente mutaciones naturales o artificiales del polipéptido BI1 según SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 y 38 así como polipéptidos homólogos de otros organismos, preferible vegetales, los cuales tienen esencialmente propiedades iguales. Las mutaciones comprenden sustituciones, adiciones, deleciones, inversión o inserciones de uno o varios residuos de aminoácidos. También están comprendidos usando proteínas BI1 de organismos no vegetales como por ejemplo el ser humano (GenBank Acc.-No.: P55061), ratas (GenBank Acc.-No.: P55062) o drosófilas (GenBank Acc.-No.: Q9VSH3). Entre proteínas BI1 vegetales y no vegetales, los motivos conservados pueden identificarse fácilmente mediante comparaciones de secuencia (compárese Alignment in Bolduc et 1. (2003) Planta 216:377-386; Fig. 1 y 6).

De esta manera, por la presente invención también están comprendidos, por ejemplo, aquellos polipéptidos que se obtienen por modificación de un polipéptido según SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 y 38.

Las secuencias de otros vegetales homólogas a las secuencias BI1 divulgadas en el contexto de esta invención pueden descubrirse, por ejemplo, por

a) búsqueda de banco de datos en bancos de organismos cuya secuencia genómica o de cADN sea total o parcialmente conocida, usando secuencias BI1 siministradas como secuencias de búsqueda o

b) inspección completa de bibliotecas de genes o de cADN usando secuencias BI1 suministradas como sondas. La inspección completa de bibliotecas de cADN o genómicas (usando, por ejemplo, un de las secuencias de ácido nucleico descritas bajo SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 y 37 o partes de las mismas como sondas), es uno de los métodos corrientes para la persona técnica en la materia para identificar homólogos en otras especies. En este caso, las sondas derivadas de las secuencias de ácido nucleico según SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 y 37 tienen una longitud de al menos 20 bp, preferible al menos 50 bp, particularmente preferible al menos 100 bp, muy particularmente preferible al menos 200 bp, lo más preferible al menos 400 bp. Para la inspección total de las bibliotecas también puede emplearse una cadena de ADN complementaria a las secuencias descritas bajo SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 y 37.

Por homología entre dos secuencias de ácido nucleico se entiende la identidad de la secuencia de ácido nucleico por toda la longitud de secuencia respectiva, la cual se calcula mediante comparación con ayuda del algoritmo de programático GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul *et al*. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 siguientes) estableciendo los siguientes parámetros:

| | |
|---|---|
| Gap Weight (peso): 50 | Length Weight (longitud peso): 3 |
| Average Match (coincidencia promedio): 10 | Average Mismatch (no coincidencia promedio): 0 |

Por ejemplo, por una secuencia que tiene una homología de al menos 80% en la base de ácido nucleico con la secuencia SEQ ID NO: 1 se entiende una secuencia que en comparación con la secuencia SEQ ID NO: 1 según el algoritmo programático de arriba con el parámetro establecido tiene una homología de al menos 80%.

Por homología entre dos polipéptidos se entiende la identidad de la secuencia de aminoácidos por toda la longitud respectiva de secuencia que se calcula por comparación con ayuda del algoritmo programático GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) estableciendo los siguientes parámetros:

| | |
|---|---|
| Gap weight (peso): 8 | lenght weight (longitud peso):2 |
| Coincidencia promedio: 2,912 | No coincidencia promedio: -2,003 |

Por ejemplo, por una secuencia que tiene una homología de sl menos 80% sobre la base de proteína con la secuencia SEQ ID NO: 2, se entiende una secuencia que en comparación con la secuencia SEQ ID NO: 2 presenta una homología de al menos 80% según el algoritmo programático con el parámetro establecido de arriba.

Las proteínas BI1 abarcan también aquellos polipéptidos que se codifican a través de las secuencias de ácido nucleico que hibridan bajo condiciones estándar con una de las secuencias de ácido nucleico BI1 descritas a través de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 y 37, con la secuencia de ácido nucleico complementaria a la misma o con partes de la previamente mencionada y que tienen las características esenciales iguales como las proteínas descritas bajo SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 y 38.

El término "condiciones de hibridación" debe entenderse ampliamente y exige condiciones de hibridación estrictas como también menos estrictas. Tales condiciones de hibridación se describen entre otros en Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T *et al*., en Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, páginas 9.31-9.57) o en Current Protocols en Molecular Biology, John Wiley &Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, las condiciones durante el paso de lavado pueden seleccionarse del rango de condiciones limitado de aquellas con baja estrictez (con aproximadamente 2X SSC a 50ºC) y aquellas con estrictez más alta (con aproximadamente 0.2X SSC a 50ºC, preferible a 65ºC) (20X SSC: citrato de sodio de 0,3M, NaCl de 3M, pH 7.0). Además, la temperatura puede aumentar durante el paso de lavado en condiciones poco estrictas a temperatura ambiente, aproximadamente 22ºC, hasta condiciones más estrictas a aproximadamente 65ºC. Ambos parámetros, concentración de sal y temperatura, pueden variar simultáneamente; Uno de los dos parámetros también puede mantenerse constante y solo variar el otro. Durante la hibridación también pueden emplearse agentes denaturalizante como por ejemplo formamida o SDS. En presencia de formamida al 50% se realiza la hibridación preferiblemente a 42ºC.

"Propiedades esenciales" significa en referencia a una proteína BI1 una o más de las siguientes propiedades:

a) el otrogamiento o aumento de la resistencia a patógenos frente a al menos un patógeno durante el aumento de la cantidad de proteína o la función de dicha proteína BI1 en al menos un tejido de la planta; dicho tejido no es la epidermis de la hoja.

b) Ausencia de una muerte celular inducida espontáneamente cuando se incrementa la cantidad de proteína o la función de dicha proteína BI

c) La propiedad de inhibir significativamente apoptosis inducida por BAX en el caso de co-transfección de BAX y dicha proteína BI1, por ejemplo en células HEK293. Se han descrito métodos correspondientes (Bolduc N *et al*. (2003) Planta 216:377-386).

d) La presencia de cinco hasta siete dominios de transmembrana putativos dentro de dicha proteína BI1.

e) Una localización preferencial en las membranas de la célula, en especial en la membrana del núcleo, membrana ER y/o membrana tilacoide.

En este caso, la manifestación cuantitativa de dichas propiedades de una proteína BI1 pueden desviarse en ambas direcciones en comparación con un valor obtenido para la proteína BI1 según SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 o 38.

El término "incremento de la cantidad de proteína BI1" debe entenderse en el contexto de esta invención de manera amplia y puede basarse en diversos mecanismos biológicos celulares.

"Cantidad de proteína" significa la cantidad de una proteína BI1 en el organismo, tejido, célula o compartimiento de célula respectivamente indicado.

"Incremento de la cantidad de proteína" significa el incremento cuantitativo de la cantidad de una proteína BI1 en el organismo, tejido, célula o compartimiento indicado respectivo - por ejemplo mediante uno de los métodos descritos abajo - en comparación con el tipo silvestre del mismo género y tipo al cual este método no se ha aplicado, pero bajo condiciones contextuales de otra manera iguales (como, por ejemplo, condiciones de cultivo, edad de las plantas, etc.). El incremento es en tal caso de al menos 10%, preferible de al menos 30% o de al menos 50%, particularmente preferible de al menos 70% ó 100%, muy particularmente preferible en al menos 200% o 500%, lo más preferible en al menos 1000%. La determinación de la cantidad de proteína puede realizarse mediante diferentes métodos corrientes para la persona técnica en la materia. A manera de ejemplo, aunque sin limitar por esto, se mencionan: el método de micro-biuret (Goa J (1953) Scand J Clin Lab Invest 5:218-222), die Folin-Ciocalteu-Metode (Lowry OH *et al*. (1951) J Biol Chem 193:265-275) o la medición de la adsorción de CBB G-250 (Bradford MM (1976) Analyt Biochem 72:248-254). También puede realizarse una cuantificación mediante métodos inmunológicos, como por ejemplo Western-Blot. La preparación de anticuerpos BI1 correspondientes así como la realización de Western-Blots BI1 se han descrito (Bolduc *et al*. (2002) FEBS Lett 532:111-114). Una cuantificación indirecta puede realizarse mediante Northern-Blots; normalmente la cantidad de mARN se correlaciona bien con la cantidad de proteína resultante. Se han descrito métodos correspondientes (entre otros, Bolduc *et al*. (2003) Planta 216:377-386; Matsumura H *et al*. (2003) Plant J 33:425-434).

"Función" significa preferiblemente la propiedad de una proteína BI1 de reducir muerte celular inducida espontáneamente y/o la propiedad de inhibir el efecto de Bax que indica apoptosis. Las funciones correspondientes pertenecen a la propiedad esencial de una proteína BI1.

"Incremento" de la función significa en el contexto de esta invención por ejemplo el incremento cuantitativo de la acción inhibitoria sobre la muerte celular apoptótica inducida por Bax, la cual puede cuantificarse mediante métodos corrientes para la persona técnica en la materia (véase arriba) La cantidad elevada es de al menos 10%, preferible de al menos 30% o de al menos 50%, particularmente preferible de al menos 70% o 100%, muy particularmente preferible en al menos 200% ó 500%, lo más preferible en al menos 1000%. Los métodos para el incremento de la función comprenden, además de los métodos descritos arriba para el incremento de la cantidad de proteína (la cual siempre aumenta la función), también la introducción de mutaciones en una proteína BI1, a manera de ejemplo pero sin limitar.

La cantidad de proteína BI1 se eleva por ejemplo, sin limitarse a, mediante uno de los siguientes métodos:

a) expresión o sobre-expresión recombinante de una proteína BI1 mediante la introducción de un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína bajo el control de un promotor específico para tejido, donde dicho promotor no tiene esencialmente actividad en la epidermis de la hoja.

b) Modificación (por ejemplo, intercambio) de las regiones regulatorias (por ejemplo, de la región de promotor) de un gen BI1 endógeno, por ejemplo intercambio de un promotor específico de tejido por medio de recombinación homóloga, donde dicho promotor no tiene esencialmente actividad en la epidermis de la hoja.

c) Inserción de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína BI1 en el genoma vegetal detrás de un promotor específico para tejido por medio de recombinación homóloga, donde dicho promotor no tiene esencialmente actividad en la epidermis de la hoja.

d) Incremento de la expresión de una proteína BI1 endógena mediante la introducción de un factor de transcripción (por ejemplo, de un factor de transcripción artificial de la clase de proteína de dedo de cinc) adecuado para la inducción de la expresión de dicha proteína BI1. Se prefiere la introducción de un casete de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para dicho factor de transcripción bajo control de un promotor específico de tejido, donde dicho promotor no tiene esencialmente actividad en la epidermis de la hoja.

El término "introducción" comprende en el contexto de la invención todos los métodos adecuados para introducir el compuesto a introducir, directa o indirectamente, en una planta o una célula, compartimiento, tejido, órgano o semilla de la misma, o generarlo allí. Están comprendidos métodos directos e indirectos. La introducción puede conducir a una presencia pasajera (transitoria) de dicho compuesto o también a una duradera (estable) o inducible. La introducción comprende, por ejemplo, métodos como la transfección, transducción o transformación.

En los casetes de expresión empleados en el contexto de la invención, una molécula de ácido nucleico (que codifica por ejemplo para una proteína BI1) está en conexión funcional con al menos un promotor específico para tejido, donde dicho promotor no tiene actividad esencialmente en la epidermis de la hoja y donde el promotor es heterólogo con respecto a la secuencia de ácido nucleico a expresar; es decir, no tiene lugar de manera natural en combinación con la misma. Los casetes de expresión recombinantes de acuerdo con la invención pueden comprender opcionalmente otros elementos de control genéticos.

Por conexión funcional se entiende, por ejemplo, la disposición secuencial del dicho promotor con la secuencia de ácido nucleico a expresar y, opcionalmente, otros elementos regulatorios como por ejemplo un terminador de tal modo que cada uno de los elementos regulatorios puede desempeñar su función en la expresión recombinante de la secuencia

de ácido nucleico. Para este propósito no es necesariamente obligatoria una conexión directa en el sentido químico. Las secuencias genéticas de control, como por ejemplo secuencias enhancer, también pueden ejercer su función desde otras posiciones alejadas o inclusive desde otras moléculas de ADN sobre la secuencia de destino. Se prefieren disposiciones en los que la secuencia de ácido nucleico a expresarse recombinante se posiciona detrás de la secuencia que funge como promotor, de modo que ambas secuencias están enlazadas una con otra de manera covalente. En tal caso se prefiere la distancia entre la secuencia de promotor y la secuencia a expresarse recombinante menor que 200 pares de bases, particularmente preferible menor que 100 pares de bases, muy particularmente preferible menor que 50 pares de bases. La preparación de una conexión funcional como también la preparación de un casete de expresión recombinante puede realizarse por medio de técnicas corrientes de recombinación y clonación, tal como se describen, por ejemplo, en Maniatis T, Fritsch EF y Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), en Silhavy TJ, Berman ML y Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM *et al*. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience y en Gelvin *et al*. (1990) en: Plant Molecular Biology Manual. Entre ambas secuencias también pueden posicionarse otras secuencias que tienen, por ejemplo, la función de un linker (enlazante) con determinadas intersecciones de enzima de restricción o de una señal de péptido. La inserción de secuencias también puede conducir a la expresión de proteínas de fusión.

Preferiblemente, el casete de expresión que se compone de una conexión del promotor y de la secuencia de ácido nucleico a expresar puede estar presente de manera integrada en un vector e insertarse a un genoma vegetal mediante transformación, por ejemplo.

Por un casete de expresión recombinante también deben entenderse aquellas construcciones en las que el promotor, por ejemplo mediante una recombinación homóloga, se ubica antes del gen BI1 endógeno y de esta manera controla la expresión de la proteína BI1. De manera análoga, la secuencia de ácido nucleico a expresarse (que codifica para una proteína BI1, por ejemplo) también puede ubicarse detrás de un promotor endógeno de tal manera que se manifieste el mismo efecto. Ambos planteamientos conducen a los casetes de expresión recombinantes en el sentido de la invención.

Por un "promotor específico para tejido que no tiene esencialmente actividad en la epidermis de la hoja" se entienden en el contexto de esta invención en general aquellos promotores que son adecuados para asegurar o elevar una expresión recombinante de una secuencia de ácido nucleico al menos en un tejido vegetal, con la condición de que

a) dicho tejido vegetal se seleccione de todos los tejidos vegetales con excepción de la epidermis, y

b) la expresión recombinante bajo el control del dicho promotor en dicho tejido vegetal alcance al menos cinco veces, preferible al menos diez veces, particularmente preferible al menos cien veces la expresión en la epidermis de hoja vegetal.

La persona técnica en la materia conoce numerosos promotores que satisfacen estos requisitos. En especial son adecuados promotores específicos para tejido tales como, por ejemplo, aunque sin limitarse a, promotores con especificidades para las anteras, los ovarios, flores, tallos, raíces, tubérculos o semillas.

a) Como promotores específicos de semillas se prefieren, por ejemplo, lo promotores de faseolina (US 5,504,200; Bustos MM *et al*. (1989) Plant Cell 1(9):839-53), 2S Albumins (Joseffson LG *et al*. (1987) J Biol Chem 262: 12196-12201), Legumins (Shirsat A *et al*. (1989) Mol Gen Genet 215(2):326-331) y Legumin B4 (LeB4; Baumlein H *et al*. (1991) Mol Gen Genet 225:121-128; Baumlein H *et al*. (1992) Plant J 2(2):233-9; Fiedler U *et al*. (1995) Biotechnology (NY) 13.(10):1090f), USP (unknown seed protein; Baumlein H *et al*. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-67), Napins (US 5,608,152; Stalberg K *et al*. (1996) L Planta 199:515-519), Saccharosebindeproteins (WO 00/26388), Oleosins (WO 98/45461), o el promotor Bce4 de Brassica (WO 91/13980). Otros promotores adecuados específicos para semillas son los de genes que codifican para la "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadina, enzima de ramificación, ADP glucosa pirofosfatasa (AGPase) o la sintaza de almidón. Además se prefieren promotores que permiten expresión específica de semilla en monocotiledóneas tales como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz etc. De manera ventajosa pueden emplearse el promotor del gen lpt2 o Ipt1 (WO 95/15389, WO 95/23230) o los promotores descritos en WO 99/16890 (promotores del gen hordeina, del gen glutelina, del gen oryzina, del gen prolamina, del gen gliadina, del gen glutelina, del gen zeina, del gen kasirina o del gen secalina). Otros promotores específicos de semilla se describen en WO 89/03887.

b) Promotores específicos de tubérculos, de raíces de almacenamiento o de raíces comprenden, por ejemplo, el promotor del gen de patatina (GenBank Acc.-No.: A08215), el promotor B33 de patatina clase I (GenBank Acc.-No.: X14483) o el promotor de la catepsina D inhibidor de patata. En especial se prefiere el promotor descrito por SEQ ID NO: 29. Los promotores específicos de tubérculos son en el contexto de la invención adecuados en especial para lograr una resistencia contra *Phitophthora infestans*. Puesto que los hongos obligat-biotróficos solo atacan las hojas, es irrelevante una actividad en el tejido epidérmico del tubérculo.

c) Los promotores específicos de flores comprenden, por ejemplo, el promotor de fitoeno sintasa Promotor (WO 92/16635) o el promotor del gen P-rr (WO 98/22593).

d) Los promotores específicos de anteras comprenden, por ejemplo, el promotor 5126 (US 5,689,049, US 5,689,051), el promotor glob-1 y el promotor $\gamma$-zein.

e) Promotores específicos de granzas, como por ejemplo el promotor en US 6,291,666. Los promotores específicos de granzas son ventajosos especialmente para facilitar una resistencia contra fusarium.

f) Promotores específicos de mesófilos tales como, por ejemplo, el promotor del gen de germen de trigo 9f-3.8 (banco de genes GenBank Acc.-No.: M63224) o el promotor de cebada GerA (WO 02/057412). Dichos promotores son especialmente ventajosos porque son tanto específicos de mesófilos como inducibles para patógenos. También es adecuado el promotor específico para mesófilo de arabidopsis CAB-2 (GenBank Acc.-No.: X15222), así como el promotor *zea mays* PPCZm1 (GenBank Acc.-No.: X63869). En especial se prefieren los promotores descritos por SEQ ID NO: 30, 31 o 32. Las secuencias de ácido nucleico presentes en casetes de expresión o vectores recombinantes utilizados en los métodos de acuerdo con la invención pueden enlazarse funcionalmente con otras secuencias genéticas en adición al promotor. El término de las secuencias genéticas de control debe entenderse de manera amplia y significa todas aquellas secuencias que tienen una influencia sobre la producción o la función del casete de expresión recombinante de acuerdo con la invención. Las secuencias de control genéticas también comprenden otros promotores, elementos de promotor o promotores mínimos, todos los cuales pueden modificar las propiedades que regulan la expresión. De esta manera, por ejemplo, la expresión específica de tejido puede depender adicionalmente de ciertos factores de estrés debido a las secuencias de control genéticas. Tales elementos se han descrito, por ejemplo para estrés de agua, ácido abscícico (Lam E & Chua NH (1991) J Biol Chem 266(26):17131-17135) y estrés de calor (Schoffl F *et al*. (1989) Mol Gen Genet 217(2-3):246-53).

Las secuencias genéticas de control comprenden también las regiones 5'-no trasladadas, intrones o la región 3' no trasladada de genes como por ejemplo el intron actin-1 o el intron Adh1-S 1, 2 y 6 (en general: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Se ha mostrado que éstas pueden desempeñar una función significativa en la regulación de la expresión génica. Así se ha mostrado que las secuencias no trasladas 5' pueden reforzar la expresión transitoria de genes heterólogos. A manera de ejemplo, para reforzadores de traslación se nombra la secuencia líder 5' del virus mosaico del tabaco (Gallie *et al*. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) y similares. Además, pueden promover aún más la especificidad de tejido (Rouster J *et al*. (1998) Plant J 15:435-440).

El casete de expresión recombinante puede comprender ventajosamente una o más de lo que se conocen como "secuencias promotoras" ("enhancer secuencies"), enlazadas funcionalmente al promotor, lo cual hace posible una expresión recombinante aumentada de la secuencia de ácido nucleico. Secuencias ventajosas adicionales, tales como otros elementos regulatorios o terminadores, también pueden insertarse en el extremo 3' de las secuencias de ácido nucleico a expresarse de manera recombinante. Las secuencias de ácido nucleico a expresarse de manera recombinante pueden estar contenidas en una o varias copias en el constructo génico.

Las señales de poliadenilación que son adecuadas como secuencias de control son señales de poliadenilación vegetales, preferible aquellas que esencialmente corresponden a señales de poliadenilación de T-ADN de *Agrobacterium tumefaciens*, en especial del terminador OCS (octopin-sintasa) y el terminador NOS (nopalin-sintasa).

Como secuencias de control se deben entender además aquellas que hacen posible una recombinación homóloga o inserción en el genoma de un organismo huésped o que permiten la remoción desde el genoma. En el caso de recombinación homóloga, el promotor natural de un gen BI1 puede intercambiarse, por ejemplo, por uno de los promotores específicos de tejido preferidos. Métodos tales como la tecnología cre/lox permiten una remoción específica de tejido, si es apropiado inducible, del casete recombinante de expresión desde el genoma del organismo huésped (Sauer B (1998) Methods. 14(4): 381-92). En este método se pegan secuencias flanqueantes determinadas (secuencias lox) que más tarde permiten la remoción por medio de cre-recombinasa.

Un casete recombinante de expresión y los vectores derivados del mismo comprenden otros elementos funcionales. El término elemento funcional debe entenderse de manera amplia y se refiere a todos aquellos elementos que tienen un efecto en la generación, amplificación o función de los casetes de expresión recombinantes, vectores u organismos recombinantes de acuerdo con la invención. Los siguientes pueden mencionarse a manera de ejemplo, pero sin limitarse:

a) marcadores de selección que confieren resistencia a un inhibidor de metabolismo tal como 2-desoxiglucosa-6-fosfato (WO 98/45456), antibióticos o biocidas, preferible herbicidas, como por ejemplo kanamycina, G 418, bleomycina, higromycina, o fosfinotricina, etc. Particularmente se prefieren marcadores de selección aquellos que confieren una resistencia contra herbicidas. A manera de ejemplo se mencionan: secuencias de ADN que codifican para fosfinotricinacetiltransferasas (PAT) e inactivan inhibidores de glutaminsintasa (gen bar y pat), genes de 5-enolpiruvilshikimat-3-fosfatsintasa (EPSP genes de sintasa), que confieren una resistencia contra Glifosato® (N-(fosfonometil) glicina), el gen gox que codifica para enzimas que degradan Glifosato® (glifosatoxidoreductasa), el gen deh (que codifican para una dehalogenasa, que desactiva Dalapon®), acetolactatosintasas que desactivan sulfonilurea e imidazolinona así como genes bxn que codifican para nitrilasaenzimas que degradan bromoxinil, el gen aasa que confiere una resistencia contra el antibiótica apectinomycina, el gen de estreptomycinfosfotransferasa (SPT), que imparte una resistencia frente a estreptomycina, el gen de neomycinfosfotransferasa (NPTII) que confiere una resistencia contra kanamycina o geneticidina, el gen de higromycinfosfotransferasa (HPT), que facilita una resistencia contra higromycina, el gen de acetolactatsintasa (ALS), que confiere una resistencia contra herbicidas de sulfonilurea (por ejemplo, variantes mutadas de ALS con, por ejemplo, la mutación de S4 y/o Hra).

b) Genes reporteros que codifican fácilmente proteóna cuantificables y, por medio de su color o de actividad enzimática, hacen posible una valoración de la eficacia de transformación, el sitio de expresión o el tiempo de expresión. En este contexto muy especialmente preferidos son proteínas reporteras (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) tal como "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen *et al*.(1995) Plant Journal 8(5):777-784; Haseloff *et al*.(1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2122-2127; Reichel *et al*.(1996) Proc Natl Acad Sci USA 93 (12):5888-5893; Tian *et al*. (1997) Plant Cell Rep 16:267-271; WO 97/41228; Chui WL *et al*. (1996) Curr Biol 6:325-330; Leffel SM *et al*. (1997) Biotechniques. 23(5):912-8), la cloramfenicoltransferasa, una luciferasa (Ow *et al*. (1986) Science 234:856-859; Millar *et al*. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414), el gen de aequorina (Prasher *et al*. (1985) Biochem Biophis Res Commun 126(3):1259-1268), la $\beta$-galactosidasa, gen R-locus (codifican una proteína que regula la producción de pigmentos de antocianina (coloración roja) en tejido vegetal y hace así posible un análisis directo de la actividad promotora cin adición de otras sustancias o sustratos cromogénicos; Dellaporta *et al*., en: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282, 1988), muy particularmente se prefiere la $\beta$-glucuronidasa (Jefferson *et al*., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907).

c) orígenes de replicación que aseguran amplificación de los casetes de expresión recombinantes o los vectores de acuerdo con la invención en *E. coli*, por ejemplo. A manera de ejemplo se mencionan ORI (origen de replicación de ADN), el ori pBR322 o el ori P15A (Sambrook *et al*.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

d) Elementos que son requeridos para una transformación de vegetal mediada por agrobacterium, tales como, por ejemplo, la limitación derecha o izquierda del T-ADN o la región vir.

Para la selección de células recombinadas o también transformadas de manera homóloga con éxito, normalmente es indispensable introducir adicionalmente un marcador seleccionable que confiera resistencia frente a un biocida (por ejemplo, un herbicida), un inhibidor de metabolismo tal como 2-sesoxiglucosa-6-fosfato (WO 98/45456) o un antibiótico. El marcador de selección permite la selección de las células transformadas de las no transformadas (McCormick *et al*. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).

La introducción de un casete de expresión recombinantes de acuerdo con la invención a un organismo o células, tejidos, órganos, partes o semillas del mismo (preferiblemente a plantas o células vegetales, tejidos, órganos, partes o semillas) puede efectuarse de manera ventajosa usando vectores en los que están contenidos los casetes de expresión recombinantes. El casete de expresión recombinante puede introducirse en el vector (por ejemplo, un plásmido) por intersecciones de restricción adecuadas. El plásmido formado se introduce primero a *E. coli*. Las *E. coli* correctamente transformadas se seleccionan, cultivan y el plásmido recombinante se obtiene mediante métodos familiares a la persona técnica en la materia. Los análisis de restricción y secuenciación pueden servir para verificar el paso de clonación.

Los vectores pueden ser, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus o también agrobacterias. En una modalidad ventajosa, la introducción del casete de expresión recombinante se realiza por medio de vectores de plásmido. Se prefieren aquellos vectores que hacen posible una integración estable del casete de expresión recombinante al genoma huésped.

La preparación de un organismo transformado (o de una célula o tejido transformados) requiere la introducción de ADN, ARN o proteína en cuestión a la célula huésped relevante en cuestión.

Para este proceso, el cual se denomina como transformación (o transducción o transfección) se encuentran disponibles cantidades de métodos (Keown *et al*. (1990) Methods Enzymol 185:527-537; Jenes B *et al*.(1993) Techniques for Gene Transfer, en: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, publicado por SD Kung y R Wu, Academic Press, pág. 128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu Rev Plant Phisiol Plant Molec Biol 42;205-225).

Así, el ADN o ARN, por ejemplo, pueden introducirse directamente mediante microiyección o por bombardeo con micropartículas recubiertas de ADN. También la célula puede permeabilizarse químicamente usando, por ejemplo, polietilenglicol de modo que el ADN pueda entrar a la célula por difusión. El ADN también puede introducirse por fusión de protoplasto con otras unidades que contienen ADN tales como minicélulas, células, lisosomas o liposomas. Otro método adecuado de introducir ADN es electroporación, donde las células se permeabilizan de manera reversible por un pulso eléctrico. Se han descrito métodos correspondientes (por ejemplo en Bilang *et al*. (1991) Gene 100:247-250; Scheid *et al*. (1991) Mol Gen Genet 228:104-112; Guerche *et al*. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhause *et al*. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein *et al*. (1987) Nature 327:70-73; Howell *et al*. (1980) Science 208:1265; Horsch *et al*.(1985) Science 227:1229-1231; DeBlock *et al*. (1989) Plant Phisiol 91:694-701).

En el caso de las plantas, los métodos arriba descritos de transformación y regeneración de plantas a partir de tejidos vegetales o células vegetales se utilizan para la transformación transitoria o estable. Métodos adecuados son especialmente transformación de protoplasto por captación de ADN inducida por polietilenglicol, el método biolístico con el cañón de gen, el así llamado método de "particle bombardement" (bombardeo de partículas), la electroporación, la incubación de embriones secos en solución con contenido de ADN y la microinyección.

Además de estas técnicas "directas" de transformación, también puede realizarse una transformación mediante infección bacteriana por medio de *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. La transformación mediada

por Agrobacterium es la más adecuada para dicotiledóneas. Los métodos se describen, por ejemplo en Horsch RB *et al*. (1985) Science 225: 1229 y sig.).

Si se usan agrobacterias el casete de expresión recombinante debe integrarse a plásmidos específicos, ya sea en un vector intermedio (en inglés: shuttle or intermediate vector) o un vector binario. Si debe usarse un plásmido Ti o Ri para la transformación, al menos el límite derecho, aunque en la mayoría de casos el límite derecho e izquierdo, del T-ADN plásmido Ti o Ri se enlaza con el casete de expresión recombinante a introducirse en la forma de una región flanqueante.

Preferiblemente se usan vectores binarios. Los vectores binarios son capaces de repliación tanto en E. colo como en Agrobacterium. Normalmente comprenden un gen de marcador de selección y un linker (enlazante) o polinker flanqueado por secuencia de limitación derecha e izquierda de T-ADN. Pueden transformarse directamente en Agrobacterium (Holsters *et al*. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). El gen de marcador de selección permite una selección de agrobacterias transformadas y es el gen nptII, por ejemplo, que confiere una resistencia contra kanamycina. La Agrobacteria que en este caso funge como organismo huésped ya debe contener un plásmido con la región vir. Esta última se requiere para transferir el T-ADN a la célula vegetal. Una agrobacteria transformada de esta manera puede usarse para transformar células vegetales. El uso de T-ADN para transformar células vegetales se ha estudiad y descrito intensamente (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasserdam, Chapter V; An *et al*. (1985) EMBO J 4:277-287). Se conocen diversos vectores binarios y se encuentran disponibles comercialmente, de manera parcial, como por ejemplo pBI101.2 o pBIN19 (Bevan *et al*. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f; Clontech Laboratories, Inc. USA). Otros promotores adecuados para la expresión en vegetales se han descrito (Rogers *et al*. (1987) Methods Enzymol 153:253-277; Schardl *et al*. (1987) Gene 61:1-11; Berger *et al*. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Por principio, las técnicas directas de transformación son adecuadas para cada organismo y tipo de célula. En el caso de inyección o electroporación de ADN o ARN en células vegetales no se requiere que los plásmidos usados cumplan algún requisito en particular. Pueden usarse plásmidos sencillos como aquellos de la serie pUC. Si deben regenerarse plantas completas de las células transformadas, es necesario que en el plásmido se localice un gen adicional de marcador seleccionable.

Pueden seleccionarse células transformadas establemente, es decir, aquellas que contienen ADN introducido, integrado al ADN de la célula huésped, de células no transformadas cuando un marcador seleccionable es componente del ADN introducido. Como marcador puede fungir, por ejemplo, cada gen que es capaz de conferir una resistencia frente a antibióticos o herbicidas (como kanamycina, G 418, bleomycina, higromycina o fosfinotricina, etc.) (véase arriba). Las células transformadas que expresan un gen de marcador así son capaces de sobrevivir en la presencia de concentraciones de un antibiótico o herbicida correspondiente que puede matar un tipo silvestre no transformado. Ejemplos de marcadores de selección adecuados se mencionan arriba. Una vez que una célula vegetal transformada se ha generado, puede obtenerse una planta completa usando métodos conocidos por la persona técnica en la materia. Por ejemplo, como material de partida se usan cultivos de callo. La formación de vástagos y raíces puede inducirse de manera conocida a partir de estas masas celulares aún sin diferenciar. Las plántulas obtenidas pueden plantarse y cultivarse. La persona técnica conoce métodos de regeneración de partes de plantas y de plantas intactas a partir de células vegetales. Los métodos para hacer esto se describen, por ejemplo, por Fennell *et al*. (1992) Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger *et al* (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne *et al*. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533. Las plantas obtenidas pueden cultivarse e hibridarse (cruzarse) en la forma acostumbrada. Dos o más generaciones deben cultivarse para asegurar que la integración genómica es estable y hereditaria.

El método de acuerdo con la invención puede combinarse con otros métodos que producen resistencia ante patógenos (por ejemplo, frente a insectos, hongos, bacterias, nematodos y similares), resistencia frente a estrés u otro mejoramiento de las propiedades de la planta. Se mencionan ejemplo, entre otros, por Dunwell JM (2000) J Exp Bot. 51 Spec No:487-96. Se divulgan secuencias de polipéptidos que codifican para proteína BI1 que comprenden al menos una secuencia seleccionada del grupo que se compone de

a) las secuencias según SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 o 38,

b) secuencias que tienen una homología de al menos 90%, preferible de al menos 95%, particularmente preferible de al menos 98% con una de las secuencias según SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 o 38, y

c) secuencias que abarcan al menos 10, preferible al menos 20, particularmente preferible al menos 30 aminoácidos relacionados de una de las secuencias según SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, 32 o 38.

En la invención se usan preferiblemente secuencias de ácido nucleico que codifican para las nuevas secuencias de polipéptido de acuerdo con la invención las cuales codifican para proteína BI1. Se prefieren las secuencias de ácido nucleico según SEQ ID NO: 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 o 37, la secuencia de ácido nucleico complementaria a éstas y las secuencias derivadas de allí como resultado de la degeneración del código genético.

Para este propósito sirven casetes de expresión recombinantes que comprenden una de las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención. En los casetes de expresión recombinante, la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína BI1 de cebada está enlazada con al menos un elemento de control genético según la defini-

ción de arriba de tal modo que pueda realizarse la expresión (transcripción y opcionalmente translación) en cualquier organismo, preferible en vegetales. Los elementos de control genéticos adecuados para este propósito se han descrito arriba. Los casetes de expresión recombinantes también pueden contener otros elementos funcionales según la definición de arriba. La secuencia insertada de ácido nucleico que codifica para una proteína BI1 de cebada puede insertarse en el casete de expresión en orientación sense o antisense, y así conducir a la expresión de ARN sense o antisense. De acuerdo con la invención también se usan vectores recombinantes que contienen los casetes de expresión recombinantes.

Con respecto a, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico, de un casete de expresión o de un vector que contienen dicha secuencia de ácido nucleico o a un organismo transformado con dicha secuencia de ácido nucleico, casete de expresión o vector, "recombinante" significa todas aquellas construcciones producidas mediante métodos de ingeniería genética en las que, o bien

a) la secuencia de ácido nucleico BI1, o

b) una secuencia de control genética enlazada de manera funcional con la secuencia de ácido nucleico BI1, por ejemplo un promotor, o

c) (a) y (b)

no se ubican en su ambiente natural genético o han sido modificados mediante métodos de ingeniería genética, donde la modificación puede ser, por ejemplo, una sustitución, adición, deleción, inversión o inserción de uno o más residuos de nucleótidos. Un ambiente natural genético significa el locus cromosomático natural en el organismo de origen o la presencia en una biblioteca genómica. En el caso de una biblioteca genómica, se conserva preferiblemente, al menos aún en parte el ambiente natural genético de la secuencia de ácido nucleico. El ambiente flanquea la secuencia de ácido nucleico al menos a un lado y tiene una secuencia de al menos 50 bp, preferible de al menos 500 bp, particularmente preferible de al menos 1000 bp, muy particularmente preferible de al menos 5000 bp, en longitud. Un casete de expresión recombinante que tienen lugar naturalmente, por ejemplo la combinación que tienen lugar de manera natural del promotor BI1 con el gen correspondiente BI1, se vuelve un casete de expresión recombiante cuando éste se modifica mediante métodos no naturales, sintéticos ("artificiales") tales como, por ejemplo, una mutagenización.

Se han descrito métodos correspondientes (US 5,565,350; WO 00/15815; véase arriba también).

En una modalidad la invención se refiere al uso de una molécula de ácido nucleico BI-1 codificante o de una proteína BI-1 para la preparación de una planta resistente ante patógenos, preferiblemente para la preparación de una planta resistente ante hongos o para la preparación de un fungicida que provoca esto o para controlar o tratar plantas que son atacadas por patógenos, o amenazadas por el ataque de patógenos.

**Secuencias**

1. SEQ ID NO: 1: Secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína BI1 de cebada (*Hordeum vulgare*).

2. SEQ ID NO: 2: Secuencia de aminoácido que codifica para una proteína BI1 de cebada (*Hordeum vulgare*).

3. SEQ ID NO: 3: Secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína BI1 de *Arabidopsis thaliana*.

4. SEQ ID NO: 4: Secuencia de aminoácido que codifica para una proteína BI1 de *Arabidopsis thaliana*.

5. SEQ ID NO: 5; Secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína BI1 de tabaco.

6. SEQ ID NO: 6: Secuencia de aminoácido que codifica para una proteína BI1 de tabaco.

7. SEQ ID NO: 7: Secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína BI1 de arroz.

8. SEQ ID NO: 8: Secuencia de aminoácido kodierende für una proteína BI1 de arroz.

9. SEQ ID NO: 9: Secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína BI1 de colza.

10. SEQ ID NO: 10: Secuencia de aminoácido que codifica para una proteína BI1 de colza.

11. SEQ ID NO: 11: Secuencia de ácido nucleico que codifica para parte de una proteína BI1de soja.

12. SEQ ID NO: 12: Secuencia de aminoácido que codifica para parte de una proteína BI1 de soja.

13. SEQ ID NO: 13: Secuencia de ácido nucleico que codifica para parte de una proteína BI1 de soja.

14. SEQ ID NO: 14: Secuencia de aminoácido que codifica para parte de una proteína BI1 de soja.

15. SEQ ID NO: 15: Secuencia de ácido nucleico que codifica para parte de una proteína BI1 de trigo.

16. SEQ ID NO: 16: Secuencia de aminoácido que codifica para parte de una proteína BI1 de trigo.

17. SEQ ID NO: 17: Secuencia de ácido nucleico que codifica para parte de una proteína BI1 de maíz.

18. SEQ ID NO: 18: Secuencia de aminoácido que codifica para parte de una proteína BI1 de maíz.

19. SEQ ID NO: 19: Secuencia de ácido nucleico que codifica para parte de una proteína BI1 de trigo.

20. SEQ ID NO: 20: Secuencia de aminoácido que codifica para parte de una proteína BI1 de trigo.

21. SEQ ID NO: 21: Secuencia de ácido nucleico que codifica para parte de una proteína BI1 de maíz.

22. SEQ ID NO: 22: Secuencia de aminoácido que codifica para parte de una proteína BI1 de maíz.

23. SEQ ID NO: 23: Secuencia de ácido nucleico que codifica para parte de una proteína BI1 de maíz.

24. SEQ ID NO: 24: Secuencia de aminoácido que codifica para parte de una proteína BI1 de maíz.

25. SEQ ID No: 25: Secuencia de ácido nucleico que codifica para parte de una proteína BI1 de trigo.

26. SEQ ID NO: 26: Secuencia de aminoácido que codifica para parte de una proteína BI1 de trigo.

27. SEQ ID NO: 27: Secuencia de ácido nucleico que codifica para parte de una proteína BI1 de maíz.

28. SEQ ID NO: 28: Secuencia de aminoácido que codifica para parte de una proteína BI1 de maíz.

29. SEQ ID NO: 29: Secuencia de ácido nucleico que codifica para el promotor patatina de patata.

30. SEQ ID NO: 30: Secuencia de ácido nucleico que codifica para el promotor 9f-3.8 de germen de trigo.

31. SEQ ID NO: 31: Secuencia de ácido nucleico que codifica para el promotor de arabidopsis CAB-2.

32. SEQ ID NO: 32: Secuencia de ácido nucleico que codifica para el promotor PPCZm1 de maíz

33. SEQ ID NO: 33: Secuencia de ácido nucleico que codifica para vector recombinante de expresión pUbiBI-1

34. SEQ ID NO: 34: Secuencia de ácido nucleico que codifica para vector recombinante de expresión pLo114UbiBI-1

35. SEQ ID NO: 35: Secuencia de ácido nucleico que codifica para vector recombinante de expresión pOXoBI-1

36. SEQ ID NO: 36: Secuencia de ácido nucleico que codifica para vector recombinante de expresión pLo114OXoBI-1

37. SEQ ID NO: 37: Secuencia de ácido nucleico que codifica para proteína BI-1 de trigo

38. SEQ ID NO: 38: Secuencia de aminoácido que codifica para proteína BI-1 de trigo

39. SEQ ID NO: 39: secuencia de ácido nucleico que codifica para PEN1 (= ROR2) de cebada

40. SEQ ID NO: 40: Secuencia de aminoácido que codifica para PEN1 (= ROR2) de cebada

41. SEQ ID NO: 41: secuencia de ácido nucleico para PEN1 (= ROR2) de *arabidopsis thaliana*

42. SEQ ID NO: 42: Secuencia de aminoácido que codifica para PEN1 (= ROR2) de *arabidopsis thaliana*

43. SEQ ID NO: 43: Secuencia de ácido nucleico que codifica para SNAP34 de cebada

44. SEQ ID NO: 44: Secuencia de aminoácido que codifica para SNAP34 de cebada

**Figuras**

1. Fig. 1a-d: Comparación de secuencia de proteínas de diversas proteínas BI-1 de plantas. AtBI-1: Arabidopsis; BnBI-1: *Brassica napus* (colza); GmBI2: *Glycine max* (soja; Variante 1); GmBI3: *Glycine max* (soja; Variante 2); HVBI-1: *Hordeum vulgare* (cebada); NtBI-1: *Nicotiana tabacum* (tabaco); OsBI-1: *Oryza sativa* (arroz); TaBI11:

*Triticum aestivum* (trigo, Variante 1); TaBI18: *Triticum aestivum* (trigo, Variante 2); TaBI5 neu: *Triticum aestivum* (trigo, Variante 3); ZmBI14: *Zea mays* (maíz; Variante 1); ZmBI16: *Zea mays* (maíz; Variante 2); ZmBI33: *Zea mays* (maíz; Variante 3); ZmBI8: *Zea mays* (maíz; Variante 4); Consenso: secuencia de consenso derivada de la alineación (alignment).

2. Fig. 2: mapa vector para el vector pUbiBI-1 (Ubi: Promotor ubiquitina; BI-1 Secuencia de ácido nucleico que codifica para proteína BI1 de cebada; ter: terminador de transcripción). También se indica la localización de las intersecciones de diversas enzimas de restricción.

3. Fig. 3: mapa vector para el vector pLO114UbiBI-1 (Ubi: Promotor ubiquitina; secuencia de ácido nucleico BI-1 que codifica para proteína BI1 de cebada; ter: terminador de transcripción). También se indica la localización de las intersecciones de diversas enzimas de restricción.

4. Fig. 4: Mapa vector para el vector pOxoBI-1 (Oxo: Promotor de TaGermin 9f-2.8; Secuencia de ácido nucleico BI-1 que codifica para proteína BI1 cebada; ter: Terminador de transcripción). También se indica la localización de las intersecciones de diversas enzimas de restricción.

5. Fig. 5: Mapa vector para el vector pLO114OxoBI-1 (Oxo: Promotor TaGermin 9f-2.8; Secuencia de ácido nucleico BI-1 que codifica para proteína BI1 de cebada; ter: terminador de transcripción). También se indica la localización de las intersecciones de diversas enzimas de restricción.

6. Fig. 6: Comparación de las secuencias de proteína de proteínas BI-1 de cebada (*Hordeum vulgare*, GenBank Acc.-No.: CAC37797), arroz (*Oryza sativa*, GenBank Acc.-No.: Q9MBD8), *arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: Q9LD45) y ser humano (*Homo sapiens*, GenBank Acc.-No.: AAB87479). Los aminoácidos puestos en negro son idénticos en todas las especies. Las barras indican los siete dominios de transmembranas predichos en HvBI-1.

7. Fig. 7: expresión BI-1 en líneas de cebada resistentes y susceptibles (análisis de cADN Gelblot): cADNs se sintetizaron por medio de RT-PCR a partir de ARN total. ARN total se obtuvo a partir de línea de cebada susceptible Pallas, línea de cebada resistente BCPMla12 y línea resistente de cebada BCPmlo5 en el tiempo 0 (es decir, inmediatamente antes de la inoculación), y respectivamente 1, 4 y 7 días después de la inoculación con Bgh y en paralelo con esto a partir de plantas de control sin infectar (∅). El RT-PCR para BI-1 se llevó a cabo usando 20 ciclos (véase abajo). La cantidad de ARN empleada (0.5 $\mu$g) se controló adicionalmente en geles por medio de tinturado de rARN con bromuro de etidio. La repetición del experimento arrojó resultados comparables.

8. Fig. 8: BI-1 se expresa en el tejido de mesófilo (análisis de cADN gelblot). RT-PCR se llevó a cabo a partir de ARN aislado de Pallas (P) y BCPM1a12 (P10) (24 h después de inocular con BghA6). Para la extracción del ARN total se separaron bandas epidérmicas abaxiales (E, inokulierte Positionen der Blätter) del mesófilo y de la epidermis adaxial (M). Se usó ubiquitina 1 (Ubi) como marcador para expresión de gen no específico para tejido. RT-PCR se realizó usando 30 ciclos.

9. Fig. 9: Expresión BI-1 se reprime durante inducción de resistencia química.

(A) resistencia inducida químicamente en la línea de cebada Pallas gg. *Blumeria graminis (DC) Speer f.sp. hordei* (Bgh). Las hojas primarias de cebada se trataron con ácido 2,6-dicloroisonicotínico (DCINA) y mostraron menos pústulas de mildiú que las plantas de control correspondientes no tratadas.

(B) ARN y cADN Blots. ARN (10 $\mu$g) se analizó 0, 1, 2 y 3 días después del tratamiento del suelo (soil drench treatment; dpt) con DCINA o con el control (sustancia portadora) y adicionalmente 1 y 4 días después de la inoculación (dpi, corresponde a 4 ó 7 dpt). RT-PCR (Ubi, BI-1) se realizó usando 20 ciclos. La repetición condujo a resultados comparables (véase ejemplo 2). Como control se empleó BCI-4. BCI-4 es un gen inducido por DCINA (Besser *et al*. (2000) Mol Plant Pahol. 1 (5): 277-286) y un miembro de la familia de genes inducidos químicamente (Barley Chemically (=BTH) Induced).

10. Fig. 10: sobreexpresión de supersusceptibilidad inducida BI-1.

(A) Eficiencia promedio de penetración de Bgh en 6 experimentos independientes con Bgh sobre línea de cebad Ingrid. PE de Bgh se incrementó de manera significativa ($p<0.01$, prueba de Students) en las células que fueron transformadas (bombardeadas) con pBI-1 en comparación con células que fueron bombardeadas con el vector vacío de control (pGY1).

(B) La eficiencia de penetración de Bgh sobre células fueron bombardeadas con un constructo antisense BI-1 (pasBI-1), fue reducido de una manera insignificante ($p>0.05$) en comparación con las células que fueron bombardeadas con el vector vacío de control (pGY1). Las columnas reflejan en cada caso el valor medio de los experimentos individuales. Las barras representan el error estándar.

11. Fig. 11: Sobreexpresión de ruptura inducida BI-1 de la resistencia de penetración mediada por mlo5.

La eficiencia de penetración de Bgh se valoró en 3 a 4 experimentos independientes usando Bgh en las líneas de cebada Ingrid-mlo5 o bien Pallas-mlo5. La PE causada por Bgh se incrementó de manera significativa ($p<0.05$) en las células que se habían transformado (bombardeado) con pBI-1 en comparación con las células que habían sido bombardeado con el vector vacío de control (pGY1). Las columnas reflejan en cada caso el valor medio de tres experimentos independientes. Las barras representan el error estándar.

12. Fig. 12: La expresión de BI-1 se induce por filtrados de cultivo tóxicos a partir de *Bipolaris sorokiniana*. Northern-Blots (10 $\mu$g de ARN total) con ARN de Ingrid (I) y BCIngrid-mlo5 (I22). ARN se aisló 0, 24, 48 y 72 h después de la inyección del filtrado de cultivo tóxico de *Bipolaris sorokiniana* (T) o agua (W). mARNs BI-1 se detectó en membranas de nylon después de lavado estricto. BI-1: Detección de inhibidor BAX 1 mARN; Ubi: Detección de ubiquitina 1; Asprot: Detección de la aspartatproteasa mARN; hat: horas después de tratamiento ("h after treatment")

13. Fig. 13: sobreexpresión BI-1 rompe resistencia que no es de huésped de cebada (cv. Manchuria) frente a *Blumeria graminis f.sp. tritici*. Velocidades de penetración fueron analizadas en tres experimentos independientes.

**Ejemplos**

*Métodos generales*

La síntesis química de oligonucleótidos puede efectuarse, por ejemplo, de la manera conocida usando el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2. edición, Wiley Press New York, páginas 896-897). Los pasos de clonación realizados para los propósitos de la presente invención tales como, por ejemplo, escisiones de restricción, electroforesis de gel agarosa, purificación de fragmentos de ADN, transferencia de ácidos nucleicos a membranas de nitrocelulosa y nylon, enlazamiento de fragmentos de ADN, transformación de células de *E. coli*, cultivo de bacterias, multiplicación de fagos y análisis secuencias de ADN recombinante, se realizan tal como se describe en Sambrook *et al*. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6. La secuenciación de moléculas de ADN recombinante se realiza con un secuenciador de ADN de fluorescencia por láser de la empresa MWG-Licor según el método de Sanger (Sanger *et al*. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467).

Ejemplo 1

*Plantas, patógenos e inoculación*

Las variedades de cebada Ingrid, Pallas y la línea retro-cruzada BCPMla12, BCPmlo5 y BCIngrid-m lo5 (I22) fueron puestas a disposición por Lisa Munk, Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University, Kopenhagen, Dinamarca. Su preparación se ha descrito (Kølster P *et al*. (1986) Crop Sci 26: 903-907).

A menos que se describa otra cosa, la semilla que había sido pre-germinada sobre papel filtro húmedo durante 12 a 36 h en la oscuridad se sembró a lo largo del borde una maceta cuadrangular (8x8 cm) de a 5 granos en tierra Fruhstorfer del tipo P, se cubrió con tierra y se regó regularmente con agua corriente de acueducto. Todas las plantas se cultivaron en cabinas o cámaras de ambiente controlado (climatizadas) por 5 a 8 días a 18ºC, 60% de humedad relativa de aire y un ciclo de luz de 16 horas y de oscuridad de 8 horas con 3000 ó 5000 lux (50 ó 60 $\mu mols^{-1}m^{-2}$ densidad de flujo de fotones) 5 a 8 días y se usaron en los experimentos en la etapa de plántulas. En experimentos en los que las aplicaciones se realizaron a las hojas primarias, éstas últimas se habían desarrollado plenamente.

Antes de los experimentos de transfección transitoria, las plantas se cultivaron en cabinetes o cámaras climatizados a una temperatura durante del día de 24ºC, de noche 20ºC, 50 a 60% de humedad relativa del aire y un ciclo de luz de 16 horas de oscuridad de 16 horas con 30000 lux.

Para la inoculación de las plantas de cebada se usó mildiú auténtico de cebada *Blumeria graminis* (DC) *Speer f.sp. hordei Em.* Marchal de la raza A6 (Wiberg A (1974) Hereditas 77: 89-148) (BghA6). Este fue suministrado por el Instituto para Biometría, JLU Gießen. El post-cultivo del inóculo se llevó a cabo en cámaras climatizadas en las mismas condiciones que se describieron arriba para las plantas, transfiriendo los conidios de material vegetal infectado a plantas de cebada cv. Golden Promise, de 7 días de edad, cultivadas regularmente, a una densidad de 100 ronidios/$mm^2$.

La inoculación se llevó a cabo sobre hojas primarias de plantas de cebada con las siguientes densidades de conidios: 5 conidios/$mm^2$ en el caso de inducción química de resistencia y valoración macroscópica del éxito de inducción, 50 conidios/$mm^2$ en el caso de estudios de expresión de gene y 150 conidios/$mm^2$ en el caso de verificación de la transformación de gene con segmentos de hoja transformados. La inoculación con BghA6 se efectuó usando embriones de 7 días de edad agitando los conidios de plantas ya infectadas en una columna de inoculación (siempre que no se indique algo diferente).

Ejemplo 2

*Modulación de la expresión BI1 con DCINA*

Se aplicó ácido 2,6-diclorisonicotínico (DCINA, Syngenta AG, Basel, Suiza; como fórmula al 25% (w/w)) sobre brotes de cebada de 4 días de edad de la variedad Pallas por medio de riego del suelo ("soil drench") en una concentración final de 8 mg/l de volumen de suelo. La suspensión usada se aplicó con agua de acueducto.Como control sirvió un riego de suelo con el material portador (polvo que puede mojarse "wettable powder"). Después de tres días las plantas se infectaron con *Blumeria graminis (DC) Speer f.sp. hordei Em*. Marchal de la raza A6 (5 conidios/$mm^2$). Las plantas con resistencia inducida químicamente (CIR) tucieron cerca de 70% menos de colonias de mildiú sobre las plantas de control correspondientes, que solo se trataron con la sustancia portadora (Fig. 9A).

Northern Blot y RT-PCT Blots se efectuaron para determinar las cantidades de transcripto de BI1; estos revelaron una reducción sorprendente de la expresión de BI1 1 a 3 días después del tratamiento químico (Fig. 9B).

Ejemplo 3

*Extracción de ARN*

Se extrajo ARN total de 8 a 10 segmentos de hojas primarias (longitud 5 cm) por medio de "RNA Extraction Buffer" (búfer de extracción de ARN) (AGS, Heidelberg, Alemania). Para este propósito se recogieron los segmentos centrales de las hojas primarias de 5 cm de longitud y se homogenizaron en morteros en nitrógeno líquido. El homogenizado se almacenó a -70ºC hasta que se extrajo el ARN. El ARN total se extrajo del material de la hoja, congelado a profundidad, con la ayuda de un kit de extracción de ARN (AGS, Heidelberg). Para este efecto, 200 mg del material de hoja profundamente congelado se cubrió con 1,7 ml de búfer de extracción de ARN (AGS) en un tubo de microcentrífuga (2 ml) e inmediatamente se mezcló bien. Después de la adición de 200 $\mu$L de cloroformo, la mezcla se volvió a mezclar bien y se sacudió por 45 minutos en un agitador horizontal a 200 rpm a temperatura ambiente. Para separar las fases, a continuación se centrifugaron los tubos por 15 minutos a 20 000 g y 4ºC, la fase superior acuosa se transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga mientras que la fase del fondo fue descartada. La fase acuosa se purificó con 900 $\mu$L de cloroformo homogenizando por 10 segundos y re-centrifugando (véase arriba) y retirando la fase acuosa (3 veces). Luego, se adicionaron 850 $\mu$L de 2-propanol y la mezcla se homogenizó y se puso en hielo por 30 a 60 minutos para precipitar el ARN. Después, la mezcla se centrifugó por 20 minutos (véase arriba), el sobrenadante se decantó con cuidado, se adicionaron mediante pipeta 2 mL de etanol al 70% (-20ºC), se mezclo la mezcla y se re-centrifugó por 10 minutos. Luego, se volvió a decantar el sobrenadante y el pelet se liberó cuidadosamente del fluido residual, usando una pipeta y luego se secó en una corriente de aire limpio antes de colocarse en un sitio de trabajo con aire limpio. Luego se disolvió el ARN en 50 $\mu$L de DEPC - agua en hielo, se mezcló y se centrifugó por 5 minutos (véase arriba). 40 $\mu$L del sobrenadante, en calidad de solución de ARN, se transfirieron a un tubo nuevo de microcentrífuga y se almacenaron a -70ºC.

La concentración del ARN se determinó fotométricamente. Para este propósito se diluyó la solución de ARN 1:99 (v/v) con agua destilada y la extinción se midió a a 260 nm (fotómetro DU 7400, Beckman) ($E_{260}$ nm = 1 a 40 $\mu$g de ARN/mL). Las concentraciones de las soluciones de ARN se ajustaron a continuación a 1 ∞g/∞L con DEPC-agua para hacer coincidir los contenidos calculados de ARN y se verificaron en un gel de agarosa.

Para verificar las concentraciones de ARN en un gel de agarosa horizontal (1% de agarosa en búfer 1 x MOPS con 0,2 $\mu$g/mL de bromuro de etidio) se trató 1 $\mu$L de solución de ARN con 1 $\mu$L de 10 x MOPS, 1 $\mu$L de marcador de color y 7 $\mu$L de DEPC-agua, se separó de acuerdo con su tamaño a una tensión (voltaje) de 120 V en el gel en búfer corriente 1 x MOPS por 1,5 h y se fotografió bajo luz UV. Diferencias eventuales en la concentración de los extractos de ARN se ajustaron con DEPC-agua y se verificó de nuevo el ajuste en el gel.

Ejemplo 4

*Clonación de secuencia de cADN BI1de cebada*

El clon de longitud completa de hvBI1 (GenBank Acc.-No.: AJ290421) comprende en el extremo 3' dos stop-codones y un codón de inicio potencial en el extremo 5'. El ORF se extiende 247 aminoácidos y muestra el más alto grado de homología de secuencia con un gen BI1 del arroz, maíz, *Brassica napus* y *Arabidopsis thaliana* (respectivamente 86% de identidad a nivel de nucleótidos) y un homólogo humano BI1 (53% de similitud) (Fig. 1 y 6). La secuencia de aminoácido de hvBI1 comprende siete dominios potenciales de transmembrana con una orientación del término C en citosol.

Se prepararon los siguientes constructos:

a) Amplificación de un fragmento 478 bp del ADN BI1 de cebada BI1 cADN (GenBank Acc.-No.: AJ290421)

BI1-sense 5'-atggacgccttctactcgacctcg-3'

BI1-antisense 5'- gccagagcaggatcgacgcc-3'

b) Amplificación de un fragmento de cADN 513 bp Ubi (GenBank Acc.-No.: M60175)

UBI-sense 5'-ccaagatgcagatcttcgtga-3'

UBI-antisense 5'-ttcgcgataggtaaaagagca-3'

c) Amplificación de un marco de lectura BI1 de longitud completa 871 bp

BI1VL sense 5'-ggattcaacgcgagcgcaggacaagc-3'

BI1VL antisense 5'-gtcgacgcggtgacggtatctacatg-3'

Los fragmentos obtenidos se ligaron al vector pGEM-T por medio de una ligadura T-excedente y sirvieron como plásmidos de partida para la generación de sondas (por ejemplo para Northern-Blot) o bien dsRNA.

Los constructos individuales llevaban la denominación pGEMT-BI1, pGEMT-BI1VL(240) y pGEMT-UBI.

El producto de longitud completa BI1 se re-clonó a partir de pGEMT en la intersección SalI del vector pGY-1 (Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O. & Dudler, R. (1999) Mol. Plant-Microbe Interact. 12, 647-654) usando la intersección SalI en pGEMT y por medio de la intersección que había sido anexado al primer antisense BI1VL. Los vectores con orientación sense (pBI-1) y antisense (pasBI-1) se aislaron y se resecuenciaron. Los vectores contienen la secuencia BI-1 bajo control del promotor CaMV 35S.

Ejemplo 5

*Transcripción reversa - reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR)*

Para detectar pequeñas cantidades de transcripto, se efectuó un RT-PCR semicuantitativo usando el "OneStep RT-PCR Kit" (Qiagen, Hilden, Germany). En tal caso, primero se trasladó el ARN (véase arriba el aislamiento) a cADN (transcripción reversa) y el cADN buscado se amplificó en una reacción PCR a continuación usando primers específicos. Para estimar la cantidad inicial de ARN matricial se interrumpió la amplificación durante la fase exponencial (después de 20 ciclos) para reflejar las diferencia en el ARN de destino. Los productos de PCR se separaron por medio de un gel agarosa, denaturalizada, borronearon (blotted) en membranas de nylon y detectaron con sondas específicas marcadas no radioactivamente en condiciones estándar estrictas. La hibridación, los pasos de lavado y la inmunodetección se efectuaron tal como se describe bajo el "Northern Blot". Para las reacciones individuales (tanda de 25 $\mu$L) se combinaron los siguientes componentes usando el kit de RT-PCR de un paso "one Step RT-P CR Kit" (Qiagen, Hilden, Alemania):

1000 ng de ARN total de una muestra determinada

0,4 mM dNTPs,

En cada caso 0,6 $\mu$M de cada primer sense y antisense

0,10 $\mu$l de inhibidor RNasa

1 $\mu$L de mezcla de enzima en buffer 1x RT

La cADN-sintasa (Transcripción reversa) se efectuó por 30 min a 50ºC. A continuación se inactivó la transcriptasa reversa por 15 min a 95ºC, lo cual simultáneamente causa la activación de polimerasa de ADN y desnaturalización de cADN. A continuación se llevó a cabo una PCR con el siguiente programa: 1 min con 94ºC; 25 ciclos de 1 min a 94ºC; 1 min a 54ºC y 1 min a 72ºC; para terminar 10 min a 72ºC. Luego, almacenamiento a 4ºC hasta seguir el procesamiento. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa 1xTBE con bromuro de etidio. Para las amplificaciones en las tandas individuales se usaron los pares de primers indicados arriba.

Ejemplo 6

*Análisis de Northem-Blot*

Para la preparación del Northern-Blotting se separó ARN en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Para este efecto, parte de la solución de ARN (correspondiente a 10 $\mu$g de ARN) fue mezclado con un volumen idéntico del búfer de muestra (con bromuro de etidio), desnaturalizado por 5 minutos a 94ºC, colocado en hielo por 5 minutos, centrifugado brevemente y aplicado al gel. El gel de 1 x MOPS (1,5% de agarosa, ultra pura) contenía 5 por ciento en volumen de solución concentrada de formaldehído (36,5% [v/v]). El ARN se separó por 2 horas a 100 V durante 2 h y a continuación se borroneó (blottet).

El Northern-Blotting se efectuó en corriente capilar como una transferencia de ARN dirigida hacia arriba. Para esto, primero se agitó el gel suavemente por 30 min en búfer de fosfato hidrosódico/dihidro fosfato de 25 mM (pH 6,5) y se cortó al tamaño. Se preparó un papel Whatman se tal manera que se colocó en una placa horixontal y se extendió en 2 lados en una cuba con búfer de fosfato hidrosódico/dihidro fosfato de 25 mM. Sobre este papel se puso el gel y las partes del papel Whatman no cubiertas se cubrieron con una película plástica. Entonces, se cubrió el gel con una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer-Mannheim) libre de burbujas de aire, después de lo cual la membrana se volvió a cubrir con una pila de papel absorbente hasta una altura de 5 cm. Además, se puso un peso de 100 g y una placa de vidrio sobre el papel absorbente. El blotting se efectuó por una noche a temperatura ambiente. La membrana se enjuagó brevemente en agua bi-destilada y se irradió con luz UV en un aparato Crosslinker (Biorad) con una energía de luz de 125 mJ para inmovilizar el ARN. Ña uniformidad de la transferencia de ARN a la membrana se verificó en un banco de luz UV.

Para la detección de mARn de cebada se separaron 10 mg de ARN total de cada muestra en un gel de agarosa y se blotearon sobre una membrana de nylon cargada positivamente mediante transferencia capilar. La detección se efectuó usando el sistema DIG de acuerdo con las especificaciones de manufactura con sondas de ARN antisense marcadas de digoxigenina (tal como se describe en Hückelhoven R *et al*. (2001) Plant Mol Biol 47:739-748).

Preparación de las sondas: para la hibridación con los mARNs a detectarse se prepararon sondas de ARN marcadas con digoxigenina o fluoresceína. Estas se generaron mediante transcripción *in vitro* de un producto PCR por medio de una polimerasa de ADN T7 o SP6 con UTPs marcados. Como modelo para la amplificación apoyada en PCR sirvieron los vectores de plásmido arriba descritos pGEMT-BI1, pGEMT-UBI. Según la orientación del inserto, se usaron diferentes polimerasas de ARN para la preparación de la cadena antisense. Se usó polimerasa ARN T7 para pGEMT-BI1, mientras que la polimerasa ARN SP6 se usó para pGEMT-UBI. El inserto del vector individual se amplificó por PCR con primers estándar flanqueantes (M13 fwd y rev). La reacción transcurrió en tal caso con las concentraciones finales siguientes en un volumen total de 50 $\mu$L de búfer PCR (Silverstar):

M13-fwd: 5'-GTAAAACGACGGCCAGTG-3'

M13-Rev: 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

10% Dimetilsulfóxido (v/v)

De a 2 ng/$\mu$L de primer (M13 forward y reversed)

1,5 mM $MgCl_2$,

0,2 mM dNTPs,

4 Units Taq-Polimerasa (Silverstar),

2 ng/$\mu$L Plasmid-ADN.

La amplificación transcurrió en un Thermocycler (Perkin-Elmar 2400) con temperatura controlada con el siguiente programa: 94ºC por 3 min; 30 ciclos con 94ºC por 30 segundos, 58ºC por 30 segundos y 72ºC por 1,2 min; 72ºC por 5 min; a continuación enfriamiento a 4ºC hasta seguir con el procesamiento. El éxito de la reacción se verificó en gel de agarosa al 1%. Los productos se purificaron a continuación con un kit producto PCR de alta pureza ("High Pure PCR-Product Purification Kit") (Boehringer-Mannheim). Se obtuvieron alrededor de 40 $\mu$L de producto eluido de la columna que fue verificado nuevamente en el gel y se almacenó a -20ºC.

La polimerización de ARN, la hibridación y la inmunodetección se realizaron en gran medida siguiendo las instrucciones del fabricante del kit con respecto a la detección no radioactiva del ARN (DIG System User's Guide, DIG-Luminescence detection Kit, Boehringer-Mannheim, Kogel *et al*. (1994) Plant Phisiol 106:1264-1277). 4 $\mu$l de producto PCR fueron tratados con 2 $\mu$L de búfer de transcripción, 2 $\mu$l de mezcla de marcación NTP, 2 $\mu$l de mezcla NTP y 10 $\mu$l de DEPC-agua. A continuación 2 $\mu$L de la solución de polimerasa de ARN T7 fueron adicionados mediante pipeta. La reacción se realizó luego por 2 h a 37ºC y a continuación se llevó a 100 $\mu$L con DEPC-agua. La sonda de ARN se detectó en el gel de bromuro de etidio y se almacenó a -20ºC.

Para preparar la hibridación, primero se agitaron suavemente las membranas por 1 h a 68ºC en 2 x SSC (salt, Sodiumcitrate), búfer de SDS 0,1% (dodecilsulfato de sodio); el búfer se renovó de 2 a 3 veces. Las membranas se aplicaron a continuación a la pared interna de los tubos de hibridación precalentados a 68ºC y se incubaron por 30 min con 10 mL de búfer de hibridación Dig-Easy en la estufa de hibridación precalentada. Mientras tanto se desnaturalizaron 10 $\mu$L de solución de sonda en 80 $\mu$L de búfer de hibridación por 5 minutos a 94ºC, a continuación la mezcla se puso en hielo y se centrifugó brevemente. Para la hibridación se transfirió luego la sonda a 10 mL de búfer de hibridación a una temperatura de 68ºC y se reemplazó el búfer en el tubo de hibridación por el búfer de sonda. La hibridación se efectuó por una noche, así mismo a 68ºC. Antes de la inmunodetección de híbridos de ARN-ADN, los blots se lavaron dos veces en condiciones estrictas por 20 minutos en cada caso en 0.1% (p/v) SDS, 0.1 x SSC a 68ºC. Para la inmunodetección los blots primero se agitaron suavemente dos veces por 5 minutos en 2 x SSC, 0,1% SDS a RT. A continuación se efectuaron 2 pasos de lavados estrictos a 68ºC en 0,1 xSSC, 0,1% SDS de a 15 min. La solución se reemplazó luego por búfer de lavado sin Tween. La mezcla de reacción se agitó por 1 minuto y la solución se intercambió por reactivo bloqueante. Después de agitar otros 30 minutos se adicionaron 10 $\mu$L de solución de anticuerpo antifluoresceina y se continuó agitando por 60 minutos. Siguieron dos pasos de lavados de 15 minutos cada uno en búfer de lavado con Tween. La membrana se equilibró a continuación 2 min en búfer de sustrato y después de haberlo dejado drenar se transfirió a una lámina de acetato. Sobre el "lado de ARN" de la membrana se repartió uniformemente luego una mezcla de 20 $\mu$L de CDP-Star™ y 2 mL de búfer de sustrato. Después, la membrana se cubrió con una segunda lámina de acetato y los bordes se sellaron con calor para suministrar un sello hermético al agua, evitando burbujas de aire. En un cuarto oscuro, la membrana se cubrió luego por 10 minutos con una película de rayos X y luego se desarrolló la película. El tiempo de exposición varió en función de la intensidad de la reacción luminiscente.

Si no se distingue por nada extraordinario, las soluciones estaban contenidas en el alcance de entrega del kit (DIG-Luminescence detection Kit, Boehringer-Mannheim). Todas las otras se prepararon a partir de las siguientes soluciones patrón mediante dilución con agua destilada autoclavada. A menos que se especifique otra cosa, todas las soluciones patrón se hicieron con DEPC (como DEPC-agua) y a continuación se autoclavaron.

- DEPC-Agua: agua destilada es tratada por una noche a 37ºC con dietilpirocarbonato (DEPC, 0,1%, p/v) y a continuación se autoclava

- Búfer 10 x MOPS: 0,2 M MOPS (ácido morfolin-3-propansulfónico), 0,05 M acetato de sodio, 0,01 M EDTA, pH ajustado con 10 M NaOH a pH 7,0

- 20 x SSC (cloruro de sodio - citrato de sodio, Salt-Sodiumcitrate): 3 M NaClo, 0,3 M citrato trisódico x 2 $H_2O$, pH ajustado con 4 M HCl a pH 7,0.

- 1% SDS (dodecilsufato de sodio, Sodiumdodecilsulfate) dodecilsulfato de sodio (p/v), sin DEPC

- búfer de muestra de RNA: 760 $\mu$L de formamida, 260 $\mu$L de formaldehído, 100 $\mu$L de bromuro de etidio (10 mg/mL), 80 $\mu$L de glicerina, 80 $\mu$L de bromfenol azul (saturado), 160 $\mu$L de 10 x MOPS, 100 $\mu$L de agua.

- 10 x búfer de lavado sin Tween: 1,0 M ácido maleico, 1,5 M NaCl; sin DEPC, con NaOH (sólido, cerca de 77 g) y 10 M NaOH pH ajustado a 7,5.

- Búfer de lavado con Tween: a partir de búfer de lavado sin Tween con Tween (0,3%, v/v)

- 10 x reactivo bloqueante: suspender 50 g de polvo bloqueante (Boehringer-Mannheim) en 500 mL de búfer de lavado sin Tween.

- Búfer de sustrato: 100 mM Tris (trishidroximetilamino-metano), 150 mM NaCl con 4 M HCl pH ajustado a 9,5.

- 10 x marcador de color: 50% de glicerina (v/v), 1,0 mM EDTA pH 8,0, 0,25% bromfenolazul (p/v), 0,25% xilencianol (p/v).

Una expresión BI1 se analizó tal como se describe usando RT-PCR y cADN Gelblots y se reveló que BI1 se expresa de manera predominante en el tejido de mesófilo de las hojas mientras que ubiquitina se expresa de manera constitutiva uniformemente en la epidermis y mesófilo (Fig. 8).

Además debe observarse una expresión de BI1 como respuesta al tratamiento de plantas con filtrados de cultivos tóxicos de *Bipolaris sorokiniana*. Las hojas primarias de cebada muestran manchas necróticas típicas (leaf spot blotch symptoms) después de tratar las plantas con filtrados de cultivo tóxico de *Bipolaris sorokiniana* (realizado tal como se describe por Kumar *et al*. 2001). La necrosis de hoja fue discernible 48 horas después del tratamiento. La lesión de tejido observada fue más claramente sobresaliente en la línea Bgh-resistente BCIngrid-mlo5 (I22) que en la línea padre Ingrid (Mlo-genotipo. Kumar *et al*. 2001). La expresión de BI1se correlaciona con la manifestación de la necrosis de hoja 72 horas después del tratamiento (hat) (Fig. 12).

Ejemplo 7

El promotor de oxalato oxidasa de trigo (germin 9f-2.8) se emplea para obtener sobreexpresión estable, específica de mesófilo. En cebada, la correspondiente expresión de oxalato-oxidasa es específica de mesófilo, débilmente constitutiva y sensible a patógeno (Gregersen PL *et al*. (1997) Phisiol Mol Plant Pathol 51: 85-97). Por lo tanto puede utilizarse para la expresión específica de mesófilo de BI1. Como un control, HVBI1 se sobre-expresa bajo el control de promotor de ubiquitina de maíz (Christensen AH *et al*. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689) o del promotor de actina de arroz (Zhang W *et al*. (1991) Plant Cell 3:1155-1165). Los siguientes constructos se emplean:

a) pUbiBI-1 (SEQ ID NO: 33; para transformación transitoria de cebada y de trigo con bombardeo de partículas. Expresión de BI-1 bajo control del promotor de ubititna del maíz).

b) pLo114UbiBI-1 (SEQ ID NO: 34; obtenida mediante re-clonación del casete de expresión Ubi/BI-1 como fragmento EcoR1 de pUbiBI-1 en pLo114-GUS-Kan; vector binario para la transformación transitoria de cebada con *A. tumefaciens*)

c) pOXoBI-1 (SEQ ID NO: 35; promotor específico de mesófilo TaGermin 9f-2.8 de BI1 para la transformación de trigo mediante bombardeo de partículas.

d) pLo114OXoBI-1 (SEQ ID NO: 36)

Cebada y trigo de tipo silvestre, así como cebada -mlo se transforman, se propagan y se polinizan. La transformación de cebada y trigo se efectúa como se ha descrito (Repellin A *et al*. (2001) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 159-183): para este propósito se transforman callos de embriones inmaduros de trigo (o c ebada) por transferencia genética biolítica con microproyectiles. En este caso se co-transforman vectores basados en pUC junto con vectores que llevan los marcadores de selección. A continuación, los embriones se cultivan en un medio de selección y se regeneran. La cebada de transforma con la ayuda de *Agrobacterium tumefaciens*. En este caso, se emplea un vector binario basado en pcambia1301. Los embriones inmaduros de cebada se co-cultivan con *A. tumefaciens*, se seleccionan y después se regeneran (Repellin A *et al*. (2001) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 159-183; Horvath H *et al*. (2003) Proc Natl. Acad Sci USA 100: 365-369; Horvath H *et al*. (2002) en Barley Science, eds. Slafer, G. A., Molina-Cano, J. L., Savin, R., Araus, J. L. & Romagosa, J. (Harworth, New York), pp. 143-1.76; Tingay S *et al*. (1997) Plant J. 11: 1369-1376).

Las plantas de cebada y trigo transgénicas (recombinantes) de la generación T1 ó T2 se ensayan en resistencia frente a patógenos hemibiotróficos y pertotróficos. Para este fin se inoculan las hojas con diversos patógenos. Como patógenos biotróficos se usan mildiú polvoroso de cebada (*Blumeria graminis f.sp. hordei*) y orín pardo (*Puccinia hordei*). Como medida de la susceptibilidad a mildiú se evalúa el número de pústulas por unidad de área de la hoja 5-7 días después de la inoculación con 2-5 conidios por $mm^2$ de área de hoja (Beßer K *et al*. (2000) Mol Plant Pathology 1: 277-286). Como patógenos hemibiotróficos se usan *Bipolaris sorokiniana* n y *Magnaporthe grisea*. La inoculación se efectúa tal como se ha descrito previamente (Kumar J *et al*. (2001) Phitopathology 91: 127-133; Jarosch B *et al*. (1999) Mol Plant Microbe Inter 12: 508-514). Como medida para la susceptibilidad sirve el número y el tamaño de las lesiones de la hoja 2 a 6 días después de la inoculación por aspersión con conidios (Kumar J *et al*. (2001) Phitopathology 91:127-133; Jarosch B *et al*. (1999) Mol Plant Microbe Inter 12:508-514; Jarosch B *et al*. (2003) Mol Plant Microbe Inter 16:107-114.). Como patógeno pertotrófico se usa *Fusarium graminearum*.

Para la determinación de la resistencia tipo 1 a Fusarium Head Blight (FHB) se aspergieron granzas de trigo en una etapa temprana de florecimiento con una suspensión de macroconidios (cerca de 2 x 105 $ml^{-1}$) de *Fusarium graminearum* o *Fusarium culmorcum*. Las plantas inoculadas se transfieren por 3 días a una cámara de niebla con 25ºC de temperatura del aire y 100% de humedad relativa del aire. Después las plantas se incuban en invernadero bajo luz continua a una temperatura de 20ºC y la severidad de los síntomas FHB en las granzas se evaluó después de 5, 7 y 8 días.

Para cuantificar la resistencia tipo II al Fusarium Head Blight (FHB) se inyectaron respectivamente 10 - 20 $\mu$l de alícuotas de una suspensión de macroconidios (cerca de 2 x 105 $ml^{-1}$) de *Fusarium graminearum* o *Fusarium culmorum* en granzas individuales, ubicadas relativamente centradas, de plantas de trigo. Las plantas inoculadas se transfieren por 3 días a una cámara de niebla con 25ºC de temperatura de aire y 100% de humedad relativa de aire. Después las plantas se incuban en invernadero bajo luz continua a una temperatura de 20ºC y se evalúa la expansión de los síntomas de FHB por las granzas después de 7, 14 y 21 días. La expansión de los síntomas por las granzas (la así llamada Fusarium-spreading) se toma como medida para la resistencia tipo II a FHB.

Ejemplo de comparación 1

*Expresión transitoria de BI1 en la epidermis y evaluación del desarrollo de patógenos fúngicos*

Se transformaron segmentos de hoja de cebada cv Ingrid con un pGY-BI1 junto con un vector de expresión GFP. Después se inocularon las hojas con Bgh y el resultado se analizó después de 48 horas por medio de microscopía de luz y fluorescente. La penetración en las células que expresan GFP se evaluó detectando historias en células vivas y

mediante la evaluación del desarrollo de los hongos en precisamente aquellas células. Se empleó un método de transformación transitoria que ya ha sido descrito para la introducción biolística de ADN y ARN a las células epidérmicas de hojas de cebada (Schweizer P *et al*. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; Schweizer P *et al*. (2000) Plant J 2000 24:895-903).

Para preparación de micro portadores, se lavaron dos veces 55 mg de partículas de tungsteno (M 17, diámetro 1,1 $\mu$m; Bio-Rad, Munich) con 1 ml de agua destilada autoclavada y una vez con 1 mL de etanol absoluto, se secó y se absorbió en 1 ml de glicerina al 50% (cerca de 50 mg/ml de solución patrón). La solución se diluyó con glicerina al 50% a 25 mg/ml, antes del consumo se mezcló bien y se suspendió en un baño de ultrasonido.

Para recubrir los microportadores para cada bombardeo se adicionan a gotas 0,3 $\mu$g de plásmido pGFP (GFP bajo control del promotor CaMV 35S; Schweizer P *et al*. (1999) Mol Plant-Microbe Interact 12:647-654.), 0,7 $\mu$g del vector vacío pGY o pGY-BI1 (1$\mu$L), 12,5 $\mu$l de suspensión de partículas de tungsteno (25 mg/ml; correspondiente a 312 $\mu$g de partículas de tungsteno), 12,5 $\mu$l de solución de $Ca(NO_3)_2$ 1 M (pH 10) mezclando continuamente, se deja quieto por 10 min a RT, se centrifuga brevemente y se retiran 20 $\mu$l del sobrenadante. El residuo se re-suspende con las partículas de tungsteno (baño de ultrasonido) y se emplean en el experimento.

Se usaron segmentos de hojas primarias de cebada de alrededor de 4 cm de longitud. Los tejidos se colocaron en 0,5% Phitagar (GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe) con 20 $\mu$g/ml de benzimidazol en cajas de Petri (6,5 cm de diámetro) y los bordes se cubrieron directamente antes del bombardeo de partículas con una plantilla provista con una abertura rectangular de 2,2 cm x 2,3 cm. Las cajas se colocaron, una después de la otra, en el fondo de la cámara de vacío (Schweizer P *et al*. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54) sobre la cual se había insertado una red de nylon (tamaño de malla 0,2 mm, Millipore, Eschborn) en una placa agujereada (5 cm por encima del suelo, 11 cm por debajo del macroportador, véase abajo), para actuar como difusor con el fin de dispersar los agregados de partículas y disminuir la velocidad del flujo de partículas. Para cada bombardeo, el macro portador (sostenedor de filtro plástico estéril, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK), el cual se adjuntó a la cima de la cámara, se cargó con 5,8 $\mu$L de partículas de tungsteno recubiertas de ADN (microportador, véase abajo). LA presión en la cámara se redujo en 0,9 bar usando una bpmba de vacío de diafragma (Vacuubrand, Wertheim) y la superficie del tejido vegetal se bombardeó con las partículas de tungsteno a una presión del gas de helio de 9 bar. La cámara se aireó inmediatamente después. Para etiquetar las células transformadas las hojas se bombardearon con el plásmido (pGFP; vector a base de pUC18, promotor/terminador CaMV 35S - casete con gen de GFP insertado; Schweizer P *et al*. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; puesto a disposición por el Dr. P. Schweizer, Instituto para genética vegetal IPK, Gatersleben, Alemania). Antes del bombardeo de otro plásmido se limpió profundamente el macroportador cada vez con agua. Después de incubación de cuatro horas después del bombardeo con cajas de Petri ligeramente abiertas, RT y luz del día, las hojas se inocularon con 100 conidios/$mm^2$ del hongo mildiú polvoroso de cebada auténtico (raza A6; *Blumeria graminis f.sp. hordei mildiú* A6) y se incubaron por otras 40 horas en condiciones idénticas. Luego se evaluó la penetración. El resultado (por ejemplo,la eficiencia de penetración), definida como un porcentaje de las células atacadas con un haustorio maduro y una hifa secundaria (hifas secundarias alongantes o "secondary elongating hifae"), se analizó mediante microscopía de fluorescencia y luz. Una inoculación con 150 conidios/$mm^2$ da lugar a una frecuencia de ataque de cerca de 50% de las células transformadas. Para cada experimento individual se evaluó un número mínimo de 100 sitios de interacción. Las células transformadas (que expresan GFP) se identificaron bajo excitación con luz azul. Se distinguieron tres categorías diferentes de células transformadas:

1 Células penetradas que comprenden un haustorio fácilmente reconocible. Una célula con más de un haustorio contado como una célula.

2. Células que fueron atacadas por un apresorio fúngico pero que no comprenden haustorio. Una célula que fue atacada repetidamente por Bgh, pero no comprende haustorio, contado como una célula.

3. Células que no fueron atacadas por Bgh.

Células estomatales y células estomatales subsidiarias se excluyeron de la evaluación. Las estructuras de superficie de Bgh se analizaron mediante microscopía de luz o tinturación fluorescente del hongo con 0,3% calcofluor (p/v en agua) por 30 segundos. El desarrollo fúngico puede evaluarse fácilmente mediante tinturación con calcoflúor seguida de microscopía de fluorescencia. Mientras que el hongo desarrolla un tubo de germen primario y un tubo de germen apresorial ("germ-tube") en células transformadas con BI1-dsRNA, falla al desarrollar un haustorio. El desarrollo de haustorios es una precondición para la formación de una hifa secundaria. Las eficiencias de penetración (tasas de penetración) se calculan como el número de células penetradas dividido por el número de las células atacadas, multiplicado por 100.

La eficiencia de penetración sirve para la determinación de la susceptibilidad de la células que se transfectaron con pGY-BI1 en comparación con las células que se transformaron con un control de vector vacío (Fig. 10). Se observó que la sobreexpresión de BI1 eleva la frecuencia de penetración de manera significativa (Fig. 10). En seis experimentos independientes la sobreexpresión en las variedades susceptibles de cebada Ingrid provocó un incremento significativa de la eficiencia promedio de penetración (PE) desde 47% hasta 72% (165% de los controles) en células que habían sobreexpresado BI1 en comparación con células que se habían transformado con el vector vacío (control) (Fig. 10).

Aún más, las células epidérmicas de la cebada mlo5 resistentes a Bgh se transformaron transitoriamente con el constructo de sobreexpresión BI1 pGY-1 tal como se describe arriba. El genotipo mlo5 en un fondo Pallas o Ingrid muestra una susceptibilidad muy baja contra Bgh. En 7 experimentos independientes se encontró una eficiencia de penetración en plantas de control (transformación con vector vacío y vector GFP) de mínimo o hasta máximo 11%. De manera sorprendente, la sobreexpresión (pGY-BI1) dio lugar a una reconstitución casi total del fenotipo susceptible; es decir, se efectuó una ruptura casi completa de la resistencia a mlo. La eficiencia promedio de penetración de Bgh a los segmentos de hoja de Ingrid-mlo5 y Pallas-mlo5 se subió desde 4% a 23%, o bien de 6% a 33% (Fig. 11). Esto significa un aumento relativo de la penetración a un 520% ó 510% de los controles. Además, la sobreexpresión de BI1 en cebada cv Manchuria incrementó la susceptibilidad contra el patógeno de trigo *Blumeria graminis f.sp. tritici* en tres experimentos independientes desde 0 a 4% a 19 hasta 27% (Fig. 13).

## REIVINDICACIONES

1. Método para la generación o incremento de la resistencia frente a al menos un factor de estrés biótico en plantas en el cual están comprendidos los siguientes pasos de trabajo:

a) Incremento de la cantidad de proteína de al menos una proteína de inhibidor de Bax -1 (BI1) en al menos un tejido vegetal de la planta con la condición de que la expresión en la epidermis de la hoja permanezca esencialmente sin modificar o que se reduzca, y

b) Selección de las plantas en las que en comparación con la planta de partida ya exista una resistencia contra al menos un factor de estrés biótico o se incremente; y

en donde el factor de estrés es un patógeno de la planta.

2. Método según la reivindicación 1 donde el factor de estrés es un patógeno necrotrófico o hemibiotrófico.

3. Método según una de las reivindicaciones 1 a 2, donde la proteína BI-1 comprende al menos una secuencia que presenta una homología de al menos 50% con al menos un motivo de consenso BI1 seleccionado del grupo que se compone de

a) H (L/I) KXVY,

b) AXGA (Y/F) XH,

c) NIGG,

d) P (V/P) (Y/F) E (E/Q) (R/Q) KR,

e) (E/Q) G (A/S) S (V/I) GPL,

f) DP(S/G)(L/I)(I/L),

g) V (G/A) T (A/S) (L/I) AF (A/G) CF (S/T),

h) IL (Y/F) LGG,

i) L (L/V) SS (G/W) L (S/T) (I/M) L (L/M) W, y

j) DTGX(I/V) (I/V)E.

4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína BI1 se codifica por un polipéptido que comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que se compone de:

a) las secuencias según SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 o 38, y

b) secuencias que presentan una identidad de al menos 50% con una de las secuencias según SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 o 38,

c) secuencias que comprenden al menos una secuencia parcial de al menos 10 residuos de aminoácidos relacionados de una de las secuencias según SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 o 38.

5. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el incremento de la cantidad de proteína de al menos una proteína BI1s mediante expresión recombinante de la dicha proteína BI1 se realiza bajo control de un promotor específico para raíz, tubérculo o mesófilo.

6. Método según una de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende

(a) transformación estable de una célula de la planta con un casete recombinante de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína BI en conexión funcional con un promotor específico de tejido, donde el promotor no presenta esencialmente actividad en la epidermis de la hoja y donde el promotor es heterólogo con respecto a la dicha secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína BI,

(b) Regeneración de la planta a partir de la célula de la planta, y

(c) Expresión de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína BI en una cantidad y durante un tiempo que sean suficientes para generar o elevar una resistencia a patógenos en dicha planta.

7. Método según una de las reivindicaciones 1 a 6, donde la planta se selecciona de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

8. Método según una de las reivindicaciones 1 a 7, donde la planta se selecciona del grupo de las plantas monocotiledóneas que se compone de trigo, avena, mijo, cebada, centeno, maíz, arroz, alforfón, trigo, triticale, escanda, lino o caña de azúcar.

9. Método según una de las reivindicaciones 1 a 8, donde la expresión del inhibidor de Bax -1 (BI-1) se eleva en el mesófilo.

10. Método según una de las reivindicaciones 1 a 9, donde la planta presenta un fenotipo resistente a mlo o inhibe la expresión o función de MLO, RacB y/o NaOx al menos en la epidermis o se reduce en comparación con una planta de control y/o se incrementa la expresión o función de PEN2, SNAP34 y/o PEN1 al menos en la epidermis en comparación con una planta de control.

```
1                                                    50
   AtBI-1     (1) ---------MDAFSSFFDSQPGS---RSWSYDSLKNFRQISPAVQNHLKR
   BnBI-1     (1) ---------MDSFSSFFDSQPGS---RSWSYDSLKNLRQISPSVQNHLKR
    GmBI2     (1) -----RLQAMDAFNSFFDS------RNRWNYDTLKNFRQISPVVQNHLKQ
    GmBI3     (1) ITKTIRFDSLFSMDTFFKSPSSSSSRSRWSYDTLKNFREISPLVQNHIKL
   HVBI-1     (1) -----------MDAFYSTS---SAAASGWGHDSLKNFRQISPAVQSHLKL
   NtBI-1     (1) ---------MESCTSFFNSQSASS-RNRWSYDSLKNFRQISPFVQTHLKK
   OsBI-1     (1) -----------MDAFYSTSSAYGAAASGWGYDSLKNFRQISPAVQSHLKL
   TaBI11     (1) ----------------------------------------------------
   TaBI18     (1) ------------------FSGTFRNSRSDDFVLCELQRELPRCRDATLTV
TaBI5 neu     (1) ----------------------------------------VAMPGR
   ZmBI14     (1) ----------------------------------------------------
   ZmBI16     (1) ----------------------------------------------------
   ZmBI33     (1) ----------------------------------------------------
    ZmBI8     (1) ----------------------------------------------------
Consensus     (1)                F  S         W YDSLKN R ISP VQ HLK

                  51                                               100
   AtBI-1    (39) VYLTLCCALVASAFGAYLHVLWNIGGILTTIGCIGTMIWLLSCPPYEHQK
   BnBI-1    (39) VYLTLCCALVASAFGAYLHVLWNIGGILTTIGCFGSMIWLLSCPPYEQQK
    GmBI2    (40) VYFTLCFAVVAAAVGAYLHVLLNIGGFLTTVACMGSSFWLLSTPPFEERK
    GmBI3    (51) VYFTLCCAVVAAAVGAFLHVLWNIGGFLTTLASIGSMFWLLSTPPFEEQK
   HVBI-1    (37) VYLTLCFALASSAVGAYLHIALNIGGMLTMLACVGTIAWMFSVPVYEERK
   NtBI-1    (41) VYLSLCCALVASAAGAYLHILWNIGGLLTTLGCVGSIVWLMATPLYEEQK
   OsBI-1    (40) VYLTLCVALAASAVGAYLHVALNIGGMLTMLGCVGSIAWLFSVPVFEERK
   TaBI11     (1) ----------------------------------------------------
   TaBI18    (33) VYVIPIVGRIKSAAGAYLHIALNIGGMLTMLACIGTIAWMFSVPVYEERK
TaBI5 neu     (7) RFRLTYALPGLICRGCLPAHCPEHWRDADNARVYRNHRLDVLGASLRGEP
   ZmBI14     (1) ---------------------------------GSIAWLFSVPVYEERK
   ZmBI16     (1) --------------------WNIGVRLTMLGCIGSIDWLFSVPVYEERK
   ZmBI33     (1) --------------------WNIGGTLTMLGCVGSIAWLFSVPVYEERK
    ZmBI8     (1) ----------------------------------------------------
Consensus    (51) VY TLC AL ASA GAYLHV  NIGG LT LGCIGSI WL S PVYEERK

                  101                                              150
   AtBI-1    (89) RLSLLFVSAVLEGASVGPLIKVAIDVDPSILITAFVGTAIAFVCFSAAAM
   BnBI-1    (89) RLSLLFLSAVLEGASVGPLIKVAVDFDPSILITAFVGTAIAFICFSGAAM
    GmBI2    (90) RVTLLMAASLFQGSSIGPLIDLAIHIDPSLIFSAFVGTALAFACFSGAAL
    GmBI3   (101) RLSLLMASALFQGASIGPLIDLAFAIDPGLIIGAFVATSLAFACFSAVAL
   HVBI-1    (87) RFGLLMGAALLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTAIAFGCFSGAAI
   NtBI-1    (91) RIALLMAAALFKGASIGPLIELAIDFDPSIVIGAFVGCAVAFGCFSAAAM
   OsBI-1    (90) RFGILLAAALLEGASVGPLIKLAVDFDSSILVTAFVGTAIAFGCFTCAAI
   TaBI11     (1) ----------------------------------------------AAI
   TaBI18    (83) RFGLLMGAALLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTAIAFGCFSGAAI
TaBI5 neu    (57) EVWAADGCSLLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTAIAFGCFSGAAI
   ZmBI14    (17) RYWLLMAAALLEGASVGPLIKLAVEFDPSILVTAFVGTAIAFACFSCAAM
   ZmBI16    (30) RYGLLMAAALLEGASVGPLVKLAVEFDPSILVTAFVGTAIAFACFSGAAM
   ZmBI33    (30) RYGLLMAAALLEGASVGPLVKLAVEFDPSILVTAFVGTAIAFACFSGAPW
    ZmBI8     (1) ---------------------VIDLDSRILVTAFVGTAVAFACFSGAAI
Consensus   (101) R  LLMAAALLEGASVGPLI LAIDFDPSILVTAFVGTAIAFACFSGAAI
```

**Fig.1a**

```
                151                                                 200
AtBI-1     (139) LARRREYLYLGGLLSSGLSMLMWLQFASSIFG-GSASIFKFELYFGLLIF
BnBI-1     (139) LARRREYLYLGGLLSSGLSMLMWLQFASSIFG-GSASIFKFELYFGLLIF
GmBI2      (140) VARRREYLYLGGLVSSGLSILLWLHFASSIFG-GSTALFKFELYFGLLVF
GmBI3      (151) VARRREYLYLGGLLSSWLSILMWLHSDSSLFG-GSIALFKFELYFGLLVF
HVBI-1     (137) IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFVTSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF
NtBI-1     (141) VARRREYLYLGGLLSSGLSILFWLHFASSIFG-GSMALFKFEVYFGLLVF
OsBI-1     (140) VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFAASIFGHST-GSFMFEVYFGLLIF
TaBI11       (4) IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF
TaBI18     (133) IAKRREYLYLGGLLSSG----------------------------LTIL
TaBI5 neu  (107) IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF
ZmBI14      (67) VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFAASIFGHQSTSSFMFEVYFGLLIF
ZmBI16      (80) VARRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQLAASIF-GHSATSFMFEVYFGLLIF
ZmBI33      (80) WQAR-EYLYLGGCSRRGSPSCSGCSSPPPSS--ALRNSFMFEVYFGLLIL
ZmBI8       (29) IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHTS-ATFMFELYFGLLVF
Consensus  (151) VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFASSIFG  S ASFMFEVYFGLLIF

                201                                                 250
AtBI-1     (188) VGYMVVDTQEIIEKAHLGDMDYVKHSLTLFTDFVAVFVRILIIMLKNSAD
BnBI-1     (188) VGYMVVDTQDIIEKAHLGDMDYVKHSLTLFTDFVAVFVRVLIIMLKNSAD
GmBI2      (189) VGYIVVDTQEIVERAHLGDLDYVKHALTLFTDLVAVFVRILVIMLKNSTE
GmBI3      (200) VGYVIVDTQEIIERAHFGDLDYVKHALTLFTDLAAIFVRILIIMLKNSSE
HVBI-1     (186) LGYMVVYDTQEIIERAHHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLIIMLKNAGD
NtBI-1     (190) VGYIIFDTQDIIEKAHLGDLDYVKHALTLFTDFVAVFVRILIIMLKNASD
OsBI-1     (189) LGYMVYDTQEIIERAHHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRILVIMLKNASD
TaBI11      (53) LGYMVYDTQEIIERAHHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRILIIMLKNAGD
TaBI18     (154) L-------------------------------------------------
TaBI5 neu  (156) LGYMVYDTQEIIERAHHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLIILLKNAAD
ZmBI14     (117) LGYMVYDTQEVIERAHHG-----------------------------------
ZmBI16     (129) LGYVVYDT--------------------------------------------
ZmBI33     (127) LG------------------------------------------------
ZmBI8       (78) LGYMVFDTQEIIERAHRGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRILVIMMKNAQE
Consensus  (201) LGYMVYDTQEIIERAH GDMDYIKHALTLFTDFVAV VRILIIMLKNA D

                251                                                 300
AtBI-1     (238) KEEKKKKRRN-------GDVK-I-LYGCYRVWPL-RYYLLALSIGDQTCF
BnBI-1     (238) KEDKKKRRRN-----D-KVRKKAK-SGCYVCFKK-----------KRVG
GmBI2      (239) RNEKKKKRRD-----------------------------------------
GmBI3      (250) RNEKKKKRRD--ADRPTRAQASLQ-FSLWRIHN-------LFR-CWSLV-
HVBI-1     (236) KSEDKKKRKRG-----------------S---------------------
NtBI-1     (240) KEEKKKKRRN----CISGYSKTL-L-NLAFSCS---TSVDLRQVCC--FG
OsBI-1     (239) KSEEKKRKKRS-ELLFPLCT-EKTTAAIASTYYDRAALQLGFMVNTSSFA
TaBI11     (103) KSEDKKKRKRRS----------------------------------------
TaBI18     (155) -----------------------------------------------------
TaBI5 neu  (206) KVGGQEEEEEEKS---------------------------------------
ZmBI14     (135) -----------------------------------------------------
ZmBI16     (137) -----------------------------------------------------
ZmBI33     (129) -----------------------------------------------------
ZmBI8      (128) KSQDEKKRK-------------------------------------------
Consensus  (251) K E KKKRR
```

**Fig.1b**

```
                    301                                                 350
  AtBI-1   (278)  H-KG-SACFTSAQVPSSDCK-------------LECCSSFHKLLFFKSL
  BnBI-1   (269)  VISTDMIALVFFTCLEQFW------------QHTLRICVFLLVTPDCEWI
   GmBI2   (249)  --------------------------------------------------
   GmBI3   (288)  LVSYVFAVMVNVRISFKHLHMYLPIS-CVV-HHTLV-KKKKKKKKKKKKK
  HVBI-1   (248)  --------------------------------------------------
  NtBI-1   (279)  NASD-AARLCYAACQCGYGGT-MVLF----PKHTIK-HACLHYIDNLRVY
  OsBI-1   (287)  FC-YGVNLLRFVVVVALQILACYMTRIFL-WWSR-SKRENTSSFATNLFA
Consensus  (301)

                    351                                                 400
  AtBI-1   (312)  VLLIASYQAKNNVGK---------SCLNFLKCVHFRKKKKKKKK-----
  BnBI-1   (307)  SILKLC-KLSVGS-----------------------------------
   GmBI2   (249)  --------------------------------------------------
   GmBI3   (335)  KKKKKXXXXXXXXXXXX--XXXXXGVCGLRYSRHSSNH-EGSLW-PGLC-
  HVBI-1   (248)  --------------------------------------------------
  NtBI-1   (322)  YLFLLPFAVLGCS-LYS-FSVMLDHLLS-RLISHIDGRNENSHRRPNLFK
  OsBI-1   (334)  FW-LMMILSPKKKK-----------------------------------
Consensus  (351)

                    401                                                 450
  AtBI-1   (348)  --------------------------------------------------
  BnBI-1   (319)  --------------------------------------------------
   GmBI2   (249)  --------------------------------------------------
   GmBI3   (380)  ACIDTVH-FGCNLCANS-YNVE-FI-EK-EEEEERLIG-PIAMCRVIWFV
  HVBI-1   (248)  --------------------------------------------------
  NtBI-1   (369)  TEAQL--------------------------------------------
Consensus  (401)

                    451                                                 500
   GmBI3   (424)  ENT-LAV-KLLVPLCS--LAMCLL-W-MSGFLLNIFICIC--S-YIV-TS
Consensus  (451)

                    501      512
   GmBI3   (464)  FLGLKKEKKKKK
Consensus  (501)
```

**Fig.1c**

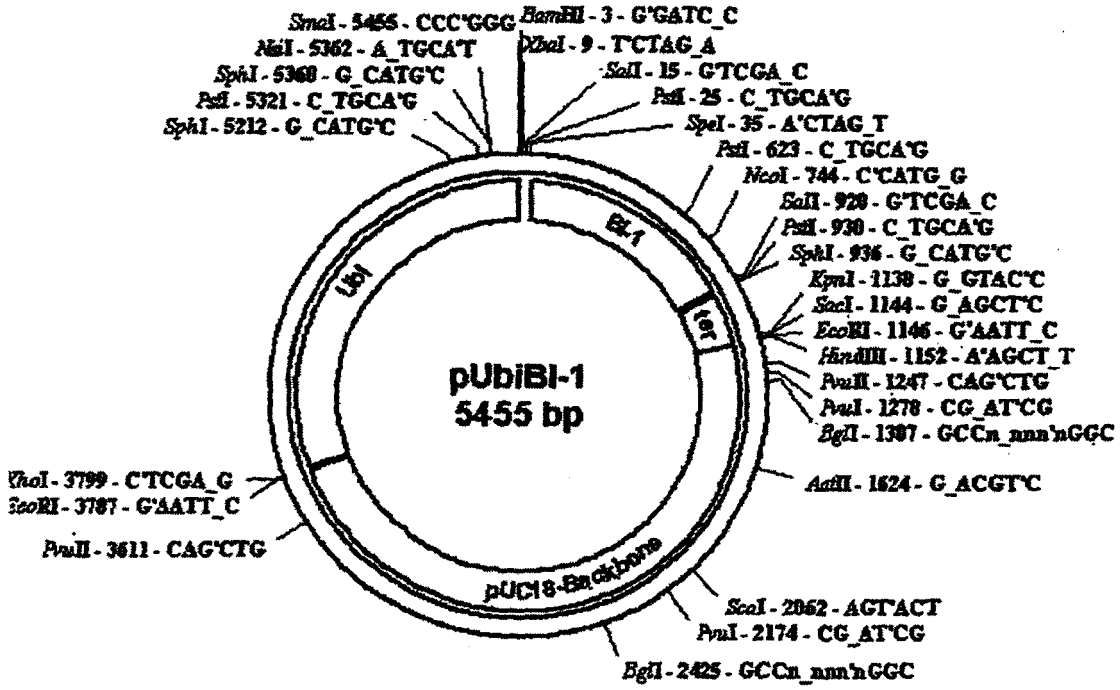
SmaI - 5455 - CCC'GGG
AflI - 5362 - A_TGCA'T
SphI - 5368 - G_CATG'C
PstI - 5321 - C_TGCA'G
SphI - 5212 - G_CATG'C
BamHI - 3 - G'GATC_C
XbaI - 9 - T'CTAG_A
SalI - 15 - G'TCGA_C
PstI - 25 - C_TGCA'G
SpeI - 35 - A'CTAG_T
PstI - 623 - C_TGCA'G
NcoI - 744 - C'CATG_G
SalI - 928 - G'TCGA_C
PstI - 930 - C_TGCA'G
SphI - 936 - G_CATG'C
KpnI - 1138 - G_GTAC'C
SacI - 1144 - G_AGCT'C
EcoRI - 1146 - G'AATT_C
HindIII - 1152 - A'AGCT_T
PvuII - 1247 - CAG'CTG
PvuI - 1278 - CG_AT'CG
BglI - 1387 - GCCn_nnn'nGGC
AatII - 1624 - G_ACGT'C
ScaI - 2062 - AGT'ACT
PvuI - 2174 - CG_AT'CG
BglI - 2425 - GCCn_nnn'nGGC
XhoI - 3799 - C'TCGA_G
EcoRI - 3787 - G'AATT_C
PvuII - 3611 - CAG'CTG
pUbiBI-1
5455 bp
UbI
BL1
tet
pUC18-Backbone

Fig.2

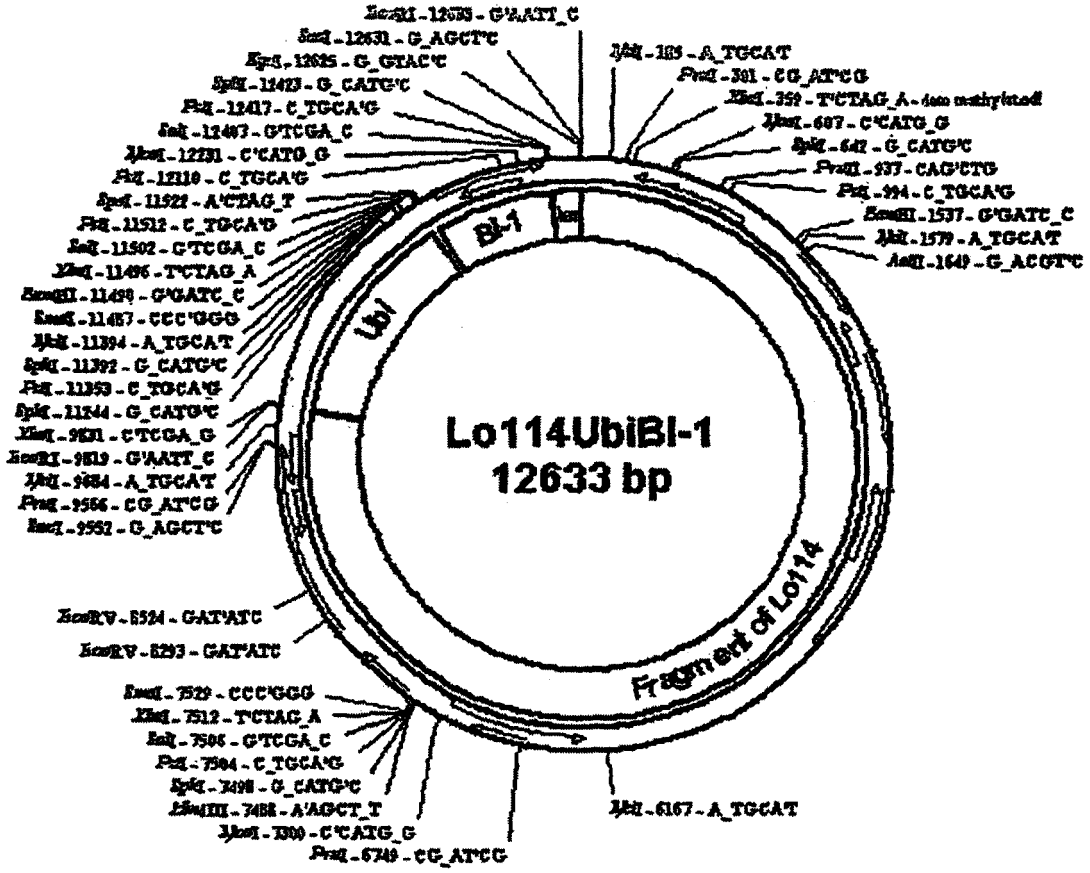


Fig.3

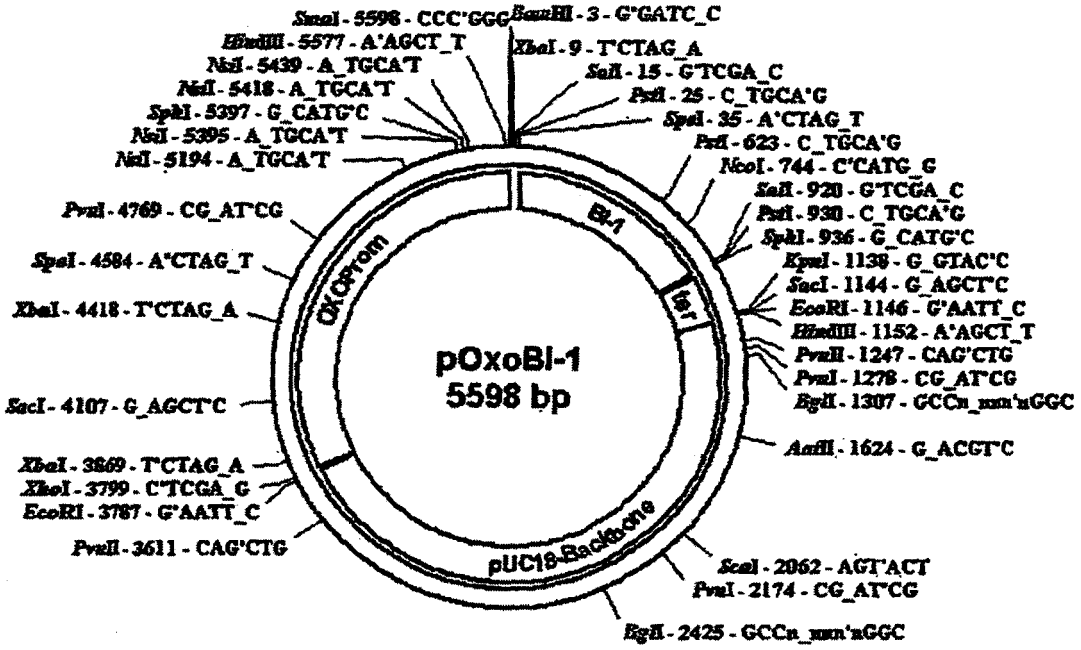
SmaI - 5598 - CCC'GGG
BamHI - 3 - G'GATC_C
HindIII - 5577 - A'AGCT_T
XbaI - 9 - T'CTAG_A
NsiI - 5439 - A_TGCA'T
SalI - 15 - G'TCGA_C
NsiI - 5418 - A_TGCA'T
PstI - 25 - C_TGCA'G
SphI - 5397 - G_CATG'C
SpeI - 35 - A'CTAG_T
NsiI - 5395 - A_TGCA'T
PstI - 623 - C_TGCA'G
NsiI - 5194 - A_TGCA'T
NcoI - 744 - C'CATG_G
SalI - 920 - G'TCGA_C
PvuI - 4769 - CG_AT'CG
PstI - 930 - C_TGCA'G
SphI - 936 - G_CATG'C
SpeI - 4584 - A'CTAG_T
EcoRI - 1138 - G_GTAC'C
SacI - 1144 - G_AGCT'C
XbaI - 4418 - T'CTAG_A
EcoRI - 1146 - G'AATT_C
HindIII - 1152 - A'AGCT_T
PvuII - 1247 - CAG'CTG
PvuI - 1278 - CG_AT'CG
BglI - 1307 - GCCn_nnn'nGGC
pOxoBI-1
5598 bp
SacI - 4107 - G_AGCT'C
AatII - 1624 - G_ACGT'C
XbaI - 3869 - T'CTAG_A
XhoI - 3799 - C'TCGA_G
EcoRI - 3787 - G'AATT_C
PvuII - 3611 - CAG'CTG
ScaI - 2062 - AGT'ACT
PvuI - 2174 - CG_AT'CG
BglI - 2425 - GCCn_nnn'nGGC

Fig.4

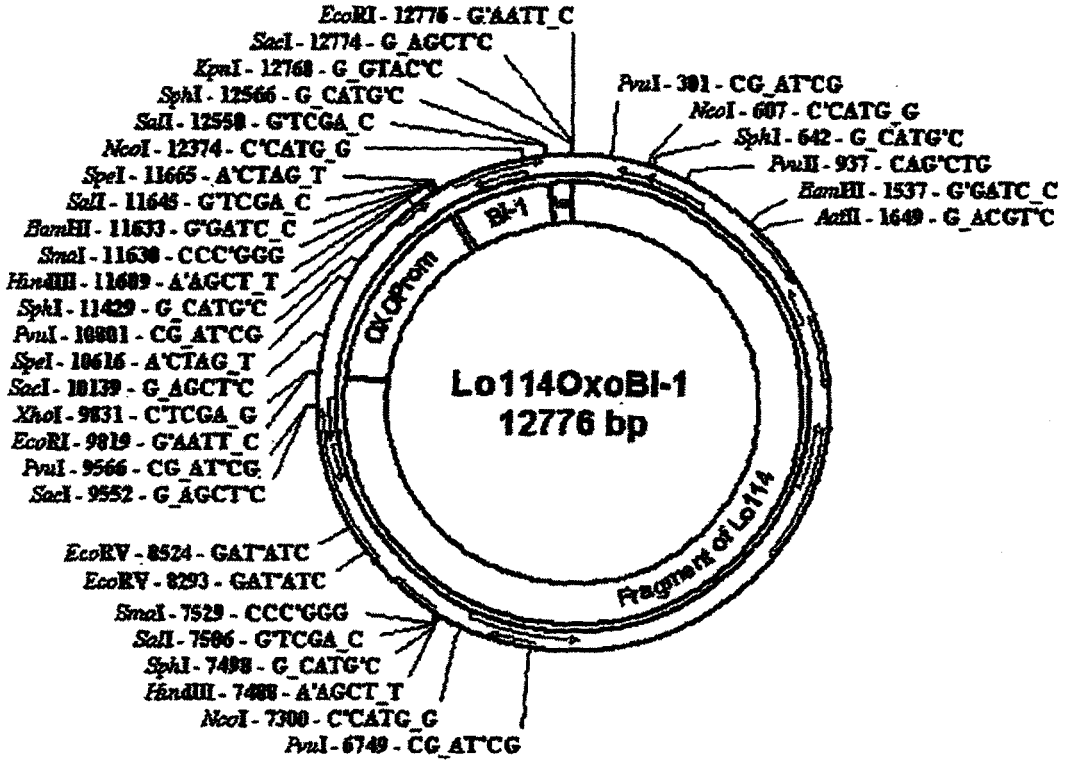
EcoRI - 12776 - G'AATT_C
SacI - 12774 - G_AGCT'C
KpnI - 12768 - G_GTAC'C
SphI - 12566 - G_CATG'C
SalI - 12558 - G'TCGA_C
NcoI - 12374 - C'CATG_G
SpeI - 11665 - A'CTAG_T
SalI - 11648 - G'TCGA_C
BamHI - 11633 - G'GATC_C
SmaI - 11630 - CCC'GGG
HindIII - 11609 - A'AGCT_T
SphI - 11429 - G_CATG'C
PvuI - 10801 - CG_AT'CG
SpeI - 10616 - A'CTAG_T
SacI - 10139 - G_AGCT'C
XhoI - 9831 - C'TCGA_G
EcoRI - 9819 - G'AATT_C
PvuI - 9566 - CG_AT'CG
SacI - 9552 - G_AGCT'C
EcoRV - 8524 - GAT'ATC
EcoRV - 8293 - GAT'ATC
SmaI - 7529 - CCC'GGG
SalI - 7506 - G'TCGA_C
SphI - 7498 - G_CATG'C
HindIII - 7488 - A'AGCT_T
NcoI - 7300 - C'CATG_G
PvuI - 6749 - CG_AT'CG
PvuI - 301 - CG_AT'CG
NcoI - 607 - C'CATG_G
SphI - 642 - G_CATG'C
PvuII - 937 - CAG'CTG
BamHI - 1537 - G'GATC_C
AatII - 1649 - G_ACGT'C
Bl-1
OxOrf1cm
Lo114OxoBI-1
12776 bp
Fragment of Lo114

**Fig.5**

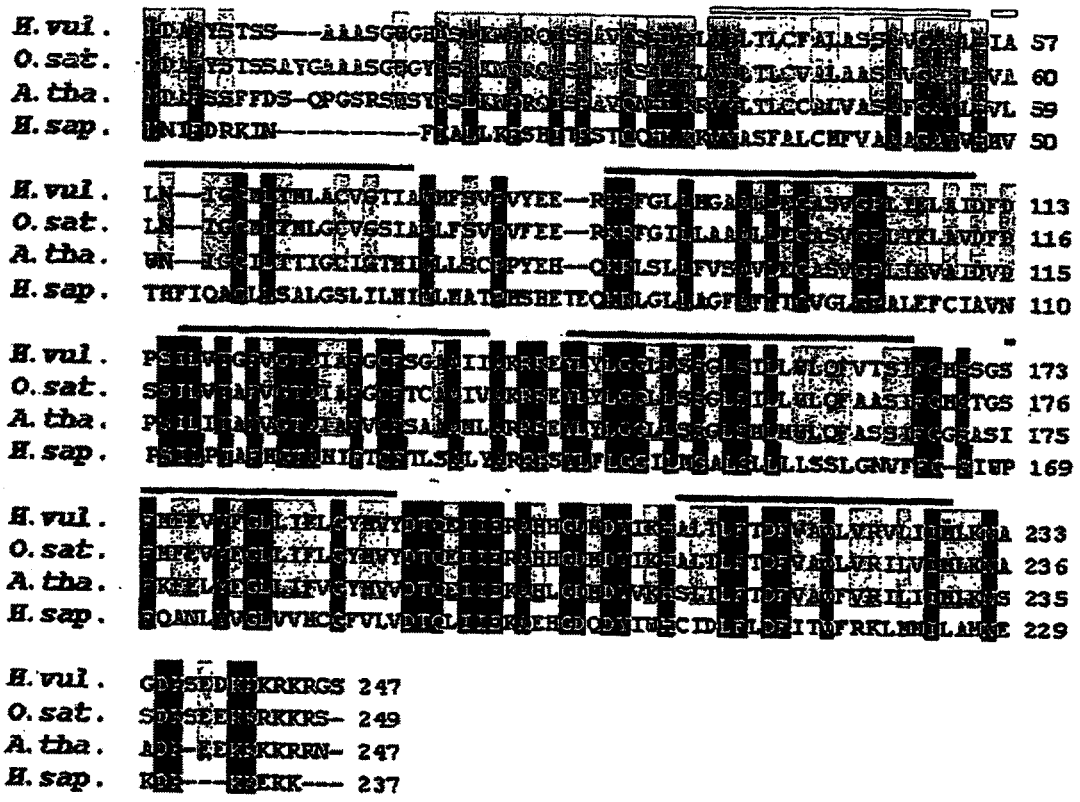


Fig.6

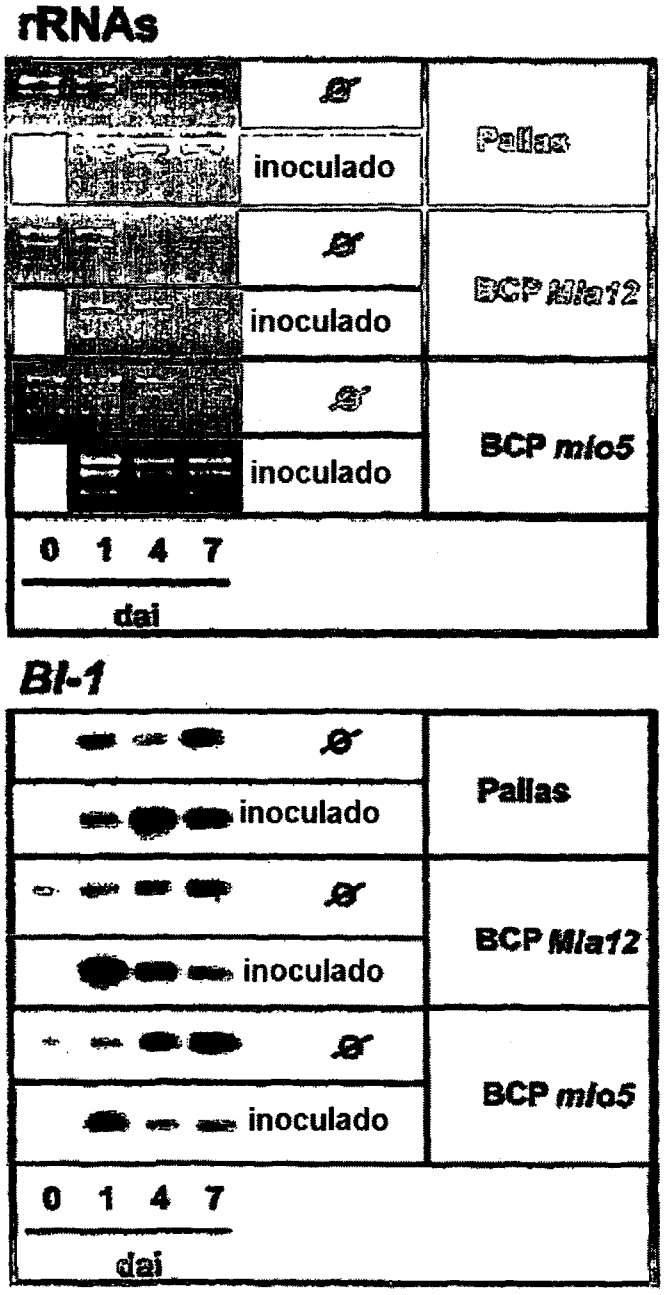
rRNAs
Ø
inoculado
Pallas
Ø
inoculado
BCP Mla12
Ø
inoculado
BCP mlo5
0 1 4 7
dai
Bl-1
Ø
inoculado
Pallas
Ø
inoculado
BCP Mla12
Ø
inoculado
BCP mlo5
0 1 4 7
dai

Fig.7

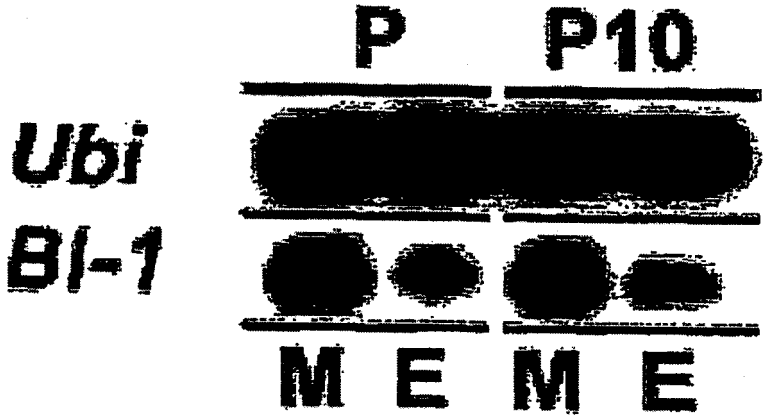


Fig.8

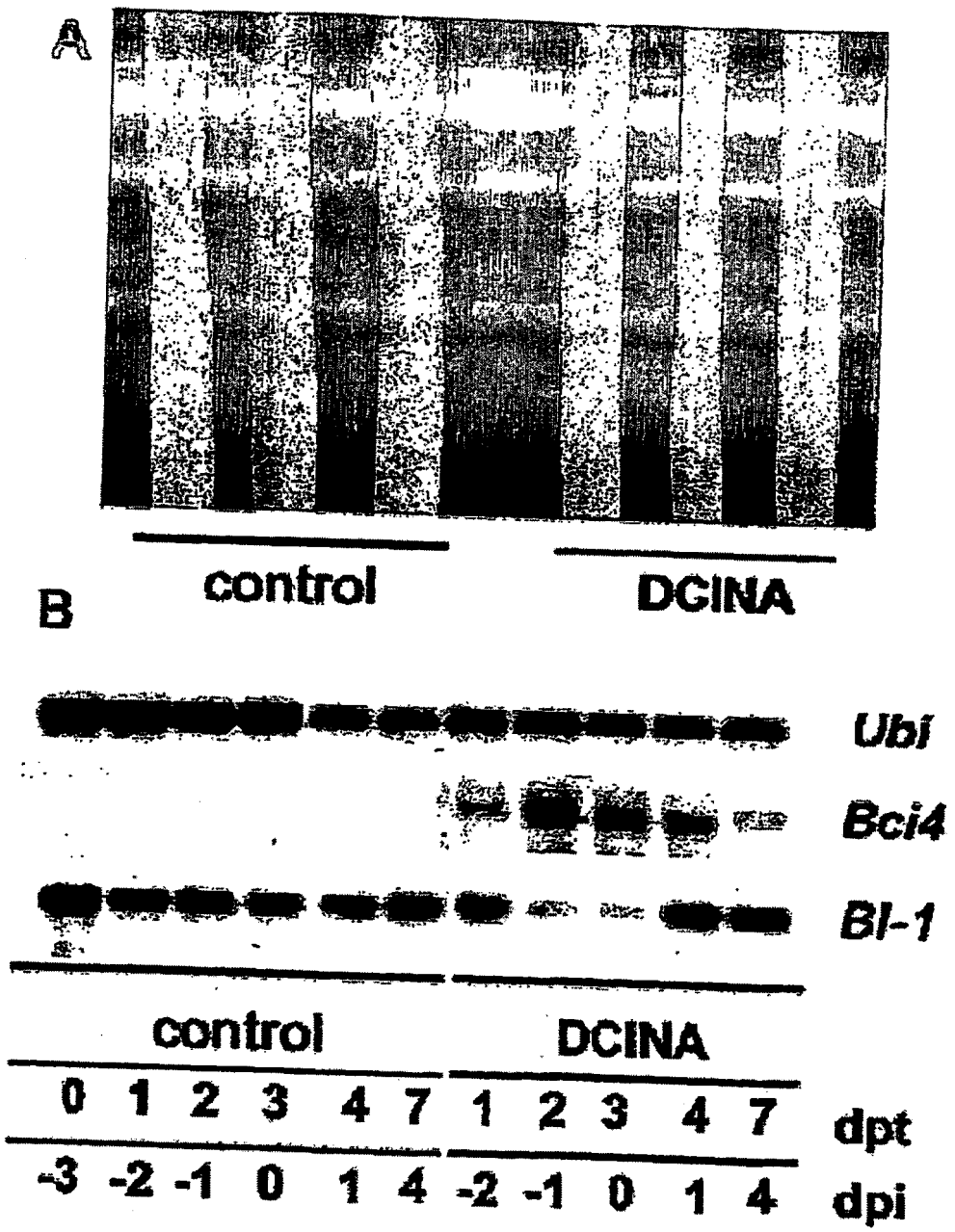
A
control
DCINA
B
Ubi
Bci4
Bl-1
control
DCINA
0 1 2 3 4 7 1 2 3 4 7
dpt
-3 -2 -1 0 1 4 -2 -1 0 1 4
dpi

Fig.9

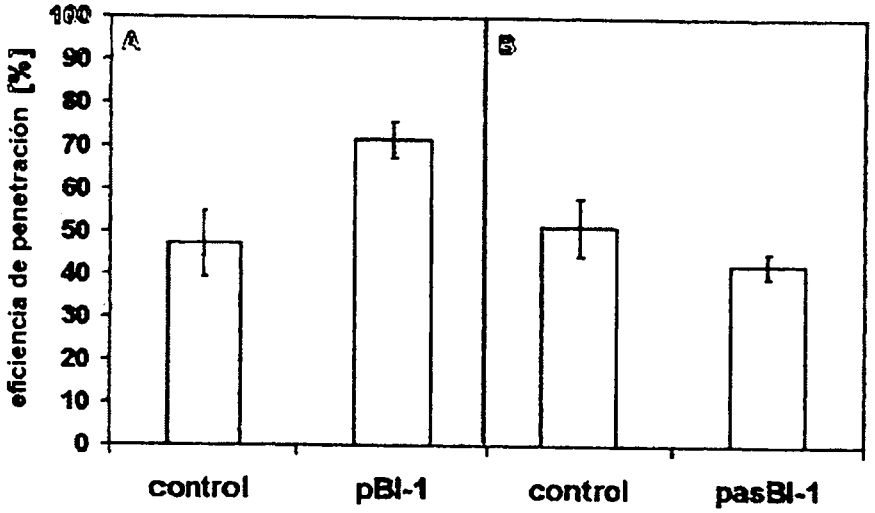
eficiencia de penetración [%]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
A
B
control
pBI-1
control
pasBI-1

Fig.10

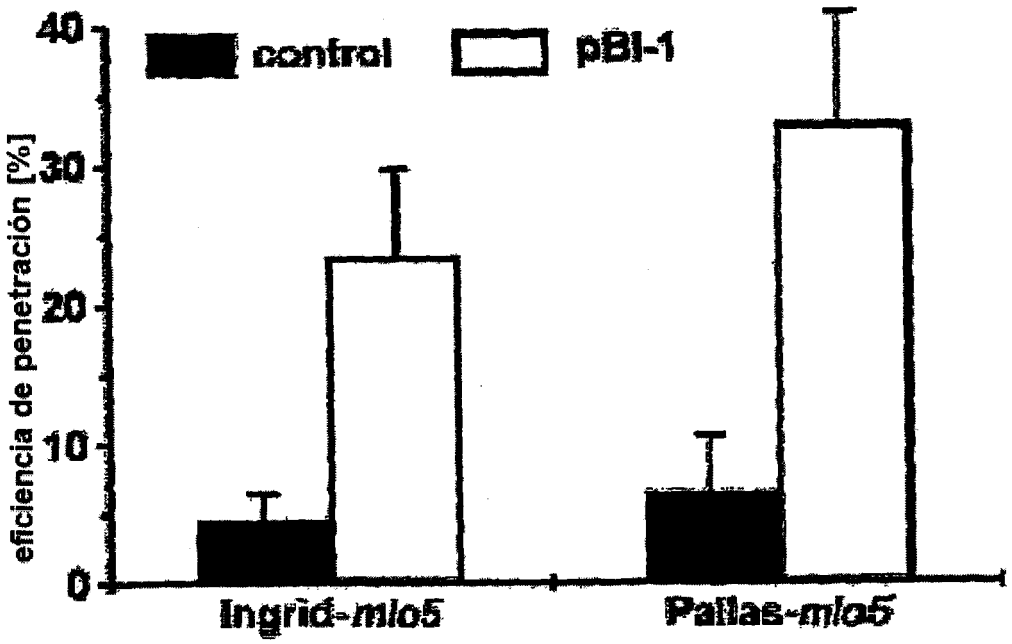
40
30
20
10
0
eficiencia de penetración [%]
control
pBI-1
Ingrid-mlo5
Pallas-mlo5

Fig.11

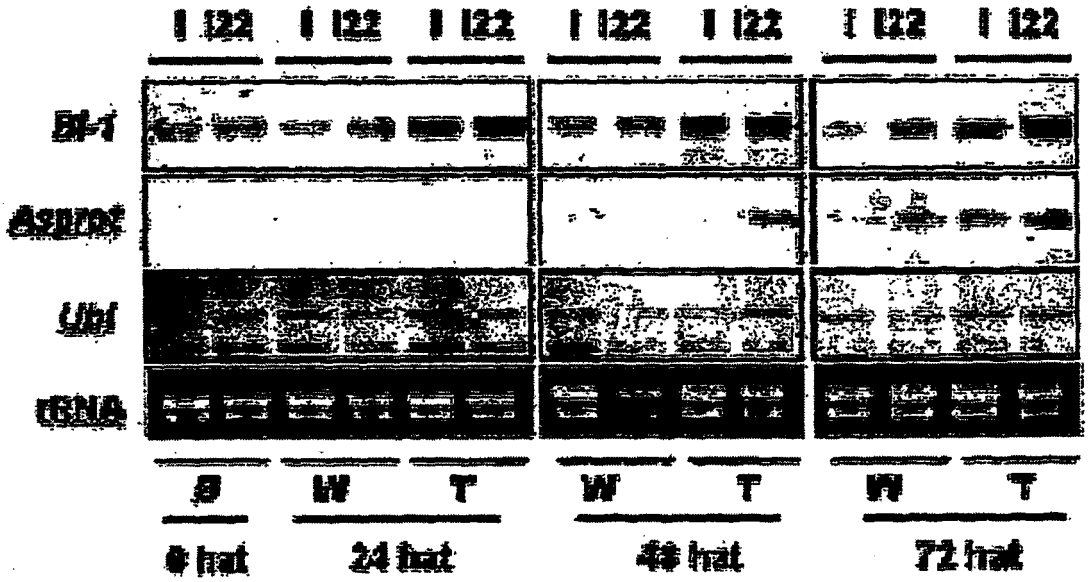
122
122
122
122
122
122
122
Bf-1
Aspm
Ubf
rRNA
B
W
T
W
T
W
T
0 hat
24 hat
48 hat
72 hat

Fig.12

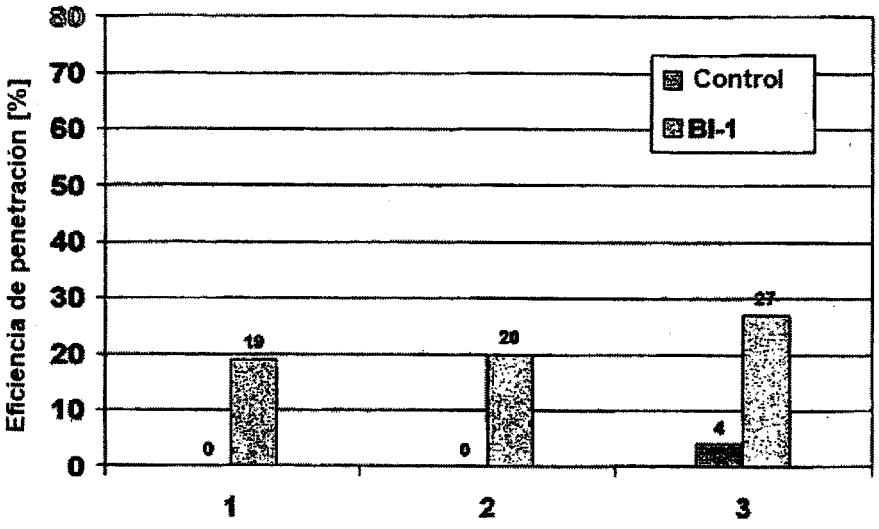
Eficiencia de penetración [%]
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Control
BI-1
0
19
0
20
4
27
1
2
3

Fig.13

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> BASF Plant Science GmbH

<120> Método para el incremento de la resistencia frente a factores de estrés en plantas

<130> PF54350-AT

<140>

<141>

<160> 44

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 744

<212> ADN

<213> *Hordeum vulgare*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(741)

<223> codificación para Proteína BI1

<400> 1

```
atg gac gcc ttc tac tcg acc tcg tcg gcg gcg gcg agc ggc tgg ggc   48
Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly
  1               5                  10                  15

cac gac tcc ctc aag aac ttc cgc cag atc tcc ccc gcc gtg cag tcc   96
His Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser
            20                  25                  30

cac ctc aag ctc gtt tac ctg act cta tgc ttt gca ctg gcc tca tct  144
His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser
        35                  40                  45

gcc gtg ggt gct tac cta cac att gcc ctg aac atc ggc ggg atg ctg  192
Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu
    50                  55                  60

aca atg ctc gct tgt gtc gga act atc gcc tgg atg ttc tcg gtg cca  240
Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro
65                  70                  75                  80

gtc tat gag gag agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc  288
Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu
                85                  90                  95

ctg gaa ggg gct tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt  336
Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe
            100                 105                 110

gac cca agc atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc gcc ttt  384
Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe
        115                 120                 125

ggg tgc ttc tct ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg  432
Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu
    130                 135                 140

tac ctc ggt ggc ctg ctc tcg tct ggc ctg tcg atc ctg ctc tgg ctg  480
Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu
145                 150                 155                 160

cag ttt gtc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt  528
Gln Phe Val Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe
                165                 170                 175

gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg ggg tac atg gtg tac gac  576
Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp
            180                 185                 190
```

```
acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cat ggc gac atg gac tac atc   624
Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile
        195                 200                 205

aag cac gcc ctc acc ctc ttc acc gac ttt gtt gcc gtc ctc gtc cga   672
Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg
    210                 215                 220

gtc ctc atc atc atg ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag   720
Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys
225                 230                 235                 240

aag aag agg aag agg ggg tcc tga                                   744
Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser
                245
```

<210> 2

<211> 247

<212> PRT

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 2

```
Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly
  1               5                  10                  15

His Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser
            20                  25                  30

His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser
        35                  40                  45

Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu
    50                  55                  60

Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro
65                  70                  75                  80

Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu
                85                  90                  95

Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe
            100                 105                 110

Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe
        115                 120                 125

Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu
    130                 135                 140

Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu
145                 150                 155                 160

Gln Phe Val Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe
                165                 170                 175

Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp
            180                 185                 190

Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile
        195                 200                 205

Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg
    210                 215                 220

Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys
225                 230                 235                 240

Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser
                245
```

<210> 3

<211> 1067

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(741)

<223> codificación para Proteína BI1

<400> 3

```
atg gat gcg ttc tct tcc ttc ttc gat tct caa cct ggt agc aga agc   48
Met Asp Ala Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser
  1               5                  10                  15

tgg agc tat gat tct ctt aaa aac ttc cgt cag att tct cca gcc gtt   96
Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val
            20                  25                  30

cag aat cat ctt aaa cgg gtt tat ttg acc tta tgt tgt gct ctt gtg   144
Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val
        35                  40                  45

gcg tct gcc ttt gga gct tac ctc cat gtg ctc tgg aat atc ggc ggt   192
Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly
    50                  55                  60

att ctt aca acg att gga tgt att gga act atg att tgg ctc ctt tca   240
Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Ile Gly Thr Met Ile Trp Leu Leu Ser
65                  70                  75                  80

tgt cct cct tat gaa cac caa aaa agg ctt tct ctt ctg ttt gtg tct   288
Cys Pro Pro Tyr Glu His Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Val Ser
                85                  90                  95

gct gtt ctt gaa ggt gct tct gtt ggc ccc ttg atc aaa gtg gca att   336
Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Ile
            100                 105                 110

gat gtt gac cca agc atc ctt atc act gca ttt gtt gga act gcg ata   384
Asp Val Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile
        115                 120                 125

gcg ttt gtc tgt ttc tca gca gca gca atg tta gca aga cgc agg gag   432
Ala Phe Val Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu
    130                 135                 140

tat ctc tac ctt gga gga ctg ctt tca tct ggc ttg tct atg cta atg   480
Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met
145                 150                 155                 160

tgg ctc cag ttt gcc tct tca atc ttt ggt ggc tct gca tct atc ttt   528
Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe
                165                 170                 175

aag ttt gag ttg tac ttt gga ctt ttg atc ttt gtg gga tac atg gtg   576
Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val
            180                 185                 190

gtg gac aca caa gag att ata gaa aag gca cac ctc ggt gac atg gac   624
Val Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp
        195                 200                 205

tat gta aaa cat tcg ttg acc ctt ttc act gac ttt gta gct gtg ttt   672
Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe
    210                 215                 220

gtt cgg att ctc atc ata atg ttg aag aac tca gca gat aaa gaa gag   720
Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Glu
225                 230                 235                 240
```

aag aag aag aaa agg aga aac tgaggggatg taaagtaaat ttaactttat 771
Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn
245

ggttgttatc gtgtgtggcc actttgaaga tattacttgt tagcactctc tattggtgac 831

cagacatgtt tccactaaaa aggatctgct tgtttcactt ctgcacaagt accatcttca 891

gattgtaaat gactcgagtg ttgttcttct tttcataaac ttttgttctt taagagtttg 951

gttctactga ttgcatctta ccaagctaag aataatgtag gaaaatgata atcctgttta 1011

aattttctaa aatgtgtgca tttcagaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1067

<210> 4

<211> 247

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 4

Met Asp Ala Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser
1 5 10 15

Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val
20 25 30

Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val
35 40 45

Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly
50 55 60

Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Ile Gly Thr Met Ile Trp Leu Leu Ser
65 70 75 80

Cys Pro Pro Tyr Glu His Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Val Ser
85 90 95

Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Ile
100 105 110

Asp Val Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile
115 120 125

Ala Phe Val Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu
130 135 140

Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met
145 150 155 160

Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe
165 170 175

Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val
180 185 190

Val Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp
195 200 205

Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe
210 215 220

Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Glu
225 230 235 240

Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn
245

<210> 5

<211> 1160

<212> ADN

<213> *Nicotiana tabacum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(747)

<223> codificación para Proteína BI1

<400> 5

```
atg gag tct tgc aca tcg ttc ttc aat tca cag tcg gcg tcg tct cgc   48
Met Glu Ser Cys Thr Ser Phe Phe Asn Ser Gln Ser Ala Ser Ser Arg
  1               5                  10                  15

aat cgc tgg agt tac gat tct ctt aag aac ttc cgc cag atc tct ccc   96
Asn Arg Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro
            20                  25                  30

ttt gtt caa act cat ctc aaa aag gtc tac ctt tca tta tgt tgt gct  144
Phe Val Gln Thr His Leu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Leu Cys Cys Ala
        35                  40                  45

tta gtt gct tcg gct gct gga gct tac ctt cac att ctt tgg aac att  192
Leu Val Ala Ser Ala Ala Gly Ala Tyr Leu His Ile Leu Trp Asn Ile
    50                  55                  60

ggt ggc tta ctt acg aca ttg gga tgt gtg gga agc ata gtg tgg ctg  240
Gly Gly Leu Leu Thr Thr Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Val Trp Leu
65                  70                  75                  80

atg gcg aca cct ctg tat gaa gag caa aag agg ata gca ctt ctg atg  288
Met Ala Thr Pro Leu Tyr Glu Glu Gln Lys Arg Ile Ala Leu Leu Met
                85                  90                  95

gca gct gca ctg ttt aaa gga gca tct att ggt cca ctg att gaa ttg  336
Ala Ala Ala Leu Phe Lys Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Glu Leu
            100                 105                 110

gct att gac ttt gac cca agc att gtg atc ggt gct ttt gtt ggt tgt  384
Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile Val Ile Gly Ala Phe Val Gly Cys
        115                 120                 125

gct gtg gct ttt ggt tgc ttc tca gct gct gcc atg gtg gca agg cgc  432
Ala Val Ala Phe Gly Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Val Ala Arg Arg
    130                 135                 140

aga gag tac ttg tat ctt gga ggt ctt ctt tca tct ggt ctc tct atc  480
Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile
145                 150                 155                 160

ctt ttc tgg ttg cac ttc gcg tcc tcc att ttt ggt ggt tct atg gcc  528
Leu Phe Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Met Ala
                165                 170                 175

ttg ttc aag ttc gag gtt tat ttt ggg ctc ttg gtg ttt gtg ggc tat  576
Leu Phe Lys Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr
            180                 185                 190

atc att ttt gac acc caa gat ata att gag aag gca cac ctt ggg gat  624
Ile Ile Phe Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp
        195                 200                 205

ttg gac tac gtg aag cat gct ctg acc ctc ttt aca gat ttt gtt gct  672
Leu Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala
    210                 215                 220

gtt ttt gtg cga ata tta atc ata atg ctg aag aat gca tcc gac aag  720
Val Phe Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys
225                 230                 235                 240

gaa gag aag aag aag aag agg aga aac taatgcataa gcggttattc        767
Glu Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn
                245
```

aaagactctg taactctaga atctggcatt ttcttgttca taaacttctg tagaccttcg 827

acaagtatgt tgttaatagt ttggtaacgc ctcagattaa gctgcgaggc tctgttatgc 887

cgcatgccaa tgtggttatg gtggtacata gatggttttg tttccgaagc ataccatcaa 947

ataacatgca tgtttacact atatcgataa cctacgagtg tactacttat ttctgctccc 1007

ttttgctgtg ttaggttgtt catgattgta tagttgattt tccgttatgt tagaccatct 1067

tctttcttga cgtttaattt ctcatattga tgggagaaat gaaaattcac accgtcgccc 1127

caacttgttt aagactgagg cgcaattgta gtt 1160

<210> 6

<211> 249

<212> PRT

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 6

Met Glu Ser Cys Thr Ser Phe Phe Asn Ser Gln Ser Ala Ser Ser Arg
1 5 10 15

Asn Arg Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro
20 25 30

Phe Val Gln Thr His Leu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Leu Cys Cys Ala
35 40 45

Leu Val Ala Ser Ala Ala Gly Ala Tyr Leu His Ile Leu Trp Asn Ile
50 55 60

Gly Gly Leu Leu Thr Thr Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Val Trp Leu
65 70 75 80

Met Ala Thr Pro Leu Tyr Glu Glu Gln Lys Arg Ile Ala Leu Leu Met
85 90 95

Ala Ala Ala Leu Phe Lys Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Glu Leu
100 105 110

Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile Val Ile Gly Ala Phe Val Gly Cys
115 120 125

Ala Val Ala Phe Gly Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Val Ala Arg Arg
130 135 140

Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile
145 150 155 160

Leu Phe Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Met Ala
165 170 175

Leu Phe Lys Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr
180 185 190

Ile Ile Phe Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp
195 200 205

Leu Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala
210 215 220

Val Phe Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys
225 230 235 240

Glu Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn
245

<210> 7

<211> 1056

<212> ADN

<213> *Oryza sativa*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(747)

<223> codificación para Proteína BI1

<400> 7

```
atg gac gcc ttc tac tcg acc tcg tcg gcg tac gga gcg gcg gcg agc   48
Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Ala Ala Ala Ser
  1               5                  10                  15

ggc tgg ggc tac gac tcg ctg aag aac ttc cgc cag atc tcc ccc gcc   96
Gly Trp Gly Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala
            20                  25                  30

gtc cag tcc cac ctc aag ctc gtt tac ctg aca cta tgc gtc gcc ctg  144
Val Gln Ser His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Val Ala Leu
        35                  40                  45

gct gcg tcg gcg gtg ggc gca tac ctg cac gtc gcc ttg aac atc ggc  192
Ala Ala Ser Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Ala Leu Asn Ile Gly
    50                  55                  60

ggg atg ttg act atg ctc ggg tgc gtg ggg agc atc gcc tgg ttg ttc  240
Gly Met Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe
65                  70                  75                  80

tcg gtg cct gtc ttt gag gag agg aag agg ttt ggg att ctc ttg gcc  288
Ser Val Pro Val Phe Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Ile Leu Leu Ala
                85                  90                  95

gct gcc ctg ctg gaa ggg gct tca gtt ggg cct ctg atc aag ctt gct  336
Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala
            100                 105                 110

gta gac ttt gac tca agc att ctc gta aca gca ttt gtt gga act gcc  384
Val Asp Phe Asp Ser Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala
        115                 120                 125

att gca ttt ggg tgc ttc act tgc gct gcc atc gtt gcc aag cgt agg  432
Ile Ala Phe Gly Cys Phe Thr Cys Ala Ala Ile Val Ala Lys Arg Arg
    130                 135                 140

gag tac ctc tac ctt ggt ggt ttg ctc tct tct ggc ctc tcc atc ctg  480
Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu
145                 150                 155                 160

ctc tgg ctg cag ttt gcc gca tcc atc ttt ggc cac tcc acc ggc agc  528
Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile Phe Gly His Ser Thr Gly Ser
                165                 170                 175

ttc atg ttt gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg ggg tac atg  576
Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met
            180                 185                 190

gtg tat gac acg cag gag atc atc gag agg gct cac cac ggt gac atg  624
Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met
        195                 200                 205

gac tac atc aag cac gca ctc acc ctc ttc act gac ttc gtg gcc gtc  672
Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val
    210                 215                 220

ctt gtc cgg atc ctc gtc atc atg ctc aag aac gcg tct gac aag tcg  720
Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Ser
225                 230                 235                 240

gag gag aag aag agg aag aag agg tct tgagagcttc tcttcccgct        767
Glu Glu Lys Lys Arg Lys Lys Arg Ser
                245
```

ttgcacataa gaaaaaacca ccgcggctat tgcctctacg tattatgaca gagccgcact 827

tcaactgggt tttatggtga atacaagttc ttttgcattt tgttgatacg gtgtgaatct 887

tctcaggttt gtcgtcgtag tagctttgca aatactagca tgctacatga cacggatctt 947

tctgtaatgg tggtcgcgtt gatcgaaacg tgaaaacaca tcttcatttg cgactaattt 1007

gtttgccttt tggtgattga tgatgatcct ttccccaaaa aaaaaaaaa 1056

<210> 8

<211> 249

<212> PRT

<213> *Oryza sativa*

<400> 8

Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Ala Ala Ala Ser
1 5 10 15

Gly Trp Gly Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala
20 25 30

Val Gln Ser His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Val Ala Leu
35 40 45

Ala Ala Ser Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Ala Leu Asn Ile Gly
50 55 60

Gly Met Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe
65 70 75 80

Ser Val Pro Val Phe Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Ile Leu Leu Ala
85 90 95

Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala
100 105 110

Val Asp Phe Asp Ser Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala
115 120 125

Ile Ala Phe Gly Cys Phe Thr Cys Ala Ala Ile Val Ala Lys Arg Arg
130 135 140

Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu
145 150 155 160

Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile Phe Gly His Ser Thr Gly Ser
165 170 175

Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met
180 185 190

Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met
195 200 205

Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val
210 215 220

Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Ser
225 230 235 240

Glu Glu Lys Lys Arg Lys Lys Arg Ser
245

<210> 9

<211> 973

<212> ADN

<213> *Brassica napus*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(741)

<223> codificación para Proteína BI1

<400> 9

```
atg gat tca ttc tcg tcc ttc ttc gat tct caa cct ggt agc aga agc   48
Met Asp Ser Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser
  1               5                  10                  15

tgg agc tat gat tct ctc aaa aac ctc cgt cag att tct ccc tcc gtc   96
Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Leu Arg Gln Ile Ser Pro Ser Val
             20                  25                  30

cag aat cat ctc aag agg gtt tat ctc act ctg tgt tgt gct ctc gtt  144
Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val
         35                  40                  45

gcg tct gcg ttt gga gct tac ctc cac gtg ctc tgg aac ata ggt ggt  192
Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly
     50                  55                  60

att ctc act acc att gga tgc ttt gga agc atg att tgg ctg ctc tcc  240
Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Phe Gly Ser Met Ile Trp Leu Leu Ser
 65                  70                  75                  80

tgt cct cct tat gaa caa caa aag agg ctt tcc ctt ctg ttt ctg tct  288
Cys Pro Pro Tyr Glu Gln Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ser
                 85                  90                  95

gct gtt ctc gaa ggt gct tca gtt ggt ccc ttg atc aaa gtg gca gtt  336
Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Val
            100                 105                 110

gat ttt gac cca agc atc ctc atc act gcg ttt gtc gga act gcg ata  384
Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile
        115                 120                 125

gcc ttt atc tgt ttc tca ggg gca gcg atg ttg gca aga cgc aga gag  432
Ala Phe Ile Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu
    130                 135                 140

tac ctc tac ctc gga gga ctg ctt tca tct ggc ttg tcc atg ctt atg  480
Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met
145                 150                 155                 160

tgg ctt cag ttt gcc tct tcc atc ttt ggt ggc tct gca tcc atc ttt  528
Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe
                165                 170                 175

aag ttt gag ctc tac ttt gga ctc ttg atc ttt gtg gga tac atg gtg  576
Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val
            180                 185                 190

gtg gac act caa gat att ata gag aag gcc cac ctc ggt gac atg gat  624
Val Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp
        195                 200                 205

tac gtg aaa cat tcg ttg acc ctt ttc acc gat ttt gta gct gtg ttt  672
Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe
    210                 215                 220

gtt cgt gtt ctc atc att atg ctg aag aac tcg gca gat aaa gaa gat  720
Val Arg Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Asp
225                 230                 235                 240

aaa aag aag agg agg agg aac tgagactaaa aagtgagaaa gaaagctaaa     771
Lys Lys Lys Arg Arg Arg Asn
                245

tagagtgggt gttatgtgtg tttcaaaaaa taaaaaagag tgggtgttat aagtacagac 831

atgatagcgt tggtgttttt tacttgtttg gaacagtttt ggtaacaaca cacgttacgt 891

atttgtgtat tcctcttagt gactccagat tgtgaatgga tcagtatctt gaaactgtgt 951

tgaaaattat cagttgggag ct                                          973
```

<210> 10

<211> 247

<212> PRT

<213> *Brassica napus*

<400> 10

```
Met Asp Ser Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser
 1               5                  10                  15

Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Leu Arg Gln Ile Ser Pro Ser Val
            20                  25                  30

Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val
        35                  40                  45

Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly
    50                  55                  60

Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Phe Gly Ser Met Ile Trp Leu Leu Ser
65                  70                  75                  80

Cys Pro Pro Tyr Glu Gln Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ser
                85                  90                  95

Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Val
            100                 105                 110

Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile
        115                 120                 125

Ala Phe Ile Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu
    130                 135                 140

Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met
145                 150                 155                 160

Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe
                165                 170                 175

Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val
            180                 185                 190

Val Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp
        195                 200                 205

Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe
    210                 215                 220

Val Arg Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Asp
225                 230                 235                 240

Lys Lys Lys Arg Arg Arg Asn
                245
```

<210> 11

<211> 747

<212> ADN

<213> *Glycine max*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(744)

<223> codificación para Proteína BI1

<400> 11

```
Arg Leu Gln Ala Met Asp Ala Phe Asn Ser Phe Phe Asp Ser Arg Asn
  1               5                  10                  15

cga tgg aat tac gat act ctc aaa aac ttc cgt cag att tct ccg gtc   96
Arg Trp Asn Tyr Asp Thr Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Val
            20                  25                  30

gtg cag aat cac ctg aag cag gtt tat ttt act ctg tgt ttt gcc gtg   144
Val Gln Asn His Leu Lys Gln Val Tyr Phe Thr Leu Cys Phe Ala Val
        35                  40                  45

gtt gct gcg gct gtc ggg gct tac ctt cat gtc ctc ttg aac att ggg   192
Val Ala Ala Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Leu Asn Ile Gly
    50                  55                  60

ggt ttt ctt act aca gtg gca tgc atg gga agc agc ttt tgg tta ctc   240
Gly Phe Leu Thr Thr Val Ala Cys Met Gly Ser Ser Phe Trp Leu Leu
65                  70                  75                  80

tcc aca cct cct ttt gaa gag agg aag agg gtg act ttg ttg atg gcc   288
Ser Thr Pro Pro Phe Glu Glu Arg Lys Arg Val Thr Leu Leu Met Ala
                85                  90                  95

gca tca ctg ttt cag ggt tcc tct att gga ccc ttg att gat ttg gct   336
Ala Ser Leu Phe Gln Gly Ser Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala
            100                 105                 110

att cat atc gat cca agc ctt atc ttt agt gca ttt gtg gga aca gcc   384
Ile His Ile Asp Pro Ser Leu Ile Phe Ser Ala Phe Val Gly Thr Ala
        115                 120                 125

ttg gcc ttt gca tgc ttc tca gga gca gct ttg gtt gct agg cgt agg   432
Leu Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg
    130                 135                 140

gag tac ctg tac ctt ggt ggc ttg gtt tct tct gga ttg tcc atc ctt   480
Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Val Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu
145                 150                 155                 160

ctc tgg ttg cac ttt gct tct tcc atc ttt gga ggc tca aca gct ctc   528
Leu Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Thr Ala Leu
                165                 170                 175

ttt aag ttt gag ttg tac ttt ggg ctt ttg gtg ttt gta ggt tac att   576
Phe Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Ile
            180                 185                 190

gta gta gac acc caa gaa ata gtt gag agg gca cac ttg ggc gat ctg   624
Val Val Asp Thr Gln Glu Ile Val Glu Arg Ala His Leu Gly Asp Leu
        195                 200                 205

gac tat gta aag cat gcc ttg acc ttg ttt acc gat ttg gtc gca gtt   672
Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Val Ala Val
    210                 215                 220

ttt gtc cgg att ctt gtt att atg ttg aag aat tcg act gag agg aat   720
Phe Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ser Thr Glu Arg Asn
225                 230                 235                 240

gag aag aaa aag aag aga aga gat tga                              747
Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asp
                245

cga ttg caa gca atg gac gcc ttc aat tcc ttc ttc gat tca aga aac   48
```

<210> 12

<211> 248

<212> PRT

<213> *Glycine max*

<400> 12

```
Arg Leu Gln Ala Met Asp Ala Phe Asn Ser Phe Phe Asp Ser Arg Asn
 1               5                  10                  15

Arg Trp Asn Tyr Asp Thr Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Val
            20                  25                  30

Val Gln Asn His Leu Lys Gln Val Tyr Phe Thr Leu Cys Phe Ala Val
        35                  40                  45

Val Ala Ala Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Leu Asn Ile Gly
    50                  55                  60

Gly Phe Leu Thr Thr Val Ala Cys Met Gly Ser Ser Phe Trp Leu Leu
65                  70                  75                  80

Ser Thr Pro Pro Phe Glu Glu Arg Lys Arg Val Thr Leu Leu Met Ala
                85                  90                  95

Ala Ser Leu Phe Gln Gly Ser Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala
            100                 105                 110

Ile His Ile Asp Pro Ser Leu Ile Phe Ser Ala Phe Val Gly Thr Ala
        115                 120                 125

Leu Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg
    130                 135                 140

Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Val Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu
145                 150                 155                 160

Leu Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Thr Ala Leu
                165                 170                 175

Phe Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Ile
            180                 185                 190

Val Val Asp Thr Gln Glu Ile Val Glu Arg Ala His Leu Gly Asp Leu
        195                 200                 205
```

<210> 13

<211> 1510

<212> ADN

<213> *Glycine max*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(777)

<223> codificación para BI-1 protein

<400> 13

```
atc acg aaa act ata cga ttc gat tcc ttg ttt tcg atg gac act ttc   48
Ile Thr Lys Thr Ile Arg Phe Asp Ser Leu Phe Ser Met Asp Thr Phe
 1               5                  10                  15

ttc aag tcc cca tct tct tct tct tcg aga agc cgc tgg agt tac gat   96
Phe Lys Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Arg Ser Arg Trp Ser Tyr Asp
            20                  25                  30

act ctc aag aat ttc cgc gag atc tct ccg ctc gtt cag aat cac atc   144
Thr Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Leu Val Gln Asn His Ile
        35                  40                  45

aaa ctg gtt tat ttt acg tta tgt tgc gct gtg gtg gct gct gct gtt   192
Lys Leu Val Tyr Phe Thr Leu Cys Cys Ala Val Val Ala Ala Ala Val
    50                  55                  60
```

```
gga gct ttc ctt cat gtt ctg tgg aac att ggc ggt ttt ctc acc acg   240
Gly Ala Phe Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly Phe Leu Thr Thr
 65                  70                  75                  80

ttg gct tcc att ggg agc atg ttt tgg ttg cta tct aca ccc cct ttt   288
Leu Ala Ser Ile Gly Ser Met Phe Trp Leu Leu Ser Thr Pro Pro Phe
                85                  90                  95

gaa gag caa aag agg ttg tct ctg ttg atg gct tcg gcc ctg ttt cag   336
Glu Glu Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Met Ala Ser Ala Leu Phe Gln
            100                 105                 110

ggt gct tcc att gga cct ctg att gat ttg gct ttt gcc att gat cct   384
Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala Phe Ala Ile Asp Pro
        115                 120                 125

ggc ctt atc att ggc gca ttt gtg gca act tct ttg gct ttt gct tgc   432
Gly Leu Ile Ile Gly Ala Phe Val Ala Thr Ser Leu Ala Phe Ala Cys
    130                 135                 140

ttt tct gca gta gcc tta gtt gca agg cga agg gag tac ctc tac ctt   480
Phe Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu
145                 150                 155                 160

ggt ggt ttg ctt tct tct tgg ctt tcc att ctt atg tgg ttg cac tct   528
Gly Gly Leu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Ile Leu Met Trp Leu His Ser
                165                 170                 175

gat tcc tct ctc ttt ggg ggc tca att gca ctc ttc aag ttt gag ctg   576
Asp Ser Ser Leu Phe Gly Gly Ser Ile Ala Leu Phe Lys Phe Glu Leu
            180                 185                 190

tac ttt ggg ctt ttg gtg ttt gtg ggc tac gtt ata gta gac act caa   624
Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Val Ile Val Asp Thr Gln
        195                 200                 205

gaa att att gaa agg gct cac ttt ggt gac ctg gat tat gtg aag cat   672
Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Phe Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys His
    210                 215                 220

gca ttg aca ttg ttc act gat ttg gct gca atc ttt gtg cga att ctt   720
Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Ala Ala Ile Phe Val Arg Ile Leu
225                 230                 235                 240

att ata atg ttg aag aat tca tct gag aga aat gag aag aag aag aaa   768
Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ser Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys Lys
                245                 250                 255

agg aga gat tagtaggctg accgaccgac tcgagctcag gcttctctac           817
Arg Arg Asp

agtaatttag tttgtggaga atacataatt agctgtttag atgatgttgg tcccttgtgt 877

agttagttag ctatgtgttt gctgtaatgg taaatgtcag gatttctttt aaacatcttc 937

atatgtattt gccaatatca taatgtgtcg tataacatca taccttggtt taaaaaaaaa 997

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaann nnnnnnnnnn 1057

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngg tgtttgtggg ctacgttata 1117

gtagacactc aagtaatcat tgagagggct cactttggtg acctggatta tgttaagcat 1177

gcattgacac tgttcactga tttggctgca atctttgtgc gaattcttaa tataatgttg 1237

aataattcat ctaagagaaa tgagaagaag aggaggagag attaataggt tgaccgattg 1297

ctatgtgtag agtaatttgg tttgtagaga atacataatt agctgtttag aagttgttgg 1357

tccccttgtg tagttagtag ttagctatgt gtttgctgta atggtaaatg tcaggatttc 1417

ttttaaacat tttcatatgt atttgctaat aatcataata tatagtataa acatcattcc 1477

ttggtttaaa aaaagaaaaa aaaaaaaaaa aaa                               1510
```

<210> 14

<211> 259

<212> PRT

<213> *Glycine max*

<400> 14

```
Ile Thr Lys Thr Ile Arg Phe Asp Ser Leu Phe Ser Met Asp Thr Phe
 1               5                  10                  15

Phe Lys Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Arg Ser Arg Trp Ser Tyr Asp
            20                  25                  30

Thr Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Leu Val Gln Asn His Ile
        35                  40                  45

Lys Leu Val Tyr Phe Thr Leu Cys Cys Ala Val Val Ala Ala Ala Val
    50                  55                  60

Gly Ala Phe Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly Phe Leu Thr Thr
65                  70                  75                  80

Leu Ala Ser Ile Gly Ser Met Phe Trp Leu Leu Ser Thr Pro Pro Phe
                85                  90                  95

Glu Glu Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Met Ala Ser Ala Leu Phe Gln
            100                 105                 110

Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala Phe Ala Ile Asp Pro
        115                 120                 125

Gly Leu Ile Ile Gly Ala Phe Val Ala Thr Ser Leu Ala Phe Ala Cys
    130                 135                 140

Phe Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu
145                 150                 155                 160

Gly Gly Leu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Ile Leu Met Trp Leu His Ser
                165                 170                 175

Asp Ser Ser Leu Phe Gly Gly Ser Ile Ala Leu Phe Lys Phe Glu Leu
            180                 185                 190

Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Val Ile Val Asp Thr Gln
        195                 200                 205

Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Phe Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys His
    210                 215                 220

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

Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ser Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys Lys
                245                 250                 255

Arg Arg Asp
```

<210> 15

<211> 651

<212> ADN

<213> *Triticum aestivum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(651)

<223> codificación para BI-1 protein

<400> 15

```
gtc gca atg ccg ggt cga cga ttt cgt ctg acc tat gct ttg cct ggc   48
Val Ala Met Pro Gly Arg Arg Phe Arg Leu Thr Tyr Ala Leu Pro Gly
  1               5                  10                  15

ctc atc tgc cgt ggg tgc tta cct gca cat tgc cct gaa cat tgg cgg   96
Leu Ile Cys Arg Gly Cys Leu Pro Ala His Cys Pro Glu His Trp Arg
            20                  25                  30

gat gct gac aat gct cgc gtg tat cgg aac cat cgc ctg gat gtt ctc  144
Asp Ala Asp Asn Ala Arg Val Tyr Arg Asn His Arg Leu Asp Val Leu
        35                  40                  45

ggt gcc agt cta cga gga gag gaa gag gtt tgg gct gct gat ggg tgc  192
Gly Ala Ser Leu Arg Gly Glu Glu Glu Val Trp Ala Ala Asp Gly Cys
    50                  55                  60

agc ctc ctg gaa ggg gct tca gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata  240
Ser Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile
65                  70                  75                  80

gac ttt gac cca agt atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc  288
Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile
                85                  90                  95

gcc ttc ggg tgc ttc tct ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag  336
Ala Phe Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu
            100                 105                 110

tac ctg tac ctc ggt ggt ctg ctc tcc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc  384
Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu
        115                 120                 125

tgg ctg cag ttt gcc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc  432
Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe
    130                 135                 140

atg ttt gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg gga tac atg gtg  480
Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val
145                 150                 155                 160

tac gac acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cac ggc gac atg gat  528
Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp
                165                 170                 175

tac atc aag cac gcg ctc acc ctc ttc acc gac ttc gtc gcc gtt ctc  576
Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu
            180                 185                 190

gtc cgc gtc ctc atc atc ttg ctc aag aac gca gcg gac aag gtc gga  624
Val Arg Val Leu Ile Ile Leu Leu Lys Asn Ala Ala Asp Lys Val Gly
        195                 200                 205

ggc caa gaa gag gag gaa gag aag tcc                              651
Gly Gln Glu Glu Glu Glu Glu Lys Ser
    210                 215
```

<210> 16

<211> 217

<212> PRT

<213> *Triticum aestivum*

<400> 16

```
Val Ala Met Pro Gly Arg Arg Phe Arg Leu Thr Tyr Ala Leu Pro Gly
 1               5                  10                  15

Leu Ile Cys Arg Gly Cys Leu Pro Ala His Cys Pro Glu His Trp Arg
            20                  25                  30

Asp Ala Asp Asn Ala Arg Val Tyr Arg Asn His Arg Leu Asp Val Leu
        35                  40                  45

Gly Ala Ser Leu Arg Gly Glu Glu Glu Val Trp Ala Ala Asp Gly Cys
    50                  55                  60

Ser Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile
65                  70                  75                  80

Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile
                85                  90                  95

Ala Phe Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu
            100                 105                 110

Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu
        115                 120                 125

Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe
    130                 135                 140

Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val
145                 150                 155                 160

Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp
                165                 170                 175

Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu
            180                 185                 190

Val Arg Val Leu Ile Ile Leu Leu Lys Asn Ala Ala Asp Lys Val Gly
        195                 200                 205

Gly Gln Glu Glu Glu Glu Glu Lys Ser
    210                 215
```

<210> 17
<211> 412
<212> ADN
<213> *Zea mays*

<220>
<221> CDS
<222> (3)..(410)
<223> codificación para Proteína BI1

<400> 17

```
tt gtt att gac ttg gat tcg agg att ctc gtc act gcg ttc gtc ggg     47
   Val Ile Asp Leu Asp Ser Arg Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly
     1               5                  10                  15

acc gca gtt gct ttt gca tgc ttc tct ggc gct gcc atc atc gcc aag     95
Thr Ala Val Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys
                 20                  25                  30

cgc agg gaa tac ctg tac ctc ggc ggt ctg ctt tca tct ggc ctc tcc    143
Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser
             35                  40                  45

att ctt ctc tgg ctg cag ttt gct act tca atc ttt ggc cac acc agc    191
Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Thr Ser
         50                  55                  60

gcg acc ttc atg ttt gag ctc tac ttt ggc ctc ctg gtt ttc ctg gga    239
Ala Thr Phe Met Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Leu Gly
     65                  70                  75

tat atg gtg ttt gac acc cag gag atc atc gag agg gcg cac cgt ggg    287
Tyr Met Val Phe Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Arg Gly
 80                  85                  90                  95

gac atg gac tac atc aag cac gcg ctg act ctc ttc acc gac ttt gtt    335
Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val
                100                 105                 110

gcg gtt ctt gtt cga atc ctt gtc atc atg atg aag aat gca cag gag    383
Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Met Lys Asn Ala Gln Glu
            115                 120                 125

aaa tcc caa gac gag aag aag agg aag aa                             412
Lys Ser Gln Asp Glu Lys Lys Arg Lys
        130                 135
```

<210> 18

<211> 136

<212> PRT

<213> *Zea mays*

<400> 18

```
Val Ile Asp Leu Asp Ser Arg Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr
 1               5                  10                  15

Ala Val Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg
            20                  25                  30

Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile
        35                  40                  45

Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Thr Ser Ala
    50                  55                  60

Thr Phe Met Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Leu Gly Tyr
65                  70                  75                  80

Met Val Phe Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Arg Gly Asp
                85                  90                  95

Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala
            100                 105                 110

Val Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Met Lys Asn Ala Gln Glu Lys
        115                 120                 125

Ser Gln Asp Glu Lys Lys Arg Lys
    130                 135
```

<210> 19

<211> 345

<212> ADN

<213> *Triticum aestivum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(342)

<400> 19

```
gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg tac ctc ggt ggc ctg   48
Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu
  1               5                  10                  15

ctc tcc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc tgg ctg cag ttt gcc acg tcc   96
Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser
            20                  25                  30

atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt gag gtt tac ttt ggc   144
Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly
        35                  40                  45

ctg ttg atc ttt ctg gga tac atg gtg tac gac acg cag gag atc atc   192
Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile
    50                  55                  60

gag agg gcg cac cac ggc gac atg gac tac atc aag cac gcg ctc acc   240
Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr
65                  70                  75                  80

ctc ttc acc gac ttt gtc gcc gtc ctc gtc cgg atc ctc atc atc atg   288
Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Ile Ile Met
                85                  90                  95

ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag aag aag agg aag agg   336
Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Arg Lys Arg
            100                 105                 110

agg tcc tga                                                      345
Arg Ser
```

<210> 20

<211> 114

<212> PRT

<213> *Triticum aestivum*

<400> 20

```
Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu
  1               5                  10                  15

Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser
            20                  25                  30

Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly
        35                  40                  45

Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile
    50                  55                  60

Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr
65                  70                  75                  80

Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Ile Ile Met
                85                  90                  95

Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Arg Lys Arg
            100                 105                 110

Arg Ser
```

<210> 21

<211> 403

<212> ADN

<213> *Zea mays*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(402)

<223> codificación para Proteína BI1

<400> 21

```
ggc agc atc gcc tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag   48
Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys
  1               5                  10                  15

agg tac tgg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggg gcg tcg gtt   96
Arg Tyr Trp Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val
            20                  25                  30

gga ccc ctc atc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg   144
Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val
        35                  40                  45

aca gcg ttc gtg ggg act gcc att gcg ttc gcg tgc ttc tct tgc gcg   192
Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Cys Ala
    50                  55                  60

gcc atg gtg gcc aag cgc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggg ctg ctc   240
Ala Met Val Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu
65                  70                  75                  80

tct tct ggc ctc tcc atc ctg ctc tgg ctg cag ttc gcc gcc tcc atc   288
Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile
                85                  90                  95

ttc ggc cac caa tcc act agc agc ttc atg ttt gag gtc tac ttt ggg   336
Phe Gly His Gln Ser Thr Ser Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly
            100                 105                 110

ctg ctc atc ttc ctg ggc tac atg gtg tac gac acg cag gag gtc atc   384
Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Val Ile
        115                 120                 125

gag agg gcg cac cac ggc g                                        403
Glu Arg Ala His His Gly
    130
```

<210> 22

<211> 134

<212> PRT

<213> *Zea mays*

<400> 22

```
Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys
 1               5                  10                  15
Arg Tyr Trp Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val
            20                  25                  30
Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val
        35                  40                  45
Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Cys Ala
    50                  55                  60
Ala Met Val Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu
65                  70                  75                  80
Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile
                85                  90                  95
Phe Gly His Gln Ser Thr Ser Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly
            100                 105                 110
Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Val Ile
        115                 120                 125
Glu Arg Ala His His Gly
    130
```

<210> 23

<211> 410

<212> ADN

<213> *Zea mays*

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(410)

<223> codificación para Proteína BI1

<400> 23

```
gc tgg aac atc ggc gtg agg ctg aca atg ctc ggt tgc atc ggc agc    47
   Trp Asn Ile Gly Val Arg Leu Thr Met Leu Gly Cys Ile Gly Ser
     1               5                  10                  15
atc gac tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag agg tat    95
Ile Asp Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr
                20                  25                  30
ggg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggc gct tcg gtc gga ccc   143
Gly Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro
            35                  40                  45
ctc gtc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg acg gcg   191
Leu Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala
        50                  55                  60
ttc gtg ggg act gcc atc gcg ttc gcg tgc ttc tcc ggc gcg gcc atg   239
Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met
    65                  70                  75
gtg gcc agg cgc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggg ctg ctc tcg tcg   287
Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser
80                  85                  90                  95
ggg ctc tcc atc ctg ctc tgg ctg cag ctc gcc gcc tcc atc ttc ggc   335
Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ala Ala Ser Ile Phe Gly
                100                 105                 110
cac tcc gca acc agc ttc atg ttc gag gtc tac ttc ggg ctg ctc atc   383
His Ser Ala Thr Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile
            115                 120                 125
ttc ctg ggc tac gtg gtg tac gac acg                               410
Phe Leu Gly Tyr Val Val Tyr Asp Thr
        130                 135
```

<210> 24
<211> 136
<212> PRT
<213> *Zea mays*

<400> 24

```
Trp Asn Ile Gly Val Arg Leu Thr Met Leu Gly Cys Ile Gly Ser Ile
 1               5                  10                  15

Asp Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr Gly
            20                  25                  30

Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu
        35                  40                  45

Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe
    50                  55                  60

Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Val
65                  70                  75                  80

Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly
                85                  90                  95

Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ala Ala Ser Ile Phe Gly His
            100                 105                 110

Ser Ala Thr Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe
        115                 120                 125

Leu Gly Tyr Val Val Tyr Asp Thr
    130                 135
```

<210> 25
<211> 463
<212> ADN
<213> *Triticum aestivum*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(462)
<223> codificación para Proteína BI1

<400> 25

```
ttc tca ggt acg ttc cgc aat tcc cgg agc gac gat ttc gtg ctc tgc   48
Phe Ser Gly Thr Phe Arg Asn Ser Arg Ser Asp Asp Phe Val Leu Cys
  1               5                  10                  15

gaa ctt cag cga gag ctc ccc cga tgc cgg gac gca acc ttg acg gtc   96
Glu Leu Gln Arg Glu Leu Pro Arg Cys Arg Asp Ala Thr Leu Thr Val
            20                  25                  30

gta tac gtg atc cca ata gtg ggc cga ata aaa tct gcc gcg ggt gct  144
Val Tyr Val Ile Pro Ile Val Gly Arg Ile Lys Ser Ala Ala Gly Ala
        35                  40                  45

tac ctg cac att gcc ctg aac atc ggt ggg atg ctg aca atg ctt gcg  192
Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu Thr Met Leu Ala
    50                  55                  60

tgt atc gga acc att gcc tgg atg ttc tct gtg cca gtc tat gag gag  240
Cys Ile Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu
65                  70                  75                  80

agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc ctg gaa ggg gct  288
Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala
                85                  90                  95

tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt gac cca agc atc  336
Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile
            100                 105                 110

ctc gtg aca ggg ttt gtt gga acc gcc atc gcc ttt ggg tgc ttc tct  384
Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Gly Cys Phe Ser
        115                 120                 125

ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg tac ctc gga ggc  432
Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly
    130                 135                 140

ctg ctc tcc tcc ggc ctg acg atc ctg ctc t                        463
Leu Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ile Leu Leu
145                 150
```

<210> 26

<211> 154

<212> PRT

<213> *Triticum aestivum*

<400> 26

```
Phe Ser Gly Thr Phe Arg Asn Ser Arg Ser Asp Asp Phe Val Leu Cys
 1               5                  10                  15

Glu Leu Gln Arg Glu Leu Pro Arg Cys Arg Asp Ala Thr Leu Thr Val
            20                  25                  30

Val Tyr Val Ile Pro Ile Val Gly Arg Ile Lys Ser Ala Ala Gly Ala
        35                  40                  45

Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu Thr Met Leu Ala
    50                  55                  60

Cys Ile Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu
65                  70                  75                  80

Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala
                85                  90                  95

Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile
            100                 105                 110

Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Gly Cys Phe Ser
        115                 120                 125

Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly
    130                 135                 140

Leu Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ile Leu Leu
145                 150
```

<210> 27
<211> 388
<212> ADN
<213> *Zea mays*

<220>
<221> CDS
<222> (3)..(386)
<223> codificación para Proteína BI1

<400> 27

```
tc tgg aac atc ggc ggg acg ctg aca atg ctc ggt tgc gtc ggc agc    47
   Trp Asn Ile Gly Gly Thr Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser
     1               5                  10                  15

atc gcc tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag agg tat   95
Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr
                20                  25                  30

ggg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggc gct tcg gtc gga ccc   143
Gly Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro
            35                  40                  45

ctc gtc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg acg gcg   191
Leu Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala
        50                  55                  60

ttc gtg ggg act gcc atc gcg ttc gcg tgc ttc tcc ggc gcg cca tgg   239
Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Pro Trp
    65                  70                  75

tgg cag gcc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggc tgc tct cgt cga ggc   287
Trp Gln Ala Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Cys Ser Arg Arg Gly
80                  85                  90                  95

tct cca tcc tgc tct ggc tgc agc tcg ccg cct cca tct tcg gca ctc   335
Ser Pro Ser Cys Ser Gly Cys Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Ala Leu
                100                 105                 110

cgc aac agc ttc atg ttc gag gtc tac ttc ggg ctg ctc att ctt ctg   383
Arg Asn Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Leu Leu
            115                 120                 125

ggc ta                                                          388
Gly
```

<210> 28

<211> 128

<212> PRT

<213> *Zea mays*

<400> 28

```
Trp Asn Ile Gly Gly Thr Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile
  1               5                  10                  15

Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr Gly
            20                  25                  30

Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu
        35                  40                  45

Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe
```

```
     50                  55                  60

Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Pro Trp Trp
 65                  70                  75                  80

Gln Ala Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Cys Ser Arg Arg Gly Ser
                85                  90                  95

Pro Ser Cys Ser Gly Cys Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Ala Leu Arg
            100                 105                 110

Asn Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Leu Leu Gly
        115                 120                 125
```

<210> 29
<211> 1737
<212> ADN
<213> *Solanum tuberosum*

<220>
<221> promotor
<222> (1)..(1737)
<223> promotor de patatina

<400> 29

```
aagcttatgt tgccatatag agtagtttgt gatggtatac ttcataaact ttaacttatg 60
ttaaatttgt aatgataaaa tttttattgt aaattaaaaa ttacttataa aattgggcat 120
tataacatat gaaagacaaa ttgtgttaca tattttactt ttgactttaa tatgaatatt 180
tcaatttaaa tcattgtttt attttctctt tctttttaca ggtataaaag gtgaaaattg 240
aagcaagatt gattgcaagc tatgtgtcac cacgttattg atactttgga agaaattttt 300
acttatatgt ctttgtttag gagtaatatt tgatatgttt tagttagatt ttcttgtcat 360
ttatgcttta gtataatttt agttattttt attatatgat catgggtgaa ttttgataca 420
aatatttttg tcattaaata aattaattta tcacaacttg attactttca gtgacaaaaa 480
atgtattgtc gtagtaccct tttttgttga atatgaataa tttttttttat tttgtgacaa 540
ttgtaattgt cactacttat gataatattt agtgacatat atgtcgtcgg taaaagcaaa 600
cactttcagt gacaaaataa tagatttaat cacaaaatta ttaacctttt ttataataat 660
aaatttatcc ctaatttata catttaagga caaagtattt tttttatata taaaaaatag 720
tctttagtga cgatcgtagt gttgagtcta gaaatcataa tgttgaatct agaaaaatct 780
catgcagtgt aaaataaacc tcaaaaagga cgttcagtcc atagaggggg tgtatgtgac 840
accccaacct cagcaaaaga aaacctcccc tcaacaagga catttgcggt gctaaacaat 900
ttcaagtctc atcacacata tatttattat ataatactaa taaagaatag aaaaggaaag 960
gtaaacatca ttaaatcgtc tttgtatatt tttagtgaca actgattgac gaaatctttt 1020
tcgtcacaca aaatttttag tgacgaaaca tgatttatag atgatgaaat tatttgtccc 1080
tcataatcta atttgttgta gtgatcatta ctcctttgtt tgttttattt gtcatgttag 1140
tccattaaaa aaaaatatct ctcttcttat gtacgtgaat ggttggaacg gatctattat 1200
ataatactaa taaagaatag aaaaaggaaa gtgagtgagg ttcgagggag agaatctgtt 1260
taatatcaga gtcgatcatg tgtcaatttt atcgatatga ccctaacttc aactgagttt 1320
aaccaattcc gataaggcga gaaatatcat agtattgagt ctagaaaaat ctcatgtagt 1380
gtggggtaaa cctcagcaag gacgttgagt ccatagaggg gggtgtatgt gacaccccaa 1440
cctcagcaaa agaaaacctc ccctcaagaa ggacatttgc ggtgctaaac aatttcaagt 1500
ctcatcacac atatatatat attatataat actaataaat aatagaaaaa ggaaaggtaa 1560
acatcactaa cgacagttgc ggtgcaaact gagtgaggta ataaacatca ctaactttta 1620
ttggttatgt caaactcaaa gtaaaatttc tcaacttgtt tacgtgccta tatataccat 1680
gcttgttata tgctcaaagc accaacaaaa tttaaaaaca ctttgaacat ttgcaaa    1737
```

<210> 30
<211> 1317
<212> ADN
<213> *Triticum aestivum*

<220>
<221> promotor
<222> (1)..(1317)
<223> germin 9f-3.8 promotor de gen

<400> 30

```
gaattcaagc tatcactctc gaaccaagca cattgatgta aggtatcatt ggattccaga 60
tgtcgtgagt tccaagttgc tgaaacttga gaagatccat accgacgaca atggttcaga 120
tatgatgacc aagatattgc gaaataagaa gctacaagca tgttgcaagg tagcgggcat 180
ggcggtgccc ccatcatgag tcggaggggg agatttgttg ggatatcctc ctcatgtggg 240

ttctgaggag atgaccattt gaggcctttt agccagccca aagaggtgca gaagcccact 300
acccattagg gttatgacct agggtcattt tggactttgc acatgagtgg atggggatgc 360
tttaccctcc atccagcagc caccaccaag ggtgacgaaa atcagttcat cctccaagag 420
agaagaagag agaaaaccaa gagagcaagg gaagaagagg aagattgaag gaagaagaaa 480
agggagctcc tccccaaggt tgtgatggtc catatccact atcttgtctc cttcaaactt 540
cggttccacc atctttggta agattgttct aatccctagt tcttgagccc caaatcttgt 600
tgtgttcatc caagattcag aaatcttgat gtatgagatc ctctagtgct gtctagagaa 660
gaatttgttg tatcccacat ttgataatag tggaagagga tttgggtggc ttcggcccat 720
ggtttttccc ctcaagttga ggggttttcc acgtaaaatc tggtgtctct ttgttgatgc 780
ttggtgttgt ccagaaactt actcctacca caagacacta ggggccagtt cttttgggaa 840
attctcccag aattgaccct ctccccagct tctcccagaa ttgtcactcc atttttcttt 900
acaattccta gctagttaag gtctaattag ttaggaattg taaaaaaata tcaagtggca 960
attctgggag aagctgggga gggggtcaat tctggaagaa ttgcccaaaa gaactggccc 1020
taggctgagg agtgtcttgc ctgctgctta acattttctg cctccatata tgttgttgca 1080
tatgtttcct tccgtgctaa gcaacgatcc ttgagttagt acatgatgtg gtgctgagat 1140
tactttgttt tcgctgcagt tatcagttaa ccacaagtgc atttgcgtgc taattcccaa 1200
caatatgcca cccgcaactc atccaccata gctcagcagc aaccaccaat gccatagaca 1260
ctctcggtaa acaacctgta gcttatcagt ctagctaagc gtgctgcata gcaagca    1317
```

<210> 31
<211> 959
<212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
<221> promotor
<222> (1)..(959)
<223> CAB-2 promotor

<400> 31

```
gaattcatgt gtgagggcaa ttagtgattg taaaaataaa attgtgtttt gtaaaaaact 60
tttactgtcg aaattattta gggtgatgaa aaaatcagta aactacgaat gatagcttaa 120
agagtttcta tcaaagtgat tgaggaatag tttgttgcaa attaaacctc taacaaaatg 180
ttttctgttg tggtttttca tctctacaaa ttttgaattt tatgatgaat tagaaagata 240
gaatgagtta ctttagattt taaaaggttg ttcaagttta caaaacagat tactagaatc 300
atgattaaaa atttacaagc tacatattgt ctaaaccaat gatgttgaac ataccagatg 360
atagtttttc agtgtttgaa caatcaattg gatagttttt atgtttctgc aaaatatgca 420
aataatcagt gtttttgagt ctttgcattt tgatttaaaa gcaaaaacaa ctgagtttca 480
aggttaaatt aattacatta ttcatgagat ttatcaggtt agtggataaa ctgacaatgg 540
aatcaatgtt attgtaaatt ggtagtgatg ttggacttct aatgttactc tctatgatgt 600
ttcggtcatc ggtatcacac tatctttact tttatttaaa ggaaagatca cacaaataag 660
ttatctctat tcagaactat taagctgctt ccaaaagact tgcaacatgt ggtctcgaaa 720
tgctttggct gcaatgaaaa aatcatagca aaagctagtg gactagagac tgccacataa 780
gaatagtaaa cgttaaaacc aaaatctcaa aaatccaatg agtaaagaga tatagattac 840
ttcatagata acaaacgtta ctcgcaattt tcctatataa tccaacccta cctaaccatt 900
ttcaatcact ctcactcaca agttagtcac caaaaaaaaa aaaaacacaa aaagtttca  959
```

<210> 32
<211> 445
<212> ADN
<213> *Zea mays*
<220>
<221> promotor
<222> (1)..(445)
<223> PPCZm1 promotor

<400> 32

```
gaattccaaa aatagacacg gcaattttct tattcacaga aaaaatataa ctacaactaa 60
tccccaagtc cacagggatt agggatcaat ctgcaaaact aaaagtactt ttacagttgt 120
acttggcatg agtcatgtga ccatgagaga ggcgcacggt tcagcaaagc aacataaaat 180
tctccaaacg ggccccgcca cacacgatca ccatcacccc cgggctcccg acccagtaca 240
aatagacacg cacactccca actccccacc catctccgcc gcgcacaccg cccaatcagc 300
caatctcctc ctcctcctcc gctctcagac gagcagcggt tgccatcact ctccacttcc 360
cacgcccgct gcgggctcgc aggcggcaga gaattgtctg tgccgccggg tgggaatttg 420
attcggtcgg attccgtgcg ccgcg                                      445
```

<210> 33
<211> 5455
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: vector de expresión recombinante pUbiB1-1

<400> 33

```
ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcgg ccgcactagt gattaggatt ccaacgcgag 60
ccaggacaag cgaggaacct tgcgtgcgag gcgaggccgc cccgctccga ttcgattcga 120
cgcgcaggcg caggcgcagg gatggacgcc ttctactcga cctcgtcggc ggcggcgagc 180
ggctggggcc acgactccct caagaacttc cgccagatct cccccgccgt gcagtcccac 240
ctcaagctcg tttacctgac tctatgcttt gcactggcct catctgccgt gggtgcttac 300
ctacacattg ccctgaacat cggcgggatg ctgacaatgc tcgcttgtgt cggaactatc 360
gcctggatgt tctcggtgcc agtctatgag gagaggaaga ggtttgggct gctgatgggt 420
gcagccctcc tggaaggggc ttcggttgga cctctgattg agcttgccat agactttgac 480
ccaagcatcc tcgtgacagg gtttgtcgga accgccatcg cctttgggtg cttctctggc 540
gccgccatca tcgccaagcg cagggagtac ctgtacctcg gtggcctgct ctcgtctggc 600
ctgtcgatcc tgctctggct gcagtttgtc acgtccatct ttggccactc ctctggcagc 660
ttcatgtttg aggtttactt tggcctgttg atcttcctgg ggtacatggt gtacgacacg 720
caggagatca tcgagagggc gcaccatggc gacatggact acatcaagca cgccctcacc 780
ctcttcaccg actttgttgc cgtcctcgtc cgagtcctca tcatcatgct caagaacgca 840
ggcgacaagt cggaggacaa gaagaagagg aagagggggt cctgaacgtw tctcccgcac 900
atgtagatac cgtcaccgcg tcgacctgca ggcatgcccg ctgaaatcac cagtctctct 960
ctacaaatct atctctctca taataatgtg tgagtagttc ccagataagg gaattagggt 1020
tcttataggg tttcgctcat gtgttgagca tataagaaac ccttagtatg tatttgtatt 1080
tgtaaaatac ttctatcaat aaaatttcta attcctaaaa ccaaaatcca gtgggtaccg 1140
agctcgaatt caagcttggc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct 1200
ggcgttaccc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc 1260
gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc 1320
ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat atggtgcact 1380
ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc 1440
gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc 1500
gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga 1560
aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag 1620
acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa 1680
atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat 1740
tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg 1800
gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa 1860
gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt 1920
gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt 1980
ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat 2040
tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg 2100
acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta 2160
cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat 2220
catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag 2280
cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa 2340
ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca 2400
ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc 2460
ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt 2520
atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc 2580
gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat 2640
atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt 2700
tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac 2760
cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc 2820
ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca 2880
actcttttte cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta 2940
gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct 3000
ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg 3060
gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc 3120
acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagctt 3180
tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg 3240
gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt 3300
cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggga 3360
cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac ggttcctggc cttttgctgg 3420
ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc 3480
gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg 3540
agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt 3600
cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca 3660
attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt tacactttat gcttccggct 3720
cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag ctatgaccat 3780
gattacgaat tcccatgcct cgaggatcta acatgcttag atacatgaag taacatgctg 3840
ctacggttta ataattcttg agttgatttt tactggtact tagatagatg tatatacatg 3900
cttagataca tgaagtaaca tgctcctaca gttcctttaa tcattattga gtacctatat 3960
```

```
attctaataa atcagtatgt tttaaattat tttgatttta ctggtactta gatagatgta 4020
tatatacatg ctcaaacatg cttagataca tgaagtaaca tgctgctacg gtttagtcat 4080
tattgagtgc ctataatttc taataaatca gtatgtttta aattattttg attttactgg 4140
tacttagata gatgtatata tacatgctca aacatgctta gatacatgaa gtaatatgct 4200
actacggttt aattgttctt gagtacctat atattctaat aaatcagtat gttttaaatt 4260
atttcgattt tactggtact tagatagatg tatatataca tgcttagata catgaagtaa 4320
catgctacta cggtttaatt gttcttgaat acctatatat tctaataaat cagtatgttt 4380
taaattattt cgattttact ggtacttaga tagatgtata tatacatgct cgaacatgct 4440
tagatacatg aagtaacatg ctacatatat attataataa atcagtatgt cttaaattat 4500
tttgatttta ctggtactta gatagatgta tatacatgct caaacatgct tagatacatg 4560
aagtaacatg ctactacggt ttaatcatta ttgagtacct atatattcta ataaatcagt 4620
atgttttcaa ttgttttgat tttactggta cttagatata tgtatatata catgctcgaa 4680
catgcttaga tacgtgaagt aacatgctac tatggttaat tgttcttgag tacctatata 4740
ttctaataaa tcagtatgtt ttaaattatt tcgattttac tggtacttag atagatgtat 4800
atatacatgc tcgaacatgc ttagatacat gaagtaacat gctactacgg tttaatcgtt 4860
cttgagtacc tatatattct aataaatcag tatgtcttaa attatcttga ttttactggt 4920
acttagatag atgtatatac atgcttagat acatgaagta acatgctact atgatttaat 4980
cgttcttgag tacctatata ttctaataaa tcagtatgtt tttaattatt ttgattttac 5040
tggtacttag atagatgtat atatacatgc tcgaacatgc ttagatacat gaagtaacat 5100
gctactacgg tttaatcatt cttgagtacc tatatattct aataaatcag tatgttttta 5160
attattttga tattactggt acttaacatg tttagataca tcatatagca tgcacatgct 5220
gctactgttt aatcattcgt gaatacctat atattctaat atatcagtat gtcttctaat 5280
tattatgatt ttgatgtact tgtatggtgg catatgctgc agctatgtgt agattttgaa 5340
tacccagtgt gatgagcatg catggcgcct tcatagttca tatgctgttt atttcctttg 5400
agactgttct tttttgttga tagtcaccct gttgtttggt gattcttatg cacccc      5455
```

<210> 34

<211> 12633

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: vector de expresión recombinante pLol14UbiBI-1

<400> 34

```
aattcactgg ccgtcgtttt acaacgactc agagcttgac aggaggcccg atctagtaac 60
atagatgaca ccgcgcgcga taatttatcc tagtttgcgc gctatatttt gttttctatc 120
gcgtattaaa tgtataattg cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc 180
atgcattaca tgttaattat tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataatc 240
atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga 300
tcggggatca tccgggtctg tggcgggaac tccacgaaaa tatccgaacg cagcaagatc 360
tagagcttgg gtcccgctca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgctgc 420
gaatcgggag cggcgatacc gtaaagcacg aggaagcggt cagcccattc gccgccaagc 480
tcttcagcaa tatcacgggt agccaacgct atgtcctgat agcggtccgc cacacccagc 540
cggccacagt cgatgaatcc agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt cggcaagcag 600
gcatcgccat gggtcacgac gagatcctcg ccgtcgggca tgcgcgcctt gagcctggcg 660
aacagttcgg ctggcgcgag cccctgatgc tcttcgtcca gatcatcctg atcgacaaga 720
ccggcttcca tccgagtacg tgctcgctcg atgcgatgtt tcgcttggtg gtcgaatggg 780
caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc cgcattgcat cagccatgat ggatactttc 840
tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tcctgccccg gcacttcgcc caatagcagc 900
cagtcccttc ccgcttcagt gacaacgtcg agcacagctg cgcaaggaac gcccgtcgtg 960
gccagccacg atagccgcgc tgcctcgtcc tgcagttcat tcagggcacc ggacaggtcg 1020
gtcttgacaa aaagaaccgg gcgcccctgc gctgacagcc ggaacacggc ggcatcagag 1080
cagccgattg tctgttgtgc ccagtcatag ccgaatagcc tctccaccca agcggccgga 1140
gaacctgcgt gcaatccatc ttgttcaatc atgcgaaacg atccagatcc ggtgcagatt 1200
atttggattg agagtgaata tgagactcta attggatacc gaggggaatt tatggaacgt 1260
cagtggagca tttttgacaa gaaatatttg ctagctgata gtgaccttag gcgacttttg 1320
aacgcgcaat aatggtttct gacgtatgtg cttagctcat taaactccag aaacccgcgg 1380
ctgagtggct ccttcaacgt tgcggttctg tcagttccaa acgtaaaacg gcttgtcccg 1440
cgtcatcggc gggggtcata acgtgactcc cttaattctc cgctcatgat cagattgtcg 1500
tttcccgcct tcagtttaaa ctatcagtgt ttgacaggat cctgcttggt aataattgtc 1560
attagattgt ttttatgcat agatgcactc gaaatcagcc aatttttagac aagtatcaaa 1620
cggatgttaa ttcagtacat taaagacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc 1680
aatttgttta caccacaata tatcctgcca ccagccagcc aacagctccc cgaccggcag 1740
ctcggcacaa aatcaccacg cgttaccacc acgccggccg gccgcatggt gttgaccgtg 1800
ttcgccggca ttgccgagtt cgagcgttcc ctaatcatcg accgcacccg gagcgggcgc 1860
gaggccgcca aggccccgag cgtgaagttt ggcccccgcc ctaccctcac cccggcacag 1920
atcgcgcacg cccgcgagct gatcgaccag gaaggccgca ccgtgaaaga ggcggctgca 1980
ctgcttggcg tgcatcgctc gaccctgtac cgcgcacttg agcgcagcga ggaagtgacg 2040
cccaccgagg ccaggcggcg cggtgccttc cgtgaggacg cattgaccga ggccgacgcc 2100
ctggcggccg ccgagaatga acgccaagag gaacaagcat gaaaccgcac caggacggcc 2160
```

aggacgaacc gtttttcatt accgaagaga tcgaggcgga gatgatcgcg gccgggtacg 2220
tgttcgagcc gcccgcgcac gtctcaaccg tgcggctgca tgaaatcctg gccggtttgt 2280
ctgatgccaa gctggcggcc tggccggcca gcttggccgc tgaagaaacc gagcgccgcc 2340
gtctaaaaag gtgatgtgta tttgagtaaa acagcttgcg tcatgcggtc gctgcgtata 2400
tgatgcgatg agtaaataaa caaatacgca aggggaacgc atgaaggtta tcgctgtact 2460
taaccagaaa ggcgggtcag gcaagacgac catcgcaacc catctagccc gcgccctgca 2520
actcgccggg gccgatgttc tgttagtcga ttccgatccc cagggcagtg cccgcgattg 2580
ggcggccgtg cgggaagatc aaccgctaac cgttgtcggc atcgaccgcc cgacgattga 2640
ccgcgacgtg aaggccatcg gccggcgcga cttcgtagtg atcgacggag cgccccaggc 2700
ggcggacttg gctgtgtccg cgatcaaggc agccgacttc gtgctgattc cggtgcagcc 2760
aagcccttac gacatatggg ccaccgccga cctggtggag ctggttaagc agcgcattga 2820
ggtcacggat ggaaggctac aagcggcctt tgtcgtgtcg cgggcgatca aaggcacgcg 2880
catcggcggt gaggttgccg aggcgctggc cgggtacgag ctgcccattc ttgagtcccg 2940
tatcacgcag cgcgtgagct acccaggcac tgccgccgcc ggcacaaccg ttcttgaatc 3000
agaacccgag ggcgacgctg cccgcgaggt ccaggcgctg gccgctgaaa ttaaatcaaa 3060
actcatttga gttaatgagg taaagagaaa atgagcaaaa gcacaaacac gctaagtgcc 3120
ggccgtccga gcgcacgcag cagcaaggct gcaacgttgg ccagcctggc agacacgcca 3180
gccatgaagc gggtcaactt tcagttgccg gcggaggatc acaccaagct gaagatgtac 3240
gcggtacgcc aaggcaagac cattaccgag ctgctatctg aatacatcgc gcagctacca 3300
gagtaaatga gcaaatgaat aaatgagtag atgaatttta gcggctaaag gaggcggcat 3360
ggaaaatcaa gaacaaccag gcaccgacgc cgtggaatgc cccatgtgtg gaggaacggg 3420
cggttggcca ggcgtaagcg gctgggttgt ctgccggccc tgcaatggca ctggaacccc 3480
caagccccgag gaatcggcgt gagcggtcgc aaaccatccg gcccggtaca aatcggcgcg 3540
gcgctgggtg atgacctggt ggagaagttg aaggccgcgc aggccgccca gcggcaacgc 3600
atcgaggcag aagcacgccc cggtgaatcg tggcaagcgg ccgctgatcg aatccgcaaa 3660
gaatcccggc aaccgccggc agccggtgcg ccgtcgatta ggaagccgcc caagggcgac 3720
gagcaaccag atttttttcgt tccgatgctc tatgacgtgg gcacccgcga tagtcgcagc 3780
atcatggacg tggccgtttt ccgtctgtcg aagcgtgacc gacgagctgg cgaggtgatc 3840
cgctacgagc ttccagacgg gcacgtagag gtttccgcag ggccggccgg catggccagt 3900
gtgtgggatt acgacctggt actgatggcg gtttcccatc taaccgaatc catgaaccga 3960
taccgggaag ggaagggaga caagcccggc cgcgtgttcc gtccacacgt tgcggacgta 4020
ctcaagttct gccggcgagc cgatggcgga aagcagaaag acgacctggt agaaacctgc 4080
attcggttaa acaccacgca cgttgccatg cagcgtacga agaaggccaa gaacggcgcc 4140
ctggtgacgg tatccgaggg tgaagccttg attagccgct acaagatcgt aaagagcgaa 4200
accgggcggc cggagtacat cgagatcgag ctagctgatt ggatgtaccg cgagatcaca 4260
gaaggcaaga acccggacgt gctgacggtt caccccgatt acttttgat cgatccggc 4320
atcggccgtt ttctctaccg cctggcacgc cgcgccgcag gcaaggcaga agccagatgg 4380
ttgttcaaga cgatctacga acgcagtggc agcgccggag agttcaagaa gttctgtttc 4440
accgtgcgca agctgatcgg gtcaaatgac ctgccggagt acgatttgaa ggaggaggcg 4500
gggcaggctg gcccgatcct agtcatgcgc taccgcaacc tgatcgaggg cgaagcatcc 4560
gccggttcct aatgtacgga gcagatgcta gggcaaattg ccctagcagg ggaaaaaggt 4620
cgaaaaggtc tctttcctgt ggatagcacg tacattggga acccaaagcc gtacattggg 4680
aaccggaacc cgtacattgg gaacccaaag ccgtacattg ggaaccggtc acacatgtaa 4740
gtgactgata taaaagagaa aaaaggcgat ttttccgcct aaaactcttt aaaacttatt 4800
aaaactctta aaaccccgcct ggcctgtgca taactgtctg gccagcgcac agccgaagag 4860
ctgcaaaaag cgcctaccct tcggtcgctg cgctcctac gcccccgccgc ttcgcgtcgg 4920
cctatcgcgg ccgctggccg ctcaaaaatg gctggcctac ggccaggcaa tctaccaggg 4980
cgcggacaag ccgcgccgtc gccactcgac cgccggcgcc cacatcaagg caccctgcct 5040
cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac 5100
agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt 5160
tggcgggtgt cggggcgcag ccatgaccca gtcacgtagc gatagcggag tgtatactgg 5220
cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata 5280
ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct cttccgcttc ctcgctcact 5340
gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta 5400
atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag 5460
caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc 5520
cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta 5580
taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg 5640
ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc 5700
tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac 5760
gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac 5820
ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg 5880
aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga 5940
aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt 6000
agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag 6060
cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct 6120
gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgcatga tatatctccc 6180
aatttgtgta gggcttatta tgcacgctta aaaataataa agcagacttt gacctgatag 6240
tttggctgtg agcaattatg tgcttagtgc atctaacgct tgagttaagc cgcgccgcga 6300
agcggcgtcg gcttgaacga atttctagct agacattatt tgccgactac cttggtgatc 6360
tcgcctttca cgtagtggac aaattcttcc aactgatctg cgcgcgaggc caagcgatct 6420
tcttcttgtc caagataagc ctgtctagct tcaagtatga cgggctgata ctgggccggc 6480
aggcgctcca ttgcccagtc ggcagcgaca tccttcggcg cgattttgcc ggttactgcg 6540

```
ctgtaccaaa tgcgggacaa cgtaagcact acatttcgct catcgccagc ccagtcgggc 6600
ggcgagttcc atagcgttaa ggtttcattt agcgcctcaa atagatcctg ttcaggaacc 6660
ggatcaaaga gttcctccgc cgctggacct accaaggcaa cgctatgttc tcttgctttt 6720
gtcagcaaga tagccagatc aatgtcgatc gtggctggct cgaagatacc tgcaagaatg 6780
tcattgcgct gccattctcc aaattgcagt tcgcgcttag ctggataacg ccacggaatg 6840
atgtcgtcgt gcacaacaat ggtgacttct acagcgcgga gaatctcgct ctctccaggg 6900
gaagccgaag tttccaaaag gtcgttgatc aaagctcgcc gcgttgtttc atcaagcctt 6960
acggtcaccg taaccagcaa atcaatatca ctgtgtggct tcaggccgcc atccactgcg 7020
gagccgtaca aatgtacggc cagcaacgtc ggttcgagat ggcgctcgat gacgccaact 7080
acctctgata gttgagtcga tacttcggcg atcaccgctt ccccatgat gtttaacttt 7140
gttttagggc gactgccctg ctgcgtaaca tcgttgctgc tccataacat caaacatcga 7200
cccacggcgt aacgcgcttg ctgcttggat gcccgaggca tagactgtac cccaaaaaaa 7260
cagtcataac aagccatgaa aaccgccact gcgggggttc catggacata caaatggacg 7320
aacggataaa ccttttcacg ccctttaaa tatccgatta ttctaataaa cgctcttttc 7380
tcttaggttt acccgccaat atatcctgtc aaacactgat agtttaaact gaaggcggga 7440
aacgacaatc agatctagta ggaaacagct atgaccatga ttacgccaag cttgcatgcc 7500
tgcaggtcga ctctagagga tcgatccccg ggtaggtcag tcccttatgt tacgtcctgt 7560
agaaacccca acccgtgaaa tcaaaaaact cgacggcctg tgggcattca gtctggatcg 7620
cgaaaactgt ggaattggtc agcgttggtg ggaaagcgcg ttacaagaaa gccgggcaat 7680
tgctgtgcca ggcagtttta acgatcagtt cgccgatgca gatattcgta attatgcggg 7740
caacgtctgg tatcagcgcg aagtctttat accgaaaggt tgggcaggcc agcgtatcgt 7800
gctgcgtttc gatgcggtca ctcattacgg caaagtgtgg gtcaataatc aggaagtgat 7860
ggagcatcag ggcggctata cgccatttga agccgatgtc acgccgtatg ttattgccgg 7920
gaaaagtgta cgtaagtttc tgcttctacc tttgatatat atataataat tatcattaat 7980
tagtagtaat ataatatttc aaatatttct ttcaaaataa aagaatgtag tatatagcaa 8040
ttgcttttct gtagtttata agtgtgtata ttttaattta taacttttct aatatatgac 8100
caaaatttgt tgatgtgcag gtatcaccgt ttgtgtgaac aacgaactga actggcagac 8160
tatcccgccg ggaatggtga ttaccgacga aaacggcaag aaaaagcagt cttacttcca 8220
tgatttcttt aactatgccg gaatccatcg cagcgtaatg ctctacacca cgccgaacac 8280
ctgggtggac gatatcaccg tggtgacgca tgtcgcgcaa gactgtaacc acgcgtctgt 8340
tgactggcag gtggtggcca atggtgatgt cagcgttgaa ctgcgtgatg cggatcaaca 8400
ggtggttgca actggacaag gcactagcgg gactttgcaa gtggtgaatc cgcacctctg 8460
gcaaccgggt gaaggttatc tctatgaact gtgcgtcaca gccaaaagcc agacagagtg 8520
tgatatctac ccgcttcgcg tcggcatccg gtcagtggca gtgaagggcg aacagttcct 8580
gattaaccac aaaccgttct actttactgg ctttggtcgt catgaagatg cggacttgcg 8640
tggcaaagga ttcgataacg tgctgatggt gcacgaccac gcattaatgg actggattgg 8700
ggccaactcc taccgtacct cgcattaccc ttacgctgaa gagatgctcg actgggcaga 8760
tgaacatggc atcgtggtga ttgatgaaac tgctgctgtc ggctttaacc tctcttagg 8820
cattggtttc gaagcgggca acaagccgaa agaactgtac agcgaagagg cagtcaacgg 8880
ggaaactcag caagcgcact tacaggcgat taaagagctg atagcgcgtg acaaaaacca 8940
cccaagcgtg gtgatgtgga gtattgccaa cgaaccggat acccgtccgc aaggtgcacg 9000
ggaatatttc gcgccactgg cggaagcaac gcgtaaactc gacccgacgc gtccgatcac 9060
ctgcgtcaat gtaatgttct gcgacgctca caccgatacc atcagcgatc tctttgatgt 9120
gctgtgcctg aaccgttatt acggatggta tgtccaaagc ggcgatttgg aaacggcaga 9180
gaaggtactg gaaaaagaac ttctggcctg gcaggagaaa ctgcatcagc cgattatcat 9240
caccgaatac ggcgtggata cgttagccgg gctgcactca atgtacaccg acatgtggag 9300
tgaagagtat cagtgtgcat ggctggatat gtatcaccgc gtctttgatc gcgtcagcgc 9360
cgtcgtcggt gaacaggtat ggaatttcgc cgattttgcg acctcgcaag gcatattgcg 9420
cgttggcggt aacaagaaag ggatcttcac tcgcgaccgc aaaccgaagt cggcggcttt 9480
tctgctgcaa aaacgctgga ctggcatgaa cttcggtgaa aaaccgcagc agggaggcaa 9540
acaatgagag ctcgaatttc cccgatcggt caaacatttg gcaataaagn ttcttaagat 9600
tgaatcctgt tgccggtctt gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc 9660
atgtaataat taacatgtaa tgcatgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag 9720
tcccgcaatt atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atancgcgca aactaggata 9780
aattatcgcg cgcggtgtca tctatgttac tagatcggga attcccatgc ctcgaggatc 9840
taacatgctt agatacatga agtaacatgc tgctacggtt taataattct tgagttgatt 9900
tttactggta cttagataga tgtatataca tgcttagata catgaagtaa catgctccta 9960
cagttccttt aatcattatt gagtacctat atattctaat aaatcagtat gttttaaatt 10020
attttgattt tactggtact tagatagatg tatatataca tgctcaaaca tgcttagata 10080
catgaagtaa catgctgcta cggtttagtc attattgagt gcctataatt tctaataaat 10140
cagtatgttt taaattattt tgattttact ggtacttaga tagatgtata tatacatgct 10200
caaacatgct tagatacatg aagtaatatg ctactacggt ttaattgttc ttgagtacct 10260
atatattcta ataaatcagt atgttttaaa ttatttcgat tttactggta cttagataga 10320
tgtatatata catgcttaga tacatgaagt aacatgctac tacggtttaa ttgttcttga 10380
atacctatat attctaataa atcagtatgt tttaaattat ttcgatttta ctggtactta 10440
gatagatgta tatatacatg ctcgaacatg cttagataca tgaagtaaca tgctacatat 10500
atattataat aaatcagtat gtcttaaatt attttgattt tactggtact tagatagatg 10560
tatatacatg ctcaaacatg cttagataca tgaagtaaca tgctactacg gtttaatcat 10620
tattgagtac ctatatattc taataaatca gtatgttttc aattgttttg attttactgg 10680
tacttagata tatgtatata tacatgctcg aacatgctta gatacgtgaa gtaacatgct 10740
actatggtta attgttcttg agtacctata tattctaata aatcagtatg ttttaaatta 10800
tttcgatttt actggtactt agatagatgt atatatacat gcttcgaacat gcttagatac 10860
atgaagtaac atgctactac ggtttaatcg ttcttgagta cctatatatt ctaataaatc 10920
```

```
agtatgtctt aaattatctt gattttactg gtacttagat agatgtatat acatgcttag 10980
atacatgaag taacatgcta ctatgattta atcgttcttg agtacctata tattctaata 11040
aatcagtatg tttttaatta ttttgatttt actggtactt agatagatgt atatatacat 11100
gctcgaacat gcttagatac atgaagtaac atgctactac ggtttaatca ttcttgagta 11160
cctatatatt ctaataaatc agtatgtttt taattatttt gatattactg gtacttaaca 11220
tgtttagata catcatatag catgcacatg ctgctactgt ttaatcattc gtgaatacct 11280
atatattcta atatatcagt atgtcttcta attattatga ttttgatgta cttgtatggt 11340
ggcatatgct gcagctatgt gtagattttg aatacccagt gtgatgagca tgcatggcgc 11400
cttcatagtt catatgctgt ttatttcctt tgagactgtt ctttttgtt gatagtcacc 11460
ctgttgtttg gtgattctta tgcacccggg gatcctctag agtcgacctg caggcggccg 11520
cactagtgat taggattcca acgcgagcca ggacaagcga ggaaccttgc gtgcgaggcg 11580
aggccgcccc gctccgattc gattcgacgc gcaggcgcag gcgcagggat ggacgccttc 11640
tactcgacct cgtcggcggc ggcgagcggc tggggccacg actcccctcaa gaacttccgc 11700
cagatctccc ccgccgtgca gtcccacctc aagctcgttt acctgactct atgctttgca 11760
ctggcctcat ctgccgtggg tgcttaccta cacattgccc tgaacatcgg cgggatgctg 11820
acaatgctcg cttgtgtcgg aactatcgcc tggatgttct cggtgccagt ctatgaggag 11880
aggaagaggt ttgggctgct gatgggtgca gccctcctgg aaggggcttc ggttggacct 11940
ctgattgagc ttgccataga ctttgaccca agcatcctcg tgacagggtt tgtcggaacc 12000
gccatcgcct ttgggtgctt ctctggcgcc gccatcatcg ccaagcgcag ggagtacctg 12060
tacctcggtg gcctgctctc gtctggcctg tcgatcctgc tctggctgca gtttgtcacg 12120
tccatctttg gccactcctc tggcagcttc atgtttgagg tttactttgg cctgttgatc 12180
ttcctggggt acatggtgta cgacacgcag gagatcatcg agagggcgca ccatggcgac 12240
atggactaca tcaagcacgc cctcaccctc ttcaccgact ttgttgccgt cctcgtccga 12300
gtcctcatca tcatgctcaa gaacgcaggc gacaagtcgg aggacaagaa gaagaggaag 12360
agggggtcct gaacgtwtct cccgcacatg tagataccgt caccgcgtcg acctgcaggc 12420
atgcccgctg aaatcaccag tctctctcta caaatctatc tctctcataa taatgtgtga 12480
gtagttccca gataagggaa ttagggttct tatagggttt cgctcatgtg ttgagcatat 12540
aagaaaccct tagtatgtat ttgtatttgt aaaatacttc tatcaataaa atttctaatt 12600
cctaaaacca aaatccagtg ggtaccgagc tcg                              12633
```

<210> 35

<211> 5598

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: vector de expresión recombinante pOXoBI-1

<400> 35

```
ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcgg ccgcactagt gattaggatt ccaacgcgag 60
ccaggacaag cgaggaacct tgcgtgcgag gcgaggccgc cccgctccga ttcgattcga 120
cgcgcaggcg caggcgcagg gatggacgcc ttctacgtcggc ggcggcgagc 180
ggctggggcc acgactccct caagaacttc cgccagatct cccccgccgt gcagtcccac 240
ctcaagctcg tttacctgac tctatgcttt gcactggcct catctgccgt gggtgcttac 300
ctacacattg ccctgaacat cggcgggatg ctgacaatgc tcgcttgtgt cggaactatc 360
gcctggatgt tctcggtgcc agtctatgag gagaggaaga ggtttgggct gctgatgggt 420
gcagccctcc tggaaggggc ttcggttgga cctctgattg agcttgccat agactttgac 480
ccaagcatcc tcgtgacagg gtttgtcgga accgccatcg cctttgggtg cttctctggc 540
gccgccatca tcgccaagcg cagggagtac ctgtacctcg gtggcctgct ctcgtctggc 600
ctgtcgatcc tgctctggct gcagtttgtc acgtccatct ttggccactc ctctggcagc 660
ttcatgtttg aggtttactt tggcctgttg atcttcctgg ggtacatggt gtacgacacg 720
caggagatca tcgagagggc gcaccatggc gacatggact acatcaagca cgccctcacc 780
ctcttcaccg actttgttgc cgtcctcgtc cgagtcctca tcatcatgct caagaacgca 840
ggcgacaagt cggaggacaa gaagaagagg aagaggggct cctgaacgtw tctcccgcac 900
atgtagatac cgtcaccgcg tcgacctgca ggcatgcccg ctgaaatcac cagtctctct 960
ctacaaatct atctctctca taataatgtg tgagtagttc ccagataagg gaattagggt 1020
tcttataggg tttcgctcat gtgttgagca tataagaaac ccttagtatg tatttgtatt 1080
tgtaaaatac ttctatcaat aaaatttcta attcctaaaa ccaaaatcca gtgggtaccg 1140
agctcgaatt caagcttggc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct 1200
ggcgttaccc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc 1260
gaagaggccc gcaccgatcg ccccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc 1320
ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat atggtgcact 1380
ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc 1440
gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc 1500
gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga 1560
aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag 1620
acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa 1680
atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat 1740
tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg 1800
gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa 1860
gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt 1920
```

```
gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt 1980
ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat 2040
tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg 2100
acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta 2160
cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat 2220
catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag 2280
cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa 2340
ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca 2400
ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc 2460
ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt 2520
atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc 2580
gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat 2640
atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt 2700
tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac 2760
cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc 2820
ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca 2880
actcttttte cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta 2940
gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct 3000
ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg 3060
gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc 3120
acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagctt 3180
tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg 3240
gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt 3300
cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggg 3360
cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac ggttcctggc cttttgctgg 3420
ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc 3480
gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg 3540
agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt 3600
cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca 3660
attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt tacactttat gcttccggct 3720
cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag ctatgaccat 3780
gattacgaat tcccatgcct cgagcagaaa gatataatat gtaaaaaaat gggtctatat 3840
atatggaagg tttcaggaag acaaaggttc tagaaacttc caaaaaaaat ccagaatata 3900
ttttggaaga aataccctct tgggttggcc ccggcgcagc ccctagtggg ccaaaaagcc 3960
acgatctaat cccggtctaa ttggtctaat agtttagact tctaattaga cgggctctta 4020
tgccggtcta attggtctaa ttagattaaa atcctaatta aatatgaacg caactaggct 4080
tccctctct ctagttttct cggagctctt tttcatggac cttgaagtat tgccggatca 4140
ctacttcgga actcgtggat acttcagagt gcacatctac tttgaatctt gattggtaga 4200
tcatctcgga gaaattctca cagttgggag gtataaccag ttgccgaaat tgccatgctt 4260
cactcacagc caggatcagc ccatgtccca aggcaaccct tgtagctaca tgccgaggcc 4320
tgactacttg gggcctcgcg ccctgcattt ttgcatgttc atgtgacacg ttaaatgttg 4380
agagaaatag attactaaat atcacccatt tcgttattct agatgagtat cctacaatat 4440
gtataccgaa aaatgtattt taaactgtgg taggtgagaa agatctatta aaaagaactc 4500
tacgtatact ccccctctcc aatccccatc caggtttgta agacactttc gtctttttt 4560
gccgaatttt aaccgtaaat ttgactagta aaaataagtt atactgaatg taataaatat 4620
cgtacattcg gatgttggag acagggagag gctggctggt gcgctggatg gatcacggtc 4680
agaaagtctg acttgcaacg ccacaggccc gttgattgcc actgacaacc aagttttcgt 4740
tgttcgctg gtgccatatt ttccgcgatc gaatatttaa actgcgagga gaaaggcaag 4800
cagggcgcca tatcagcact tgatcactca ctgatcgatc agtagtagcc accttctctg 4860
cgccgacgtg ttatatatta ttggcaacaa gtcatcgatt gagaacagaa acaaaacaag 4920
aagagaacta tttgagagag agtagttacg ccgcagcgag tagcctccca tttctgacga 4980
tcatgccata cgataaaccg gccggcggcg agaccagtta gcaaggttga aatgccaaca 5040
catgtcgcgc tcatttctcg gcttttttcat tttgcatgtc gtcatgcagg ccctggacac 5100
tgacatttct ctcttttgct gttgaatgaa gaccctaacc tttcaccatc agcacgcccc 5160
tcaacttgat aagcctagac gaaacccata tgcatgattg atgagtaatg gtgtgcacga 5220
atattatgaa cccgtttcca agagcaatac tccattgaga tacacctcct ccttgtatct 5280
gttcgttggt cccatttcca tagcagccgg cagtggcctt gactctgact gccacgcaag 5340
taatatatct ttaataaact cgctgccttg cttcgtgtgt ccatttgcaa atgcatgcag 5400
tgacgacatg cacatgcata gcttaattag ctccatgcat ccactgcttc cattaatccc 5460
ctatataaag gactccatat gcctcaccat tcactcatcc accacagctt agcagcagca 5520
acaaccagtg ccatagacac tctccatcaa caaactctag ctgatcaatc ctagctaagc 5580
ttattacata gcaagccc                                              5598
```

<210> 36

<211> 12776

<212> ADN

<213> Secuencia artificical

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: vector de expresión recombinante pLo114oXoB1-1

<400> 36

aattcactgg ccgtcgtttt acaacgactc agagcttgac aggaggcccg atctagtaac 60
atagatgaca ccgcgcgcga taatttatcc tagtttgcgc gctatatttt gttttctatc 120
gcgtattaaa tgtataattg cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc 180
atgcattaca tgttaattat tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataatc 240
atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga 300
tcggggatca tccgggtctg tggcgggaac tccacgaaaa tatccgaacg cagcaagatc 360
tagagcttgg gtcccgctca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgctgc 420
gaatcgggag cggcgatacc gtaaagcacg aggaagcggt cagcccattc gccgccaagc 480
tcttcagcaa tatcacgggt agccaacgct atgtcctgat agcggtccgc cacacccagc 540
cggccacagt cgatgaatcc agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt cggcaagcag 600
gcatcgccat gggtcacgac gagatcctcg ccgtcgggca tgcgcgcctt gagcctggcg 660
aacagttcgg ctggcgcgag cccctgatgc tcttcgtcca gatcatcctg atcgacaaga 720
ccggcttcca tccgagtacg tgctcgctcg atgcgatgtt tcgcttggtg gtcgaatggg 780
caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc cgcattgcat cagccatgat ggatactttc 840
tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tcctgccccg gcacttcgcc caatagcagc 900
cagtcccttc ccgcttcagt gacaacgtcg agcacagctg cgcaaggaac gcccgtcgtg 960
gccagccacg atagccgcgc tgcctcgtcc tgcagttcat tcagggcacc ggacaggtcg 1020
gtcttgacaa aaagaaccgg gcgcccctgc gctgacagcc ggaacacggc ggcatcagag 1080
cagccgattg tctgttgtgc ccagtcatag ccgaatagcc tctccaccca agcggccgga 1140
gaacctgcgt gcaatccatc ttgttcaatc atgcgaaacg atccagatcc ggtgcagatt 1200
atttggattg agagtgaata tgagactcta attggatacc gaggggaatt tatggaacgt 1260
cagtggagca tttttgacaa gaaatatttg ctagctgata gtgaccttag gcgacttttg 1320
aacgcgcaat aatggtttct gacgtatgtg cttagctcat taaactccag aaacccgcgg 1380
ctgagtggct ccttcaacgt tgcggttctg tcagttccaa acgtaaaacg gcttgtcccg 1440
cgtcatcggc gggggtcata acgtgactcc cttaattctc cgctcatgat cagattgtcg 1500
tttcccgcct tcagtttaaa ctatcagtgt ttgacaggat cctgcttggt aataattgtc 1560
attagattgt ttttatgcat agatgcactc gaaatcagcc aattttagac aagtatcaaa 1620
cggatgttaa ttcagtacat taaagacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc 1680
aatttgttta caccacaata tatcctgcca ccagccagcc aacagctccc cgaccggcag 1740
ctcggcacaa aatcaccacg cgttaccacc acgccggccg gccgcatggt gttgaccgtg 1800
ttcgccggca ttgccgagtt cgagcgttcc ctaatcatcg accgcacccg gagcgggcgc 1860
gaggccgcca aggccgagg cgtgaagttt ggccccccgc ctaccctcac cccggcacag 1920
atcgcgcacg cccgcgagct gatcgaccag gaaggccgca ccgtgaaaga ggcggctgca 1980
ctgcttggcg tgcatcgctc gaccctgtac cgcgcacttg agcgcagcga ggaagtgacg 2040
cccaccgagg ccaggcggcg cggtgccttc cgtgaggacg cattgaccga ggccgacgcc 2100
ctggcggccg ccgagaatga acgccaagag gaacaagcat gaaaccgcac caggacggcc 2160
aggacgaacc gtttttcatt accgaagaga tcgaggcgga gatgatcgcg gccgggtacg 2220
tgttcgagcc gcccgcgcac gtctcaaccg tgcggctgca tgaaatcctg gccggtttgt 2280
ctgatgccaa gctggcggcc tggccggcca gcttggccgc tgaagaaacc gagcgccgcc 2340
gtctaaaaag gtgatgtgta tttgagtaaa acagcttgcg tcatgcggtc gctgcgtata 2400
tgatgcgatg agtaaataaa caaatacgca aggggaacgc atgaaggtta tcgctgtact 2460
taaccagaaa ggcgggtcag gcaagacgac catcgcaacc catctagccc gcgccctgca 2520
actcgccggg gccgatgttc tgttagtcga ttccgatccc cagggcagtg cccgcgattg 2580
ggcggccgtg cgggaagatc aaccgctaac cgttgtcggc atcgaccgcc cgacgattga 2640
ccgcgacgtg aaggccatcg gccggcgcga cttcgtagtg atcgacggag cgccccaggc 2700
ggcggacttg gctgtgtccg cgatcaaggc agccgacttc gtgctgattc cggtgcagcc 2760
aagcccttac gacatatggg ccaccgccga cctggtggag ctggttaagc agcgcattga 2820
ggtcacggat ggaaggctac aagcggcctt tgtcgtgtcg cgggcgatca aaggcacgcg 2880
catcggcggt gaggttgccg aggcgctggc cgggtacgag ctgccccattc ttgagtcccg 2940
tatcacgcag cgcgtgagct acccaggcac tgccgccgcc ggcacaaccg ttcttgaatc 3000
agaacccgag ggcgacgctg cccgcgaggt ccaggcgctg gccgctgaaa ttaaatcaaa 3060
actcatttga gttaatgagg taaagagaaa atgagcaaaa gcacaaacac gctaagtgcc 3120
ggccgtccga gcgcacgcag cagcaaggct gcaacgttgg ccagcctggc agacacgcca 3180
gccatgaagc gggtcaactt tcagttgccg gcggaggatc acaccaagct gaagatgtac 3240
gcggtacgcc aaggcaagac cattaccgag ctgctatctg aatacatcgc gcagctacca 3300
gagtaaatga gcaaatgaat aaatgagtag atgaatttta gcggctaaag gaggcggcat 3360
ggaaaatcaa gaacaaccag gcaccgacgc cgtggaatgc cccatgtgtg gaggaacggg 3420
cggttggcca ggcgtaagcg gctgggttgt ctgccggccc tgcaatggca ctggaacccc 3480
caagcccgag gaatcggcgt gagcggtcgc aaaccatccg gcccggtaca aatcggcgcg 3540
gcgctgggtg atgacctggt ggagaagttg aaggccgcgc aggccgccca gcggcaacgc 3600
atcgaggcag aagccacgcc cggtgaatcg tggcaagcgg ccgctgatcg aatccgcaaa 3660
gaatcccggc aaccgccggc agccggtgcg ccgtcgatta ggaagccgcc caagggcgac 3720
gagcaaccag attttttcgt tccgatgctc tatgacgtgg gcacccgcga tagtcgcagc 3780
atcatggacg tggccgtttt ccgtctgtcg aagcgtgacc gacgagctgg cgaggtgatc 3840
cgctacgagc ttccagacgg gcacgtagag gtttccgcag ggccggccgg catggccagt 3900
gtgtgggatt acgacctggt actgatggcg gtttcccatc taaccgaatc catgaaccga 3960
taccgggaag ggaagggaga caagcccggc cgccgttcct gtccacacgt tgcggacgta 4020
ctcaagttct gccggcgagc cgatggcgga aagcagaaag acgacctggt agaaacctgc 4080
attcggttaa acaccacgca cgttgccatg cagcgtacga agaaggccaa gaacggccgc 4140
ctggtgacgg tatccgaggg tgaagccttg attagccgct acaagatcgt aaagagcgaa 4200
accgggcggc cggagtacat cgagatcgag ctagctgatt ggatgtaccg cgagatcaca 4260
gaaggcaaga acccggacgt gctgacggtt caccccgatt actttttgat cgatcccggc 4320

```
atcggccgtt ttctctaccg cctggcacgc cgccgccgcag gcaaggcaga agccagatgg 4380
ttgttcaaga cgatctacga acgcagtggc agcgccggag agttcaagaa gttctgtttc 4440
acogtgcgca agctgatcgg gtcaaatgac ctgccggagt acgatttgaa ggaggaggcg 4500
gggcaggctg gcccgatcct agtcatgcgc taccgcaacc tgatcgaggg cgaagcatcc 4560
gccggttcct aatgtacgga gcagatgcta gggcaaattg ccctagcagg ggaaaaaggt 4620
cgaaaaggtc tctttcctgt ggatagcacg tacattgggа acccaaagcc gtacattggg 4680
aaccggaacc cgtacattgg gaacccaaag ccgtacattg ggaaccggtc acacatgtaa 4740
gtgactgata taaaagagaa aaaaggcgat ttttccgcct aaaactcttt aaaacttatt 4800
aaaactctta aaacccgcct ggcctgtgca taactgtctg gccagcgcac agccgaagag 4860
ctgcaaaaag cgcctaccct tcggtcgctg cgctccctac gccccgccgc ttcgcgtcgg 4920
cctatcgcgg ccgctggccg ctcaaaaatg gctggcctac ggccaggcaa tctaccaggg 4980
cgcggacaag ccgcgccgtc gccactcgac cgccggcgcc cacatcaagg caccctgcct 5040
cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac 5100
agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt 5160
tggcgggtgt cggggcgcag ccatgaccca gtcacgtagc gatagcggag tgtatactgg 5220
cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata 5280
ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct cttccgcttc ctcgctcact 5340
gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta 5400
atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag 5460
caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc 5520
cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta 5580
taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg 5640
ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc 5700
tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac 5760
gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac 5820
ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg 5880
aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga 5940
aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt 6000
agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gttttttttgt ttgcaagcag 6060
cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct 6120
gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgcatga tatatctccc 6180
aatttgtgta gggcttatta tgcacgctta aaaataataa aagcagactt gacctgatag 6240
tttggctgtg agcaattatg tgcttagtgc atctaacgct tgagttaagc cgcgccgcga 6300
agcggcgtcg gcttgaacga atttctagct agacattatt tgccgactac cttggtgatc 6360
tcgcctttca cgtagtggac aaattcttcc aactgatctg cgcgcgaggc caagcgatct 6420
tcttcttgtc caagataagc ctgtctagct tcaagtatga cgggctgata ctgggccggc 6480
aggcgctcca ttgcccagtc ggcagcgaca tccttcggcg cgattttgcc ggttactgcg 6540
ctgtaccaaa tgcgggacaa cgtaagcact acatttcgct catcgccagc ccagtcgggc 6600
ggcgagttcc atagcgttaa ggtttcattt agcgcctcaa atagatcctg ttcaggaacc 6660
ggatcaaaga gttcctccgc cgctggacct accaaggcaa cgctatgttc tcttgctttt 6720
gtcagcaaga tagccagatc aatgtcgatc gtggctggct cgaagatacc tgcaagaatg 6780
tcattgcgct gccattctcc aaattgcagt tcgcgcttag ctggataacg ccacggaatg 6840
atgtcgtcgt gcacaacaat ggtgacttct acagcgcgga gaatctcgct ctctccaggg 6900
gaagccgaag tttccaaaag gtcgttgatc aaagctcgcc gcgttgtttc atcaagcctt 6960
acggtcaccg taaccagcaa atcaatatca ctgtgtggct tcaggccgcc atccactgcg 7020
gagccgtaca aatgtacggc cagcaacgtc ggttcgagat ggcgctcgat gacgccaact 7080
acctctgata gttgagtcga tacttcggcg atcaccgctt cccccatgat gtttaacttt 7140
gttttagggc gactgccctg ctgcgtaaca tcgttgctgc tccataacat caaacatcga 7200
cccacggcgt aacgcgcttg ctgcttggat gcccgaggca tagactgtac cccaaaaaaa 7260
cagtcataac aagccatgaa aaccgccact gcgggggttc catggacata caaatggacg 7320
aacggataaa cctttttcacg ccctttaaa tatccgatta ttctaataaa cgctcttttc 7380
tcttaggttt acccgccaat atatcctgtc aaacactgat agtttaaact gaaggcggga 7440
aacgacaatc agatctagta ggaaacagct atgaccatga ttacgccaag cttgcatgcc 7500
tgcaggtcga ctctagagga tcgatccccg ggtaggtcag tcccttatgt tacgtcctgt 7560
agaaacccca acccgtgaaa tcaaaaaact cgacggcctg tgggcattca gtctggatcg 7620
cgaaaactgt ggaattggtc agcgttggtg ggaaagcgcg ttacaagaaa gccgggcaat 7680
tgctgtgcca ggcagtttta acgatcagtt cgccgatgca gatattcgta attatgcggg 7740
caacgtctgg tatcagcgcg aagtctttat accgaaaggt tgggcaggcc agcgtatcgt 7800
gctgcgtttc gatgcggtca ctcattacgg caaagtgtgg gtcaataatc aggaagtgat 7860
ggagcatcag ggcggctata cgccatttga agccgatgtc acgccgtatg ttattgccgg 7920
gaaaagtgta cgtaagtttc tgcttctacc tttgatatat atataataat tatcattaat 7980
tagtagtaat ataatatttc aaatattttt ttcaaaataa aagaatgtag tatatagcaa 8040
ttgcttttct gtagtttata agtgtgtata ttttaattta taacttttct aatatatgac 8100
caaaatttgt tgatgtgcag gtatcaccgt ttgtgtgaac aacgaactga actggcagac 8160
tatcccgccg ggaatggtga ttaccgacga aaacggcaag aaaaagcagt cttacttcca 8220
tgatttcttt aactatgccg gaatccatcg cagcgtaatg ctctacacca cgccgaacac 8280
ctgggtggac gatatcaccg tggtgacgca tgtcgcgcaa gactgtaacc acgcgtctgt 8340
tgactggcag gtggtggcca atggtgatgt cagcgttgaa ctgcgtgatg cggatcaaca 8400
ggtggttgca actggacaag gcactagcgg gactttgcaa gtggtgaatc cgcacctctg 8460
gcaaccgggt gaaggttatc tctatgaact gtgcgtcaca gccaaaagcc agacagagtg 8520
tgatatctac ccgcttcgcg tcggcatccg gtcagtggca gtgaagggcg aacagttcct 8580
gattaaccac aaaccgttct actttactgg ctttggtcgt catgaagatg cggacttgcg 8640
tggcaaagga ttcgataacg tgctgatggt gcacgaccac gcattaatgg actggattgg 8700
```

ggccaactcc taccgtacct cgcattaccc ttacgctgaa gagatgctcg actgggcaga 8760
tgaacatggc atcgtggtga ttgatgaaac tgctgctgtc ggctttaacc tctctttagg 8820
cattggtttc gaagcgggca acaagccgaa agaactgtac agcgaagagg cagtcaacgg 8880
ggaaactcag caagcgcact tacaggcgat taaagagctg atagcgcgtg acaaaaacca 8940
cccaagcgtg gtgatgtgga gtattgccaa cgaaccggat acccgtccgc aaggtgcacg 9000
ggaatatttc gcgccactgg cggaagcaac gcgtaaactc gacccgacgc gtccgatcac 9060
ctgcgtcaat gtaatgttct gcgacgctca caccgatacc atcagcgatc tctttgatgt 9120
gctgtgcctg aaccgttatt acggatggta tgtccaaagc ggcgatttgg aaacggcaga 9180
gaaggtactg gaaaaagaac ttctggcctg gcaggagaaa ctgcatcagc cgattatcat 9240
caccgaatac ggcgtggata cgttagccgg gctgcactca atgtacaccg acatgtggag 9300
tgaagagtat cagtgtgcat ggctggatat gtatcaccgc gtctttgatc gcgtcagcgc 9360
cgtcgtcggt gaacaggtat ggaatttcgc cgattttgcg acctcgcaag gcatattgcg 9420
cgttggcggt aacaagaaag ggatcttcac tcgcgaccgc aaaccgaagt cggcggcttt 9480
tctgctgcaa aaacgctgga ctggcatgaa cttcggtgaa aaaccgcagc agggaggcaa 9540
acaatgagag ctcgaatttc cccgatcggt caaacatttg gcaataaagn ttcttaagat 9600
tgaatcctgt tgccggtctt gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc 9660
atgtaataat taacatgtaa tgcatgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag 9720
tcccgcaatt atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atancgcgca aactaggata 9780
aattatcgcg cgcggtgtca tctatgttac tagatcggga attcccatgc ctcgagcaga 9840
aagatataat atgtaaaaaa atgggtctat atatatggaa ggtttcagga agacaaaggt 9900
tctagaaact tccaaaaaaa atccagaata tattttggaa gaaataccct cttgggttgg 9960
ccccggcgca gcccctagtg ggccaaaaag ccacgatcta atcccggtct aattggtcta 10020
atagtttaga cttctaatta gacgggctct tatgccggtc taattggtct aattagatta 10080
aaatcctaat taaatatgaa cgcaactagg cttcccctct ctctagtttt ctcggagctc 10140
tttttcatgg accttgaagt attgccggat cactacttcg gaactcgtgg atacttcaga 10200
gtgcacatct actttgaatc ttgattggta gatcatctcg gagaaattct cacagttggg 10260
aggtataacc agttgccgaa attgccatgc ttcactcaca gccaggatca gcccatgtcc 10320
caaggcaacc cttgtagcta catgccgagg cctgactact tggggcctcg cgccctgcat 10380
ttttgcatgt tcatgtgaca cgttaaatgt tgagagaaat agattactaa atatcaccca 10440
tttcgttatt ctagatgagt atcctacaat atgtataccg aaaaatgtat tttaaactgt 10500
ggtaggtgag aaagatctat taaaaagaac tctacgtata ctccccctc ccaatcccca 10560
tccaggtttg taagacactt tcgtcttttt ttgccgaatt ttaaccgtaa atttgactag 10620
taaaaataag ttatactgaa tgtaataaat atcgtacatt cggatgttgg agacagggag 10680
aggctggctg gtgcgctgga tggatcacgg tcagaaagtc tgacttgcaa cgccacaggc 10740
ccgttgattg ccactgacaa ccaagttttc gttgtttcgc tggtgccata ttttccgcga 10800
tcgaatattt aaactgcgag gagaaaggca agcagggcgc catatcagca cttgatcact 10860
cactgatcga tcagtagtag ccaccttctc tgcgccgacg tgttatatat tattggcaac 10920
aagtcatcga ttgagaacag aaacaaaaca agaagagaac tatttgagag agagtagtta 10980
cgccgcagcg agtagcctcc catttctgac gatcatgcca tacgataaac cggccggcgg 11040
cgagaccagt tagcaaggtt gaaatgccaa cacatgtcgc gctcatttct cggctttttc 11100
attttgcatg tcgtcatgca ggccctggac actgacattt ctctcttttg ctgttgaatg 11160
aagaccctaa cctttcacca tcagcacgcc cctcaacttg ataagcctag acgaaaccca 11220
tatgcatgat tgatgagtaa tggtgtgcac gaatattatg aacccgtttc caagagcaat 11280
actccattga gatacacctc ctccttgtat ctgttcgttg gtcccatttc catagcagcc 11340
ggcagtggcc ttgactctga ctgccacgca agtaatatat ctttaataaa ctcgctgcct 11400
tgcttcgtgt gtccatttgc aaatgcatgc agtgacgaca tgcacatgca tagcttaatt 11460
agctccatgc atccactgct tccattaatc cctatataa aggactccat atgcctcacc 11520
attcactcat ccaccacagc ttagcagcag caacaaccag tgccatagac actctccatc 11580
aacaaactct agctgatcaa tcctagctaa gcttattaca tagcaagccc ggggatcctc 11640
tagagtcgac ctgcaggcgg ccgcactagt gattaggatt ccaacgcgag ccaggacaag 11700
cgaggaacct tgcgtgcgag gcgaggccgc cccgctccga ttcgattcga cgcgcaggcg 11760
caggcgcagg gatggacgcc ttctactcga cctcgtcggc ggcggcgagc ggctggggcc 11820
acgactccct caagaacttc cgccagatct cccccgccgt gcagtcccac ctcaagctcg 11880
tttacctgac tctatgcttt gcactggcct catctgccgt gggtgcttac ctacacattg 11940
ccctgaacat cggcgggatg ctgacaatgc tcgcttgtgt cggaactatc gcctggatgt 12000
tctcggtgcc agtctatgag gagaggaaga ggtttgggct gctgatgggt gcagccctcc 12060
tggaaggggc ttcggttgga cctctgattg agcttgccat agactttgac ccaagcatcc 12120
tcgtgacagg gtttgtcgga accgccatcg cctttgggtg cttctctggc gccgccatca 12180
tcgccaagcg cagggagtac ctgtacctcg gtggcctgct ctcgtctggc ctgtcgatcc 12240
tgctctggct gcagtttgtc acgtccatct ttggccactc ctctggcagc ttcatgtttg 12300
aggtttactt tggcctgttg atcttcctgg ggtacatggt gtacgacacg caggagatca 12360
tcgagagggc gcaccatggc gacatggact acatcaagca cgccctcacc ctcttcaccg 12420
actttgttgc cgtcctcgtc cgagtcctca tcatcatgct caagaacgca ggcgacaagt 12480
cggaggacaa gaagaagagg aagagggggt cctgaacgtw tctcccgcac atgtagatac 12540
cgtcaccgcg tcgacctgca ggcatgcccg ctgaaatcac cagtctctct ctacaaatct 12600
atctctctca taataatgtg tgagtagttc ccagataagg gaattagggt tcttataggg 12660
tttcgctcat gtgttgagca tataagaaac ccttagtatg tatttgtatt tgtaaaatac 12720
ttctatcaat aaaatttcta attcctaaaa ccaaaatcca gtgggtaccg agctcg 12776

<210> 37

<211> 744

<212> ADN

<213> *Triticum aestivum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(741)

<223> codificación para TaBI-1

<400> 37

```
atg gac gcc ttc tac tcg acc tcg tcg gcg gcg gcg agc ggc tgg ggc   48
Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly
  1               5                  10                  15

tac gac tcc ctc aag aac ttc cgc gag atc tcc ccc gcc gtg cag tcc   96
Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser
            20                  25                  30

cac ctc aag ctc gtt tac ctg acc cta tgc ttt gcc ctg gcc tca tct  144
His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser
        35                  40                  45

gcc gtg ggt gct tac ctg cac att gcc ctg aac atc ggt ggg atg ctg  192
Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu
    50                  55                  60

aca atg ctc gcg tgt gtt gga acc atc gcc tgg atg ttc tct gtg cca  240
Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro
65                  70                  75                  80

gtc tat gag gag agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc  288
Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu
                85                  90                  95

ctg gaa ggg gct tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt  336
Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe
            100                 105                 110

gac cca agt atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc gcc ttc  384
Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe
        115                 120                 125

ggg tgc ttc tct ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg  432
Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu
    130                 135                 140

tac ctc ggt ggt ctg ctc tcc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc tgg ctg  480
Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu
145                 150                 155                 160

cag ttt gcc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt  528
Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe
                165                 170                 175

gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg gga tac atg gtg tac gac  576
Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp
            180                 185                 190

acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cac ggc gac atg gat tac atc  624
Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile
        195                 200                 205

aag cac gcg ctc acc ctc ttc acc gac ttc gtc gcc gtt ctc gtc cgc  672
Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg
    210                 215                 220

gtc ctc atc atc atg ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag  720
Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys
225                 230                 235                 240

aag aag agg aag agg ggg tcc tga                                  744
Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser
                245
```

<210> 38

<211> 247

<212> PRT

<213> *Triticum aestivum*

<400> 38

```
Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly
 1               5                  10                  15

Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser
            20                  25                  30

His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser
        35                  40                  45

Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu
    50                  55                  60

Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro
65                  70                  75                  80

Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu
                85                  90                  95

Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe
            100                 105                 110

Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe
        115                 120                 125

Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu
    130                 135                 140

Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu
145                 150                 155                 160

Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe
                165                 170                 175

Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp
            180                 185                 190

Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile
        195                 200                 205

Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg
    210                 215                 220

Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys
225                 230                 235                 240

Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser
                245
```

<210> 39

<211>

<212> ADN

<213> *Hordeum vulgare*

<220>

<221> CDS

<222> (173)..(1126)

<223> codificación para *Hordeum vulgare subsp. vulgare syntaxin* (Ror2)

<400> 39

```
gtaactaacc ccttcttcct cccttgtcca ctccgcttct ccccatccaa gaaacagcgc 60

caacagctcc acccatcgag gagaatcaag aaaccgcgcc ggcgtggtga tcaaggacat 120

ccatcgatcg atcgaccgac cctgccttgc ctgagtcaac ccggcggcag cc atg aac 178
                                                          Met Asn
                                                            1

aac ctc ttc tcg agc tcg tgg aag cgg gcg ggc gcg ggg ggc gac ggg   226
Asn Leu Phe Ser Ser Ser Trp Lys Arg Ala Gly Ala Gly Gly Asp Gly
          5                  10                  15

gac ctg gag tcg ggc ggc ggc ggc gtg gag atg acg gcg ccg ccg ggc   274
Asp Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val Glu Met Thr Ala Pro Pro Gly
     20                  25                  30

gcc gcg gcg ggg gcg agc ctg gac cgc ttc ttc gag gac gtg gag tcg   322
Ala Ala Ala Gly Ala Ser Leu Asp Arg Phe Phe Glu Asp Val Glu Ser
 35                  40                  45                  50

atc aag gac gac ctg cgg gag ctg gag cgg atc cag cgc tcc ctc cac   370
Ile Lys Asp Asp Leu Arg Glu Leu Glu Arg Ile Gln Arg Ser Leu His
                 55                  60                  65

gac ggc aac gag tcg ggc aag tcg ctc cac gac gcg tcg gcg gtg cgc   418
Asp Gly Asn Glu Ser Gly Lys Ser Leu His Asp Ala Ser Ala Val Arg
             70                  75                  80

gcg ctc cgc tcc cgc atg gac gcc gac gtg gcc gcc gcc atc aag aag   466
Ala Leu Arg Ser Arg Met Asp Ala Asp Val Ala Ala Ala Ile Lys Lys
         85                  90                  95

gcc aag gtg gtg aag ttg cgg ctc gag tcg ctc gac cgc gcc aac gcc   514
Ala Lys Val Val Lys Leu Arg Leu Glu Ser Leu Asp Arg Ala Asn Ala
    100                 105                 110

gcc aac cgg tcc gtg gcc ggg tgc ggg ccg ggg tcg tcc acg gac cgc   562
Ala Asn Arg Ser Val Ala Gly Cys Gly Pro Gly Ser Ser Thr Asp Arg
115                 120                 125                 130

acc cgc acc tcc gtc gtg gcc ggg ctg cgc aag aag ctg cgg gat gcc   610
Thr Arg Thr Ser Val Val Ala Gly Leu Arg Lys Lys Leu Arg Asp Ala
                135                 140                 145

atg gag tcc ttc tcc tcc ctc cgc tcc cgc atc acc tcc gag tac cgg   658
Met Glu Ser Phe Ser Ser Leu Arg Ser Arg Ile Thr Ser Glu Tyr Arg
            150                 155                 160

gaa acc gtg gcc cgc cgc tac ttc acg gtg acg ggg tcc cag ccc gac   706
Glu Thr Val Ala Arg Arg Tyr Phe Thr Val Thr Gly Ser Gln Pro Asp
        165                 170                 175

gag gcc acg ctg gac acg ctg gcg gag acg ggg gag ggg gag cgg ctc   754
Glu Ala Thr Leu Asp Thr Leu Ala Glu Thr Gly Glu Gly Glu Arg Leu
    180                 185                 190

ctg cag cgc gcc atc gcg gag cag cag ggg aga ggg gag gtg ctg ggc   802
Leu Gln Arg Ala Ile Ala Glu Gln Gln Gly Arg Gly Glu Val Leu Gly
195                 200                 205                 210

gtg gtg gcg gag atc cag gag cgg cac ggc gcc gtg gcg gac ctg gag   850
Val Val Ala Glu Ile Gln Glu Arg His Gly Ala Val Ala Asp Leu Glu
                215                 220                 225

cgg tcc ctg ctg gag ctg cag cag gtg ttc aac gac atg gcc gtg ctg   898
Arg Ser Leu Leu Glu Leu Gln Gln Val Phe Asn Asp Met Ala Val Leu
            230                 235                 240

gtg gcg gcg cag ggg gag cag ctg gac gac atc gag ggc cac gtc ggg   946
Val Ala Ala Gln Gly Glu Gln Leu Asp Asp Ile Glu Gly His Val Gly
        245                 250                 255

cgg gcg agg tcg ttc gtc gac cgc ggg cgc gag cag ctg cag gtg gca   994
Arg Ala Arg Ser Phe Val Asp Arg Gly Arg Glu Gln Leu Gln Val Ala
    260                 265                 270

cgc aag cac cag aag agc tcc cgc aag tgg acc ttc atc ggc atc ggc   1042
Arg Lys His Gln Lys Ser Ser Arg Lys Trp Thr Phe Ile Gly Ile Gly
```

```
275                 280                 285                 290

atc ctg ctc gtc gtc atc ctc atc atc gtc atc ccc atc gtg ctc aag   1090
Ile Leu Leu Val Val Ile Leu Ile Ile Val Ile Pro Ile Val Leu Lys
                295                 300                 305

aac acc aac aag agc aac aac aac aac agc cag cag tagtggtagg        1136
Asn Thr Asn Lys Ser Asn Asn Asn Asn Ser Gln Gln
            310                 315

aacagcctgt ggatctgttg tctgtctctg atgatcctgg tcctggattg cttcctggtt 1196

gttgttgttg attgtctttt gtggaatttt ttgcgattgt aattactcca tccatgtggt 1256

tcgttgagcc actcgattat tatttcatga ctatata                          1293
```

<210> 40

<211> 318

<212> PRT

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 40

```
Met Asn Asn Leu Phe Ser Ser Ser Trp Lys Arg Ala Gly Ala Gly Gly
  1               5                  10                  15

Asp Gly Asp Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val Glu Met Thr Ala Pro
             20                  25                  30

Pro Gly Ala Ala Ala Gly Ala Ser Leu Asp Arg Phe Phe Glu Asp Val
         35                  40                  45

Glu Ser Ile Lys Asp Asp Leu Arg Glu Leu Glu Arg Ile Gln Arg Ser
     50                  55                  60

Leu His Asp Gly Asn Glu Ser Gly Lys Ser Leu His Asp Ala Ser Ala
 65                  70                  75                  80

Val Arg Ala Leu Arg Ser Arg Met Asp Ala Asp Val Ala Ala Ala Ile
                 85                  90                  95

Lys Lys Ala Lys Val Val Lys Leu Arg Leu Glu Ser Leu Asp Arg Ala
            100                 105                 110

Asn Ala Ala Asn Arg Ser Val Ala Gly Cys Gly Pro Gly Ser Ser Thr
        115                 120                 125

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

Asp Ala Met Glu Ser Phe Ser Ser Leu Arg Ser Arg Ile Thr Ser Glu
145                 150                 155                 160

Tyr Arg Glu Thr Val Ala Arg Arg Tyr Phe Thr Val Thr Gly Ser Gln
                165                 170                 175

Pro Asp Glu Ala Thr Leu Asp Thr Leu Ala Glu Thr Gly Glu Gly Glu
            180                 185                 190

Arg Leu Leu Gln Arg Ala Ile Ala Glu Gln Gln Gly Arg Gly Glu Val
        195                 200                 205

Leu Gly Val Val Ala Glu Ile Gln Glu Arg His Gly Ala Val Ala Asp
    210                 215                 220

Leu Glu Arg Ser Leu Leu Glu Leu Gln Gln Val Phe Asn Asp Met Ala
225                 230                 235                 240

Val Leu Val Ala Ala Gln Gly Glu Gln Leu Asp Asp Ile Glu Gly His
                245                 250                 255

Val Gly Arg Ala Arg Ser Phe Val Asp Arg Gly Arg Glu Gln Leu Gln
            260                 265                 270
```

```
Val Ala Arg Lys His Gln Lys Ser Ser Arg Lys Trp Thr Phe Ile Gly
        275                 280                 285

Ile Gly Ile Leu Leu Val Val Ile Leu Ile Ile Val Ile Pro Ile Val
    290                 295                 300

Leu Lys Asn Thr Asn Lys Ser Asn Asn Asn Asn Ser Gln Gln
305                 310                 315
```

<210> 41

<211> 948

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(945)

<223> codificación para *Arabidopsis thaliana* syntaxin 121 (SYP121)/syntaxin-related protein (SYR1) (At3g11820)

<400> 41

```
atg gcg aat ccc gcg gga tca acc ggt ggt gtg aac ctc gac aag ttc   48
Met Ala Asn Pro Ala Gly Ser Thr Gly Gly Val Asn Leu Asp Lys Phe
  1               5                  10                  15

ttc gaa gat gtt gaa tct gtg aaa gaa gag cta aag gag cta gat cgg   96
Phe Glu Asp Val Glu Ser Val Lys Glu Glu Leu Lys Glu Leu Asp Arg
            20                  25                  30

ctc aac gaa aca ctc tct tca tgt cac gag cag agc aag acg ctt cac  144
Leu Asn Glu Thr Leu Ser Ser Cys His Glu Gln Ser Lys Thr Leu His
        35                  40                  45

aat gct aaa gcc gtt aaa gat ctc cgg tct aaa atg gac ggt gac gtt  192
Asn Ala Lys Ala Val Lys Asp Leu Arg Ser Lys Met Asp Gly Asp Val
    50                  55                  60

gga gtc gcg ttg aag aag gcg aag atg att aaa gtt aaa ctc gag gcg  240
Gly Val Ala Leu Lys Lys Ala Lys Met Ile Lys Val Lys Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

cta gat cgt gcc aat gct gct aat cgg agt ctc cct ggc tgt gga cct  288
Leu Asp Arg Ala Asn Ala Ala Asn Arg Ser Leu Pro Gly Cys Gly Pro
                85                  90                  95

ggt tct tcc tcc gat cga acc agg acc tct gtc ctc aat ggt ctc agg  336
Gly Ser Ser Ser Asp Arg Thr Arg Thr Ser Val Leu Asn Gly Leu Arg
            100                 105                 110

aag aaa ttg atg gac tct atg gat agt ttc aac cga ttg agg gag ctt  384
Lys Lys Leu Met Asp Ser Met Asp Ser Phe Asn Arg Leu Arg Glu Leu
        115                 120                 125

atc tcg tcc gag tat aga gaa act gta cag agg agg tac ttc acc gtc  432
Ile Ser Ser Glu Tyr Arg Glu Thr Val Gln Arg Arg Tyr Phe Thr Val
    130                 135                 140

acc ggc gag aat ccg gat gaa cga acc cta gat cga ctg att tcc act  480
Thr Gly Glu Asn Pro Asp Glu Arg Thr Leu Asp Arg Leu Ile Ser Thr
145                 150                 155                 160

gga gag agt gag aga ttc ttg cag aaa gca ata caa gaa caa gga aga  528
Gly Glu Ser Glu Arg Phe Leu Gln Lys Ala Ile Gln Glu Gln Gly Arg
                165                 170                 175

gga agg gtg tta gac acc att aac gag att caa gaa agg cat gat gcg  576
Gly Arg Val Leu Asp Thr Ile Asn Glu Ile Gln Glu Arg His Asp Ala
            180                 185                 190
```

```
gtt aaa gac att gag aag aat ctc agg gag ctt cac cag gtg ttt cta   624
Val Lys Asp Ile Glu Lys Asn Leu Arg Glu Leu His Gln Val Phe Leu
        195                 200                 205

gac atg gcc gtg ctg gta gag cac cag gga gct cag ctt gat gac atc   672
Asp Met Ala Val Leu Val Glu His Gln Gly Ala Gln Leu Asp Asp Ile
    210                 215                 220

gag agt cat gtg ggt cga gct agc tcc ttt atc aga ggc gga act gac   720
Glu Ser His Val Gly Arg Ala Ser Ser Phe Ile Arg Gly Gly Thr Asp
225                 230                 235                 240

cag cta caa acc gct cgg gtt tac cag aag aac acg cga aaa tgg aca   768
Gln Leu Gln Thr Ala Arg Val Tyr Gln Lys Asn Thr Arg Lys Trp Thr
                245                 250                 255

tgt att gcc att att att ctc atc atc atc ata act gtt gtg gtt ctt   816
Cys Ile Ala Ile Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Thr Val Val Val Leu
            260                 265                 270

gct gtt tta aaa ccg tgg aac aac agc agt ggc ggc ggc ggc ggt ggt   864
Ala Val Leu Lys Pro Trp Asn Asn Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        275                 280                 285

ggt ggt ggg ggt acc act gga gga agt caa cca aat tca ggg aca cca   912
Gly Gly Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ser Gln Pro Asn Ser Gly Thr Pro
    290                 295                 300

cca aat cct cct cag gca agg cgt cta ttg cgt tga                   948
Pro Asn Pro Pro Gln Ala Arg Arg Leu Leu Arg
305                 310                 315
```

<210> 42

<211> 315

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 42

```
Met Ala Asn Pro Ala Gly Ser Thr Gly Gly Val Asn Leu Asp Lys Phe
 1               5                  10                  15

Phe Glu Asp Val Glu Ser Val Lys Glu Glu Leu Lys Glu Leu Asp Arg
            20                  25                  30

Leu Asn Glu Thr Leu Ser Ser Cys His Glu Gln Ser Lys Thr Leu His
        35                  40                  45

Asn Ala Lys Ala Val Lys Asp Leu Arg Ser Lys Met Asp Gly Asp Val
    50                  55                  60

Gly Val Ala Leu Lys Lys Ala Lys Met Ile Lys Val Lys Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

Leu Asp Arg Ala Asn Ala Ala Asn Arg Ser Leu Pro Gly Cys Gly Pro
                85                  90                  95

Gly Ser Ser Ser Asp Arg Thr Arg Thr Ser Val Leu Asn Gly Leu Arg
            100                 105                 110

Lys Lys Leu Met Asp Ser Met Asp Ser Phe Asn Arg Leu Arg Glu Leu
        115                 120                 125

Ile Ser Ser Glu Tyr Arg Glu Thr Val Gln Arg Arg Tyr Phe Thr Val
    130                 135                 140

Thr Gly Glu Asn Pro Asp Glu Arg Thr Leu Asp Arg Leu Ile Ser Thr
145                 150                 155                 160

Gly Glu Ser Glu Arg Phe Leu Gln Lys Ala Ile Gln Glu Gln Gly Arg
                165                 170                 175

Gly Arg Val Leu Asp Thr Ile Asn Glu Ile Gln Glu Arg His Asp Ala
            180                 185                 190

Val Lys Asp Ile Glu Lys Asn Leu Arg Glu Leu His Gln Val Phe Leu
        195                 200                 205

Asp Met Ala Val Leu Val Glu His Gln Gly Ala Gln Leu Asp Asp Ile
    210                 215                 220

Glu Ser His Val Gly Arg Ala Ser Ser Phe Ile Arg Gly Gly Thr Asp
225                 230                 235                 240

Gln Leu Gln Thr Ala Arg Val Tyr Gln Lys Asn Thr Arg Lys Trp Thr
                245                 250                 255

Cys Ile Ala Ile Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Thr Val Val Val Leu
            260                 265                 270

Ala Val Leu Lys Pro Trp Asn Asn Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ser Gln Pro Asn Ser Gly Thr Pro
    290                 295                 300

Pro Asn Pro Pro Gln Ala Arg Arg Leu Leu Arg
305                 310                 315
```

<210> 43

<211> 1275

<212> ADN

<213> *Hordeum vulgare*

<220>

<221> CDS

<222> (80)..(1006)

<223> codificación para *Hordeum vulgare subsp. vulgare* SNAP-34

<400> 43

```
ggcccctcca ccccacccca cccagtcgct gcggatactt gattctgcta ctcggccagc 60

gatcgatctc gcctccgcc atg agc gcc acc agg ccc tcc ttc ttc ccc tcc  112
                     Met Ser Ala Thr Arg Pro Ser Phe Phe Pro Ser
                       1               5                  10

aac aac aac agg aac aag ccc gcc acc cgg aac ccc ttc gac tcc gac   160
Asn Asn Asn Arg Asn Lys Pro Ala Thr Arg Asn Pro Phe Asp Ser Asp
            15                  20                  25

tcg gac gac gac ggc ggc atg gcc cgg cgc ggc ccg gcg cgg gcc tcg   208
Ser Asp Asp Asp Gly Gly Met Ala Arg Arg Gly Pro Ala Arg Ala Ser
        30                  35                  40

tcc gtc ccg acc ccc gcc gcg ggg ccg gcc agg gcc tcc tcg gcc ccg   256
Ser Val Pro Thr Pro Ala Ala Gly Pro Ala Arg Ala Ser Ser Ala Pro
    45                  50                  55

atc ccc gcc gac gag gcg gac cag cgg ggc gcc ctg ttc ggc gcg ggc   304
Ile Pro Ala Asp Glu Ala Asp Gln Arg Gly Ala Leu Phe Gly Ala Gly
60                  65                  70                  75

ccc gcg ccg tcc ggc ttc gcg tcc tcc tcc tcc gcg gcc gcc agg ggc   352
Pro Ala Pro Ser Gly Phe Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Arg Gly
                80                  85                  90

cgg tac agg aac gac ttc cgc gac tcg ggc ggc gtg gag gcg cag tcc   400
Arg Tyr Arg Asn Asp Phe Arg Asp Ser Gly Gly Val Glu Ala Gln Ser
            95                  100                 105

gtg cag gag ctc gag ggc tac gcg gcc tac aag gcc gag gag acc acg   448
Val Gln Glu Leu Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Lys Ala Glu Glu Thr Thr
        110                 115                 120
```

```
cgc cgg gtc gac ggc tgc ctc cgg gtc gcc gag gag atg cgg gac acc   496
Arg Arg Val Asp Gly Cys Leu Arg Val Ala Glu Glu Met Arg Asp Thr
    125                 130                 135

gcg tca aag acc ctg ctc cag gtg cac cag cag ggc cag cag atc agg   544
Ala Ser Lys Thr Leu Leu Gln Val His Gln Gln Gly Gln Gln Ile Arg
140                 145                 150                 155

cgc acc cac gcc atg gcc gtc gac atc gac cag gat ctc tcc agg ggg   592
Arg Thr His Ala Met Ala Val Asp Ile Asp Gln Asp Leu Ser Arg Gly
                160                 165                 170

gaa aag cta cta ggt gat ctt ggt ggt ttg ttt tcc aag aag tgg aag   640
Glu Lys Leu Leu Gly Asp Leu Gly Gly Leu Phe Ser Lys Lys Trp Lys
            175                 180                 185

cca aag aag aac ggc gca atc agg ggc cct atg ctg acc aga gac gat   688
Pro Lys Lys Asn Gly Ala Ile Arg Gly Pro Met Leu Thr Arg Asp Asp
        190                 195                 200

tcc ttc ata cgc aag ggc agc cat atg gag cag agg cat aaa ctg ggg   736
Ser Phe Ile Arg Lys Gly Ser His Met Glu Gln Arg His Lys Leu Gly
    205                 210                 215

ctg tca gat cgt ccg cat cga tcc aat gca cgc cag ttc cta tct gaa   784
Leu Ser Asp Arg Pro His Arg Ser Asn Ala Arg Gln Phe Leu Ser Glu
220                 225                 230                 235

ccc aca tca ggc ctt gag aaa gtc gag gtg gag aag gca aag cag gat   832
Pro Thr Ser Gly Leu Glu Lys Val Glu Val Glu Lys Ala Lys Gln Asp
                240                 245                 250

gat ggc ctg tct gac ctt agc gac ata ctg aca gag ttg aaa gga atg   880
Asp Gly Leu Ser Asp Leu Ser Asp Ile Leu Thr Glu Leu Lys Gly Met
            255                 260                 265

gcc att gac atg gga act gag att gag ggg caa aca aag gat ctt ggt   928
Ala Ile Asp Met Gly Thr Glu Ile Glu Gly Gln Thr Lys Asp Leu Gly
        270                 275                 280

cat gcg gag aag gac ttt gac gaa ctt aac tac agg gtc aag ggg gca   976
His Ala Glu Lys Asp Phe Asp Glu Leu Asn Tyr Arg Val Lys Gly Ala
    285                 290                 295

aac gct cga aca cgt cgc ctg ctt ggc aga taggcaagaa gcatatgttg     1026
Asn Ala Arg Thr Arg Arg Leu Leu Gly Arg
300                 305

ttcaccagag gattctgtga cactccttat cttctgcatt tgctttcgtg ggctgttaat 1086

tcagatcatt ttgtgcataa aactctggtt aggaaggtct gttggggagt tgtatcaggg 1146

tttattgtgt atatacgcta gacgggcggt tcgttttcta tgttgcagtt gtactacatt 1206

tgctatggac agtagatacg tttgtattcg gttttcttgt tttgcaatcg ctatgctgca 1266

ggaaagcac                                                        1275
```

<210> 44

<211> 309

<212> PRT

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 44

```
Met Ser Ala Thr Arg Pro Ser Phe Phe Pro Ser Asn Asn Asn Arg Asn
 1               5                  10                  15

Lys Pro Ala Thr Arg Asn Pro Phe Asp Ser Asp Ser Asp Asp Asp Gly
            20                  25                  30

Gly Met Ala Arg Arg Gly Pro Ala Arg Ala Ser Ser Val Pro Thr Pro
        35                  40                  45

Ala Ala Gly Pro Ala Arg Ala Ser Ser Ala Pro Ile Pro Ala Asp Glu
    50                  55                  60

Ala Asp Gln Arg Gly Ala Leu Phe Gly Ala Gly Pro Ala Pro Ser Gly
65                  70                  75                  80

Phe Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Arg Gly Arg Tyr Arg Asn Asp
                85                  90                  95

Phe Arg Asp Ser Gly Gly Val Glu Ala Gln Ser Val Gln Glu Leu Glu
            100                 105                 110

Gly Tyr Ala Ala Tyr Lys Ala Glu Glu Thr Thr Arg Arg Val Asp Gly
        115                 120                 125

Cys Leu Arg Val Ala Glu Glu Met Arg Asp Thr Ala Ser Lys Thr Leu
    130                 135                 140

Leu Gln Val His Gln Gln Gly Gln Gln Ile Arg Arg Thr His Ala Met
145                 150                 155                 160

Ala Val Asp Ile Asp Gln Asp Leu Ser Arg Gly Glu Lys Leu Leu Gly
                165                 170                 175

Asp Leu Gly Gly Leu Phe Ser Lys Lys Trp Lys Pro Lys Lys Asn Gly
            180                 185                 190

Ala Ile Arg Gly Pro Met Leu Thr Arg Asp Asp Ser Phe Ile Arg Lys
        195                 200                 205

Gly Ser His Met Glu Gln Arg His Lys Leu Gly Leu Ser Asp Arg Pro
    210                 215                 220

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

Glu Lys Val Glu Val Glu Lys Ala Lys Gln Asp Asp Gly Leu Ser Asp
                245                 250                 255

Leu Ser Asp Ile Leu Thr Glu Leu Lys Gly Met Ala Ile Asp Met Gly
            260                 265                 270

Thr Glu Ile Glu Gly Gln Thr Lys Asp Leu Gly His Ala Glu Lys Asp
        275                 280                 285

Phe Asp Glu Leu Asn Tyr Arg Val Lys Gly Ala Asn Ala Arg Thr Arg
    290                 295                 300

Arg Leu Leu Gly Arg
305
```