



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 833**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06023948 .0**

96 Fecha de presentación : **06.04.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1760146**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2007**

54 Título: **Proteínas proteína-quinasa relacionadas con el estrés y métodos de utilización en las plantas.**

30 Prioridad: **07.04.2000 US 196001 P**

73 Titular/es: **BASF Plant Science GmbH
Carl-Bosch-Strasse 38
67056 Ludwigshafen, DE**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.10.2010

72 Inventor/es: **Da Costa e Silva, Oswaldo;
Chen, Ruoying;
Bohnert, Hans J.;
Van Thielen, Nocha y
Sarria-Millan, Rodrigo**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.10.2010

74 Agente: **Lehmann Novo, María 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).

DESCRIPCIÓN

Proteínas proteína-quinasa relacionadas con el estrés y métodos de utilización en las plantas.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 Esta invención se refiere a células de plantas y plantas de monocotiledóneas o dicotiledóneas que comprenden un ácido nucleico que codifica CPK-2 que confiere tolerancia incrementada al estrés por sequía en comparación con una variedad de tipo salvaje de la célula o planta, y a métodos correspondientes.

Técnica anterior

15 Los estados de estrés ambiental abiótico, tales como estrés por sequía, estrés por salinidad, estrés por calor y estrés por frío, son factores limitantes importantes del crecimiento y la productividad de las plantas. Las pérdidas de cosechas y las pérdidas de rendimiento de cosecha en cosechas importantes tales como arroz, maíz dulce (maíz común) y trigo causadas por estos estados de estrés representan un factor económico y político importante y contribuyen a la escasez de alimentos en muchos países subdesarrollados.

20 Las plantas se ven expuestas típicamente durante su ciclo vital a condiciones de contenido de agua ambiental reducido. La mayoría de las plantas han desarrollado estrategias para protegerse a sí mismas contra estas condiciones de desecación. No obstante, si la severidad y duración de las condiciones de sequía son demasiado grandes, los efectos sobre el desarrollo, el crecimiento y el rendimiento de la mayoría de las plantas de cosecha son profundos. Adicionalmente, la mayoría de las plantas de cosecha son muy sensibles a concentraciones más altas de sal en el suelo. 25 La exposición continua a sequía y contenido elevado de sal causan alteraciones importantes en el metabolismo de las plantas. Estos grandes cambios en el metabolismo conducen finalmente a la muerte celular y por consiguiente a pérdidas de rendimiento.

30 El desarrollo de plantas tolerantes al estrés es una estrategia que tiene el potencial de resolver o mediar al menos algunos de estos problemas. Sin embargo, las estrategias tradicionales de reproducción de las plantas para desarrollar nuevas líneas de plantas que exhiban resistencia (tolerancia) a estos tipos de estrés son relativamente lentas y requieren líneas resistentes específicas para cruzamiento con la línea deseada. Los recursos limitados de germoplasma para tolerancia al estrés e incompatibilidad en los cruzamientos entre especies de plantas remotamente emparentadas representan problemas importantes encontrados en la reproducción convencional. Adicionalmente, los procesos celulares que conducen a la tolerancia a la sequía, el frío y la sal en plantas modelo tolerantes a la sequía y/o la sal son de 35 naturaleza compleja e implican mecanismos múltiples de adaptación celular y numerosos caminos metabólicos. Esta naturaleza multi-componente de la tolerancia al estrés no sólo ha hecho infructuosa en gran parte la reproducción orientada a la tolerancia, sino que ha limitado también la posibilidad de modificar por bioingeniería plantas tolerantes al estrés utilizando métodos biotecnológicos.

40 Los estados de estrés por sequía, frío y sal tienen un tema común importante para el crecimiento de las plantas, que es la disponibilidad de agua. Las plantas se ven expuestas durante todo su ciclo vital a condiciones de contenido de agua reducido en el medio ambiente. La mayoría de las plantas han desarrollado estrategias para protegerse a sí mismas contra estas condiciones de desecación. No obstante, si la severidad y duración de las condiciones de sequía son demasiado grandes, los efectos sobre el desarrollo de las plantas, el crecimiento y el rendimiento de la mayoría de las plantas de cosecha son profundos. Dado que un contenido elevado de sal en algunos suelos da como resultado menos agua disponible para captura por las células, su efecto es similar a los observados en condiciones de sequía. Adicionalmente, a temperaturas de helada, las células vegetales pierden agua como resultado de la formación de hielo 50 que comienza en el apoplasto y sustrae agua del simplasto. Por regla general, los mecanismos de respuesta molecular de una planta a cada una de estas condiciones de estrés son comunes, y las proteína-quinasas juegan un papel esencial en estos mecanismos moleculares.

55 Las proteína-quinasas representan una super-familia y los miembros de esta familia catalizan la transferencia reversible de un grupo fosfato del ATP a las cadenas laterales de los aminoácidos serina, treonina y tirosina en las proteínas diana. Las proteína-quinasas son elementos primarios en los procesos de señalización de las plantas y se ha informado que desempeñan papeles cruciales en la percepción y transducción de señales que permiten que una célula (y la planta) respondan a los estímulos ambientales. En particular, las proteína-quinasas receptoras (RPKs) representan un grupo de proteína-quinasas que activan un sistema complejo de caminos de señalización intracelulares en respuesta al ambiente 60 extracelular (Van der Gear *et al.*, 1994 Annu. Rev. Cell Biol. 10: 251-337). Las RPKs son proteínas transmembranales de un solo paso que contienen una secuencia señal amino-terminal, dominios extracelulares singulares para cada receptor, y un dominio citoplásmico de quinasa. La fijación de ligandos induce la homo- o hetero-dimerización de las RPKs, y la proximidad estrecha resultante de los dominios citoplásmicos da como resultado la activación de las quinazas por transfosforilación. Aunque las plantas tienen muchas proteínas similares a RPKs, no se ha identificado 65 ligando alguno para estas quinazas semejantes a receptores (RLKs). La mayoría de las RLKs de las plantas que se han identificado pertenecen a la familia de las serina/treonina (Ser/Thr)-quinazas, y la mayor parte de ellas tienen repeticiones extracelulares ricas en leucina (Becraft, PW. 1998, Trends Plant Sci. 3: 384-388).

Otro tipo de proteína-quinasa es la proteína-quinasa dependiente de Ca^{2+} (CDPK). Este tipo de quinasa tiene un dominio semejante a calmodulina en el término COOH, que permite la respuesta a señales de Ca^{2+} directamente sin que esté presente calmodulina. Normalmente, las CDPKs son las proteína-quinasas Ser/Thr más predominantes encontradas en las plantas superiores. Aunque sus papeles fisiológicos siguen sin estar claros, las mismas son inducidas por frío, sequía y ácido abscísico (ABA) (Knight *et al.*, 1991 Nature 352:524; Schroeder, JI y Thuleau, P., 1991 Plant Cell 3: 555; Bush, D.S., 1995 Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol. 46: 95; Urao, T. *et al.*, 1994 Mol. Gen. Genet. 244: 331).

Otro tipo de mecanismo de señalización implica miembros de la familia de las proteína-quinasas SNF1 serina/treonina conservadas. Estas quinasas juegan papeles esenciales en la señalización de glucosa y estrés de los eucariotas. Las quinasas semejantes a SNF1 de las plantas participan en el control de enzimas metabólicas fundamentales, que incluyen HMGR, nitrato-reductasa, sacarosa-sintasa, y sacarosa-fosfato-sintasa (SPS). Datos genéticos y bioquímicos indican que la regulación dependiente del azúcar de las quinasas SMF1 implica varios otros componentes sensoriales y de señalización en levaduras, plantas y animales.

Adicionalmente, miembros de la familia de las Proteína-Quinasas Activadas por Mitógenos (MAPK) han sido implicados en las acciones de numerosos estados de estrés ambiental en animales, levaduras y plantas. Se ha demostrado que tanto la actividad de las quinasas semejantes a MAPK como los niveles de mRNA de los componentes de las cascadas de MAPK aumentan en respuesta al estrés ambiental y a la transducción de señales hormonales de las plantas. Las quinasas MAP son componentes de cascadas secuenciales de quinasas, que son activadas por fosforilación de residuos treonina y tirosina por quinasas intermedias de tipo MAP-quinasa situadas aguas arriba (MAPKKs). Las MAPKKs son activadas en sí mismas por fosforilación de residuos serina y treonina por quinasas situadas aguas arriba (MAPKKKs). Cierta número de genes de MAP-quinasa han sido consignados en plantas superiores.

WO 98/26045 describe métodos para aumentar la tolerancia de una planta al estrés ambiental.

Urao, T. *et al.*; MGG (1994), 244, 4, pp. 331-340 describe dos genes que codifican enfermedades de proteínas dependientes de Ca^{2+} que son inducidas por estados de estrés debidos a sequía y concentraciones altas de sal en *Arabidopsis thaliana*.

Nishiyama, R., *et al.*, Plant Cell Physiol. (1999), 40, 2, pp. 205-212 describe especies de mRNA que codifican proteína-quinasas dependientes de calcio que se expresan distintamente en los órganos sexuales de *Marchantia polymorpha* por remodelación alternativa.

Sumario de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones.

Esta invención satisface en parte la necesidad de identificar una nueva proteína-quinasa singular capaz de conferir tolerancia a la sequía a las plantas por sobre-expresión. La presente invención proporciona una célula de planta monocotiledónea o dicotiledónea transformada por un ácido nucleico codificante de una Proteína Proteína-Quinasa Relacionada con el Estrés (PKSRP), en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la célula de la planta da como resultado una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una variedad de tipo salvaje de la célula vegetal. A saber, en esta memoria se describe la proteína-quinasa siguiente: proteína-quinasa dependiente de calcio (CDPK-2) de *Physcomitrella patens*. De acuerdo con la invención, la PKSRP es afín a CDPK-2 como se define en SEQ ID NO:39 o SEQ ID NO:26.

El ácido nucleico y la proteína son de una *Physcomitrella patens*. La invención estipula que el estrés ambiental es sequía.

La invención proporciona adicionalmente una semilla producida por una planta transgénica transformada por un ácido nucleico codificante de PKSRP, en donde la planta es mejora genética auténtica para tolerancia incrementada al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta. La invención proporciona adicionalmente una semilla producida por una planta transgénica que expresa una PKSRP, en donde la planta es mejora genética auténtica para tolerancia incrementada al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta.

Se describe adicionalmente un producto agrícola producido por cualquiera de las plantas, partes de plantas o semillas transgénicas descritas más adelante. La invención proporciona adicionalmente una PKSRP aislada como se describe más adelante. La invención proporciona adicionalmente un ácido nucleico codificante de PKSRP aislado, en donde el ácido nucleico codificante de PKSRP codifica una PKSRP como se describe más adelante.

La invención proporciona adicionalmente un vector de expresión recombinante aislado que comprende un ácido nucleico codificante de PKSRP como se describe más adelante, en donde la expresión del vector en una célula hospedadora da como resultado una tolerancia incrementada al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo salvaje de la célula hospedadora. La invención proporciona adicionalmente una célula hospedadora que contiene el vector y una planta que contiene la célula hospedadora.

La invención proporciona adicionalmente un método de producción de una planta transgénica con un ácido nucleico codificante de PKSRP, en donde la expresión del ácido nucleico en la planta da como resultado una tolerancia incrementada al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta que comprende: (a) transformar una célula vegetal con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico codificante de PKSRP, y (b) generar a partir de la célula vegetal una planta transgénica con una tolerancia incrementada al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta. En realizaciones preferidas, la PKSRP y el ácido nucleico codificante de PKSRP son como se describe más adelante.

La presente invención proporciona adicionalmente un método de identificación de una nueva PKSRP, que comprende (a) generar una respuesta específica de anticuerpos para una PKSRP, o fragmento de la misma, como se describe más adelante; (b) cribar material supuesto de PKSRP con el anticuerpo, en donde la fijación específica del anticuerpo al material indica la presencia de una PKSRP potencialmente nueva; y (c) identificar a partir del material fijado una PKSRP nueva en comparación con PKSRPs conocidas. Alternativamente, la hibridación con sondas de ácido nucleico como se describe más adelante puede utilizarse para identificar nuevos ácidos nucleicos de PKSRP.

La presente invención proporciona también métodos de modificación de la tolerancia al estrés de una planta que comprenden modificar la expresión de un ácido nucleico de PKSRP en la planta, en donde la PKSRP es como se describe más adelante. La invención estipula que este método puede realizarse de tal modo que la tolerancia al estrés se aumente o se reduzca. Preferiblemente, se incrementa la tolerancia al estrés en una planta por aumento de la expresión de un ácido nucleico de PKSRP.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1(A-M) muestran las secuencias parciales de cDNA de CPK-2 (SEQ ID NO: 1), PK-7 (SEQ ID NO: 2), PK-8 (SEQ ID NO: 3), PK-9 (SEQ ID NO: 4), CK-1 (SEQ ID NO: 5), CK-2 (SEQ ID NO: 6), CK-3 (SEQ ID NO: 7), MPK-2 (SEQ ID NO: 8), MPK-3 (SEQ ID NO: 9), MPK-4 (SEQ ID NO: 10), MPK-5 (SEQ ID NO: 11), CPK-1 (SEQ ID NO: 12) para comparación y CPK-2 (SEQ ID NO: 13) de *Physcomitrella patens*.

Las Figuras 2(A-M) muestran las secuencias de longitud total de cDNA de CPK-2 (SEQ ID NO: 26), PK-7 (SEQ ID NO: 15), PK-8 (SEQ ID NO: 16), PK-9 (SEQ ID NO: 17), CK-1 (SEQ ID NO: 18), CK-2 (SEQ ID NO: 19), CK-3 (SEQ ID NO: 20), MPK-2 (SEQ ID NO: 21), MPK-3 (SEQ ID NO: 22), MPK-4 (SEQ ID NO: 23), MPK-5 (SEQ ID NO: 24), CPK-1 (SEQ ID NO: 25) para comparación y CPK-2 (SEQ ID NO: 26) de *Physcomitrella patens*.

Las Figuras 3(A-M) muestran las secuencias de aminoácidos deducidas de CPK-2 (SEQ ID NO: 39), PK-7 (SEQ ID NO: 28), PK-8 (SEQ ID NO: 29), PK-9 (SEQ ID NO: 30), CK-1 (SEQ ID NO: 31), CK-2 (SEQ ID NO: 32), CK-3 (SEQ ID NO: 33), MPK-2 (SEQ ID NO: 34), MPK-3 (SEQ ID NO: 35), MPK-4 (SEQ ID NO: 36), MPK-5 (SEQ ID NO: 37), CPK-1 (SEQ ID NO: 38) para comparación y CPK-2 (SEQ ID NO: 39) de *Physcomitrella patens*.

La Figura 4 muestra un diagrama del vector de expresión de plantas pBPSSC022 que contiene el super-promotor que dirige la expresión de SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 para comparación y 26 ("Desired Gene"). Los componentes son: gen NPTII de resistencia a la kanamicina (Bevan M, Nucleic Acids Res. 26: 8711-21, 1984), promotor AtAct2-i (An YQ *et al.*, Plant J. 10: 107-121, 1996), terminador OCS3 (During K, Transgenic Res. 3: 138-140, 1994), terminador NOSpA (Jefferson *et al.*, EMBO J 6: 3901-7, 1987).

La Figura 5 muestra los resultados de un ensayo de estrés por sequía con plantas transgénicas que sobre-expresan PpPK-6 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

La Figura 6 muestra los resultados de un ensayo de estrés por sequía con plantas transgénicas que sobre-expresan PpPK-7 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

La Figura 7 muestra los resultados de un ensayo de estrés por helada con plantas transgénicas que sobre-expresan PpPK-7 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

La Figura 8 muestra los resultados de un ensayo de estrés por sequía con plantas transgénicas que sobre-expresan PpPK-9 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

La Figura 9 muestra los resultados de un ensayo de estrés por helada con plantas transgénicas que sobre-expresan PpPK-9 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

La Figura 10 muestra los resultados de un ensayo de estrés por sequía con plantas transgénicas que sobre-expresan PpCK-1 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

La Figura 11 muestra los resultados de un ensayo de estrés por helada con plantas transgénicas que sobre-expresan PpCK-1 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

5 La Figura 12 muestra los resultados de un ensayo de estrés por sequía con plantas transgénicas que sobre-expresan PpCK-2 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

10 La Figura 13 muestra los resultados de un ensayo de estrés por sequía con plantas transgénicas que sobre-expresan PpCK-3 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

15 La Figura 14 muestra los resultados de un ensayo de estrés por sequía con plantas transgénicas que sobre-expresan PpMPK-2 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

20 La Figura 15 muestra los resultados de un ensayo de estrés por helada con plantas transgénicas que sobre-expresan PpMPK-2 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

La Figura 16 muestra los resultados de un ensayo de estrés por sequía con plantas transgénicas que sobre-expresan PpMPK-3 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

25 La Figura 17 muestra los resultados de un ensayo de estrés por helada con plantas transgénicas que sobre-expresan PpMPK-3 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

30 La Figura 18 muestra los resultados de un ensayo de estrés por sequía con plantas transgénicas que sobre-expresan PpMPK-4 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

35 La Figura 19 muestra los resultados de un ensayo de estrés por sequía con plantas transgénicas que sobre-expresan PpCK-5 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

40 La Figura 20 muestra los resultados de un ensayo de estrés por sequía con plantas transgénicas que sobre-expresan PpCPK-1 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (para comparación).

La Figura 21 muestra los resultados de un ensayo de estrés por sequía con plantas transgénicas que sobre-expresan PpCPK-2 y líneas de tipo salvaje de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas exhiben un fenotipo tolerante. Se muestran líneas transformantes individuales (inventiva).

45 Descripción detallada de la invención

La presente invención puede comprenderse más fácilmente por referencia a la descripción detallada que sigue de las realizaciones preferidas de la invención.

50 La presente invención proporciona una célula vegetal de una monocotiledónea o dicotiledónea transformada por un ácido nucleico codificante de PKSRP, en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la célula de la planta da como resultado una tolerancia incrementada al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo salvaje de la célula de la planta. La invención proporciona adicionalmente partes de plantas transgénicas y plantas transgénicas que contienen las células vegetales descritas en esta memoria. Se proporciona también una semilla de
55 planta producida por una planta transgénica transformada por un ácido nucleico codificante de PKSRP, en donde la semilla contiene el ácido nucleico codificante de PKSRP, y en donde la planta es mejora genética auténtica para tolerancia incrementada al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta. La invención proporciona adicionalmente una semilla producida por una planta transgénica que expresa una PKSRP, en donde la semilla contiene la PKSRP, y en donde la planta es mejora genética auténtica para tolerancia incrementada al estrés
60 ambiental en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta. Se describe también un producto agrícola producido por cualquiera de las plantas, partes de plantas y semillas de plantas transgénicas descritas más adelante.

65 Como se utiliza en esta memoria, el término “variedad” se refiere a un grupo de plantas dentro de una especie que comparten caracteres constantes que las separan de la forma típica y de otras posibles variedades en dicha especie. Si bien posee al menos un rasgo distintivo, una variedad se caracteriza también por cierta variación entre los individuos comprendidos en la variedad, basada fundamentalmente en la segregación mendeliana de rasgos entre la progenie de generaciones sucesivas. Una variedad se considera “mejora genética auténtica” para un rasgo particular si la misma es genéticamente homocigótica para dicho rasgo en tal grado que, cuando la variedad de mejora genética auténtica se

auto-poliniza, no se observa una cantidad importante de segregación independiente del rasgo entre la progenie. En la presente invención, el rasgo procede de la expresión transgénica de una o más secuencias de DNA introducidas en una variedad de planta.

La presente invención describe por primera vez que la PKSRP CPK-2 de *Physcomitrella patens* es útil para aumentar la tolerancia de una planta al estrés ambiental. De acuerdo con ello, la presente invención proporciona una PKSRP aislada, a saber CPK-2 y homólogos de la misma. La PKSRP es la proteína proteína-quinasa-2 dependiente de calcio (CPK-2) como se define en SEQ ID NO: 39, y homólogos y ortólogos de la misma. A continuación se definen homólogos y ortólogos de las secuencias de aminoácidos.

Las PKSRPs de la presente invención se producen con preferencia por técnicas de DNA recombinante. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína se somete a clonación en un vector de expresión (como se describe más adelante), se introduce el vector de expresión en una célula hospedadora (como se describe más adelante) y se expresa la PKSRP en la célula hospedadora. La PKSRP puede aislarse luego de las células por un esquema de purificación apropiado utilizando técnicas estándar de purificación de proteínas. Alternativamente a la expresión recombinante, un polipéptido o péptido PKSRP puede sintetizarse químicamente utilizando técnicas estándar de síntesis de péptidos. Además, la PKSRP nativa puede aislarse de células (v.g., *Physcomitrella patens*), por ejemplo utilizando un anticuerpo anti-PKSRP, que puede producirse por técnicas estándar utilizando una PKSRP o fragmento de la misma.

La invención proporciona adicionalmente un ácido nucleico codificante de PKSRP aislado. La presente invención incluye ácidos nucleicos codificantes de PKSRP que codifican PKSRP como se describe en esta memoria. En realizaciones preferidas, el ácido nucleico codificante de PKSRPs es ácido nucleico de la proteína quinasa-2 (CPK-2) dependiente de calcio como se define en SEQ ID NO: 26 y homólogos y ortólogos del mismo. Homólogos y ortólogos de las secuencias de nucleótidos se definen más adelante. En una realización preferida, el ácido nucleico y la proteína se aíslan del género de plantas *Physcomitrella*. En otra realización preferida, el ácido nucleico y la proteína son de una planta *Physcomitrella patens* (*P. patens*).

Como se utiliza en esta memoria, el término “estrés ambiental” hace referencia a cualquier condición de crecimiento sub-óptima e incluye, pero sin carácter limitante, condiciones sub-óptimas asociadas con sequía.

Debe entenderse también que tal como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, “un” o “uno” puede significar uno o más, dependiendo del contexto en el que se utilice. Así, por ejemplo, la referencia a “una célula” puede significar que puede utilizarse al menos una célula.

Como se utilizan también en esta memoria, debe entenderse que los términos “ácido nucleico” y “molécula de ácido nucleico” incluyen moléculas de DNA (v.g., cDNA o DNA genómico) y moléculas de RNA (v.g., mRNA) y análogos del DNA o RNA generados utilizando análogos de nucleótidos. Este término abarca también secuencias no traducidas localizadas en ambos extremos 3' y 5' de la región codificante del gen: al menos aproximadamente 1000 nucleótidos de secuencia aguas arriba del extremo 5' de la región codificante y al menos aproximadamente 200 nucleótidos de la secuencia aguas abajo del extremo 3' de la región codificante del gen. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero con preferencia es DNA bicatenario.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una que está separada sustancialmente de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Con preferencia, un ácido nucleico “aislado” está exento de algunas de las secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el DNA genómico del organismo del que se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico de PKSRP aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el DNA genómico de la célula de la que se deriva el ácido nucleico (v.g., una célula de *Physcomitrella patens*). Además, una molécula de ácido nucleico “aislada”, tal como una molécula de cDNA, puede estar exenta de algo del material celular restante con el que está asociada naturalmente, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, v.g. una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 26, o una porción de la misma, puede aislarse utilizando técnicas estándar de biología molecular y la información de secuencias proporcionada en esta memoria. Por ejemplo, un cDNA de PKSRP de *P. patens* puede aislarse a partir de una biblioteca de *P. patens* utilizando la totalidad o una porción de la secuencia de SEQ ID NO: 13.

Además, una molécula de ácido nucleico que abarca la totalidad o una porción de la secuencia SEQ ID NO: 13 puede aislarse por la reacción en cadena de la polimerasa utilizando iniciadores oligonucleotídicos diseñados sobre la base de esta secuencia. Por ejemplo, puede aislarse mRNA a partir de células vegetales (v.g., por el procedimiento de extracción con tiocianato de guanidinio de Chirgwin *et al.*, 1979 *Biochemistry* 18: 5294-5299) y puede prepararse cDNA utilizando transcriptasa inversa (v.g., transcriptasa inversa de MLV de Moloney, disponible de Gibco/BRL, Bethesda, MD; o transcriptasa inversa de AMV, disponible de Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Pueden diseñarse iniciadores oligonucleotídicos sintéticos para amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa ba-

sándose en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 13. Una molécula de ácido nucleico de la invención puede amplificarse utilizando cDNA o, alternativamente, DNA genómico, como molde e iniciadores oligonucleotídicos apropiados de acuerdo con técnicas estándar de amplificación por PCR. La molécula de ácido nucleico así amplificada puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de la secuencia de DNA. Adicionalmente, pueden prepararse oligonucleótidos correspondientes a una secuencia de nucleótidos de PKSRR por técnicas estándar de síntesis, v.g., utilizando un sintetizador automático de DNA.

En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 26. Estos cDNA comprenden secuencias que codifican las PKSRRs (es decir, la “región codificante”, indicada en la Tabla 1), así como secuencias 5’ no traducidas y secuencias 3’ no traducidas. Debe entenderse que SEQ ID NO: 26 comprende a la vez las regiones codificantes 5’ y 3’ no traducidas. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden comprender solamente la región codificante de la secuencia en SEQ ID NO: 26, o pueden contener fragmentos genómicos enteros aislados del DNA genómico. Una región codificante de estas secuencias se indica como “posición ORF”. La presente invención incluye también ácidos nucleicos codificantes de PKSRR que codifican PKSRRs como se describen en esta memoria. Se prefiere un ácido nucleico codificante de PKSRR que codifica una PKSRR que es CPK-2 (SEQ ID NO:39).

Además, la molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender solamente una porción de la región codificante de la secuencia en SEQ ID NO: 26, por ejemplo, un fragmento que puede utilizarse como sonda o iniciador o un fragmento que codifica una porción biológicamente activa de una PKSRR. Las secuencias de nucleótidos determinadas por la clonación de los genes PKSRR de *P. patens* permiten la generación de sondas e iniciadores diseñados para uso en la identificación y/o clonación de homólogos de PKSRR en otros tipos de células y organismos, así como homólogos de PKSRR de otros musgos y especies afines.

Las porciones de proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico de PKSRR son con preferencia porciones biológicamente activas de una de las PKSRRs descritas en esta memoria. Tal como se utiliza en esta memoria, el término “porción biológicamente activa de” una PKSRR tiene por objeto incluir una porción, v.g., un dominio/motivo, de una PKSRR que participa en una respuesta de tolerancia al estrés en una planta, tiene una actividad como se indica en la Tabla 1, o participa en la transcripción de una proteína implicada en una respuesta de tolerancia al estrés en una planta. Para determinar si una PKSRR, o una porción biológicamente activa de la misma, puede participar en la transcripción de una proteína implicada en una respuesta de tolerancia al estrés en una planta, o si la represión de una PKSRR da como resultado una tolerancia incrementada al estrés en una planta, puede realizarse un análisis de estrés de una planta que comprende la PKSRR. Métodos de análisis de este tipo son bien conocidos por los expertos en la técnica, como se detalla en el Ejemplo 7. De modo más específico, fragmentos de ácido nucleico que codifican porciones biológicamente activas de una PKSRR pueden prepararse por aislamiento de una porción de la secuencia SEQ ID NO: 39, que expresa la porción codificada de la PKSRR o el péptido (v.g., por expresión recombinante *in vitro*) y evaluación de la actividad de la porción codificada de la PKSRR o el péptido.

Se contemplan en la presente invención porciones biológicamente activas de una PKSRR, e incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de aminoácidos de una PKSRR, v.g., una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, o la secuencia de aminoácidos de una proteína homóloga a una PKSRR, que incluyen menos aminoácidos que una PKSRR de longitud total o la proteína de longitud total que es homóloga a una PKSRR, y exhiben al menos una actividad de una PKSRR. Típicamente, porciones biológicamente activas (v.g., péptidos que tienen, por ejemplo, una longitud de 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100, o más aminoácidos) comprenden un dominio o motivo que tiene al menos una actividad de PKSRR. Además, otras porciones biológicamente activas en las cuales están delecionadas otras regiones de la proteína, pueden prepararse por técnicas recombinantes y evaluarse respecto a una o más de las actividades descritas en esta memoria. Con preferencia, las porciones biológicamente activas de una PKSRR incluyen uno o más dominios/motivos seleccionados o porciones de los mismos que tienen actividad biológica.

La invención proporciona también proteínas PKSRR quiméricas o de fusión. Como se utiliza en esta memoria, una “proteína quimérica” o “proteína de fusión” PKSRR comprende un polipéptido de PKSRR enlazado operativamente a un polipéptido distinto de PKSRR. Un polipéptido de PKSRR hace referencia a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a una PKSRR, mientras que un polipéptido distinto de PKSRR hace referencia a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a una proteína que no es sustancialmente homóloga a la PKSRR, v.g., una proteína que es diferente de la PKSRR y se deriva del mismo organismo o de un organismo diferente. Dentro de la proteína de fusión, el término “enlazado operativamente” tiene por objeto indicar que el polipéptido PKSRR y el polipéptido distinto de PKSRR están fusionados uno a otro de tal manera que ambas secuencias cumplen la función propuesta atribuida a la secuencia utilizada. El polipéptido distinto de PKSRR puede fusionarse al término N o al término C del polipéptido PKSRR. Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión GST-PKSRR en donde las secuencias de PKSRR están fusionadas al término C de las secuencias de GST. Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de PKSRRs recombinantes. En otra realización, la proteína de fusión es una PKSRR que contiene una secuencia señal heteróloga en su término N. En ciertas células hospedadoras (v.g., células hospedadoras de mamífero), la expresión y/o secreción de una PKSRR puede incrementarse por el uso de una secuencia señal heteróloga.

Con preferencia, una proteína PKSRR quimérica o de fusión de la invención se produce por técnicas estándar de DNA recombinante. Por ejemplo, fragmentos de DNA que codifican las secuencias polipeptídicas diferentes se

ligan uno a otro en marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo empleando extremos romos o con extremos cohesivos para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar términos apropiados, rellenado de extremos cohesivos en caso apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar unión indeseable y ligación enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales que incluyen sintetizadores automáticos de DNA. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo utilizando iniciadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de gen consecutivos que pueden reasociarse y re-amplificarse subsiguientemente para generar una secuencia de gen quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, compiladores Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons: 1992). Además, están disponibles comercialmente muchos vectores de expresión que codifican ya un resto de fusión (v.g., un polipéptido de GST). Un ácido nucleico codificante de PKSRP puede clonarse en un vector de expresión de este tipo de tal manera que el resto de fusión está enlazado en marco a la PKSRP.

Además de fragmentos y proteínas de fusión de las PKSRPs descritas en esta memoria, la presente invención incluye homólogos y análogos de PKSRPs existentes naturalmente y ácidos nucleicos codificantes de PKSRP en una planta. Los “homólogos” se definen en esta memoria como dos ácidos nucleicos o proteínas que tienen secuencias similares, u “homólogas”, de nucleótidos o aminoácidos, respectivamente. Los homólogos incluyen variantes alélicas, ortólogos, parálogos, agonistas y antagonistas de PKSRPs como se definen más adelante. El término “homólogo” abarca adicionalmente moléculas de ácido nucleico que difieren de las secuencias de nucleótidos que se muestran en SEQ ID NO: 26 (y porciones de las mismas) debido a la degeneración del código genético y codifican por tanto la misma PKSRP que la codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 26. Como se utiliza en esta memoria, una PKSRP “existente naturalmente” hace referencia a una secuencia de aminoácidos de PKSRP que existe en la naturaleza. Con preferencia, una PKSRP existente naturalmente comprende una secuencia de aminoácidos que es SEQ ID NO: 39.

Un agonista de la PKSRP puede retener sustancialmente las mismas, o un subconjunto, de las actividades biológicas de las PKSRP. Un antagonista de la PKSRP puede inhibir una o más de las actividades de la forma existente naturalmente de la PKSRP. Por ejemplo, el antagonista de PKSRP puede fijarse competitivamente a un miembro de aguas abajo o aguas arriba de la cascada metabólica de componentes de la membrana celular que incluye la PKSRP, o fijarse a una PKSRP que media el transporte de compuestos a través de tales membranas, previniendo de este modo que tenga lugar translocación.

Moléculas de ácido nucleico correspondientes a variantes alélicas naturales y análogos, ortólogos y parálogos de un cDNA de PKSRP pueden aislarse sobre la base de su identidad con los ácidos nucleicos de PKSRP de *Physcomitrella patens* descritos en esta memoria utilizando cDNAs de PKSRP, o una porción de los mismos, como sonda de hibridación de acuerdo con técnicas estándar de hibridación en condiciones de hibridación severas. En una realización alternativa, pueden identificarse homólogos de la PKSRP por cribado de bibliotecas combinatorias de mutantes, v.g., mutantes de truncación, de la PKSRP en cuanto a actividad agonista o antagonista de PKSRP. En una realización, se genera una biblioteca diversificada de variantes de PKSRP por mutagénesis combinatoria al nivel del ácido nucleico y se codifica por una biblioteca diversificada de genes. Una biblioteca diversificada de variantes de PKSRP puede producirse mediante, por ejemplo, ligación enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de tal modo que una serie degenerada de secuencias potenciales de PKSRP puede expresarse como polipéptidos individuales, o alternativamente, como una serie de proteínas de fusión mayores (v.g., para presentación de fago) que contienen la serie de secuencias de PKSRP en ellas. Existe una diversidad de métodos que pueden utilizarse para producir bibliotecas de homólogos potenciales de PKSRP a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia de genes degenerada puede realizarse en un sintetizador automático de DNA, y el gen sintético se liga luego a un vector de expresión apropiado. El uso de una serie degenerada de genes permite la provisión, en una sola mezcla, de la totalidad de las secuencias que codifican la serie deseada de secuencias potenciales de PKSRP. Métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (véase, v.g., Narang, S.A., 1983 Tetrahedron 39: 3; Itakura *et al.*, 1984 Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura *et al.*, 1984 Science 198: 1056; Ike *et al.*, 1983 Nucleic Acids Res. 11: 477).

Adicionalmente, pueden utilizarse bibliotecas de fragmentos de las regiones codificantes de PKSRP para generar una población diversificada de fragmentos de PKSRP para cribado y selección subsiguiente de homólogos de una PKSRP. En una realización, puede generarse una biblioteca de fragmentos de secuencia codificante por tratamiento de un fragmento de PCR bicatenario de una secuencia codificante de PKSRP con una nucleasa en condiciones en las cuales se produce mellado sólo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalización del DNA bicatenario, renaturalización del DNA para formar DNA bicatenario, lo que puede incluir pares sentido/antisentido de productos mellados diferentes, eliminación de porciones monocatenarias a partir de los dúplex reformados por tratamiento con nucleasa S1, y ligación de la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Por este método, puede derivarse una biblioteca de expresión que codifica fragmentos N-terminales, C-terminales e internos de diversos tamaños de la PKSRP.

Se conocen en la técnica varios métodos para cribar productos génicos de bibliotecas combinatorias producidas por mutaciones puntuales o truncación, y para cribar bibliotecas de cDNA respecto a productos génicos que tengan una propiedad seleccionada. Dichas técnicas son adaptables para cribado rápido de las bibliotecas de genes generadas por la mutagénesis combinatoria de homólogos de PKSRP. Las técnicas utilizadas más ampliamente, que son susceptibles de análisis de alta capacidad, para cribado de grandes bibliotecas de genes, incluyen típicamente clonación de la biblioteca de genes en vectores de expresión replicables, transformación de células apropiadas con la biblioteca de

vectores resultante, y expresión de los genes combinatorios en condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se ha detectado. La mutagénesis recurrente de conjunto (REM), una nueva técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, puede utilizarse en combinación con los ensayos de cribado para identificar homólogos de PKSRP (Arkin y Yourvan, 1992 PNAS 89: 7811-7815; Delgrave *et al.*, 1993 Protein Engineering 6(3): 327-331). En otra realización, pueden aprovecharse ensayos basados en células para analizar una biblioteca diversificada de PKSRP, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Se proporciona adicionalmente un método de identificación de una nueva PKSRP, que comprende (a) generar una respuesta de anticuerpos específica para una PKSRP, o un fragmento de la misma, como se describe en esta memoria; (b) cribar material PKSRP supuesto con el anticuerpo, en donde la fijación específica del anticuerpo al material indica la presencia de una PKSRP potencialmente nueva; y (c) analizar el material fijado en comparación con PKSRP conocida, para determinar su novedad.

Para determinar el porcentaje de homología de dos secuencias de aminoácidos (v.g., de la secuencia SEQ ID NO: 39 y una forma mutante de la misma), se alinean las secuencias para propósitos óptimos de comparación (v.g., pueden introducirse lagunas en la secuencia de una proteína o ácido nucleico para alineación óptima con la otra proteína o el otro ácido nucleico). Se comparan luego los residuos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en una secuencia (v.g., de la secuencia SEQ ID NO: 39) está ocupada por el mismo residuo de aminoácido que la posición correspondiente en la otra secuencia (v.g., una forma mutante de la secuencia del polipéptido de SEQ ID NO: 39), entonces las moléculas son homólogas en dicha posición (es decir, tal como se utiliza en esta memoria, "homología" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "identidad" de aminoácido o ácido nucleico). El mismo tipo de comparación puede hacerse entre dos secuencias de ácido nucleico.

El porcentaje de homología entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = números de posiciones idénticas/números de posiciones totales x 100). Con preferencia, las secuencias de aminoácidos incluidas en la presente invención son aproximadamente al menos 70-80%, 80-90%, 90-95%, y de modo más preferible al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o más homólogas a una secuencia entera de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 39. En otra realización adicional, al menos aproximadamente 70-80%, 80-90%, 90-95%, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o más homólogas a una secuencia entera de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico que se muestra en SEQ ID NO: 26.

En otras realizaciones, la longitud preferible de comparación de secuencias para las proteínas es al menos 15 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 25 residuos de aminoácido y muy preferiblemente al menos 35 residuos de aminoácido.

En otra realización preferida, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que es 90-95%, y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga a una secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO: 26, o una porción de la misma. La longitud preferible de comparación de secuencias para ácidos nucleicos es al menos 75 nucleótidos, más preferiblemente al menos 100 nucleótidos y muy preferiblemente la longitud entera de la región codificante.

Es asimismo preferible que la molécula de ácido nucleico homóloga de la invención codifique una proteína o porción de la misma que incluye una secuencia de aminoácidos que es suficientemente homóloga a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 39, de tal modo que la proteína o porción de la misma mantiene la misma o similar función que la secuencia de aminoácidos con la que se compara. Funciones de las secuencias de aminoácidos de PKSRP de la presente invención incluyen la capacidad de participar en una respuesta de tolerancia al estrés en una planta, o más particularmente, para participar en la transcripción de una proteína implicada en una respuesta de tolerancia al estrés en una planta *Physcomitrella patens*. Ejemplos de tales actividades se describen en la Tabla 1.

Además de los métodos arriba descritos, una determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias puede realizarse utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido y no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877). Un algoritmo de este tipo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.* (1990 J. Mol. Biol. 215: 403-410).

Las búsquedas de ácidos nucleicos BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, registro = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de ácido nucleico homólogas a las moléculas de ácido nucleico de PKSRP de la invención. Adicionalmente, las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, registro = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las PKSRPs de la presente invención. Para obtener alineaciones que incluyen lagunas para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.* (1997 Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden utilizarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (v.g., XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers and Millar (CABIOS 1989). Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que forma parte del paquete de soporte lógico de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparación de secuencias de aminoácidos, pueden utilizarse una tabla de residuos de peso PAM120, una penalidad por longitud de laguna de 12 y una penalidad por laguna de 4 a fin de obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las PKSRPs de la presente invención. Para obtener alineaciones que incluyen lagunas

para fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.* (1997 Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden utilizarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (v.g., XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers and Millar (CABIOS 5 1989). Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que forma parte del paquete de soporte lógico de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparación de secuencias de aminoácidos, pueden utilizarse una tabla de residuos de peso PAM120, una penalidad por longitud de laguna de 12 y una penalidad por laguna de 4.

10 Por último, puede determinarse también la homología entre secuencias de ácido nucleico utilizando métodos de hibridación conocidos por los expertos en la técnica. De acuerdo con ello, una molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida, v.g. se hibrida en condiciones severas, a la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 26, o una porción de la misma. De modo más particular, una molécula de ácido nucleico aislada tiene al menos 15 nucleótidos de longitud y se hibrida en condiciones severas a la molécula 15 de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 26. En otras realizaciones, el ácido nucleico tiene al menos 30, 50, 100, 250 o más nucleótidos de longitud.

Como se utiliza en esta memoria, el término “se hibrida en condiciones severas” tiene por objeto describir condiciones para hibridación y lavado en las cuales las secuencias de nucleótidos que tienen al menos una homología de 20 60% entre sí se mantienen típicamente hibridadas una a otra. Con preferencia, las condiciones son tales que secuencias que son al menos aproximadamente 65%, de modo más preferible al menos aproximadamente 70%, y de modo todavía más preferible al menos aproximadamente 75% o más homólogas una a otra se mantienen típicamente hibridadas entre sí. Tales condiciones severas son conocidas por los expertos en la técnica y pueden encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, 6.3.1-6.3.6, John Wiley & Sons, N.Y. (1989). Un ejemplo no limitante preferido de condiciones severas de hibridación son hibridación en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, 25 seguido por uno o más lavados en 0,2 X SSC, 0,1% SDS a 50-65°C. Con preferencia, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención que se hibrida en condiciones severas a una secuencia de SEQ ID NO: 26 corresponde a una molécula de ácido nucleico existente naturalmente. Como se utiliza en esta memoria, una molécula de ácido nucleico “existente naturalmente” hace referencia a una molécula de RNA o DNA que tiene una secuencia de nucleótidos que 30 existe en la naturaleza (v.g., codifica una proteína natural). En una realización, el ácido nucleico codifica una PKSRP de *Physcomitrella patens* existente naturalmente.

Utilizando los métodos arriba descritos, y otros conocidos por los expertos en la técnica, una persona con experiencia ordinaria en la técnica puede aislar homólogos de las PKSRPs que comprenden la secuencia de aminoácidos 35 que se muestra en SEQ ID NO: 39. Un subgrupo de estos homólogos son variantes alélicas. Como se utiliza en esta memoria, el término “variante alélica” hace referencia a una secuencia de nucleótidos que contiene polimorfismos que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de una PKSRP y que existen dentro de una población natural (v.g., una especie o variedad de planta). Tales variaciones alélicas naturales pueden dar típicamente como resultado una varianza de 1-5% en un ácido nucleico de PKSRP. Las variantes alélicas pueden identificarse por secuenciación 40 de la secuencia de ácido nucleico de interés en cierto número de plantas diferentes, lo que puede realizarse fácilmente utilizando sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético de PKSRP en dichas plantas. Cualquiera y la totalidad de dichas variaciones de ácido nucleico y polimorfismos o variaciones de aminoácidos resultantes en una PKSRP que son el resultado de la variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional de una PKSRP, deben considerarse dentro del alcance de la invención.

45 Deben considerarse comprendidas además dentro del alcance de la presente invención moléculas de ácido nucleico que codifican PKSRPs de la misma u otra especie tales como análogos, ortólogos y parálogos de PKSRP. Como se utiliza en esta memoria, el término “análogos” hace referencia a dos ácidos nucleicos que tienen la misma o similar función, pero que han evolucionado por separado en organismos no afines. Como se utiliza en esta memoria, el término 50 “ortólogos” hace referencia a dos ácidos nucleicos de especies diferentes, pero que han evolucionado a partir de un gen ancestral común por especiación. Normalmente, los ortólogos codifican proteínas que tienen la misma o similares funciones. Como se utiliza también en esta memoria, el término “parálogos” hace referencia a dos ácidos nucleicos que están relacionados por duplicación en un mismo genoma. Los parálogos tienen usualmente funciones diferentes, pero estas funciones pueden ser afines (Tatusov, R.L. *et al.* 1997 Science 278 (5338): 631-637). Análogos, ortólogos y parálogos de una PKSRP existente naturalmente pueden diferir de la PKSRP existente naturalmente por modificaciones 55 posteriores a la traducción, por diferencias en la secuencia de aminoácidos, o por ambas cosas. Modificaciones posteriores a la traducción incluyen derivatización química de polipéptidos *in vivo* e *in vitro*, v.g. acetilación, carboxilación, fosforilación, o glicosilación, y tales modificaciones pueden ocurrir durante la síntesis o el procesamiento de los polipéptidos o después del tratamiento con enzimas modificantes aisladas. En particular, los ortólogos de la invención exhibirán generalmente al menos 80-85%, con más preferencia 90%, y muy preferiblemente 95%, 96%, 97%, 98% o incluso 99% de identidad u homología con la totalidad o una parte de una secuencia de aminoácidos de PKSRP existente naturalmente y exhibirán una función similar a una PKSRP. Los ortólogos de la presente invención son también con preferencia capaces de participar en la respuesta al estrés en las plantas. En una realización, los ortólogos de PKSRP mantienen la capacidad para participar en el metabolismo de los compuestos necesarios para la construcción 65 de membranas celulares en *Physcomitrella patens*, o en el transporte de moléculas a través de estas membranas.

Además de las variantes existentes naturalmente de una secuencia de PKSRP que pueden existir en la población, el experto en la técnica apreciará adicionalmente que pueden introducirse cambios por mutación en la secuencia de

nucleótidos SEQ ID NO: 26, conduciendo con ello a cambios en la secuencia de aminoácidos de la PKSRP codificada, sin alterar la capacidad funcional de la PKSRP. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos “no esenciales” en la secuencia SEQ ID NO: 26. Un residuo de aminoácido “no esencial” es un residuo que puede estar alterado respecto de la secuencia de tipo salvaje de una de las PKSRLs sin alterar la actividad de dicha PKSRL, mientras que un residuo de aminoácido “esencial” es necesario para la actividad de la PKSRL. Otros residuos de aminoácidos, sin embargo (v.g., aquéllos que no están conservados o están sólo semi-conservados en el dominio que tiene actividad de PKSRL) pueden ser esenciales o no para la actividad y por consiguiente son probablemente susceptibles de alteración sin que se altere la actividad de la PKSRL.

De acuerdo con ello, otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican PKSRLs que contienen cambios en los residuos de aminoácidos que no son esenciales para la actividad de la PKSRL. Tales PKSRLs difieren en secuencia de aminoácidos de la secuencia contenida en SEQ ID NO: 39, pero retienen al menos una de las actividades de PKSRL descritas en esta memoria. ID NO: 39 (sic). Con preferencia, la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico tiene una homología de al menos aproximadamente 70-80%, 80-90%, 90-95% con la secuencia SEQ ID NO: 39, y de modo más preferible una homología de al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, o 99% con la secuencia SEQ ID NO: 39. Los homólogos de PKSRL preferidos de la presente invención son con preferencia capaces de participar en la respuesta de tolerancia al estrés en una planta, o más particularmente, participar en la transcripción de una proteína implicada en una respuesta de tolerancia al estrés en una planta de *Physcomitrella patens*, o tienen una o más actividades indicadas en la Tabla 1.

Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un homólogo de PKSRL a una secuencia de proteína de SEQ ID NO: 39 puede crearse por introducción de una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 26, de tal modo que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en la proteína codificada. Pueden introducirse mutaciones en la secuencia SEQ ID NO: 26 por técnicas estándar, tales como mutagénesis orientada y mutagénesis mediada por PCR. Con preferencia, se hacen sustituciones conservadoras de aminoácidos en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos. Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es una en la que el residuo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar.

Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (v.g., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (v.g., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (v.g., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales apolares (v.g., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (v.g., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (v.g., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un residuo de aminoácido no esencial predicho en una PKSRL se reemplaza con preferencia con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Alternativamente, en otra realización, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia codificante de PKSRL, por ejemplo por mutagénesis de saturación, y los mutantes que resultan pueden cribarse respecto a una actividad de PKSRL descrita en esta memoria para identificar mutantes que retienen actividad de PKSRL. Después de la mutagénesis de la secuencia de SEQ ID NO: 26, la proteína codificada puede expresarse recombinantemente y la actividad de la proteína puede determinarse por análisis de la tolerancia al estrés de una planta que expresa la proteína como se describe en el Ejemplo 7.

Además de las moléculas de ácido nucleico que codifican la PKSRL arriba descrita, otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que son antisentido respecto a las aquélla. Un ácido nucleico “antisentido” comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico “sentido” que codifica una proteína, v.g., complementaria a la cadena codificante de una molécula de cDNA bicatenario o complementaria a una secuencia de mRNA. De acuerdo con ello, un ácido nucleico antisentido puede estar unido por enlaces hidrógeno a un ácido nucleico sentido. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una cadena codificante de PKSRL entera, o sólo a una porción de la misma. En una realización, una molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido para una “región codificante” de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica una PKSRL. El término “región codificante” hace referencia a la región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que se traducen en residuos de aminoácidos (v.g., la región codificante entera de comprende los nucleótidos 1 a). En otra realización, la molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido para una “región no codificante” de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica una PKSRL. El término “región no codificante” se refiere a secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante que no se traducen en aminoácidos (es decir, a las que se hace referencia también como regiones 5' y 3' no traducidas).

En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 26, o una porción de la misma. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 26 es una que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 26, de tal modo que puede hibridarse a la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 26, formando con ello un dúplex estable.

Dadas las secuencias de las cadenas codificantes que codifican las PKSRLs de la invención descritas en esta memoria (v.g., la secuencia de SEQ ID NO: 26), pueden diseñarse ácidos nucleicos antisentido de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases de Watson y Crick. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria para

la región codificante entera de mRNA de PKSRP, pero con más preferencia es un oligonucleótido que es antisentido sólo para una porción de la región codificante o no codificante de mRNA de PKSRP. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario para la región que rodea el sitio de comienzo de la traducción de mRNA de PKSRP. Un oligonucleótido antisentido puede tener, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 nucleótidos.

Un ácido nucleico antisentido puede construirse utilizando reacciones de síntesis química y ligación enzimática que emplean procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (v.g., un oligonucleótido antisentido) puede sintetizarse químicamente utilizando nucleótidos existentes naturalmente o nucleótidos modificados de diversos modos diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y sentido, v.g., pueden utilizarse derivados fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Ejemplos de nucleótidos modificados que pueden utilizarse para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)-uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetil-aminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosil-queosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metil-adenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metil-citosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilamino-metiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxi-uracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, uracil-5-oxiacetato de metilo, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)-uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, el ácido nucleico antisentido puede producirse biológicamente utilizando un vector de expresión en el cual un ácido nucleico se ha subclonado en una orientación antisentido (es decir, el RNA transcrito a partir del ácido nucleico insertado será de orientación antisentido para un ácido nucleico diana de interés, descrito adicionalmente en la subsección siguiente).

Las moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención se administran típicamente a una célula o se generan *in situ* de tal modo que las mismas se hibridan con o se fijan a mRNA celular y/o DNA genómico codificante de una PKSRP para inhibir con ello la expresión de la proteína. v.g., por inhibición de la transcripción y/o la traducción. La hibridación puede realizarse por complementariedad convencional de nucleótidos a fin de formar un dúplex estable, o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se fija a los dúplex de DNA, por interacciones específicas en la hendidura mayor de la doble hélice. La molécula antisentido puede modificarse de tal manera que se fije específicamente a un receptor o un antígeno expresado en una superficie celular seleccionada, v.g., por enlace de la molécula de ácido nucleico antisentido a un péptido o un anticuerpo que se fija a un receptor o antígeno de la superficie celular. La molécula de ácido nucleico antisentido puede suministrarse también a las células utilizando los vectores descritos en esta memoria. Para alcanzar concentraciones intracelulares suficientes de las moléculas antisentido, se prefieren constructos vectores en los cuales la molécula de ácido nucleico antisentido está puesta esencialmente bajo el control de un promotor fuerte procariota, viral, o eucariota (con inclusión de promotores vegetales).

En otra realización adicional, la molécula de ácido nucleico antisentido de la invención es una molécula de ácido nucleico α -anomérica. Una molécula de ácido nucleico α -anomérica forma híbridos bicatenarios específicos con RNA complementario en los cuales, contrariamente a las unidades β usuales, las cadenas corren paralelas una a otra (Gaultier *et al.*, 1987, Nucleic Acids Res. 15: 6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido puede comprender también un 2'-o-metil-ribonucleótido (Inoue *et al.*, 1987, Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) o un análogo quimérico RNA-DNA (Inoue *et al.*, 1987 FEBS Lett, 215: 327-330).

En otra realización adicional, un ácido nucleico antisentido de la invención es una ribozima. Las ribozimas son moléculas catalíticas de RNA con actividad de ribonucleasa que son capaces de escindir un ácido nucleico monocatenario, tal como un mRNA, para el cual tienen una región complementaria. Así, las ribozimas (v.g., las ribozimas con cabeza de martillo descritas en Haselhoff y Gerlach, 1988, Nature 334: 585-591) pueden utilizarse para escindir catalíticamente transcritos de mRNA de PKSRP a fin de inhibir con ello la traducción de mRNA de PKSRP. Una ribozima que tiene especificidad para un ácido nucleico codificante de PKSRP puede diseñarse sobre la base de la secuencia de nucleótidos de un cDNA de PKSRP, como se describe en esta memoria (es decir, SEQ ID NO: 26), o sobre la base de una secuencia heteróloga que puede aislarse de acuerdo con los métodos expuestos en esta invención. Por ejemplo, puede construirse un derivado de un RNA IVS L-19 de *Tetrahymena*, en el cual la secuencia de nucleótidos del sitio activo es complementaria a la secuencia de nucleótidos a escindir en un mRNA codificante de PKSRP. Véase, v.g., Cech *et al.* Patente U.S. No. 4.987.071 y Cech *et al.*, Patente U.S. No. 5.116.742. Alternativamente, puede utilizarse mRNA de PKSRP para seleccionar un RNA catalítico que tiene una actividad específica de ribonucleasa a partir de una agrupación de moléculas de RNA. Véase, v.g., Bartel, D. y Szostak, J.W., 1993, Science 261: 1411-1418.

Alternativamente, la expresión de genes de PKSRP puede inhibirse por direccionamiento de secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora de una secuencia de nucleótidos de PKSRP (v.g., un promotor y/o intensificador de PKSRP) para formar estructuras de triple hélice que impiden la transcripción de un gen de PKSRP en células diana. Véase generalmente, Helene, C., 1991 Anticancer Drug Des. 6(6):569-84; Helene, C. *et al.*, 1992 Ann N.Y. Acad. Sci. 660:27-36; y Maher, L.J., 1992; Bioassays 14(12):807-15.

Además de los ácidos nucleicos y proteínas PKSRP arriba descritos, la presente invención abarca estos ácidos nucleicos y proteínas fijados a un resto. Estos restos incluyen, pero sin carácter limitante, restos de detección, restos de hibridación, restos de purificación, restos de suministro, restos de reacción, restos de fijación, etcétera. Un grupo

típico de ácidos nucleicos que tienen restos unidos son sondas e iniciadores. Las sondas y los iniciadores comprenden típicamente un oligonucleótido sustancialmente aislado. El oligonucleótido comprende típicamente una región de secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones severas a al menos aproximadamente 12, con preferencia aproximadamente 25, de modo más preferible aproximadamente 40, 50 ó 75 nucleótidos consecutivos de una cadena sentido de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 26, una secuencia antisentido de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 26, o mutantes de la misma existentes naturalmente. Iniciadores basados en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 26 pueden utilizarse en reacciones PCR para clonar homólogos de PKSRP.

Puede utilizarse SEQ ID NO:26 en reacciones PCR para clonar homólogos de PKSRP. Sondas basadas en las secuencias de nucleótidos PKSRP pueden utilizarse para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican la misma proteína o proteínas homólogas. En realizaciones preferidas, la sonda comprende adicionalmente un grupo marcador unido a ella, v.g. el grupo marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático. Tales sondas pueden utilizarse como parte de un kit de test de marcadores genómicos para identificar células que expresan una PKSRP, tal como por medida de un nivel de un ácido nucleico codificante de PKSRP, en una muestra de células, v.g., por detección de los niveles de mRNA de PKSRP o determinación de si un gen de PKSRP genómico se ha mutado o ha sido deletado.

En particular, un método útil para averiguar el nivel de transcripción del gen (un indicador de la cantidad de mRNA disponible para traducción al producto génico) consiste en realizar una transferencia Northern (para referencia, véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, 1988 Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: Nueva York). Esta información demuestra al menos parcialmente el grado de transcripción del gen transformado. El RNA celular total puede prepararse a partir de células, tejidos u órganos por varios métodos, todos ellos bien conocidos en la técnica, tales como el descrito en Bormann, E.R. *et al.*, 1992 Mol. Microbiol. 6:317-326. Para cribar la presencia o cantidad relativa de proteína traducida a partir de este mRNA, pueden emplearse técnicas estándar, tales como una transferencia Western. Estos métodos son bien conocidos por una persona con experiencia ordinaria en la técnica. (Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, 1988 Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: Nueva York).

La invención proporciona adicionalmente un vector de expresión recombinante aislado que comprende un ácido nucleico de PKSRP como se ha descrito arriba, en donde la expresión del vector en una célula hospedadora da como resultado una tolerancia incrementada al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo salvaje de la célula hospedadora. Como se utiliza en esta memoria, el término “vector” hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado. Un tipo de vector es un “plásmido”, que hace referencia a un bucle circular de DNA bicatenario en donde pueden ligarse segmentos de DNA adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde pueden ligarse segmentos de DNA adicionales al genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la cual se han introducido (v.g. vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (v.g., vectores de mamífero no episómicos) se integran en el genoma de una célula hospedadora después de introducción en la célula hospedadora, y por consiguiente se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se han enlazado operativamente. A dichos vectores se hace referencia en esta memoria como “vectores de expresión”. En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de DNA recombinante se encuentran a menudo en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden utilizarse intercambiamente dado que el plásmido es la forma de vector utilizada más comúnmente. No obstante, la invención tiene por objeto incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (v.g., retrovirus deficientes en replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que desempeñan funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de la célula hospedadora a utilizar para la expresión, lo que está enlazado operativamente a la secuencia de ácido nucleico a expresar. En un vector de expresión recombinante, debe entenderse que “enlazado operativamente” significa que la secuencia nucleotídica de interés está enlazada a la o las secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión de la secuencia nucleotídica (v.g., en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedadora cuando el vector se introduce en la célula hospedadora). El término “secuencia reguladora” tiene por objeto incluir promotores, intensificadores y otros elementos de control de la expresión (v.g., señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) o véase: Gruber and Crosby, en: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, compiladores Glick y Thompson, capítulo 7, 89-108, CRC Press, Boca Raton, Florida, con inclusión de las referencias citadas en dicho lugar. Secuencias reguladoras incluyen aquéllas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia nucleotídica en muchos tipos de células hospedadoras y aquéllas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos únicamente en ciertas células hospedadoras o en ciertas condiciones. Será apreciado por los expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células hospedadoras para producir con ello proteínas o péptidos, con inclusión de proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describen en esta memoria (v.g., PKSRPs, formas mutantes de PKSRPs, proteínas de fusión, etc.).

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para expresión de PKSRPs en células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, pueden expresarse genes de PKSRP en células bacterianas tales como *C.*

glutamicum, células de insecto (utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura y otras células fúngicas (véase Romanos, M.A. *et al.*, 1992 Foreign gene expression in yeast: a review, *Yeast* 8:423-488; van den Hondel C.A.M.J.J. *et al.*, 1991 Heterologous gene expression in filamentous fungi, en: *More Gene Manipulations in Fungi*, J.W. Bennet, & L.L. Lasure, compiladores, p. 396-428; Academic Press: S. Diego; y van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt. P.J., 1991, Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, en: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J.F. *et al.*, compiladores, p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), algas (Falcitore *et al.*, 1999 *Marine Biotechnology* 1(3): 239-251), ciliados de los tipos: *Holotrichia*, *Peritrichia*, *Spirotrichia*, *Suctorina*, *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Colpidium*, *Glaucoma*, *Platyophrya*, *Potomacus*, *Pseudocohnilembus*, *Euplotes*, *Engelmanniella*, y *Stylonychia*, especialmente del género *Stylonychia lemnae*, con vectores siguiendo un método de transformación como el descrito en WO 98/01572 y células de plantas multicelulares (véase Schmidt, R. and Willmitzer, L., 1988 High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants, *Plant Cell Rep.* 583-586); *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, C Press, Boca Raton, Florida, capítulo 6/7, p. 71-119 (1993); F.F. White, B. Jené *et al.*, *Techniques for Gene Transfer*, en: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. Kung und R. Wu, 128-43, Academic Press: 1993; Potrykus, 1991 *Annu. Rev. Plant Physiol. Molec. Biol.* 42:205-225 y las referencias citadas en dichos lugares) o células de mamífero. Células hospedadoras adecuadas se describen más detalladamente en Goeddel, *Gene Expresión Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press: San Diego, Ca (1990). Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo utilizando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

La expresión de proteínas en procariotas se lleva a cabo en la mayoría de los casos con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o distintas de las proteínas de fusión. Los vectores de fusión añaden cierto número de aminoácidos a una proteína codificada en ellos, usualmente al término amino de la proteína recombinante, pero también al término C o se fusionan en regiones adecuadas en las proteínas. Tales vectores de fusión sirven típicamente para tres propósitos: 1) aumentar la expresión de una proteína recombinante; 2) aumentar la solubilidad de una proteína recombinante; y 3) facilitar la purificación de una proteína recombinante por actuar como un ligando en la purificación por afinidad. A menudo, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión subsiguientemente a la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento cognadas, incluyen Factor Xa, trombina y enteroquinasa.

Vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc.; Smith, D.B. y Johnson, K.S., 1988 *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia Piscataway, NJ) que fusionan glutatión-S-transferasa (GST), la proteína E de fijación de maltosa, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante diana. En una realización, la secuencia codificante de la PKSRP se clona a un vector de expresión pGEX para crear un vector que codifica una proteína de fusión que comprende, desde el término N al término C, GST-sitio de escisión de trombina-proteína X. La proteína de fusión puede purificarse por cromatografía de afinidad utilizando resina glutatión-agarosa. La PKSRP recombinante no fusionada a GST puede recuperarse por escisión de la proteína de fusión con trombina.

Ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* inducibles adecuados que no son de fusión incluyen pTrc (Amann *et al.*, 1988 *Gene* 69:301-315) y pET 11d (Studier *et al.*, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California, (1990) 60-89). La expresión de genes diana a partir del vector pTrc está basada en la transcripción de RNA-polimerasa del hospedador por un promotor de fusión híbrido trp-lac. La expresión del gen diana a partir del vector pET-11d está basada en la transcripción de un promotor de fusión T7 gn10-lac mediada por una RNA-polimerasa viral co-expresada (T7 gn1). Esta polimerasa viral es suministrada por las cepas hospedadoras BL21(DE3) o HMS174 (DE3) a partir de un profago λ residente que aloja un gen de T7 gn1 bajo el control de transcripción del promotor lacUV5.

Una estrategia para maximizar la expresión de proteínas recombinantes consiste en expresar la proteína en una bacteria hospedadora con una capacidad deteriorada para escindir proteolíticamente la proteína recombinante (Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128). Otra estrategia consiste en alterar la secuencia del ácido nucleico a insertar en un vector de expresión de tal modo que los codones individuales para cada aminoácido son los utilizados preferentemente en la bacteria seleccionada para expresión, tales como *C. glutamicum* (Wada *et al.*, 1992 *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Dicha alteración en las secuencias de ácido nucleico de la invención puede llevarse a cabo por técnicas estándar de síntesis de DNA.

En otra realización, el vector de expresión de PKSRP es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para expresión en la levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari, *et al.*, 1977 *Embo J.* 6:229-234, pMFa (Kurjan y Herskowitz, 1982 *Cell* 30:939-943), pJRY88 (Schultz *et al.* 1987 *Gene* 54:113-123), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vectores y métodos para la construcción de vectores apropiados para uso en otros hongos, tales como los hongos filamentosos, incluyen los detallados en: van den Hondel C.A.M.J.J. & Punt. P.J. (1991): "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", en: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J.F. Peberdy *et al.*, compiladores., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

En otra realización, las PKSRPs de la invención se expresan en células vegetales de plantas superiores (v.g., las espermatofitas, tales como plantas de cosecha). Ejemplos de vectores de expresión en plantas incluyen los detallados en: Becker, D., Kemper E., Schell, J. y Masterson, R., 1992 *New plant binary vectors with selectable markers located*

proximal to the left border, *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197; y Bevan, M.W., 1984 Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation, *Nucl. Acid. Res.* 12: 8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; en: *Transgenic Plants*, vol. 1, Engineering and Utilization, compiladores: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993; p. 15-38.

- 5 Una casete de expresión en plantas contiene con preferencia secuencias reguladoras capaces de impulsar la expresión génica en células vegetales y enlazadas operativamente de tal modo que cada secuencia puede desempeñar su función, por ejemplo, terminación de la transcripción por señales de poliadenilación. Señales de poliadenilación preferidas son las procedentes de t-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* tales como el gen 3 conocido como octopina-sintasa del plásmido Ti pTiACH5 (Gielen *et al.*, 1984 *EMBO J.* 3:835) o equivalentes funcionales del mismo, pero
10 también son adecuados otros terminadores funcionalmente activos en plantas.

- Dado que la expresión de genes vegetales no se limita en muchos casos a niveles de transcripción, una casete de expresión en plantas contiene con preferencia otras secuencias enlazadas operativamente como mejoradores de la traducción tales como la secuencia superimpulsora ("overdrive") que contiene la secuencia conductora 5' no traducida del virus del mosaico del tabaco que mejora la relación de proteína por RNA (Gallie *et al.*, 1987 *Nucl. Acids Research* 15:8693-8711).
15

- La expresión de genes de plantas tiene que estar enlazada operativamente a un promotor apropiado que confiere la expresión génica de una manera oportuna, específica de la célula o del tejido. Se prefieren promotores que impulsan expresión constitutiva (Benfey *et al.*, 1989 *EMBO J.* 8:2195-2202) al igual que los derivados de virus de plantas tales como el CAMV 35S (Franck *et al.*, 1980 *Cell* 21:285-294), el CaMV 19S (véase también la Patente U.S. No. 5352605 y la solicitud PCT No. WO 8402913) o promotores de plantas tales como los de la subunidad pequeña de Rubisco descrita en la Patente U.S. No. 4962028.
20

- Otras secuencias preferidas para uso en casetes de expresión de genes vegetales son secuencias de direccionamiento necesarias para dirigir el producto génico en su compartimiento celular apropiado (para revisión, véase Kermode, 1996 *Crit. Rev. Plant Sci.* 15 (4):285-423 y las referencias citadas en dicho lugar) tales como la vacuola, el núcleo, todos los tipos de plástidos tales como amiloplastos, cloroplastos, cromoplastos, el espacio extracelular, la mitocondria, el retículo endoplasmático, cuerpos aceitosos, peroxisomas y otros compartimientos de las células vegetales.
25

- La expresión de genes vegetales puede ser facilitada también por un promotor inducible (para revisión véase Gatz, 1997 *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:89-108). Promotores químicamente inducibles son especialmente adecuados si se quiere que la expresión génica ocurra de una manera específica en el tiempo. Ejemplos de tales promotores son un promotor inducible por ácido salicílico (Solicitud PCT No. WO 95/19443), un promotor inducible por tetraciclina (Gatz *et al.*, 1992 *Plant J.* 2:397-404) y un promotor inducible por etanol (solicitud PCT No. WO 93/21334).
30

- Asimismo, promotores adecuados que responden a condiciones de estrés biótico o abiótico son aquéllos tales como el promotor del gen PRP1 inducible por patógenos (Ward *et al.*, 1993 *Plant. Mol. Biol.* 22:361-366), el promotor hsp80 del tomate inducible por calor (Patente U.S. No. 5187267), el promotor de α -amilasa de la patata inducible por frío (solicitud PCT No. WO 96/12814) o el promotor pinII inducible por lesiones (Patente Europea No. 375091). Para otros ejemplos de promotores inducibles por sequía, frío y sal, tal como el promotor RD29A, véase Yamaguchi-Shinozaki *et al.* (1993) *Mol. Gen. Genet.* 236:331-340).
35

- Se prefieren especialmente aquellos promotores que confieren expresión génica en tejidos y órganos específicos, tales como células de guarda y las células de los pelos radiculares. Promotores adecuados incluyen el promotor del gen napin de la colza (Patente U.S. No. 5608152), el promotor USP de Vicia faba (Baeumlein *et al.*, 1991 *Mol. Gen. Genet.* 225 (3):459-67), el promotor oleosina de *Arabidopsis* (solicitud PCT No. WO 98/45461), el promotor faseolina de *Phaseolus vulgaris* (Patente U.S. No. 5504200), el promotor Bce4 de *Brassica* (solicitud PCT No. WO 91/13980) o el promotor B4 de legumina (LeB4; Baeumlein *et al.*, 1992 *Plant Journal*, 2 (2):233-9) así como promotores que confieren expresión específica de semillas en plantas monocotiledóneas como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz, etcétera. Promotores adecuados dignos de mención son el promotor del gen lpt2 o lpt1 de la cebada (solicitud PCT No. WO 95/15389 y solicitud PCT No. WO 95/23230) o los descritos en la solicitud PCT No. WO 99/16890 (promotores del gen hordeína de la cebada, el gen glutelina del arroz, el gen orizina del arroz, el gen prolamina del arroz, el gen gliadina del trigo, el gen glutelina del trigo, el gen zeína del maíz, el gel glutelina de la avena, el gen kasirina del sorgo y el gen secalina del centeno).
45

- Son también especialmente adecuados promotores que confieren expresión génica específica de plástidos, dado que los plástidos son el compartimiento en el que tiene lugar la biosíntesis de los lípidos. Promotores adecuados son el promotor de RNA-polimerasa viral descrito en la solicitud PCT No. WO 95/16783 y la solicitud PCT No. WO 97/06250, y el promotor clpP de *Arabidopsis* descrito en la solicitud PCT No. WO 99/46394.
50

- La invención proporciona adicionalmente un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de DNA de PKSRP de la invención clonada en el vector de expresión en orientación antisentido. Es decir, la molécula de DNA está enlazada operativamente a una secuencia reguladora de una manera que permite la expresión (por transcripción de la molécula de DNA) de una molécula de RNA que es antisentido para un mRNA de PKSRP. Pueden seleccionarse secuencias reguladoras enlazadas operativamente a una molécula de ácido nucleico clonada en orientación antisentido, que dirigen la expresión continua de la molécula de RNA antisentido en una diversidad de tipos
55

de células. Por ejemplo, pueden seleccionarse promotores y/o intensificadores virales, o secuencias reguladoras que dirigen la expresión constitutiva directa, específica de tejido o específica del tipo de célula de RNA antisentido. El vector de expresión antisentido puede encontrarse en la forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en donde los ácidos nucleicos antisentido se producen bajo el control de una región reguladora de alta eficiencia.

5 La actividad de la región reguladora puede estar determinada por el tipo de célula en el que se introduce el vector. Para una exposición de la regulación de la expresión génica utilizando genes antisentido véase Weintraub, H. *et al.*, Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986 y Mol *et al.*, 1990 FEBS Letters 268:427-430.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a células hospedadoras en las cuales se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Los términos “célula hospedadora” y “célula hospedadora recombinante” se utilizan en esta memoria de modo intercambiable. Debe entenderse que dichos términos se refieren no sólo a la célula particular de que se trata, sino que se aplican también a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Dado que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha

15 progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula originaria, pero se incluye todavía dentro del alcance del término como se utiliza en esta memoria.

Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, una PKSRP puede expresarse en células bacterianas tales como *C. glutamicum*, células de insecto, células fúngicas, o células de mamífero

20 (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS), algas, ciliados, células de plantas, hongos u otros microorganismos como *C. glutamicum*. Otras células hospedadoras adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.

El DNA vector puede introducirse en células procariotas o eucariotas por técnicas convencionales de transformación o transfección. Tal como se utilizan en esta memoria, los términos “transformación”, “transfección”, “conjugación” y “transducción” tienen por objeto hacer referencia a una diversidad de métodos reconocidos en la técnica para introducir ácido nucleico extraño (v.g., DNA) en una célula hospedadora, con inclusión de co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, competencia natural, transferencia mediada por productos químicos y electroporación. Métodos adecuados para transformación o transfección de

25 células hospedadoras que incluyen células vegetales pueden encontrarse en Sambrook, *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros manuales de laboratorio tales como Methods in Molecular Biology, 1995, vol. 44, *Agrobacterium* protocols, compiladores: Gartland y Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey. Dado que la tolerancia al estrés biótico y abiótico es un rasgo general que se desea sea heredado en una gran diversidad de plantas tales como

30 maíz, trigo, centeno, avena, trigo híbrido, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza y canola, mandioca, pimienta, girasol y tagetes, plantas solanáceas tales como patata, tabaco, berenjena, y tomate, especies de Vicia, guisante, alfalfa, plantas arbustivas (café, cacao, té), especies de *Salix*, árboles (palma de aceite, cocotero), hierbas perennes y cosechas forrajeras, estas plantas de cosecha son también plantas diana preferidas para ingeniería genética como una realización adicional de la presente invención.

40 En particular, la invención proporciona un método de producción de una planta transgénica con un ácido nucleico codificante de PKSRP, en donde la expresión del o de los ácidos nucleicos en la planta da como resultado una tolerancia incrementada al estrés en comparación con una variedad de tipo salvaje en la planta que comprende: (a) transformar una célula de la planta con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de PKSRP, y (b) generar a partir

45 de la célula de la planta una planta transgénica con una tolerancia incrementada al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta. La invención proporciona también un método de incrementar la expresión de un gen de interés en una célula hospedadora en comparación con una variedad de tipo salvaje de la célula hospedadora, en donde el gen de interés se transcribe en respuesta a una PKSRP, que comprende: (a) transformar la célula hospedadora con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico codificante de PKSRP, y (b) expresar

50 la PKSRP en la célula hospedadora, aumentado con ello la expresión del gen transcrito en respuesta a la PKSRP, en comparación con una variedad de tipo salvaje de la célula hospedadora.

Para dicha transformación de plantas, pueden utilizarse vectores binarios tales como pBinAR (Höfgen y Willmitzer, 1990 Plant Science 66:221-230). La construcción de los vectores binarios puede realizarse por ligación del cDNA en orientación sentido o antisentido en el T-DNA. En posición 5' respecto al cDNA, un promotor de planta activa la transcripción del cDNA. Una secuencia de poliadenilación está localizada en posición 3-prima respecto al cDNA. La expresión específica de tejidos puede conseguirse utilizando un promotor específico de tejido. Por ejemplo, la expresión específica de semilla puede conseguirse por clonación del promotor napin o LeB4 o USP en posición 5' respecto al cDNA. Asimismo, puede utilizarse cualquier otro elemento promotor específico de semilla. Para expresión

55 constitutiva en la planta entera, puede utilizarse el promotor CaMV 35S. La proteína expresada puede direccionarse a un compartimiento celular utilizando un péptido señal, por ejemplo para plástidos, la mitocondria o el retículo endoplasmático (Kermode, 1996 Crit. Rev. Plant Sci. 4(15):285-423). El péptido señal se clona en posición 5' en marco al cDNA para archivar la localización subcelular de la proteína de fusión. Adicionalmente, promotores que son sensibles a estados de estrés abiótico tales como el promotor RD29A de *Arabidopsis*, pueden utilizarse con las

60 secuencias de ácido nucleico descritas en esta memoria. Un experto en la técnica reconocerá que el promotor utilizado debería estar enlazado operativamente al ácido nucleico de tal modo que el promotor cause la transcripción del ácido nucleico, lo que da como resultado la síntesis de un mRNA que codifica un polipéptido. Alternativamente, el RNA puede ser un RNA antisentido para uso a fines de influir en la expresión subsiguiente del mismo u otro gen o genes.

Métodos alternativos de transfección incluyen la transferencia directa de DNA a flores en desarrollo por electroporación o transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*. La transfección de plantas mediada por *Agrobacterium* puede realizarse utilizando por ejemplo la cepa GV3101 (pMP90) (Koncz y Schell, 1986 Mol. Gen. Genet. 204:383-396) o LBA4404 (Clontech) de *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación puede realizarse por técnicas estándar de transformación y regeneración (Deblaere *et al.*, 1994 Nucl. Acids. Res. 13:4777-4788; Gelvin, Stanton B. y Schilperoort, Robert A, Plant Molecular Biology Manual, 2ª edición, - Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995. - in Sect., Ringbuc Centrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R.; Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993. - 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). Por ejemplo, la colza puede transformarse por transformación de los cotiledones o del hipocótilo (Moloney *et al.*, 1989 Plant Cell Report 8:238-242; De Block *et al.*, 1989 Plant Physiol. 91:694-701). El uso de antibióticos para la selección de *Agrobacterium* y de plantas depende del vector binario y la cepa de *Agrobacterium* utilizados para la transformación. La selección de la colza se realiza normalmente utilizando kanamicina como marcador de plantas seleccionable. La transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* al lino puede realizarse utilizando, por ejemplo, una técnica descrita por Mlynarova *et al.*, 1994 Plant Cell Report 13:282-285. Adicionalmente, la transformación de la soja puede realizarse utilizando por ejemplo una técnica descrita en la Patente Europea No. 0424047, la Patente U.S. No. 5.322.783, la Patente Europea No. 0397687, la Patente U.S. No. 5.376.543 o la Patente U.S. No. 5.169.770. La transformación del maíz puede realizarse por bombardeo de partículas, captura de DNA mediada por polietilenglicol o por la técnica de fibras de carburo de silicio. (Véase, por ejemplo, Freeling y Walbot "The Maize Handbook" Springer Verlag: Nueva York (1993), ISBN 3-540-97826-7). Un ejemplo específico de transformación de maíz se encuentra en la Patente U.S. No. 5.990.387 y un ejemplo específico de transformación de trigo puede encontrarse en la solicitud PCT No. WO 93/07256.

Una célula hospedadora de la invención, tal como una célula hospedadora procariota o eucariota en cultivo, puede utilizarse para producir (es decir, expresar) una PKSRR. De acuerdo con ello, la invención proporciona adicionalmente métodos para producir PKSRRs utilizando las células hospedadoras de la invención. En una realización, el método comprende cultivar la célula hospedadora de la invención (en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica una PKSRR, o en cuyo genoma se ha introducido un gen que codifica una PKSRR de tipo salvaje o alterada) en un medio adecuado hasta que se produce la PKSRR. En otra realización, el método comprende adicionalmente aislar PKSRRs del medio o la célula hospedadora.

Otro aspecto de la invención se refiere a PKSRRs aisladas, y porciones biológicamente activas de las mismas. Una proteína o porción biológicamente activa de la misma "aislada" o "purificada" está exenta de algo del material celular cuando se produce por técnicas de DNA recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La frase "sustancialmente exenta de material celular" incluye preparaciones de PKSRR en las cuales la proteína está separada de una parte de los componentes celulares de las células en las cuales se produce la misma natural o recombinantemente. En una realización, la frase "sustancialmente exenta de material celular" incluye preparaciones de una PKSRR que tienen menos de aproximadamente 30% (referido a peso seco) de material distinto de PKSRR (a lo que se hace referencia también en esta memoria como una "proteína contaminante"), de modo más preferible menos de aproximadamente 20% de material distinto de PKSRR, de modo todavía más preferible menos de aproximadamente 10% de material distinto de PKSRR, y de modo muy preferible menos de aproximadamente 5% de material distinto de PKSRR.

Cuando la PKSRR o porción biológicamente activa de ella se produce recombinantemente, la misma está de modo preferible sustancialmente exenta también de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, de modo más preferible menos de aproximadamente 10%, y de modo muy preferible menos de aproximadamente 5% del volumen de la preparación de proteína. La frase "sustancialmente exenta de precursores químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de PKSRR en las cuales la proteína está separada de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. En una realización, la frase "sustancialmente exenta de precursores químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de una PKSRR que tienen menos de aproximadamente 30% (referido a peso seco) de precursores químicos o productos químicos distintos de PKSRR, de modo más preferible menos de aproximadamente 20% de precursores químicos o productos químicos distintos de PKSRR, de modo todavía más preferible menos de aproximadamente 10% de precursores químicos o productos químicos distintos de PKSRR, y de modo muy preferible menos de aproximadamente 5% de precursores químicos o productos químicos distintos de PKSRR. En realizaciones preferidas, las proteínas aisladas, o porciones biológicamente activas de las mismas, carecen de proteínas contaminantes del mismo organismo del que se deriva la PKSRR. Típicamente, tales proteínas se producen por expresión recombinante de, por ejemplo, una PKSRR de *Physcomitrella patens* en plantas distintas de *Physcomitrella patens* o microorganismos tales como *C. glutamicum*, ciliados, algas u hongos.

Las moléculas de ácido nucleico, proteínas, homólogos de proteínas, proteínas de fusión, iniciadores, vectores, y células hospedadoras descritas en esta memoria pueden utilizarse en uno o más de los métodos siguientes: identificación de *Physcomitrella patens* y organismos afines; mapeado de genomas de organismos afines a *Physcomitrella patens*; identificación y localización de secuencias de interés de *Physcomitrella patens*; estudios de evolución; determinación de regiones de PKSRR requeridas para función; modulación de la actividad de una PKSRR; modulación del metabolismo de una o más funciones celulares; modulación del transporte transmembranal de uno o más compuestos; y modulación de la resistencia al estrés.

El musgo *Physcomitrella patens* presenta un miembro de los musgos. El mismo es afín a otros musgos tales como *Ceratodon purpureus* que es capaz de crecer en ausencia de luz. Musgos tales como *Ceratodon* y *Physcomitrella*

comparten un alto grado de homología en la secuencia de DNA y el nivel de polipéptidos, lo que permite el uso de cribado heterólogo de moléculas de DNA con sondas procedentes de otros musgos u organismos, haciendo posible con ello la derivación de una secuencia de consenso adecuada para el cribado heterólogo o la anotación y predicción funcional de funciones génicas en terceras especies. La posibilidad de identificar tales funciones puede tener por tanto gran importancia, v.g., la predicción de la especificidad de sustrato de las enzimas. Adicionalmente, estas moléculas de ácido nucleico pueden servir como puntos de referencia para el mapeado de genomas de musgos, o de genomas de organismos afines.

Las moléculas de ácido nucleico de PKSRP de la invención tienen una diversidad de usos. De modo muy importante, las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de la presente invención pueden utilizarse para transformar plantas, induciendo con ello tolerancia al estrés tal como sequía, salinidad alta y frío. La presente invención proporciona por tanto una planta transgénica transformada por un ácido nucleico (codificante o antisentido) de PKSRP, en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la planta da como resultado una tolerancia incrementada al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta. La planta transgénica puede ser una monocotiledónea o una dicotiledónea. La invención estipula adicionalmente que la planta transgénica puede seleccionarse de maíz, trigo, centeno, avena, trigo híbrido, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza, canola, mandioca, pimiento, girasol, tagetes, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especies de Vicia, guisante, alfalfa, café, cacao, té, especies de *Sáliz*, palma de aceite, cocotero, hierbas perennes y cosechas forrajeras, por ejemplo.

En particular, la presente invención describe el uso de la expresión de CPK-2 de *Physcomitrella patens* para producir por bioingeniería plantas tolerantes a la sequía, tolerantes a la sal y/o tolerantes al frío. Esta estrategia se ha demostrado en esta memoria para *Arabidopsis thaliana*, colza/canola, soja, maíz y trigo, pero su aplicación no está restringida a estas plantas. De acuerdo con ello, la invención proporciona una planta monocotiledónea o dicotiledónea que contiene una PKSRP, a saber CPK-2 (SEQ ID NO: 39), en donde el estrés ambiental es sequía, sal incrementada o temperatura incrementada o reducida.

La presente invención proporciona también métodos de modificación de la tolerancia al estrés de una planta que comprenden modificar la expresión de una PKSRP en la planta. La invención estipula que este método puede realizarse de tal modo que la tolerancia al estrés se aumenta o se reduce. En particular, la presente invención proporciona métodos de producción de una planta transgénica que tiene una tolerancia incrementada al estrés en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta que comprenden aumentar la expresión de una PKSRP en una planta.

Los métodos de aumento de la expresión de PKSRPs pueden utilizarse en casos en que la planta es transgénica o no transgénica. En los casos en que la planta es transgénica, la planta puede transformarse con un vector que contiene cualquiera de los ácidos nucleicos codificantes de PKSRP descritos anteriormente, o bien puede transformarse la planta con un promotor que dirige la expresión de PKSRP nativa en la planta, por ejemplo. La invención estipula que dicho promotor puede ser específico de un tejido. Adicionalmente, dicho promotor puede estar regulado evolutivamente. De modo alternativo, las plantas no transgénicas pueden tener expresión de PKSRP nativa modificada por inducción de un promotor nativo.

La expresión de CPK-2 (SEQ ID NO: 26) en plantas diana puede realizarse por, pero sin carácter limitante, uno de los ejemplos siguientes: (a) promotor constitutivo, (b) promotor inducible por estrés, (c) promotor inducido por productos químicos, y (d) sobre-expresión de un promotor modificado por bioingeniería con, por ejemplo, factores de transcripción derivados de dedos de cinc (Greisman y Pabo, 1997 Science 275: 657). El último caso implica la identificación de los homólogos de CPK-2 (SEQ ID NO: 39) en la planta diana así como de su promotor. Los factores de transcripción recombinantes que contienen dedos de cinc se modifican por bioingeniería para interaccionar específicamente con el homólogo de CPK-2 (SEQ ID NO: 39), activándose la transcripción del gen correspondiente.

Además de introducir las secuencias de ácido nucleico de PKSRP en plantas transgénicas, estas secuencias pueden utilizarse también para identificar un organismo como *Physcomitrella patens* o un pariente próximo del mismo. Asimismo, aquéllas pueden utilizarse para identificar la presencia de *Physcomitrella patens* o un pariente del mismo en una población mixta de microorganismos. La invención proporciona las secuencias de ácido nucleico de cierto número de genes de *Physcomitrella patens*; por sondeo del DNA genómico extraído de un cultivo de una población singular o mixta de microorganismos en condiciones severas con una sonda que abarque una región de un gen de *Physcomitrella patens* que es exclusivo de este organismo, puede averiguarse si dicho organismo está presente.

Adicionalmente, las moléculas de ácido nucleico y proteína de la invención pueden servir como marcadores para regiones específicas del genoma. Esto tiene utilidad no sólo en el mapeado del genoma, sino también en estudios funcionales de las proteínas de *Physcomitrella patens*. Por ejemplo, para identificar la región del genoma a la cual se fija una proteína particular de fijación de DNA de *Physcomitrella patens*, podría digerirse el genoma de *Physcomitrella patens*, e incubarse los fragmentos con la proteína de fijación de DNA. Aquellos fragmentos que fijan la proteína pueden sondarse adicionalmente con las moléculas de ácido nucleico de la invención, con preferencia con marcadores fácilmente detectables. La fijación de una molécula de ácido nucleico de este tipo al fragmento del genoma permite la localización del fragmento al mapa genómico de *Physcomitrella patens*, y, cuando se realiza múltiples veces con diferentes enzimas, facilita una determinación rápida de la secuencia de ácido nucleico a la que se fija la proteína. Además, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser suficientemente homólogas a las secuencias de especies afines, con lo que estas moléculas de ácido nucleico pueden servir como marcadores para la construcción de un mapa genómico en musgos afines.

Las moléculas de ácido nucleico de PKSRP de la invención son también útiles para estudios evolutivos y estructurales de proteínas. Los procesos metabólicos y de transporte en los cuales participan las moléculas de la invención son utilizados por una gran diversidad de células procariotas y eucariotas; por comparación de las secuencias de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención con aquellas que codifican enzimas similares de otros organismos, puede estimarse la afinidad evolutiva de los organismos. Análogamente, una comparación de este tipo permite una estimación de cuáles son las regiones de la secuencia que se conservan y cuáles no lo son, lo que puede ayudar a la determinación de aquellas regiones de la proteína que son esenciales para el funcionamiento de la enzima. Este tipo de determinación es valioso para estudios de ingeniería de proteínas y puede proporcionar una indicación de lo que puede tolerar la proteína en términos de mutagénesis sin perder su función.

La manipulación de las moléculas de ácido nucleico de PKSRP de la invención puede dar como resultado la producción de PKSRLPs que tienen diferencias funcionales de la PKSRP de tipo salvaje. Estas proteínas pueden estar mejoradas en eficiencia o actividad, pueden estar presentes en la célula en mayores números que lo que es usual, o pueden verse reducidas en eficiencia o actividad.

Existen varios mecanismos por los cuales la alteración de una PKSRP de la invención puede afectar directamente a la respuesta al estrés y/o la tolerancia al estrés. En el caso de plantas que expresan PKSRLPs, el transporte incrementado puede conducir a un reparto mejorado de sal y/o solutos en los tejidos y órganos de la planta. Por aumento del número o la actividad de las moléculas transportadoras que exportan moléculas iónicas desde la célula, puede ser posible afectar a la tolerancia de la célula a la sal.

El efecto de la modificación genética en plantas, *C. glutamicum*, hongos, algas, o ciliados sobre la tolerancia al estrés puede evaluarse por cultivo del microorganismo o planta modificado en condiciones inadecuadas y analizar luego las características de crecimiento y/o metabolismo de la planta. Tales métodos de análisis son bien conocidos por un experto en la técnica, e incluyen peso seco, peso húmedo, síntesis de proteínas, síntesis de carbohidratos, síntesis de lípidos, tasas de evapotranspiración, rendimiento de la planta en general y/o de la cosecha, floración, reproducción, producción de semillas, crecimiento de raíces, tasas de respiración, tasas de fotosíntesis, etc. (Aplicaciones de HPLC en Bioquímica, en: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 17; Rehm *et al.*, 1993 Biotechnology, vol. 3, capítulo III: Recuperación y purificación de productos, páginas 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A. *et al.*, 1988 Bioseparations: downstream processing for biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F. y Cabral, J.M.S., 1992 Recovery processes for biological materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A. y Henry, J.D., 1988 Biochemical Separations, en: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. B3, capítulo 11, páginas 1-27, VCH: Weinheim; y Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

Por ejemplo, vectores de expresión en levadura que comprenden los ácidos nucleicos descritos en esta memoria, o fragmentos de los mismos, pueden construirse y transformarse en *Saccharomyces cerevisiae* utilizando protocolos estándar. Las células transgénicas resultantes pueden ensayarse luego en cuanto a fallo o alteración de su tolerancia al estrés por sequía, sal y temperatura. Análogamente, vectores de expresión de plantas que comprenden los ácidos nucleicos descritos en esta memoria, o fragmentos de los mismos, pueden construirse y transformarse en una célula de planta apropiada tal como *Arabidopsis*, soja, colza, maíz, trigo, *Medicago truncatula*, etc., utilizando protocolos estándar. Las células transgénicas resultantes y/o las plantas derivadas de ellas pueden ensayarse luego en cuanto a fallo o alteración de su tolerancia al estrés por sequía, sal y temperatura.

La modificación por bioingeniería de uno o más genes de PKSRP de la invención puede dar también como resultado PKSRLPs que tengan actividades alteradas que afectan indirectamente a la respuesta al estrés y/o la tolerancia al estrés de algas, plantas, ciliados u hongos u otros microorganismos como *C. glutamicum*. Por ejemplo, los procesos bioquímicos normales del metabolismo dan como resultado la producción de una diversidad de productos (v.g., peróxido de hidrógeno y otras especies de oxígeno reactivas) que pueden interferir activamente con estos mismos procesos metabólicos (por ejemplo, se sabe que el peroxinitrito nitrifica las cadenas laterales de la tirosina, desactivando con ello algunas enzimas que tienen tirosina en el sitio activo (Groves, J.T., 1999 Curr. Opin. Chem. Biol. 3(2): 226-235). Si bien estos productos son excretados típicamente, las células pueden alterarse genéticamente para transportar más productos que lo que es típico para una célula de tipo salvaje. Por optimización de la actividad de una o más PKSRLPs de la invención que están involucradas en la exportación de moléculas específicas, tales como moléculas de sal, puede ser posible mejorar la tolerancia de la célula al estrés.

Adicionalmente, las secuencias descritas en esta memoria, o fragmentos de las mismas, pueden utilizarse para generar mutaciones de silenciamiento ("knock-out") en los genomas de diversos organismos, tales como bacterias, células de mamífero, células de levadura, y células vegetales (Girke, T., 1998 The Plant Journal 15: 39-48). Las células silenciadas resultantes pueden evaluarse luego en cuanto a su aptitud o capacidad para tolerar diversas condiciones de estrés, su respuesta a diversas condiciones de estrés, y el efecto sobre el fenotipo y/o el genotipo de la mutación. Para otros métodos de desactivación de genes véase la Patente U.S. No. 6.004.804 "Non-Chimeric Mutational Vectors", y Puttaraju *et al.*, 1999, "Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy", Nature Biotechnology 17: 246-252.

Las estrategias de mutagénesis mencionadas anteriormente para PKSRLPs que dan como resultado una resistencia incrementada al estrés no deben entenderse como limitantes; variaciones en estas estrategias serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica. Utilizando tales estrategias, e incorporando los mecanismos descritos en esta memoria,

las moléculas de ácido nucleico y proteína de la invención pueden utilizarse para generar algas, ciliados, plantas, hongos u otros microorganismos tales como *C. glutamicum* que expresan moléculas de ácido nucleico y proteínas PKSRRP mutadas tales que se mejora la tolerancia al estrés.

Se describen anticuerpos que se fijan específicamente a una PKSRRP, o una porción de la misma, tal como es codificada por un ácido nucleico descrito en esta memoria. Pueden producirse anticuerpos por muchos métodos bien conocidos (véase, v.g. *Harlow and Lane*, "Antibodies; A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, (1988)). Resumidamente, un antígeno purificado puede inyectarse en un animal en una cantidad y en intervalos suficientes para provocar una respuesta inmunitaria. Los anticuerpos pueden purificarse directamente, o pueden obtenerse células de bazo del animal. Las células pueden fusionarse luego con una línea de células inmortales e cribarse en cuanto a secreción de anticuerpos. Los anticuerpos pueden utilizarse para cribar bibliotecas de clones de ácido nucleico respecto a células que secretan el antígeno. Aquellos clones que dan resultado positivo pueden secuenciarse luego. (Véase, por ejemplo, Kelly *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10: 163-167; Bebbington *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10: 169-175).

Las expresiones "se fija selectivamente" y "se fija específicamente" con el polipéptido hacen referencia a una reacción de fijación que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otras entidades biológicas. Así, en condiciones de inmunoensayo diseñadas, los anticuerpos especificados fijados a una proteína particular no se fijan en una cantidad importante a otras proteínas presentes en la muestra. La fijación selectiva de un anticuerpo en tales condiciones puede requerir un anticuerpo que se seleccione por su especificidad para una proteína particular. Pueden utilizarse una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos que se fijan selectivamente con una proteína particular. Por ejemplo, se utilizan rutinariamente inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos selectivamente inmunorreactivos con una proteína. Véase *Harlow and Lane* "Antibodies, A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que podrían utilizarse para determinar fijación selectiva.

En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales a partir de diversos hospedadores. Una descripción de técnicas para preparar tales anticuerpos monoclonales puede encontrarse en Stites *et al.*, compiladores, "Basic and Clinical Immunology", (Lange Medical Publications, Los Altos, Calif., 4ª Edición) y las referencias citadas en dicho lugar, y en *Harlow and Lane* ("Antibodies, A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, 1988).

Ejemplos

La presente invención se ilustra por ácidos nucleicos y proteínas afines a CPK-2 como se muestra en SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 39, respectivamente. Todas las restantes secuencias de ácido nucleico y aminoácidos se presentan únicamente para comparación.

Ejemplo 1

Crecimiento de cultivos de Physcomitrella patens

Para este estudio, se utilizaron plantas de la especie *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. procedentes de la colección de la sección de estudios genéticos de la Universidad de Hamburgo.

Las mismas proceden de la cepa 16/14 recogida por H.L.K. Whitehouse en Gransden Wood, Huntingdonshire (Inglaterra), que fue subcultivada a partir de una espora por Engel (1968, *Am. J. Bot.* 55, 438-446). La proliferación de las plantas se efectuó por medio de esporas y por regeneración de los gametofitos. El protonema se desarrolló a partir de la espora haploide como un cloronema rico en cloroplastos y caulonema pobre en cloroplastos, sobre el cual se formaron yemas al cabo de aproximadamente 12 días. Estas crecieron para dar gametóforos que llevaban anteridios y arquegonios. Después de la fertilización, se obtuvo el esporofito diploide con una seta corta y la cápsula de esporas, en la cual maduraron las meiosporas.

El cultivo se realizó en una cámara climatizada a una temperatura del aire de 25°C y una intensidad de luz de 55 micromoles^{-lm2} (luz blanca; tubo fluorescente Philips TL 65W/25) y un cambio luz/oscuridad de 16/8 horas. El musgo se modificó en cultivo líquido utilizando medio de Knop de acuerdo con Reski y Abel (1985; *Planta* 165: 354-358) o se cultivó en medio Knop sólido utilizando agar oxoide al 1% (Unipath, Basingstoke, Inglaterra). Los protonemas utilizados para aislamiento de RNA y DNA se cultivaron en cultivos líquidos aireados. Los protonemas se trituraron cada 9 días y se transfirieron a medio de cultivo fresco.

Ejemplo 2

Aislamiento de DNA total a partir de plantas

Los detalles para el aislamiento del DNA total se refieren al tratamiento de 1 gramo de peso fresco de material de planta. Los materiales utilizados incluyen los tampones siguientes: tampón CTAB: 2% (p/v) de bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio (CTAB); Tris HCl 100 mM de pH 8,0; NaCl 1,4M; EDTA 20 mM; tampón de N-laurilsarcosina: 10% (p/v) de N-laurilsarcosina; Tris HCl 100 mM de pH 8,0; EDTA 20 mM.

El material de planta se trituró bajo nitrógeno líquido en un mortero para dar un polvo fino y se transfirió a vasos Eppendorf de 2 ml. El material de planta congelado se cubrió luego con una capa de 1 ml de tampón de descomposición (1 ml de tampón CTAB, 100 μ l de tampón de N-laurilsarcosina, 20 μ l de β -mercaptoetanol y 10 μ l de solución de proteínaasa K, 10 mg/ml) y se incubó a 60°C durante 1 hora con agitación continua mediante sacudidas. El homogeneizado obtenido se distribuyó en dos vasos Eppendorf (de 2 ml) y se extrajo dos veces por agitación mediante sacudidas con el mismo volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Para la separación de fases, se efectuó una centrifugación a 8000 x g y a la temperatura ambiente durante 15 minutos en cada caso. El DNA se precipitó luego a -70°C durante 30 minutos utilizando isopropanol enfriado con hielo. El DNA precipitado se sedimentó a 4°C y 10.000 g durante 30 minutos y se resuspendió en 180 μ l de tampón TE (Sambrook *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6). Para purificación ulterior, el DNA se trató con NaCl (concentración final 1,2M) y se precipitó de nuevo a -70°C durante 30 minutos utilizando dos veces el volumen de etanol absoluto. Después de un paso de lavado con etanol al 70%, el DNA se secó y se recogió subsiguientemente en 50 μ l de H₂O + RNasa (concentración final 50 mg/ml). El DNA se disolvió durante una noche a 4°C y se efectuó subsiguientemente la digestión con RNasa a 37°C durante 1 hora. El almacenamiento del DNA tuvo lugar a 4°C.

Ejemplo 3

Aislamiento de RNA total y RNA poli-(A)⁺ y construcción de una biblioteca de cDNA de Physcomitrella patens

Para el cribado de los materiales transcritos, se aislaron tanto RNA total como RNA poli(A)⁺. El RNA total se obtuvo a partir de protonemas de tipo salvaje de 9 días siguiendo el método GTC (Reski *et al.*, 1994, Mol. Gen. Genet., 244: 352-359). El RNA poli(A)⁺ se aisló utilizando DynaBeads® (Dyna, Oslo, Noruega) siguiendo las instrucciones del protocolo de los fabricantes. Después de determinar la concentración del RNA o del RNA poli(A)⁺, el RNA se precipitó por adición de 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M de pH 4,6 y 2 volúmenes de etanol, y se guardó a -70°C.

Para construcción de la biblioteca de cDNA, se realizó la síntesis de la primera cadena utilizando transcriptasa inversa del Virus de la Leucemia Murina (Roche, Mannheim, Alemania) e iniciadores oligo-d(T), y la síntesis de la segunda cadena por incubación con DNA-polimerasa I, enzima Klenow y digestión con RNasaH a 12°C (2 horas), 16°C (1 hora), y 22°C (1 hora). La reacción se paró por incubación a 65°C (10 minutos) y se transfirió subsiguientemente a hielo. Las moléculas de DNA bicatenario se hicieron romas con DNA-polimerasa T4 (Roche, Mannheim) a 37°C (30 minutos). Los nucleótidos se separaron por extracción con fenol/cloroformo y columnas rotativas Sephadex G50. Se ligaron adaptadores EcoRI (Pharmacia, Freiburg, Alemania) a los extremos del cDNA por medio de DNA-ligasa T4 (Roche, 12°C, una noche) y se fosforilaron por incubación con polinucleótido-quinasa (Roche, 37°C, 30 minutos). Esta mezcla se sometió a separación en un gel de agarosa de punto de fusión bajo. Las moléculas de DNA mayores que 300 pares de bases se eluyeron del gel, se extrajeron con fenol, se concentraron en columnas Elutip-D (Schleicher and Schuell, Dassel, Alemania) y se ligaron a ramas vectoras, después de lo cual se empaquetaron en fagos lambda ZAPII o fagos lambda ZAP-Express utilizando el Kit Gigapack Gold (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos) utilizando material y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 4

Secuenciación y anotación de la función de ESTs de Physcomitrella patens

Se utilizaron bibliotecas de cDNA como se describe en el Ejemplo 3 para secuenciación del DNA de acuerdo con métodos estándar, y en particular, por el método de terminación de cadenas utilizando el Kit ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Alemania). La secuenciación aleatoria se llevó a cabo subsiguientemente a la recuperación preparativa de plásmido a partir de bibliotecas de cDNA por escisión másica *in vivo*, retransformación, y extensión subsiguiente de DH10B sobre placas de agar (detalles de material y protocolo de Stratagene, Amsterdam, Países Bajos). Se preparó DNA plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* desarrollados durante una noche, que crecían en medio de Caldo Luria que contenía ampicilina (véase Sambrook *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) en un robot de preparación de DNA Qiagene (Qiagen, Hilden) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se utilizaron iniciadores de secuenciación con las secuencias de nucleótidos siguientes:

5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'	SEQ ID NO:40
5'-CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3'	SEQ ID NO:41
5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'	SEQ ID NO:42

Las secuencias se procesaron y anotaron utilizando el paquete de soporte lógico EST-MAX proporcionado comercialmente por Bio-Max (Munich, Alemania). El programa incorpora prácticamente todos los métodos bioinformáticos importantes para caracterización funcional y estructural de secuencias de proteínas. Para referencia se remite al sitio de la web en pedant.mips.biochem.mpg.de. Los algoritmos más importantes incorporados en EST-MAX son: FASTA: Very sensitive sequence database searches with estimates of statistical significance. Pearson W.R. (1990) Rapid and

sensitive sequence comparison with FAST and FASTA. Methods Enzymol. 183:63-98; BLAST: Very sensitive sequence database searches with estimates of statistical significance. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., y Lipman D.J. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215:403-10; PREDATOR: High-accuracy secondary structure prediction from single and multiple sequences. Frishman, D. and Argos, P. (1997) 75% accuracy in protein secondary structure prediction. Proteins, 27:329-335; CLUSTALW: Multiple sequence alignment. Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680; TMAP: Transmembrane region prediction from multiply aligned sequences. Persson, B. and Argos, P. (1994) Prediction of transmembrane segments in proteins utilizing multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 237:182-192; ALOM2: Transmembrane region prediction from single sequences. Klein, P., Kanehisa, M., and DeLisi, C. Prediction of protein function from sequence properties: A discriminate analysis of a database. Biochim. Biophys. Acta 787:221-226 (1984). Version 2 by Dr. K. Nakai; PROSEARCH: Detection of PROSITE protein sequence patterns. Kolakowski L.F. Jr., Leunissen J.A.M., Smith I.E. (1992) ProSearch: fast searching of protein sequences with regular expression patterns related to protein structure and function. Biotechniques 13, 919-921; BLIMPS: Similarity searches against a database of ungapped blocks. J.C. Wallace and Hemicoff S., (1992); PATMAT: A searching and extraction program for sequence, pattern and block queries and databases, CABIOS 8:249-254. Written by Bill Alford.

Ejemplo 5

Identificación de ORFs de Physcomitrella patens correspondientes a CPK-2, PK-7, PK-8, PK-9, CK-1, CK-2, CK-3, MPK-2, MPK-3, MPK-4, MPK-5, CPK-1 y CPK-2

Los cDNAs parciales de *Physcomitrella patens* (ESTs) que se muestran en la Tabla 1 siguiente se identificaron en el programa de secuenciación EST de *Physcomitrella patens* utilizando el programa EST-MAX por análisis BLAST. Los Números de Identificación de Secuencia correspondientes a estas ESTs son como sigue: CPK-2 (SEQ ID NO: 1), PK-7 (SEQ ID NO: 2), PK-8 (SEQ ID NO: 3), PK-9 (SEQ ID NO: 4), CK-1 (SEQ ID NO: 5), CK-2 (SEQ ID NO: 6), CK-3 (SEQ ID NO: 7), MPK-2 (SEQ ID NO: 8), MPK-3 (SEQ ID NO: 9), MPK-4 (SEQ ID NO: 10), MPK-5 (SEQ ID NO: 11), CPK-1 (SEQ ID NO: 12) y CPK-2 (SEQ ID NO: 13; inventiva).

TABLA 1

Nombre	Categorías funcionales	Función	Código de secuencia	Posición ORF
PpPK-6	Proteína-quinasa	Proteína semejante a la serina-treonina-quinasa	c_pp004044242r	1-474
PpPK-7 *	Proteína-quinasa	Proteína-quinasa cdc2MsF semejante acdc2	s_pp001031042f	1-267
PpPK-8 *	Proteína-quinasa	F13C5.120 homólogo de proteína-quinasa	c_pp004044100r	1-581
PpPK-9 *	Proteína-quinasa	Proteína-quinasa; similar a PKX1 humana	c_pp004071077r	709-137
PpCK-1 *	Proteína-quinasa	Proteína-quinasa receptora	c_pp001062017r	1160-1
PpCK-2 *	Proteína-quinasa	Caseína-quinasa	c_pp004038371r	1909-1421
PpCK-3 *	Proteína-quinasa	Subunidad catalítica de caseína-quinasa II	c_pp004076164r	2-877
PpMPK-2	Proteína-quinasa	proteína-quinasa 6 activada por mitógenos	c_pp004041329r	952-293
PpMPK-3	Proteína-quinasa	quinasa 1c grande MAP	c_pp004061263r	221-550
PpMPK-4	Proteína-quinasa	proteína-quinasa MEK1 (EC 2.7.1.-)	c_pp001064077r	1153-596
PpMPK-5	Proteína-quinasa	proteína-quinasa MEK1	c_pp004064129r	114-233
PpCPK-1	Proteína-quinasa	proteína-quinasa	c_pp004014376r	1084-173
PpCPK-2	Proteína-quinasa	proteína-quinasa dependiente de calcio	c_pp004038141r	422-1213
PpPK-6	Proteína-quinasa	proteína-quinasa cdc2MsF semejante a cdc2	s_pp001031042f	1-267

ES 2 345 833 T3

TABLA 2

Grado de Identidad y Semejanza de Aminoácidos de PpPK-6 (para comparación) y Otras Proteínas Homólogas (se utilizó el programa GCG Gap; penalidad por laguna: 10; penalidad por extensión de laguna: 0,1; matriz de registro: blosum62)

Swiss-Prot #	O81106	Q9LUL4	Q9ZQZ2	Q9MAS2	Q9LK66
Nombre de proteína	PROTEÍNA-QUINASA 2 DE REPETICIÓN TRANSMEMBRANAL, RICA EN LEUCINA	PROTEÍNA SEMEJANTE A LA SERINA/TREONINA PROTEÍNA-QUINASA	PROTEÍNA-QUINASA ENLAZADA AL RECEPTOR LRR SUPUESTA	PROTEÍNA-QUINASA DEL RECEPTOR LRR SUPUESTA	PROTEÍNA SEMEJANTE A PROTEÍNA-QUINASA
Especie	<i>Zea mays</i> (Maíz)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Berro de oreja de ratón)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Berro de oreja de ratón)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Berro de oreja de ratón)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Berro de oreja de ratón)
Identidad %	42%	42%	38%	37%	37%
Semejanza %	54%	52%	50%	49%	48%

TABLA 3

Grado de Identidad y Semejanza de Aminoácidos de PpPK-7 (para comparación) y Otras Proteínas Homólogas (se utilizó el programa GCG Gap; penalidad por laguna: 10; penalidad por extensión de laguna: 0,1; matriz de registro: blosum62)

Swiss-Prot #	P25859	O49120	Q38774	P93321	Q9ZVI4
Nombre de proteína	HOMÓLOGO B DE PROTEÍNA 2 DE CONTROL DE LA DIVISIÓN CELULAR	QUINASA 1 DEPENDIENTE DE CICLINA	HOMÓLOGO C DE PROTEÍNA 2 DE CONTROL DE LA DIVISIÓN CELULAR	HOMÓLOGO CDC2MSD DE LA QUINASA CDC2	PROTEÍNA-QUINASA SERINA/TREONINA SUPUESTA
Especie	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Berro de oreja de ratón)	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Antirrhinum majus</i> (Dragón de jardín)	<i>Medicago sativa</i> (Alfalfa)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Berro de oreja de ratón)
Identidad %	70%	68%	70%	69%	69%
Semejanza %	79%	76%	81%	79%	77%

TABLA 4

Grado de Identidad y Semejanza de Aminoácidos de PpPK-8 (para comparación) y Otras Proteínas Homólogas (se utilizó el programa GCG Gap; penalidad por laguna: 10; penalidad por extensión de laguna: 0,1; matriz de registro: blosum62)

Swiss-Prot #	O82754	Q9M085	Q02779	Q05609	Q39886
Nombre de proteína	SERINA/TREONINA QUINASA SUPUESTA	PROTEÍNA SEMEJANTE A PROTEÍNA-QUINASA	PROTEÍNA-QUINASA QUINASA 10 ACTIVADA POR MITÓGENOS (sic)	SERINA/TREONINA PROTEÍNA-QUINASA CTR1	PROTEÍNA-QUINASA
Especie	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Berro de oreja de ratón)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Berro de oreja de ratón)	<i>Homo sapiens</i> (Humano)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Berro de oreja de ratón)	<i>Glycine max</i> (Soja)
Identidad %	25%	26%	27%	27%	26%
Semejanza %	42%	40%	38%	40%	40%

ES 2 345 833 T3

TABLA 5

Grado de Identidad y Semejanza de Aminoácidos de PpPK-9 (para comparación) y Otras Proteínas Homólogas (se utilizó el programa GCG Gap; penalidad por laguna: 10; penalidad por extensión de laguna: 0,1; matriz de registro: blosum62)

Swiss-Prot #	Q9SL77	P34099	Q9TXB8	P40376	Q9SXP9
Nombre de proteína	PROTEÍNA-QUINASA DEPENDIENTE DE CAMP SUPUESTA	SUBUNIDAD CATALÍTICA DE LA PROTEÍNA-QUINASA DEPENDIENTE DE CAMP	SERINA/TREONINA PROTEÍNA-QUINASA	SUBUNIDAD CATALÍTICA DE LA PROTEÍNA-QUINASA DEPENDIENTE DE CAMP	SUBUNIDAD CATALÍTICA DE LA PROTEÍNA-QUINASA DEPENDIENTE DE CAMP
Especie	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Dictyostelium discoideum (Moho del fango)	Dictyostelium	Schizosaccharomyces pombe (Levadura de fisión)	Euglena gracilis
Identidad %	45%	33%	32%	33%	28%
Semejanza %	60%	48%	48%	50%	40%

TABLA 6

Grado de Identidad y Semejanza de Aminoácidos de PpCK-1 (para comparación) y Otras Proteínas Homólogas (se utilizó el programa GCG Gap; penalidad por laguna: 10; penalidad por extensión de laguna: 0,1; matriz de registro: blosum62)

Swiss-Prot #	Q9SZI1	Q9ZUP4	P42158	Q9LW62	Q39050
Nombre de proteína	PROTEÍNA SEMEJANTE A CASEÍNA-QUINASA I COL 0	CASEÍNA-QUINASA I SUPUESTA	CASEÍNA-QUINASA I, SEMEJANTE A LA ISOFORMA DELTA	CASEÍNA-QUINASA	CASEÍNA-QUINASA I
Especie	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)
Identidad %	49%	48%	48%	46%	40%
Semejanza %	62%	61%	61%	58%	52%

TABLA 7

Grado de Identidad y Semejanza de Aminoácidos de PpCK-2 (para comparación) y Otras Proteínas Homólogas (se utilizó el programa GCG Gap; penalidad por laguna: 10; penalidad por extensión de laguna: 0,1; matriz de registro: blosum62)

Swiss-Prot #	Q9SZI1	P42158	Q9ZWB3	Q9ZUP4	Q9LSX4
Nombre de proteína	PROTEÍNA SEMEJANTE A CASEÍNA-QUINASA I COL 0	CASEÍNA-QUINASA I	ADK1	CASEÍNA-QUINASA I SUPUESTA	CASEÍNA-QUINASA I
Especie	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)
Identidad %	64%	59%	60%	58%	57%
Semejanza %	73%	66%	72%	67%	69%

ES 2 345 833 T3

TABLA 8

Grado de Identidad y Semejanza de Aminoácidos de PpCK-3 (para comparación) y Otras Proteínas Homólogas
(se utilizó el programa GCG Gap; penalidad por laguna: 10; penalidad por extensión de laguna: 0,1;
matriz de registro: blosum62)

Swiss-Prot #	O64816	Q9ZR52	P28523	Q9SN18	Q08466
Nombre de proteína	SUBUNIDAD CATALÍTICA DE CASEÍNA-QUINASA II SUPUESTA	SUBUNIDAD ALFA DE CASEÍNA-QUINASA II	CADENA ALFA DE CASEÍNA-QUINASA II	CADENA ALFA 2 DE CASEÍNA-QUINASA II (CK II)	CADENA ALFA 2 DE CASEÍNA-QUINASA II
Especie	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Zea mays (Maíz)	Zea mays (Maíz)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)
Identidad %	87%	89%	89%	88%	88%
Semejanza %	93%	94%	93%	93%	93%

TABLA 9

Grado de Identidad y Semejanza de Aminoácidos de PpMPK-2 (para comparación) y Otras Proteínas Homólogas
(se utilizó el programa GCG Gap; penalidad por laguna: 10; penalidad por extensión de laguna: 0,1;
matriz de registro: blosum62)

Swiss-Prot #	Q9M136	Q40531	Q39024	Q40353	Q07176
Nombre de proteína	QUINASA MAP 4	HOMÓLOGO NTF6 DE LA PROTEÍNA-QUINASA ACTIVADA POR MITÓGENOS	HOMÓLOGO 4 DE LA PROTEÍNA-QUINASA ACTIVADA POR MITÓGENOS	HOMÓLOGO MMK2 DE LA PROTEÍNA-QUINASA ACTIVADA POR MITÓGENOS	HOMÓLOGO MMK1 DE LA PROTEÍNA-QUINASA ACTIVADA POR MITÓGENOS
Especie	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Nicotiana tabacum (Tabaco común)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Medicago sativa (Alfalfa)	Medicago sativa (Alfalfa)
Identidad %	70%	69%	69%	68%	66%
Semejanza %	80%	78%	80%	79%	76%

ES 2 345 833 T3

TABLA 10

Grado de Identidad y Semejanza de Aminoácidos de PpMPK-3 (para comparación) y Otras Proteínas Homólogas (se utilizó el programa GCG Gap; penalidad por laguna: 10; penalidad por extensión de laguna: 0,1; matriz de registro: blosum62)

Swiss-Prot #	Q9SUX2	P13983	Q41192	O70495	Q9RLD9
Nombre de proteína	PROTEÍNA SEMEJANTE A EXTENSINA	EXTENSINA	NAPRP3	MULTITUD DE PROLINAS-101	FERULOIL-COA SINTETASA
Especie	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Nicotiana tabacum (Tabaco común)	Nicotiana glauca (Tabaco alado) (Tabaco pánico)	Mus musculus (Ratón)	Pseudomonas sp.
Identidad %	12%	15%	22%	18%	11%
Semejanza %	21%	22%	30%	26%	20%

TABLA 11

Grado de Identidad y Semejanza de Aminoácidos de PpMPK-4 (para comparación) y Otras Proteínas Homólogas (se utilizó el programa GCG Gap; penalidad por laguna: 10; penalidad por extensión de laguna: 0,1; matriz de registro: blosum62)

Swiss-Prot #	O49975	O48616	Q9M6Q9	O80395	Q9S7U9
Nombre de proteína	PROTEÍNA-QUINASA ZMMEK1	QUINASA MAP QUINASA	QUINASA MAP QUINASA	QUINASA 2 MAP QUINASA	PROTEÍNA BETA MAP2K
Especie	Zea mays (Maíz)	Lycopersicon esculentum (Tomate)	Nicotiana glauca (Tabaco común)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)
Identidad %	59%	54%	53%	50%	50%

TABLA 12

Grado de Identidad y Semejanza de Aminoácidos de PpMPK-5 (para comparación) y Otras Proteínas Homólogas (se utilizó el programa GCG Gap; penalidad por laguna: 10; penalidad por extensión de laguna: 0,1; matriz de registro: blosum62)

Swiss-Prot #	O49975	O48616	Q9M6Q9	O80395	Q9S7U9
Nombre de proteína	PROTEÍNA-QUINASA ZMMEK1	QUINASA MAP QUINASA	QUINASA MAP QUINASA	QUINASA 2 MAP QUINASA	PROTEÍNA BETA MAP2K
Especie	Zea mays (Maíz)	Lycopersicon esculentum (Tomate)	Nicotiana glauca (Tabaco común)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)
Identidad %	59%	54%	53%	50%	50%
Semejanza %	72%	66%	66%	62%	62%

ES 2 345 833 T3

TABLA 13

Grado de Identidad y Semejanza de Aminoácidos de PpCPK-1 (para comparación) y Otras Proteínas Homólogas (se utilizó el programa GCG Gap; penalidad por laguna: 10; penalidad por extensión de laguna: 0,1; matriz de registro: blosum62)

Swiss-Prot #	Q9SCS2	O04290	P53681	P93520	Q41792
Nombre de proteína	PROTEÍNA-QUINASA AFÍN A CDPK	PROTEÍNA-QUINASA AFÍN A CDPK	PROTEÍNA-QUINASA AFÍN A CDPK	HOMÓLOGO DE PROTEÍNA-QUINASA DEPENDIENTE DE CALCIO/ CALMODULINA	PROTEÍNA-QUINASA AFÍN A CDPK
Especie	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Daucus carota (Zanahoria)	Zea mays (Maíz)	Zea mays (Maíz)
Identidad %	64%	64%	63%	63%	63%
Semejanza %	76%	76%	75%	73%	74%

TABLA 14

Grado de Identidad y Semejanza de Aminoácidos de PpCPK-2 (inventiva) y Otras Proteínas Homólogas (se utilizó el programa GCG Gap; penalidad por laguna: 10; penalidad por extensión de laguna: 0,1; matriz de registro: blosum62)

Swiss-Prot #	Q9S7Z4	Q42479	Q41790	O81390	Q9ZPM0
Nombre de proteína	PROTEÍNA-QUINASA DEPENDIENTE DE CALCIO	PROTEÍNA-QUINASA DEPENDIENTE DE CALCIO	PROTEÍNA-QUINASA DEPENDIENTE DE CALCIO	PROTEÍNA-QUINASA DEPENDIENTE DE CALCIO	PROTEÍNA-QUINASA DEPENDIENTE DE CA2+
Especie	Marchantia polymorpha (Hepática)	Arabidopsis thaliana (Berro de oreja de ratón)	Zea mays (Maíz)	Nicotiana tabacum (Tabaco común)	Mesembryantium crystallinum (Maravilla de higuera común)
Identidad %	66%	62%	59%	59%	59%
Semejanza %	75%	73%	70%	68%	70%

Ejemplo 6

Clonación del cDNA de longitud total de *Physcomitrella patens* codificante de CPK-2, PK-7, PK-8, PK-9, CK-1, CK-2, CK-3, MPK-2, MPK-3, MPK-4, MPK-5, CPK-1 y CPK-2

Para aislar los clones codificantes de CPK-2 (SEQ ID NO: 26), PK-7 (SEQ ID NO: 15), PK-8 (SEQ ID NO: 16), PK-9 (SEQ ID NO: 17), CK-1 (SEQ ID NO: 18), CK-2 (SEQ ID NO: 19), CK-3 (SEQ ID NO: 20), MPK-2 (SEQ ID NO: 21), MPK-3 (SEQ ID NO: 22), MPK-4 (SEQ ID NO: 23), MPK-5 (SEQ ID NO: 24), CPK-1 (SEQ ID NO: 25) y CPK-2 inventivo (SEQ ID NO: 26) a partir de *Physcomitrella patens*, se crearon bibliotecas de cDNA con el kit de Amplificación de cDNA SMART RACE (Clontech Laboratories) siguiendo instrucciones del fabricante. Se utilizó como molde RNA total aislado como se describe en el Ejemplo 3. Los cultivos se trataron antes del aislamiento del RNA como sigue: Estrés por Sal: 2, 6, 12, 24, 48 horas con medio complementado con NaCl 1-M; Estrés por Frío: 4°C durante los mismos tiempos que en el caso de la sal; Estrés por Sequía: los cultivos se incubaron sobre papel de filtro seco durante los mismos tiempos que en el caso de la sal.

Protocolo 5' RACE

Se utilizaron las secuencias EST CPK-2 (SEQ ID NO: 1), PK-7 (SEQ ID NO: 2), PK-8 (SEQ ID NO: 3), PK-9 (SEQ ID NO: 4), CK-1 (SEQ ID NO: 5), CK-2 (SEQ ID NO: 6), CK-3 (SEQ ID NO: 7), MPK-2 (SEQ ID NO: 8), MPK-3 (SEQ ID NO: 9), MPK-4 (SEQ ID NO: 10), MPK-5 (SEQ ID NO: 11), CPK-1 (SEQ ID NO: 12) y CPK-2 inventivo (SEQ ID NO: 13).

8), MPK-3 (SEQ ID NO: 9), MPK-4 (SEQ ID NO: 10), MPK-5 (SEQ ID NO: 11), CPK-1 (SEQ ID NO: 12) y CPK-2 inventivo (SEQ ID NO: 13) identificadas por la búsqueda en bases de datos como se describe en el Ejemplo 4, para diseñar oligos para RACE (véase Tabla 15). Las secuencias extendidas para estos genes se obtuvieron por realización de Amplificación Rápida de la reacción en cadena de la polimerasa en los Extremos de cDNA (RACE PCR) utilizando el kit PCR Advantage 2 (Clontech Laboratories) y el kit de amplificación de cDNA SMART RACE (Clontech Laboratories) utilizando un Termociclador Biometra T3 siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias obtenidas a partir de las reacciones RACE, correspondían a regiones codificantes de longitud total de CC-2 y CC-3 y se utilizaron para diseñar oligos para clonación de longitud total de los genes respectivos (véase amplificación de longitud total a continuación).

Amplificación de Longitud Total

Clones de longitud total correspondientes a CPK-2 (SEQ ID NO: 26), PK-7 (SEQ ID NO: 15), PK-8 (SEQ ID NO: 16), PK-9 (SEQ ID NO: 17), CK-1 (SEQ ID NO: 18), CK-2 (SEQ ID NO: 19), CK-3 (SEQ ID NO: 20), MPK-2 (SEQ ID NO: 21), MPK-3 (SEQ ID NO: 22), MPK-4 (SEQ ID NO: 23), MPK-5 (SEQ ID NO: 24), CPK-1 (SEQ ID NO: 25) y CPK-2 inventivo (SEQ ID NO: 26) se obtuvieron por realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores específicos de genes (véase Tabla 15) y la EST original como molde. Las condiciones para la reacción fueron condiciones estándar con DNA-polimerasa PWO (Roche). La PCR se realizó de acuerdo con condiciones estándar y con protocolos del fabricante (Sambrook *et al.*, 1989 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., Termociclador Biometra T3). Los parámetros para la reacción fueron: 5 minutos a 94°C seguidos por cinco ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C y 1,5 minutos a 72°C. Esto fue seguido por 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 65°C y 1,5 minutos a 72°C.

Los fragmentos amplificados se extrajeron de gel de agarosa con un Kit de Extracción de Gel QIAquick (Qiagen) y se ligaron en el vector TOPO pCR2.1 (Invitrogen) siguiendo instrucciones del fabricante. Los vectores recombinantes se transformaron en células Top10 (Invitrogen) utilizando condiciones estándar (Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Las células transformadas se seleccionaron sobre agar LB que contenía 100 µg/ml de carbenicilina, 0,8 mg de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosido) y 0,8 mg de IPTG (isopropiltio-β-D-galactosido) desarrollado durante una noche a 37°C. Se seleccionaron las colonias blancas y se utilizaron para inocular 3 ml de LB líquido que contenía 100 µg/ml de ampicilina y se dejaron crecer durante una noche a 37°C. Se extrajo el DNA plasmídico utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) siguiendo instrucciones del fabricante. Los análisis de clones subsiguientes y el mapeado de restricción se realizaron de acuerdo con técnicas estándar de biología molecular (Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 15

Esquema e iniciadores utilizados para clonación de clones de longitud total

Gen	Sitios en el Producto Final	Método de Aislamiento	Variedad de Iniciadores	Iniciadores RT-PCR
(Para comparación)	XmaI/Hpa	5' RACE y RT-PCR para el clon de longitud total	RC782: (SEQ ID NO:43) CCACGGTCTTCGG CTGCTGGTCGTG RC783: (SEQ ID NO:44) GCAGCACAGCAC CACCAGCGGCTAT NVT: (SEQ ID NO:45) GCGCCCAGTGAG TAGCTCCAGCATT	RC858: (SEQ ID NO:46) ATCCCGGGTGAGT ATCACTTACGGTG GCGA RC859: (SEQ ID NO:47) GCGTTAACTCGAC CAAGGTCACTATT CCAAGCA
PpPK-7 (comparación)	XmaI/Hpa	5' RACE y RT-PCR para el clon de longitud total	RC250: (SEQ ID NO:48) CGGTGCCCACCTC GTTCCTGTGGTT	RC590: (SEQ ID NO:49) ATCCCGGGAGTGG GTGGTTGGACTGT AAGGA RC591: (SEQ ID NO:50) GCGTTAACCTTCG TCTTGGACAGGTA GAGGTTAC

PpPK-8 (comparación)	XmaI/Hpa	5' RACE y RT-PCR para el clon de longitud total	(SEQ ID NO:51) GACTCAGCCCCGT AATCCTTCAACA	RC1016: (SEQ ID NO:52) ATCCCGGGCAACG AGAAGCATTCGAG ATGGC RC1021: (SEQ ID NO:53) GCGTTAACGAGCA TCACGATACTCGG TGATTTC
PpPK-9 (comparación)	XmaI/SacI	5' RACE y RT-PCR para el clon de longitud total	RC263: (SEQ ID NO:54) CGACGGCTAATA CCACGTTGGCGAC CA	RC831: (SEQ ID NO:55) ATCCCGGGCTGTG ATGTCGGTGTGGT GCTCTGC RC832: (SEQ ID NO:56) GCGAGCTCGCACC ACTGAATGATGGA GACTCAGG
PpCK-1 (comparación)	XmaI/Hpa	5' RACE y RT-PCR para el clon de longitud total	NVT: (SEQ ID NO:57) CGACCGCAGCCC ATGAGGAAGTTAT	RC614: (SEQ ID NO:58) ATCCCGGGCTCAC GTAGTGCACTGAA CTCTGTC RC615: (SEQ ID NO:59) GCGTTAACATGCC CATCTTCTCATACT CAGACC

ES 2 345 833 T3

PpCK-2 (comparación)	XmaI/Hpa	5' RACE y RT-PCR para el clon de longitud total	NVT: (SEQ ID NO:60) CTCGCCTACCAAG CCCCATTAGAAA	RC1012: (SEQ ID NO:61) ATCCCGGGTTGTC GAGGACGGAGAG AGAAGAG RC1015: (SEQ ID NO:62) GCGTTAACCTTAG GAATCGTATGGCA GAGAGCT
PpCK-3 (comparación)	HpaI/SacI	5' RACE y RT-PCR para el clon de longitud total	NVT: (SEQ ID NO:63) GCTTCACAATGTT GGGCCCTCCACA	RC640: (SEQ ID NO:64) GCGTTAACGGGAG GAAGGTCGGGGGA AGAGACG RC641: (SEQ ID NO:65) GCGAGCTCAGCGC TTCGCACAACTGA GAAACCT
PpMPK-2 (para comparación)	XmaI/Hpa	5' RACE y RT-PCR para el clon de longitud total	NVT: (SEQ ID NO:66) ACGAGAAGGTTG GTGGGCTTCAAGT	RC664: (SEQ ID NO:67) ATCCCGGGCGAGC CATGGCGCCACTT GCTT RC665: (SEQ ID NO:68) GCGTTAACGCCGA GCAACAATGTCTG CTGGATG

ES 2 345 833 T3

PpMPK-3 (para comparación)	XmaI/Hpa	5' RACE y RT-PCR para el clon de longitud total	RC268: (SEQ ID NO:69) CCCGGTAAGCCAT CGGAGTGTGGAA	RC662: (SEQ ID NO:70) ATCCCGGGCTTGT ATTGGCTCGGATA ATTT RC663: (SEQ ID NO:71) GCGTTAACGGCAA TATCTGCACAGCC GTTCACT
PpMPK-4 (para comparación)	XmaI/SacI	5' RACE y RT-PCR para el clon de longitud total	NVT: (SEQ ID NO:72) GTGTCTCGCTGGG CCAAGGAATGAA	RC1001: (SEQ ID NO:73) ATCCCGGGCGGTC GAGTCGTATTAGG TGTTGTTTC RC1005: (SEQ ID NO:74) GAGCTCCGGTAGG TCCGACCTCTTCA ATTG
PpMPK-5 (para comparación)	XmaI/SacI	5' RACE y RT-PCR para el clon de longitud total	RC266: (SEQ ID NO:75) GACGACGCGAAG CCCGGTGTGGTTG A	RC572: (SEQ ID NO:76) ATCCCGGGAGAGG CTGATCTGATGCT ACAGT RC573: (SEQ ID NO:77) ATGAGCTCTGGCG GATTGGCGAGGTA GTTTCGAC

PpCPK-1 (para comparación)	XmaI/Hpa I	5' RACE y RT-PCR para el clon de longitud total	RC526: (SEQ ID NO:78) CGGCGCAACGTA GTATGCGCTTCCA RC723N: (SEQ ID NO:79) CGCGGTGAACAA CACCTTGCAAGTG AC RC767: (SEQ ID NO:80) GCTCGGGTCAGCC CTCAACACCGCA NVT: (SEQ ID NO:81) GTTAAAGCTTGTG CAGCAGTCATGC	RC817: (SEQ ID NO:82) ATCCCGGGTGTAG GCGGGCGAGGTTT GATGC RC818: (SEQ ID NO:83) GCGTTAACGACAA CCGGAGTAGAACG GCAGTCCA
PpCPK-2 (inventiva)	XmaI/Hpa I	5' RACE y RT-PCR para el clon de longitud total	NVT: (SEQ ID NO:84) AGAAGCGAGGAA TGGGCAGGGACG A	RC703: (SEQ ID NO:85) ATCCCGGGCGAAC TGCGATCTGAGAT TCCAAC RC704: (SEQ ID NO:86) GCGTTAACGAGAT CCAACCGAAGCCA TCCTACGA

Ejemplo 7

Modificación por bioingeniería de plantas de *Arabidopsis* tolerantes al estrés por sobre-expresión de los genes CPK-2, PK-7, PK-8, PK-9, CK-1, CK-2, CK-3, MPK-2, MPK-3, MPK-4, MPK-5, CPK-1 y CPK-2 inventivo

Construcción del vector binario: kanamicina

El constructo plasmídico pACGH101 se digirió con PstI (Roche) y FseI (NEB) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. El fragmento se purificó en gel de agarosa y se extrajo por medio del kit de Extracción de DNA Qiaex II (Qiagen). Esto dio como resultado un fragmento de vector con el promotor de *Arabidopsis* Actin 2 con un intrón interno y el terminador OCS3. Los iniciadores para la amplificación por PCR del gen NPTII se diseñaron como sigue:

5'NPT-Pst:

GCG-CTG-CAG-ATT-TCA-TTT-GGA-GAG-GAC-ACG (SEQ ID NO:87)

3'NPT-Fse:

CGC-GGC-CGG-CCT-CAG-AAG-AAC-TCG-TCA-AGA-AGG-CG (SEQ ID NO:88).

ES 2 345 833 T3

El gen NPTII de 0,9 kilobases se amplificó por PCR a partir de DNA del plásmido 2301 de pCambia [94°C 60 s, {94°C 60 s, 61°C (-0,1°C por ciclo) 60 s, 72°C 2 min} x 25 ciclos, 72°C 10 min en máquina de Gradiente T Biometra], y se purificó por medio del kit de Extracción de PCR Qiaquick (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El DNA de la PCR se subclonó luego en el vector pCR-BluntII TOPO (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (constructo NPT-Topo). Estas ligaciones se transformaron en células Top10 (Invitrogen) y se dejaron crecer sobre placas LB con 50 µg/ml de sulfato de kanamicina durante una noche a 37°C. Se utilizaron luego las colonias para inocular 2 ml de medio LB con 50 µg/ml de sulfato de kanamicina y se dejaron crecer durante una noche a 37°C. El DNA plasmídico se recuperó utilizando el estuche Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen) y se secuenció en ambas direcciones 5' y 3' utilizando condiciones estándar. El análisis subsiguiente de los datos de secuencia utilizando el soporte lógico VectorNTI reveló la ausencia de errores de PCR presentes en la secuencia del gen NPTII.

El constructo NPT-Topo se digirió luego con PstI (Roche) y FseI (NEB) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. El fragmento de 0,9 kilobases se purificó en gel de agarosa y se extrajo por medio del kit de extracción de DNA Qiaex II (Qiagen). El fragmento de inserción Pst/Fse de NPT-Topo y el fragmento vector Pst/Fse de pACGH101 se ligaron luego utilizando DNA-ligasa T4 (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. La ligación se transformó luego en células Top10 (Invitrogen) en condiciones estándar, creando el constructo pBPSSc019. Se seleccionaron las colonias sobre placas LB con 50 µg/ml de sulfato de kanamicina y se dejaron crecer durante una noche a 37°C. Estas colonias se utilizaron luego para inocular 2 ml de medio LB con 50 µg/ml de sulfato de kanamicina y se dejaron crecer durante una noche a 37°C. El DNA plasmídico se recuperó utilizando el kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El constructo pBPSSC019 se digirió con KpnI y BsaI (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El fragmento se purificó por medio de gel de agarosa y se extrajo luego mediante el kit de extracción de DNA Qiaex II (Qiagen) de acuerdo con sus instrucciones, dando como resultado una casete Act-NPT de 3 kilobases, que incluía el promotor Actin 2 de *Arabidopsis* con intrón interno, el gen NPTII y el terminador OCS3.

El vector pBPSJH001 se digirió con SpeI y ApaI (Roche) y se rellenó para hacer romos los extremos con enzima Klenow y dNTPs (Roche) 0,1 mM de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esto produjo un fragmento vector de 10,1 kilobases menos la casete de Gentamicina, que se recircularizó por autoligación con DNA-ligasa T4 (Roche) y se transformó en células Top10 (Invitrogen) en condiciones estándar. Las células transformadas se seleccionaron sobre agar LB que contenía 50 µg/ml de sulfato de kanamicina y se dejaron crecer durante una noche a 37°C. Se utilizaron luego las colonias para inocular 2 ml de LB líquido que contenía 50 µg/ml de sulfato de kanamicina y se dejaron crecer durante una noche a 37°C. El DNA plasmídico se extrajo utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido recircularizado se digirió luego nuevamente con KpnI (Roche) y se extrajo del gel de agarosa por medio del kit de Extracción de DNA Qiaex II (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

La inserción Act-NPT cortada con Kpn y el vector recircularizado pBPSJH001 cortado con Kpn se ligaron luego uno a otro utilizando DNA-ligasa T4 (Roche) y se transformaron en células Top10 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. El constructo resultante, pBPSSc022, contenía ahora el Promotor Super, el gen GUS, el terminador NOS, y la casete Act-NPT. Las células transformadas se seleccionaron sobre agar LB que contenía 50 µg/ml de sulfato de kanamicina y se dejaron crecer durante una noche a 37°C. Se utilizaron luego las colonias para inocular 2 ml de LB líquido que contenía 50 µg/ml de sulfato de kanamicina y se dejaron crecer durante una noche a 37°C. El DNA plasmídico se extrajo utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la confirmación del éxito de la ligación por medio de productos de digestión con restricción, el DNA plasmídico pBPSSc022 se propagó ulteriormente y se recuperó utilizando el Kit Plasmid Midiprep (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Subclonación de CPK-2, PK-7, PK-8, PK-9, CK-1, CK-2, CK-3, MPK-2, MPK-3, MPK-4, MPK-5, CPK-1 y CPK-2 inventivo en el vector binario

Los fragmentos que contenían las diferentes proteína-quinasa de *Physcomitrella patens* se subclonaron a partir de los vectores recombinantes PCR2.1 TOPO por doble digestión con enzimas de restricción (véase la Tabla 16) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El fragmento de la subsecuencia se escindió del gel de agarosa con un Kit de Extracción de Gel QIAquick (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se ligó en los vectores binarios pGMSG, se escindió con XmaI y Ecl 136II y se desfosforiló antes de la ligación. El pGMSG recombinante resultante contenía el factor de transcripción correspondiente en la orientación de sentido bajo el super-promotor constitutivo.

TABLA 16

A continuación se indican los nombres de los diversos constructos de los factores de transcripción de *Physcomitrella patens* utilizados para transformación de plantas

Gen	Enzimas utilizadas para generar el fragmento de gen	Enzimas utilizadas para restringir pBPSJH001	Constructo Vector Binario
PpPK-6	XmaI/HpaI	XmaI/SacI	pBPSJyw022
PpPK-7	XmaI/HpaI	XmaI/Ecl136	pBPSJyw012
PpPK-8	XmaI/HpaI	XmaI/Ecl136	pBPSJYW030
PpPK-9	XmaI/SacI	XmaI/SacI	PBPSESG010
PpCK-1	XmaI/HpaI	XmaI/Ecl136	pBPSSY012
PpCK-2	XmaI/HpaI	XmaI/Ecl136	pBPSJyw034
PpCK-3	HpaI/SacI	SmaI/SacI	pBPSSY011
PpMPK-2	XmaI/HpaI	XmaI/Ecl136	pBPSSY016
PpMPK-3	XmaI/HpaI	XmaI/Ecl136	pBPSJyw014
PpMPK-4	XmaI/SacI	XmaI/SacI	pBPSJyw025
PpMPK-5	XmaI/SacI	XmaI/SacI	PBPSESG009
PpCPK-1	XmaI/HpaI	XmaI/Ecl136	PBPSESG019
PpCPK-2 (inventiva)	XmaI/HpaI	XmaI/Ecl136	pBPSJyw008

Transformación de *Agrobacterium*

Los vectores recombinantes se transformaron en *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 y PMP90 de acuerdo con condiciones estándar (Hoefgen y Willmitzer, 1990).

Transformación de plantas

Se cultivaron y transformaron *Arabidopsis thaliana* ecotipo C24 de acuerdo con condiciones estándar (Bechtold 1993, Acad. Sci. Paris, 316: 1194-1199; Bent *et al.* 1994, Science 265: 1856-1860).

Cribado de las Plantas Transformadas

Se esterilizaron semillas T1 de acuerdo con protocolos estándar (Xiong *et al.*, 1999, Plant Molecular Biology Reporter 17: 159-170). Las semillas se extendieron sobre medio 1/2 Murashige y Skoog (MS) (Sigma-Aldrich) de pH 5,7 con KOH, agar al 0,6% y se complementaron con 1% de sacarosa, 0,5 g/l de ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico (MES) (Sigma-Aldrich), 50 µg/ml de kanamicina (Sigma-Aldrich), 500 µg/ml de carbenicilina (Sigma-Aldrich) y 2 µg/ml de benomil (Sigma-Aldrich). Las semillas se vernalizaron en las placas durante cuatro días a 4°C. Las semillas se dejaron germinar en una cámara climatizada a una temperatura del aire de 22°C y con una intensidad luminosa de 40 micromoles^{-1m2} (luz blanca; tubo fluorescente Philips TL 65W/25) y ciclo diurno de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Las plantas de semillero transformadas se seleccionaron después de 14 días y se transfirieron a medio 1/2 MS de pH 5,7 con placas de agar al 0,6% en KOH complementadas con 0,6% de agar, 1% de sacarosa, 0,5 g/l de MES (Sigma-Aldrich) y 2 µg/ml de benomil (Sigma-Aldrich) y se dejó que se recuperaran durante cinco-siete días.

Cribado de la Tolerancia a la Sequía

Las plantas de semillero T1 se transfirieron a papel de filtro seco estéril en una cápsula Petri y se dejaron desecar durante 2 horas a 80% RH (humedad relativa) en un Armario de Cultivo Percival MLR-350H, micromoles^{-1m2} (luz blanca, tubo fluorescente Philips TL 65W/25). Se redujo luego la RH a 60% y se desecaron ulteriormente las plantas

ES 2 345 833 T3

de semillero durante 8 horas. Se retiraron luego las plantas de semillero y se pusieron sobre placas de agar 0,6% MS 1/2 complementadas con 2 $\mu\text{g/ml}$ de benomil (Sigma-Aldrich) y 0,5 g/l de MES (Sigma-Aldrich), y se registraron después de 5 días.

5 En condiciones de estrés por sequía, las plantas PpPK-6 que sobreexpresaban *Arabidopsis thaliana* exhibían una tasa de supervivencia de 95% (20 supervivientes de 21 plantas estresadas) al cribado de estrés; PpPK-8, 40% (2 supervivientes de 5 plantas estresadas), PpPK-9, 78% (38 supervivientes de 49 plantas estresadas), PpCK-1, 50% (5 supervivientes de 10 plantas estresadas), PpCK-2, 52% (16 supervivientes de 31 plantas estresadas), PpCK-3, 60% (3 supervivientes de 5 plantas estresadas), PpMPK-2, 100% (52 supervivientes de 52 plantas estresadas), PpMPK-3, 98% (44 supervivientes de 45 plantas estresadas), PpMPK-4, 92% (11 supervivientes de 12 plantas estresadas), PpMPK-5, 100% (9 supervivientes de 9 plantas estresadas), PpCPK-1, 60% (12 supervivientes de 20 plantas estresadas), PpCPK-2, 89% (17 supervivientes de 19 plantas estresadas), mientras que el control sin transformar presentaba solamente una tasa de supervivencia de 11% (1 superviviente de 9 plantas estresadas). Es de notar que los análisis de estas líneas transgénicas se realizaron con plantas T1, y por consiguiente, los resultados serán mejores cuando se encuentre un expresante homocigótico fuerte.

TABLA 17

Sumario de los tests de estrés por sequía

Nombre de Gen	Ensayo de Estrés por Sequia		
	Número de Supervivientes	Número total de plantas	Porcentaje de supervivientes
PpPK-6	20	21	95%
PpPK-8	2	5	40%
PpPK-9	38	49	78%
PpCK-1	5	10	50%
PpCK-2	16	31	52%
PpCK-3	3	5	60%
PpMPK-2	52	52	100%
PpMPK-3	44	45	98%
PpMPK-4	11	12	92%
PpMPK-5	9	9	100%

Cribado de Tolerancia a la Helada (para comparación)

Se llevaron plantas de semillero a cápsulas Petri que contenían 1/2 MS agar al 0,6% complementado con 2% de sacarosa y 2 $\mu\text{g/ml}$ de benomil. Después de 4 días, las plantas de semillero se incubaron a 4°C durante 1 hora y se cubrieron luego con hielo en virutas. Se pusieron luego las plantas de semillero en una Cámara Ambiental Environmental Specialist ES2000 y se incubaron durante 3,5 horas comenzando a -1,0°C, con disminución de la temperatura a -1°C por hora. Las plantas de semillero se incubaron luego a -5,0°C durante 24 horas y se dejaron descongelar luego a 5°C durante 12 horas. El agua se separó por vertido y las plantas de semillero se registraron al cabo de 5 días.

55 En condiciones de estrés por helada, las plantas PPK-7 que sobreexpresaban *Arabidopsis thaliana* presentaban una tasa de supervivencia de 73% (8 supervivientes de 11 plantas estresadas) al cribado de estrés; PpPK-9, 100% (45 supervivientes de 45 plantas estresadas), PpCK-1, 100% (14 supervivientes de 14 plantas estresadas), PpMPK-2, 68% (36 supervivientes de 53 plantas estresadas), PpMPK-3, 92% (24 supervivientes de 26 plantas estresadas), PpCPK-2, 64% (7 supervivientes de 11 plantas estresadas), mientras que el control sin transformar exhibía solamente una tasa de supervivencia de 2% (1 supervivientes de 48 plantas estresadas). Es de notar que los análisis de estas líneas transgénicas se realizaron con plantas T1, y por consiguiente, los resultados serán mejores cuando se encuentre un expresante homocigótico fuerte.

TABLA 18

Sumario de los tests de estrés por helada (comparación)

Nombre de Gen	Test de Estres por Helada		
	Numero de Supervivientes	Numero total de plantas	Porcentaje de supervivientes
PpPK-7	8	11	73%
PpPK-9	45	45	100%
PpCK-1	14	14	100%
PpMPK-2	36	53	68%
PpMPK-3	24	26	92%
PpCPK-2	7	11	64%
Control	1	48	2%

Cribado de tolerancia a la sal (para comparación)

Se transfirieron plantas de semillero a papel de filtro impregnado en $\frac{1}{2}$ MS y se pusieron sobre $\frac{1}{2}$ MS con agar al 0,6% complementado con 2 μ g/ml de benomil la noche anterior al cribado de tolerancia a la sal. Para el cribado de tolerancia a la sal, el papel de filtro con las plantas de semillero se llevó a pilas de papel de filtro estéril, impregnadas en NaCl 50 mM, en una cápsula Petri. Al cabo de 2 horas, el papel de filtro con las plantas de semillero se llevó a tiras de papel de filtro estéril, impregnadas en NaCl 200 mM en una cápsula Petri. Al cabo de 10 horas, las plantas de semillero se llevaron a cápsulas Petri que contenían $\frac{1}{2}$ MS con agar al 0,6% complementado con 2 μ g/ml de benomil. Las plantas de semillero se registraron después de 5 días.

Las plantas transgénicas se criban respecto a su tolerancia mejorada a la sal, demostrando que la expresión de los transgenes confiere tolerancia a la sal.

Ejemplo 8

Detección de los transgenes CPK-2, PK-7, PK-8, PK-9, CK-1, CK-2, CK-3, MPK-2, MPK-3, MPK-4, MPK-5, CPK-1 y CPK-2 inventivo en las líneas transgénicas de *Arabidopsis*

Una hoja de una planta de *Arabidopsis* de tipo salvaje y una planta transgénica de *Arabidopsis* se homogeneizaron en 250 μ l de tampón de bromuro de hexadeciltrimetil-amonio (CTAB) (2% CTAB, NaCl 1,4 M, EDTA 8 mM y Tris 20 mM, pH 8,0) y 1 μ l de β -mercaptoetanol. Las muestras se incubaron a 60-65°C durante 30 minutos y se añadieron luego 250 μ l de cloroformo a cada muestra. Las muestras se agitaron enérgicamente durante 3 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos a 18.000 x g. Se retiró el sobrenadante de cada muestra y se añadieron 150 μ l de isopropanol. Las muestras se incubaron a la temperatura ambiente durante 15 minutos, y se centrifugaron durante 10 minutos a 18.000 x g. Cada pellet se lavó con 70% de etanol, se secó, y se resuspendió en 20 μ l de TE. Se utilizaron 4 μ l de la suspensión anterior en una reacción PCR de 20 μ l utilizando DNA-polimerasa *Taq* (Roche Molecular Biochemicals) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El plásmido del vector binario con cada gen clonado en el mismo se utilizó como control positivo, y como control negativo se utilizó el DNA genómico C24 de tipo salvaje en las reacciones PCR. Se analizaron 10 μ l de la reacción PCR en gel de 0,8% agarosa-bromuro de etidio.

PpPk-6: Los iniciadores utilizados en las reacciones son:

GCTGACACGCCAAGCCTCGCTAGTC (SEQ ID NO:89)

GCGTTAACTCGACCAAGGTCACCTATTCCAAGCA (SEQ ID NO:90)

El programa PCR fue como sigue: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido por 10 minutos a 72°C. Se produjo un fragmento de 2,8 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas.

ES 2 345 833 T3

PpPK-7: Los iniciadores utilizados en las reacciones son:

5 **GCTGACACGCCAAGCCTCGCTAGTC (SEQ ID NO:89)**
 GCGTTAACCTTCGTCTTGGACAGGTAGAGGTTAC (SEQ ID NO:91)

10 Los iniciadores se utilizaron en la primera tanda de reacciones con el programa siguiente: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido por 10 minutos a 72°C. Se generó un fragmento de 1,1 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas T1.

15 *PpPK-8*: Los iniciadores utilizados en las reacciones fueron:

GCTGACACGCCAAGCCTCGCTAGTC (SEQ ID NO:89)
20 **GCGTTAACGAGCATCACGATACTCGGTGATTTC (SEQ ID NO:92)**

25 El programa PCR fue como sigue: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido por 10 minutos a 72°C. Se produjo un fragmento de 1,6 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas.

PpPK-9: Los iniciadores utilizados en las reacciones son:

30 **GCTGACACGCCAAGCCTCGCTAGTC (SEQ ID NO:89)**
 GCGAGCTCGCACCACTGAATGATGGAGACTCAGG (SEQ ID NO:93)

35 El programa PCR fue como sigue: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido por 10 minutos a 72°C. Se produjo un fragmento de 1,4 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas.

40 *PpCK-1*: Los iniciadores utilizados en las reacciones son:

45 **GCTGACACGCCAAGCCTCGCTAGTC (SEQ ID NO:89)**
 GCGTTAACATGCCCATCTTCTCATACTCAGACC (SEQ ID NO:94)

50 El programa PCR fue como sigue: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido por 10 minutos a 72°C. Se produjo un fragmento de 1,7 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas.

PpCK-2: Los iniciadores utilizados en las reacciones son:

55 **GCTGACACGCCAAGCCTCGCTAGTC (SEQ ID NO:89)**
 GCGTTAACCTTAGGAATCGTATGGCAGAGAGCT (SEQ ID NO:95)
60

65 El programa PCR fue como sigue: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido por 10 minutos a 72°C. Se produjo un fragmento de 1,9 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas.

ES 2 345 833 T3

PpCK-3: Los iniciadores utilizados en las reacciones son:

5 **GCTGACACGCCAAGCCTCGCTAGTC (SEQ ID NO:89)**
 GCGAGCTCAGCGCTTCGCACAACTGAGAAACCT (SEQ ID NO:96)

10 El programa PCR fue como sigue: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido por 10 minutos a 72°C. Se produjo un fragmento de 1,2 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas.

15 *PpMPK-2*: Los iniciadores utilizados en las reacciones son:

GCTGACACGCCAAGCCTCGCTAGTC (SEQ ID NO:89)
20 **GCGTTAACGGCAATATCTGCACAGCCGTTCACT (SEQ ID NO:97)**

25 El programa PCR fue como sigue: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido por 10 minutos a 72°C. Se produjo un fragmento de 1,7 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas.

PpMPK-3: Los iniciadores utilizados en las reacciones son:

30 **GCTGACACGCCAAGCCTCGCTAGTC (SEQ ID NO:89)**
 GCGTTAACGGCAATATCTGCACAGCCGTTCACT (SEQ ID NO:98)

35 El programa PCR fue como sigue: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido por 10 minutos a 72°C. Se produjo un fragmento de 2,2 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas.

40 *PpMPK-4*: Los iniciadores utilizados en las reacciones son:

GCTGACACGCCAAGCCTCGCTAGTC (SEQ ID NO:89)
45 **GAGCTCCGGTAGGTCCGACCTCTTCAATTG (SEQ ID NO:99)**

50 El programa PCR fue como sigue: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido por 10 minutos a 72°C. Se produjo un fragmento de 1,7 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas.

PpMPK-5: Los iniciadores utilizados en las reacciones son:

55 **GCTGACACGCCAAGCCTCGCTAGTC (SEQ ID NO:89)**
 ATGAGCTCTGGCGGATTGGCGAGGTAGTTCGAC (SEQ ID NO:100)

60 El programa PCR fue como sigue: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido por 10 minutos a 72°C. Se produjo un fragmento de 1,4 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas.

65

ES 2 345 833 T3

PpCPK-1: Los iniciadores utilizados en las reacciones son:

GCTGACACGCCAAGCCTCGCTAGTC (SEQ ID NO:89)

GCGTTAACGACAACCGGAGTAGAACGGCAGTCCA (SEQ ID NO:101)

El programa PCR fue como sigue: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido por 10 minutos a 72°C. Se produjo un fragmento de 2,3 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas.

PpCPK-2: Los iniciadores utilizados en las reacciones son:

GCTGACACGCCAAGCCTCGCTAGTC (SEQ ID NO:89)

GCGTTAACGAGATCCAACCGAAGCCATCCTACGA (SEQ ID NO:102)

El programa PCR fue como sigue: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido por 10 minutos a 72°C. Se produjo un fragmento de 2,2 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas.

Los transgenes se amplificaron con éxito a partir de las líneas transgénicas T1, pero no del tipo salvaje C24. Este resultado indica que las plantas transgénicas T1 contienen al menos una copia de los transgenes. No había indicación alguna de la existencia de genes idénticos o muy similares en el control de *Arabidopsis thaliana* sin 564transformar que pudo amplificarse por este método.

Ejemplo 9

Detección del mRNA de los transgenes CPK-2, PK-7, PK-8, PK-9, CK-1, CK-2, CK-3, MPK-2, MPK-3, MPK-4, MPK-5, CPK-1 y CPK-2 inventivo en líneas transgénicas de Arabidopsis

La expresión de los transgenes se detectó utilizando RT-PCR. El RNA total se aisló a partir de plantas tratadas por estrés utilizando un procedimiento adaptado de (Verwoerd *et al.*, 1989 NAR 17: 2362). Se recogieron muestras de hojas (50-100 mg) y se molieron hasta obtener un polvo fino en nitrógeno líquido. El tejido molido se resuspendió en 500 µl de una mezcla 1:1 mantenida a 80°C de fenol a tampón de extracción (LiCl 100 mM, Tris 100 mM de pH 8, EDTA 10 mM, 1% SDS), seguido por agitación tumultuosa breve para mezclar. Después de la adición de 250 µl de cloroformo, cada muestra se agitó brevemente de modo tumultuoso. Se centrifugaron luego las muestras durante 5 minutos a 12.000 x g. La fase acuosa superior se llevó a un tubo Eppendorf nuevo. El RNA se precipitó por adición de una décima parte de su volumen de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol al 95%. Las muestras se mezclaron por inversión y se dejaron en hielo durante 30 minutos. El RNA se redujo a un pelet por centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y los pelets se secaron brevemente al aire. Los pelets de la muestra de RNA se resuspendieron en 10 µl de agua tratada con DEPC. Para separar el DNA contaminante de las muestras, se trató cada una con DNasa exenta de RNasa (Roche) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se sintetizó cDNA a partir del RNA total utilizando el kit de síntesis de cDNA de la primera cadena (Boehringer Mannheim) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La amplificación por PCR de un fragmento de gen específico del cDNA sintetizado se realizó utilizando DNA-polimerasa *Taq* (Roche) e iniciadores específicos del gen (véase Tabla 15 para los iniciadores) en la reacción siguiente: 1X tampón PCR, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 µM de cada iniciador, 0,2 µM de dNTPs, 1 unidad de polimerasa, 5 µl de cDNA de la reacción de síntesis. La amplificación se realizó en las condiciones siguientes: desnaturalización, 95°C, 1 minuto; reasociación, 62°C, 30 segundos; extensión, 72°C, 1 minuto, 35 ciclos; extensión, 72°C, 5 minutos; mantenimiento, 4°C, en todo momento. Los productos PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1%, se tiñeron con bromuro de etidio, y se visualizaron bajo luz UV utilizando el sistema de documentación de gel Quantity-One (Bio-Rad).

La expresión de los transgenes se detectó en la línea transgénica T1. Estos resultados indicaban que los transgenes se expresan en las líneas transgénicas y sugerían fuertemente que su producto génico mejoraba la tolerancia de las plantas al estrés en la línea transgénica. Por otra parte, no pudo detectarse por este método expresión alguna de genes endógenos idénticos o muy similares. Estos resultados están de acuerdo con los datos del Ejemplo 7. Esto respalda sólidamente la afirmación de los inventores de que la tolerancia al estrés observada es debida al transgén introducido.

PpPK-6

CCCAGTAATAGCAGGGTTGGAGGAA (SEQ ID NO:103)
GGCTGCCTGAAGATCCGCTACAGAG (SEQ ID NO:104)

PpPK-7

CGTCAGGGCTACTTTGCGTGGAGCAC (SEQ ID NO:105)
CGGTGCTGGCTAACACCAGGCCAGA (SEQ ID NO:106)

PpPK-8

ATCCCGGGCAACGAGAAGCATTGAGATGGC (SEQ ID NO:107)
GCGTTAACGAGCATCACGATACTCGGTGATTTC (SEQ ID NO:108)

PpPK-9

CGTGGCATCTCTCCCGATGTTCTTA (SEQ ID NO:109)
GGCCAACTGAAGGCGTGTGATGATC (SEQ ID NO:110)

PpCK-1

CTCGAGGGGCTCGTTCACCGTGACCT (SEQ ID NO:111)
CGGAGGTAACAGTAGTCAGGCTGCTC (SEQ ID NO:112)

PpCK-2

CCGCGACCCTTCCACGCATCAGCAT (SEQ ID NO:113)
CCTCCAGGAAGCCTGCGCCGAGAAG (SEQ ID NO:114)

PpCK-3

GGACATTGTCCGTGATCAGCAATCGA (SEQ ID NO:115)
CAGCCTCTGGAACAACCAGACGCTG (SEQ ID NO:116)

PpMPK-2

GTCACCGCGAGGTACAAGCCACCAC (SEQ ID NO:117)
GCAGCTCTGGAGCTCTGTACCACCT (SEQ ID NO:118)

PpMPK-3

ACGGCCACGTCGAGAATCTGAGCAA (SEQ ID NO:119)
CGAAGTGCTCGCAAGCAATGCCGAA (SEQ ID NO:120)

PpMPK-4

ATCCCGGGCGGTCGAGTCGTATTAGGTGTTGTTTC (SEQ ID NO:121)
 GAGCTCCGGTAGGTCCGACCTCTTCAATTG (SEQ ID NO:122)

PpMPK-5

GGGCAACTGTCAATAGCAGACCTGGA (SEQ ID NO:123)
 GCAAGTCCCAACGAACGTGTCTCGCT (SEQ ID NO:124)

PpCPK-1

GCGAAGATGACGACTGCTATTGCGA (SEQ ID NO:125)
 CGTGATGACTCCAATGCTCCATACG (SEQ ID NO:126)

PpCPK-2

GCCAGCATCGAGGTCAGTATCCGGTGT (SEQ ID NO:127)
 GTCTGTGGCCTTCAGAGGCGCATCCTC (SEQ ID NO:128)

La amplificación se realizó en las condiciones siguientes: desnaturalización, 95°C, 1 minuto; reasociación, 62°C, 30 segundos; extensión, 72°C, 1 minuto, 35 ciclos; extensión, 72°C, 5 minutos; mantenimiento, 4°C, en todo momento. Los productos PCR se corrieron sobre un gel de agarosa al 1%, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV utilizando el sistema de documentación de gel Quantity-one (Bio-Rad).

La expresión de los transgenes se detectó en la línea transgénica T1. Estos resultados indicaban que los transgenes se expresan en las líneas transgénicas y sugieren fuertemente que su producto génico mejoraba la tolerancia de las plantas al estrés en las líneas transgénicas. De acuerdo con la afirmación anterior, no pudo detectarse por este método expresión alguna de genes endógenos idénticos o muy similares. Estos resultados están de acuerdo con los datos del Ejemplo 7.

Ejemplo 10

Modificación por ingeniería genética de plantas de soja tolerantes al estrés por sobreexpresión de los genes CPK-2, PK-7, PK-8, PK-9, CK-1, CK-2, CK-3, MPK-2, MPK-3, MPK-4, MPK-5, CPK-1 y CPK-2 inventivo

Se utilizaron los constructos pBPSJyw022, pBPSJyw012, pBPSJYW030, pBPSERG010, pBPSSY012, pBPSYyw034, pBPSSY011, pBPSSY016, pBPSJyw014, pBPSJyw025, pBPSERG009, pBPSERG019 y pBPSJyw008 para transformar soja como se describe a continuación.

Se esterilizaron en la superficie semillas de soja con etanol al 70% durante 4 minutos a la temperatura ambiente con agitación continua mediante sacudidas, seguido por 20% (v/v) de Clorox complementado con 0,05% (v/v) de Tween durante 20 minutos con agitación continua mediante sacudidas. A continuación, las semillas se lavaron cuatro veces con agua destilada y se dejaron sobre papel de filtro estéril húmedo en una cápsula Petri a la temperatura ambiente durante 6 a 39 horas. Se desprendieron las cubiertas de las semillas, y se apartaron los cotiledones del eje del embrión. Se examinó el eje del embrión para asegurarse de que la región meristemática no estaba deteriorada. Los ejes del embrión escindidos se recogieron en una cápsula Petri estéril semi-abierta y se secaron al aire hasta un contenido de humedad menor que 20% (peso fresco) en una cápsula Petri sellada hasta su utilización posterior.

Se preparó un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* a partir de una sola colonia en medio sólido LB más antibióticos apropiados (v.g. 100 mg/ml de estreptomycin, 50 mg/l de kanamicina) seguido por cultivo de la colonia simple en medio LB líquido hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,8. A continuación, el cultivo de bacterias se redujo a un pelet a 7000 rpm durante 7 minutos a la temperatura ambiente, y se resuspendió en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) complementado con acetosiringona 100 μ M. Los cultivos bacterianos se incubaron en este medio de pre-inducción durante 2 horas a la temperatura ambiente antes de su utilización. Los ejes de los embriones de las semillas cigóticas de soja con aproximadamente 15% de contenido de humedad se embebieron durante 2 horas a la temperatura ambiente con el cultivo de la suspensión de *Agrobacterium* pre-inducida. Los embriones se retiraron del cultivo de imbibición y se transfirieron a cápsulas Petri que contenían medio MS sólido complementado con 2% de sacarosa y se incubaron durante 2 días, en la oscuridad a la temperatura ambiente. Alternativamente, los embriones se pusieron sobre papel de filtro estéril húmedo (medio MS líquido) en una cápsula Petri y se incubaron en las mismas condiciones descritas anteriormente. Después de este periodo, los embriones se transfirieron a medio MS sólido o líquido complementado con 500 mg/l de carbenicilina o 300 mg/ml de cefotaximo para matar las agrobacterias. El

medio líquido se utilizó para humedecer el papel de filtro estéril. Los embriones se incubaron durante 4 semanas a 25°C, bajo 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 12 horas. Una vez que las plantas de semillero produjeron raíces, se transfirieron las mismas a suelo Metromix estéril. El medio de las plantas *in vitro* se eliminó por lavado antes de transferir las plantas al suelo. Las plantas se mantuvieron bajo una cubierta de plástico durante una semana para favorecer el proceso de aclimatación. Las plantas se transfirieron luego a una sala de crecimiento donde se incubaron a 25°C, bajo 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa y fotoperiodo de 12 horas durante aproximadamente 80 días.

Las plantas transgénicas se cribaron luego respecto a su tolerancia mejorada a la sequía, la sal y/o el frío de acuerdo con el método de cribado descrito en el Ejemplo 7, demostrando que la expresión de los transgenes confiere tolerancia al estrés.

Ejemplo 11

Manipulación por ingeniería genética de plantas de colza/canola tolerantes al estrés por sobreexpresión de los genes CPK-2, PK-7, PK-8, PK-9, CK-1, CK-2, CK-3, MPK-2, MPK-3, MPK-4, MPK-5, CPK-1 y CPK-2 inventivo

Se utilizaron los constructos pBPSJyw022, pBPSJyw012, pBPSJYW030, pBPSERG010, pBPSSY012, pBPSYyw034, pBPSSY011, pBPSSY016, pBPSJyw014, pBPSJyw025, pBPSERG009, pBPSERG019 y pBPSJyw008 para transformar colza/canola como se describe a continuación.

El método de transformación de plantas descrito en esta memoria es aplicable también a *Brassica* y otras cosechas. Las semillas de canola se esterilizan en la superficie con etanol al 70% durante 4 minutos a la temperatura ambiente con agitación continua mediante sacudidas, seguido por 20% (v/v) de Clorox complementado con 0,05% (v/v) de Tween durante 20 minutos, a la temperatura ambiente con agitación continua mediante sacudidas. A continuación, se lavan las semillas cuatro veces con agua destilada y se ponen sobre papel de filtro estéril húmedo en una cápsula Petri a la temperatura ambiente durante 18 horas. A continuación, se retiran las cubiertas de las semillas y se secan al aire las semillas durante una noche en una cápsula Petri estéril semi-abierta. Durante este periodo, las semillas pierden aproximadamente 85% de su contenido de agua. Se guardan luego las semillas a la temperatura ambiente en una cápsula Petri sellada hasta su uso ulterior. Los constructos de DNA y la imbibición de los embriones son como se describe en el Ejemplo 10. Las muestras de las plantas transgénicas primarias (T0) se analizan por PCR para confirmar la presencia de T-DNA. Estos resultados se confirman por hibridación Southern en la cual el DNA se somete a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se transfiere a una membrana de nailon cargada positivamente (Roche Diagnostics). Se utiliza el Kit de Síntesis de Sondas PCR DIG (Roche Diagnostics) para preparar una sonda marcada con digoxigenina por PCR, y se utiliza de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Las plantas transgénicas se criban luego respecto a su tolerancia mejorada al estrés de acuerdo con el método de cribado descrito en el Ejemplo 7, demostrando que la expresión de los transgenes confiere tolerancia a la sequía.

Ejemplo 12

Modificación por bioingeniería de plantas de maíz tolerantes al estrés por sobre-expresión de los genes CPK-2, PK-7, PK-8, PK-9, CK-1, CK-2, CK-3, MPK-2, MPK-3, MPK-4, MPK-5, CPK-1 y CPK-2 inventivo

Se utilizaron los constructos pBPSJyw022, pBPSJyw012, pBPSJYW030, pBPSERG010, pBPSSY012, pBPSYyw034, pBPSSY011, pBPSSY016, pBPSJyw014, pBPSJyw025, pBPSERG009, pBPSERG019 y pBPSJyw008 para transformar maíz como se describe a continuación.

La transformación de maíz (*Zea mays L.*) se realiza por el método descrito por Ishida *et al.* 1996. Nature Biotech. 14745-50. Los embriones inmaduros se co-cultivan con *Agrobacterium tumefaciens* que lleva vectores “super-binarios”, y las plantas transgénicas se recuperan por organogénesis. Este procedimiento proporciona una eficiencia de transformación comprendida entre 2,5% y 20%. Las plantas transgénicas se criban luego respecto a su tolerancia mejorada a la sequía, la sal y/o el frío de acuerdo con el método de cribado descrito en el Ejemplo 7, demostrando que la expresión de los transgenes confiere tolerancia al estrés.

Ejemplo 13

Modificación por bioingeniería de plantas de trigo tolerantes al estrés por sobre-expresión de los genes CPK-2, PK-7, PK-8, PK-9, CK-1, CK-2, CK-3, MPK-2, MPK-3, MPK-4, MPK-5, CPK-1 y CPK-2 inventivo

Se utilizaron los constructos pBPSJyw022, pBPSJyw012, pBPSJYW030, pBPSERG010, pBPSSY012, pBPSYyw034, pBPSSY011, pBPSSY016, pBPSJyw014, pBPSJyw025, pBPSERG009, pBPSERG019 y pBPSJyw008 para transformar trigo como se describe a continuación.

La transformación del trigo se realiza por el método descrito por Ishida *et al.* 1996. Nature Biotech. 14745-50. Los embriones inmaduros se co-cultivan con *Agrobacterium tumefaciens* que lleva vectores “super-binarios”, y se

recuperan plantas transgénicas por organogénesis. Este procedimiento proporciona una eficiencia de transformación entre 2,5% y 20%. Las plantas transgénicas se criban luego respecto a su tolerancia mejorada al estrés de acuerdo con el método de cribado descrito en el Ejemplo 7, demostrando que la expresión de los transgenes confiere tolerancia a la sequía.

Ejemplo 14

Identificación de Genes Homólogos y Heterólogos

Pueden utilizarse secuencias de genes para identificar genes homólogos o heterólogos a partir de cDNA o bibliotecas genómicas. Los genes homólogos (v.g., clones de cDNA de longitud total) pueden aislarse por hibridación de ácido nucleico utilizando por ejemplo bibliotecas de cDNA. Dependiendo de la abundancia del gen de interés, se extienden en placas 100.000 hasta 1.000.000 de bacteriófagos recombinantes y se transfieren a membranas de nailon. Después de desnaturalización con álcali, se inmoviliza el DNA en la membrana mediante, v.g., reticulación por UV. La hibridación se lleva a cabo en condiciones de alta severidad. En solución acuosa, la hibridación y el lavado se realizan a una concentración iónica de NaCl 1M y una temperatura de 68°C. Las sondas de hibridación se generan mediante, v.g., marcación por transcripción radiactiva de la mella (³²P) (High Prime, Roche, Mannheim, Alemania). Las señales se detectan por autorradiografía.

Los genes parcialmente homólogos o heterólogos que son afines pero no idénticos pueden identificarse de manera análoga al procedimiento arriba descrito utilizando condiciones de hibridación y lavado a baja severidad. Para la hibridación acuosa, la concentración iónica se mantiene normalmente a NaCl 1M mientras que la temperatura se reduce progresivamente desde 68 a 42°C.

El aislamiento de secuencias génicas con homologías (o identidad/similitud de secuencias) únicamente en un dominio diferenciado de (por ejemplo 10-20 aminoácidos) puede llevarse a cabo utilizando sondas oligonucleotídicas sintéticas radiomarcadas. Los oligonucleótidos radiomarcados se preparan por fosforilación del extremo 5-prima de dos oligonucleótidos complementarios con polinucleótido-quinasa T4. Los oligonucleótidos complementarios se reasocian y se ligan para formar concatémoros. Los concatémoros bicatenarios se someten luego a radiomarcación mediante, por ejemplo, transcripción de la mella. La hibridación se realiza normalmente en condiciones de severidad baja utilizando concentraciones altas de oligonucleótidos.

Solución de hibridación de oligonucleótidos:

6 x SSC

Fosfato de sodio 0,01M

EDTA 1 mM (pH 8)

0,5% de SDS

100 µg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado

0,1% de leche desnatada desecada.

Durante la hibridación, la temperatura se reduce gradualmente a 5-10°C por debajo del valor T_m estimado de los oligonucleótidos o hasta la temperatura ambiente seguido por pasos de lavado y autorradiografía. El lavado se realiza con severidad baja tal como 3 pasos de lavado utilizando 4 x SSC. Detalles adicionales han sido descritos por Sambrook, J. *et al.* (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, o Ausubel, F.M. *et al.* (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons.

Ejemplo 15

Identificación de Genes Homólogos por Cribado de Bibliotecas de Expresión con Anticuerpos

Pueden utilizarse clones de c-DNA para producir proteína recombinante por ejemplo en *E. coli* (v.g. sistema pQE QIAexpress de Qiagen). Las proteínas recombinantes se purifican luego normalmente por afinidad mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA (Qiagen). Las proteínas recombinantes se utilizan luego para producir anticuerpos específicos, por ejemplo utilizando técnicas estándar para inmunización de conejos. Los anticuerpos se purifican por afinidad utilizando una columna Ni-NTA saturada con el antígeno recombinante como ha sido descrito por Gu *et al.*, 1994 BioTechniques 17: 257-262. El anticuerpo puede utilizarse luego para cribar bibliotecas de expresión de cDNA a fin de identificar genes homólogos o heterólogos por un cribado inmunológico (Sambrook, J. *et al.* (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, o Ausubel, F.M. *et al.* (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons).

Ejemplo 16

Mutagénesis in vivo

- 5 La mutagénesis *in vivo* de microorganismos puede realizarse por paso de DNA plasmídico (u otro vector) a través de *E. coli* u otros microorganismos (v.g., *Bacillus* spp., o levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*) que están deteriorados en sus capacidades para mantener la integridad de su información genética. Las cepas mutantes típicas tienen mutaciones en los genes para el sistema de reparación de DNA (v.g., mutHLS, mutD, mutT, etc.; para referencia, véase Rupp, W.D. (1996) DNA Repair Mechanisms, en: *Escherichia coli* and *Salmonella*, p. 2277-2294, ASM: Washington). Tales cepas son bien conocidas por los expertos en la técnica. El uso de dichas cepas se ilustra, por ejemplo, en Greener, A. and Callahan, M. (1994) *Strategies* 7: 32-34. La transferencia de moléculas de DNA mutadas a plantas se realiza con preferencia después de selección y ensayo en microorganismos. Se generan plantas transgénicas de acuerdo con diversos ejemplos comprendidos en la sección de ejemplos de este documento.

15 Ejemplo 17

Análisis in Vitro de la Función de los Genes de Physcomitrella en Organismos Transgénicos

- 20 La determinación de las actividades y parámetros cinéticos de las enzimas está bien establecida en la técnica. Los experimentos para determinar la actividad de cualquier enzima dada alterada tienen que adaptarse a la actividad específica de la enzima de tipo salvaje, lo que está perfectamente dentro de la capacidad de un experto en la técnica. Revisiones acerca de enzimas en general, así como detalles específicos concernientes a la estructura, cinética, principios, métodos, aplicaciones y ejemplos para la determinación de muchas actividades enzimáticas pueden encontrarse, por ejemplo, en las referencias siguientes: Dixon, M., and Webb, E.C., (1979) *Enzymes*. Longmans: Londres; Fersht, (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*. Freeman: Nueva York; Walsh, (1979) *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Freeman: San Francisco; Price, N.C., Stevens, L. (1982) *Fundamentals of Enzymology*. Oxford Univ. Press: Oxford; Boyer, P.D., ed. (1983) *The Enzymes*, 3rd ed. Academic Press: Nueva York; Bisswanger, H., (1994) *Enzymkinetik*, 2nd ed. VCH: Weinheim (ISBN 3527300325); Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J., Grassl, M., eds. (1983-1986) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed., vol. I-XII, Verlag Chemie: Weinheim; and Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1987) vol. A9, *Enzymes*. VCH: Weinheim, p. 352-363.

- 35 La actividad de las proteínas que se fijan a DNA puede medirse por varios métodos bien establecidos, tales como los ensayos de desplazamiento de bandas de DNA (denominados también ensayos de retardación en gel). El efecto de tales proteínas sobre la expresión de otras moléculas puede medirse utilizando ensayos de genes informadores (tales como el descrito en Kolmar, H. *et al.* (1995) *EMBO J.* 14: 3895-3904 y las referencias citadas en dicho lugar). Los sistemas de ensayo de genes informadores son bien conocidos y están bien establecidos para aplicaciones en células tanto pro- como eucariotas, utilizando enzimas tales como β -galactosidasa, proteína fluorescente verde, y varias otras.

- 40 La determinación de la actividad de las proteínas de transporte de membrana puede realizarse de acuerdo con técnicas tales como las descritas en Gennis R.B. Pores, Channels and Transporters, en *Biomembranes, Molecular Structure and Function*, pp. 85-137, 199-234 y 270-322, Springer: Heidelberg (1989).

45 Ejemplo 18

Purificación del Producto Deseado a partir de Organismos Transformados

- 50 La recuperación del producto deseado a partir de material de plantas (es decir, *Physcomitrella patens* o *Arabidopsis thaliana*), hongos, algas, ciliados, células de *C. glutamicum*, u otras células bacterianas transformadas con las secuencias de ácido nucleico descritas en esta memoria, o el sobrenadante de los cultivos arriba descritos puede realizarse por diversos métodos bien conocidos en la técnica. Si el producto deseado no es secretado por las células, puede recogerse del cultivo por centrifugación a baja velocidad, y las células pueden lisarse por técnicas estándar, tales como fuerza mecánica o tratamiento por ultrasonidos. Los órganos de las plantas pueden separarse mecánicamente de otros tejidos u órganos. Después de la homogeneización, se separan por centrifugación los residuos celulares, y la fracción sobrenadante que contiene las proteínas solubles se retiene para purificación ulterior del compuesto deseado. Si el producto es secretado por las células deseadas, entonces las células se separan del cultivo por centrifugación a baja velocidad, y la fracción sobrenadante se retiene para purificación ulterior.

- 60 La fracción sobrenadante de cualquier método de purificación se somete a cromatografía con una resina adecuada, en la cual la molécula deseada es retenida sobre una resina cromatográfica mientras que muchas de las impurezas contenidas en la muestra no lo son, o donde las impurezas son retenidas por la resina mientras que la muestra no lo es. Dichos pasos de cromatografía pueden repetirse en caso necesario, utilizando las mismas o diferentes resinas cromatográficas. Un experto en la técnica estaría perfectamente versado en la selección de resinas cromatográficas apropiadas y en su aplicación más eficaz para la purificación de una molécula particular. El producto purificado puede concentrarse por filtración o ultrafiltración, y guardarse a una temperatura a la cual se maximiza la estabilidad del producto.

ES 2 345 833 T3

Existe una extensa serie de métodos de purificación conocidos en la técnica y el método precedente de purificación no debe interpretarse como limitante. Tales métodos de purificación se describen, por ejemplo, en Bailey, J.E. & Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill: Nueva York (1986). Adicionalmente, la identidad y pureza de los compuestos aislados pueden cribarse por métodos estándar en la técnica. Estos incluyen cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), métodos espectroscópicos, métodos de tinción, cromatografía en capa delgada, NIRS, ensayo enzimático, o microbiológicamente. Dichos métodos de análisis han sido revisados en: Patek *et al.*, 1994 *Appl. Environ. Microbiol.* 60:133-140; Malakhova *et al.*, 1996 *Biotekhnologiya* 11:27-32; and Schmidt *et al.*, 1998 *Bioprocess Engineer.* 19:67-70. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, (1996) vol. A27, VCH: Weinheim, p. 89-90, p. 521-540, p. 540-547, p. 559-566, 575-581 and p. 581-587; Michal, G. (1999) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley and Sons; Fallon, A. *et al.* (1987) *Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 17.

REIVINDICACIONES

1. Una célula de planta de una monocotiledónea o una dicotiledónea que comprende una casete de expresión que comprende un ácido nucleico codificante de una proteína proteína-quinasa relacionada con el estrés (PKSRP), en donde la PKSRP se selecciona de un grupo constituido por un polipéptido como se define en SEQ ID NO: 39 y un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 39, y un promotor apropiado enlazado operativamente, en donde la expresión del ácido nucleico en la célula de la planta da como resultado una tolerancia incrementada de las células de la planta al estrés por sequía en comparación con una variedad de tipo salvaje de la célula de la planta.

2. La célula de la planta de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico codificante de PKSRP se selecciona del grupo constituido por el ácido nucleico codificante de PKSRP como se define en SEQ ID NO: 26 y un ácido nucleico codificante de PKSRP que tiene al menos 80-90% de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 26.

3. La célula de la planta de la reivindicación 1, en donde la planta se selecciona del grupo constituido por maíz, trigo, centeno, avena, trigo híbrido, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza, canola, mandioca, pimienta, girasol, tagetes, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especies de Vicia, guisante, alfalfa, café, cacao, té, especies de Salix, palma de aceite, coco, césped perenne y cosechas forrajeras.

4. Una planta transgénica que es una monocotiledónea o una dicotiledónea que comprende una célula de planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

5. Una semilla producida por una planta transgénica que es una monocotiledónea o una dicotiledónea que comprende una célula de planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la semilla contiene el ácido nucleico codificante de PKSRP y en donde la semilla es progenie auténtica para una tolerancia incrementada al estrés por sequía en comparación con una variedad de tipo salvaje de la célula de la planta.

6. Uso de una planta transgénica que es una monocotiledónea o una dicotiledónea de acuerdo con la reivindicación 4 o una semilla de acuerdo con la reivindicación 5 para la fabricación de un producto agrícola.

7. Una proteína proteína-quinasa relacionada con el estrés (PKSRP) en donde la PKSRP se selecciona del grupo constituido por proteína-quinasa-2 dependiente del calcio (CPK-2) como se define en SEQ ID NO: 39 y un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 39, y en donde la expresión del ácido nucleico en una planta da como resultado una tolerancia incrementada de la planta al estrés por sequía en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta.

8. Un ácido nucleico codificante de una proteína proteína-quinasa relacionada con el estrés (PKSRP), en donde el ácido nucleico codificante de PKSRP se selecciona del grupo constituido por CPK-2 como se define en SEQ ID NO: 26 y una secuencia que tiene al menos 80-90% de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 26.

9. Un vector de expresión recombinante aislado que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 8, en donde la expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora da como resultado una tolerancia incrementada de la célula hospedadora al estrés por sequía en comparación con una variedad de tipo salvaje de la célula hospedadora.

10. Un método de producción de una planta transgénica que es una monocotiledónea o una dicotiledónea que contiene un ácido nucleico codificante de una proteína proteína-quinasa relacionada con el estrés (PKSRP), en donde la expresión del ácido nucleico en la planta da como resultado una tolerancia incrementada de la planta al estrés por sequía en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta, que comprende:

- (a) transformar una célula de la planta con un vector de expresión que comprende el ácido nucleico, y
- (b) generar a partir de la célula de la planta una planta transgénica con una tolerancia incrementada al estrés por sequía en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta,

en donde la PKSRP se selecciona del grupo constituido por proteína-quinasa-2 dependiente del calcio (CPK-2) como se define en SEQ ID NO: 39 y un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 39.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el ácido nucleico codificante de PKSRP se selecciona del grupo constituido por el ácido nucleico codificante de PKSRP como se define en SEQ ID NO: 26 y un ácido nucleico codificante de PKSRP que tiene al menos 80-90% de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 26.

ES 2 345 833 T3

12. Un método de aumentar la tolerancia al estrés por sequía de una planta que comprende

(a) transformar una planta con un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico codificante de una proteína proteína-quinasa relacionada con el estrés (PKSRP) como se define en SEQ ID NO: 26 o que tiene al menos 80-90% de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 26, y

(b) expresar el ácido nucleico de PKSRP en la planta,

en donde la tolerancia de la planta al estrés por sequía está incrementada en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en donde la planta se transforma con un promotor que dirige la expresión de la PKSRP, en donde el promotor está enlazado operativamente al ácido nucleico codificante de PKSRP a expresar.

14. El método de la reivindicación 13, en donde el promotor se selecciona del grupo constituido por un promotor específico de tejido y un promotor regulado por el desarrollo.

FIGURA 1A

Secuencia de nucleótidos de la PK-6 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:1)

GCACGAGCTCAATCCTCATGTTTCGGACTGTGGACTAGCTGCCCTTGACCATCTGGTTCT
GAACGCCAGGTGTCGGCACAAATGTTGGGCTCTTTCGGTTACAGTGCCCCTGAGTACGCC
ATGTCTGGAACCTATACCGTGAAGAGTGACGTCTACAGCTTCGGTGTTGTAATGCTGGAG
CTACTCACTGGGCGCAAGCCTTTAGACAGCTCAAGACCACGATCCGAGCAATCTTTGGTA
CGATGGGCCACACCTCAATTGCACGACATCGACGCCCTTGACGAATGGTGGATCCGTCG
TTGAAGGGCATCTACCCTGCTAAATCACTCTCTCGGTTTGCTGATATAGTCGCCCTTTGCG
TCCAGCCGGAGCCCGAGTTCCGACCCCGATGTCTGAAGTGGTGCAGGCACCTTGTAAGGC
TGATGCAGCGTGCAGTCTGAGCAAACGCAGATCGGAGTCCGCTGTTGGGAATTGAGTCG
AACGAGCCATCTGAGACTTCACCTTTGAGAGTACTGAAGCGCCCACTAGCCTAATCGTGC
ATCTTTGGCCATCTCGTTTCTGAGTGGAACACAAAGCTGGGTATATTCTTTGGTGGTTAAG
CAACCATTGTCCCAATTTGAACTTCCGCTGGNGAAGGTCTGTATGTTGAGAAACGATGC
AAAGCGTTCGCGTGGTNTGCTTGAACCTCAAA

FIGURA 1B

Secuencia de nucleótidos de la PK-7 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:2)

GGCACGAGCCGAAC TTCAGCAGCTTCTTCACATCTTCAGGTTGCTTGGCACCCCGAATGA
GACAATCTGGCCTGGTGTAGCCAGCACCGTGATTGGCACGAGTTTCCTCAATGGAGACC
ACAAGATCTGTCCCTTGCTGTTCCCGGACTCAGCGCGGTTGGCTTAGACCTTCTCGCCAAA
ATGTTGGTATTTCGAGCCCTCAAAGAGAATCTCTGCCAAAGCCGCCTTGAGCCATACTTATT
TCGCTGATGTTGATAAGACAGCAACCTAAACACAACAGAACAAATTCAAGAGAACCAGGT
AACCTCTACCTGTCCAAGACGAAGGACATCTAACTCTTCAGTCAAACCTTGGCCAATCATG
CTGATTGGGAATTGAACCACAGGAACGAGGTGGGCACCGTGGTTCGCTGTAGCATACAAA
GTAGTCTGGAAGACTTGACATCGTTAGCTGGCAATGCAGTATTTTGGAATACAATTTTTC
ATTAAAAATCTCCTAAAGATTCAATATTTG

FIGURA 1C

Secuencia de nucleótidos de la PK-8 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:3)

GCACCAGACTATGACAAGCGCACGCCCTTGACATCGCCGCGTCCCTGGATTGTGTCCCT
GTTGCTAAAGTCCTGCTTGCGGAAGGAGCAGAGTTGAATGCAAAAGACAGGTGGGGGAA
ATCTCCGAGAGGCGAGGCGGAGAGTGCAGGATACATGGAGATGGTAAAGCTGTTGAAGG
ATTACGGGGCTGAGTCACACGCAGGTGCCCCGAGGGGCCACGTTGAGAGTCTGATTCAGG
TTGCCCTCCGTTGCCTTCTAACCGCGACTGGGAGATCGCTCCGTCGGAGATTGAACTTGA
TACCAGCGAGCTCATCGGCAAAGGCTCCTTTGGAGAGATTGCGAAGGCGCTTTGGCGCGG
CACACCCGTCGCTGTGAAGACAATCAGACCTTCTCTGTCCAACGACAGAATGGTCATCAA
GGACTTCCAGCACGAGGTGCAATTGCTCGTAAAGGTTTCGGCACCCAAACATTGTGCAGTT
CCTCGGGGCTGTTACCCGTCAAAGACCTCTCATGTTAGTCACCGAGTTTCTGGCAGGGGG
GCGATTTGCATCAGTTGCTGAGGAGCACCTAAATTTGGCTCCTGACCGCATCGTGAAGT
ATGCCCTCNACATAGCTCGCGGCATGTCTTACTTCACCATCGGAGCAGCCCA

FIGURA 1D

Secuencia de nucleótidos de la PK-9 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:4)

TCCAGCCCATTTGGTTGGCCACACACAGCTGTTTCATGAGTCACCCGCTTCAGGNTGAACTG
AAGAAACGTAACCTCCGTACGGCTATTTTACCAAATTTTCAAGCTCGTTGTCCCGCCATGAT
CCAAATGGAAGCTCAGTTTGCAACATGAAGTACATTGAACACACCTACCGCCCACCAGTC
AGAAGCCAGGCCATGACCTTGTCTTGAATGATCTCGGGTGCTAAGAAATCAGCCATGCC
ACAGACTGTGAAAGTGCCTCATCCGACATTTGCTTTGCAAACCGAAAATCAACCAGCTG
AAGTCGTCCTTTCCGATCTATCATAAGAATCGGGAGAGATGCCACGATATACAACGCC
ATCCTTGTGCAGAAAGTTCGACGGCTAATACCACGTTGGCGACCAGAAAACGAGCTGAGTT
CTCGTCTAAAGGTGACCGAAGTAGAAGTTCTAGAGGCCAGCTAACACACAATTAAGAAC
GAGTGCCACATTGTCACTGTCAATAGGGGTGGCCAAGAGATGCGGCACGAATGGGGAAG
GCCTCAGTTGCTTGAAAAGAGTTCTCTCCAATAGGACTTGGCCCTCCCGACCGAGTCTCTG
AACTTTACGTCTCTGGTACCTTTTCATGCTTATGACGTCATCTGATTTCTTGCAGAGCACCA
CACCGACATCACAGCAATCGGTTGAATAGACCTGGTGCCGATTCTCT

FIGURA 1E

Secuencia de nucleótidos de la CK-1 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:5)

TATGCCCATCTTCTCATACTCAGACCAGATCCTCTATTTCAATTACAGAAGAAAGTTGCTT
GTGCAACGTATTGAAATCATCACCGTCATGGGCTTTCCGAGTAAAAATTCTTGTAAATGGAT
AAAGTCATTTCTAGTCTGATCCATACAAGCTACCGACACAATGCTAGAAGCCTTGATTTAC
ACACTACACACTAGAGAGTCTACAACCTCTTTTCTACACTCTGCTTAGTTGCCTCATCCTC
AACTCCATAAACCCCAATCACAATCATGTAAGACTTGAGAGAGGGAAACAGTAAGCAAC
CTTGTGCTATTTTAGTACCAGAGCAGAGGATGAACCACTAGTCTCCCAACGTAAGCCCT
AATTGCGCCGAACAACCTCACGACGGAACCTCGACTTGGTCAAGGGTGGACAATATGATA
CATTCGAAGGTCGATTTTGCAAATGGGACGAAGCAGCGGAATTCTGGCTGCGCACTGATT
GCAGAGAGCCATTCTGGGGGAGTTGAGTATACACAGTCCAGTCGTACACATGGTCGAGCT
GGAATTTTTCTGAATGAAAAGATCACGGAACAAGCTTCGGAGGTACAGTAGTCAGGCTG
CTCGTAAAAACCTANACTTCGCGCGCTGGTGCAAAAAGTCGGCAAATTGACTGGGATACC
CATCACAAGCTCCTCCCACAGTGGGGGTCACTTGATTTTGTGTGCATGTACTCGTGTT
GCTTCTGGTCAGTGAGGGCGTTGCCCGCCCTTCCCTTGCCATGGCAAATTGCCTCTTAGAA
AGTACATAAGAATGTAACCCAAGTGATTCTATGTCATCTCTTCTACTGTGCTCGATTCCCTC
TGTGCTGATTCTACTAGCGTACCGTGCCGTCCCTGTGAAGCTCTTCTATCTCGGTAAGG
GATATGCCTTCGTGTTGCCGGGTCCATGTACTCCTTTGCCAAGCCAAAAATCTATAATGAAC
ACTTGGTTTCCTTGCCGACCGCAGCCCATGAGGAAGTTATCCGGCTTCAGGTACAGGTGA
ACGAGCCCTCGAGAATGCACGTATTCACCCGGTCAATCATTTGGTAACCGAGCATAATC
ACGGTCTTCAACGAAAACCTTAGCCACACACCTTAAAGAGGTGCAACAGGTTCCGGCCCC
AATAGGTCTAGCACCATCACATTGTAGTCTTCTGCTGCTTTTCCGAACCATCTCATGTTGG
GCACTCCCTTCCACCCCGCAATATGTTGTACAAGCGGCACTCGTGCATTAACCTCTCGTGC

FIGURA 1F

Secuencia de nucleótidos de la CK-2 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:6)

TTTTTTTTTCCAATAGATTGCAATTACATAACTCCAAGTTATGATATGTACAGGTTAGCAA
CAAGCTAATGGCTGCAAGCAGTGAACATACTACCAAGGGAGAGATTCTCACTCCCTAGAC
TTCATCCTCGTACGTTACTTGGCAAGGATTATGGTTTAGTGATAAAAAGCTTCACAAGCCG
GCAAGCATGCTGGTTGCTTCTGCTGCAATCTAATGATTATTCCTTAGGAATCGTATGGCA
GAGAGCTACCACACAAAGCACTGACAATGGTTTGATGGTAACAAGATAGAGATCCATTCA
TTCCTAAGTATGAGAGACCTGTAGTCTTAGCACCATTGTAGGACAGAACCACCGTTTTCCC
CTCAATCAGGCTGTTGCCAAATGTAGAGCAACTCTCATCAACATAACAAGAGGGTTTGAT
AGAAGACAGAGCCCGCTATATAACCACAAGCCCTGCGCCTACCTTATAACGGCTTGGAT
CCACCTCAACAGAAAAGTGATTCAACTCCCTTGATACCGGCTTTCGTAAATCCTCAAGTTGG
CAGATGGCGGTTGTGGATGGCGGCTAGATATCCGCTTTGGGTCCGAAGTAAGTGGAGAGC
TCCTCTGCATCCCTGCTGACGACCGTAAGCTGGTGGGACCAAGCTTACTGCTCCCTGTTCTG
AGAGGAATCTACGACTTCTGCTGATGCCCCTGAGGGCCTGCTGCTAGATAGGACAGCTCG
CCTGGAGGAAGAACCCCCCGAGTTGCATACGAAGATGTATGCATGCGCTCTGGTTCTGA
ACACAACAGCAAGAGCAGAATCCTTAGCAGATTTCATCAAGTCCAGGACTTTTGTGCTTAGA
TGAGTCCAAAGCATTTGCGACCCCGAGCCATTTGCTCCTCCAGGAAGCCTGCGCCGAGA
AGGATCCATTGGTTTCGGTGGGCCGCTGCAGGTCTCGGCTTCCTGTAGCCCCAGTTCCAAGT
GCACCACTGGTTTGCCCTGCAGAAGCACCCAGTCGAGTTGAACTGCCACCGGAAATTTGT
GACTGCTGGTACTTCAGAATTGTCCAGTCAAAAACGTAGTCAAATTGAAAACCTGTAAAA
CTATTTCCAGTTTAGGCAACAGAAAGTGGCACTGTAATAAACTGAAAATCATCAAACATT
CACAAACTATCTGTTTCGTTGATAGAGCATAAGTAAAGTCTGCGCTTAGGATCAAGTCTTGAT
ACATTACAATGCCCAAGCAAGAGTGAAACCTACAAAAGTTACAGTTTTTCATACCCTCACG

FIGURA 1F, Continuación

GACCTCAATGGGCGTGGACATTTGTTTTCTCACTGATCTTCTCGTACTTCTGCTTCTTGGTT
CCCGCTTTCAGTCCTTGCCCATGGAAGACTGCCTCTCAGGAAGTACATGAGCACATATCCA
AGAGATTCCAAATCATCTCGTCTGCTTTGCTCAATACCAAGATGAGTGTGATGCTTGCAT
ACCGAGCAGTCCCTGTCAGATTTTGTCTCCCTGTAGGGAATATGCTGATGCGTGGAAGG
GTCGCGGTACTTCTTGGCAAGACCAAAATCAATAATGTAGACCTGGTTTGCTCGCCTACCA
AGCCCCATTAGAAAATTATCAGGCTTGATGTCTCTATGAAGAAAGCTTTTCGCATGCACAT
ACTCCACTCTGTTGATCAGCTGGTCAGCAAGCATGAGAACAGTCTTTAAAGAGAACTTCC
GGCTGCAGAAAGTTGAAAAGGTCTTCGAGACTTGGCCCCAACAGATCCAGAACCAAGACAT
TGTA GTCTCCTTCTATCCCGAACCATCCTCGTGC

FIGURA 1G

Secuencia de nucleótidos de la CK-3 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:7)

CGGTGGGGCGCTCCCCAATATTTTATCCCCGGGGCTGCAGGGAATCCGGCGACCAGTNTT
TGAAGGTGTCAACGCCGTGAATAGTGAGCGTTGCGTTATGAAGATTTTGAAGCCAGTAAA
GAAAAAAAAAGATCAAAAGAGAGATCAAGATTCTGCAAACCTTTGTGGAGGGCCCAACA
TTGTGAAGCTTCTGGACATTGTCCGTGATCAGCAATCGAAGACACCCAGCCTAATTTTGA
ATATGTGAACAATACTGATTTCAAAGTGCTCTACCCCACTCTTACAGACTTTGATATCCGA
TACTACATTCATGAGCTGCTCAAGGCTTTGGACTATTGCCATTCTCAAGGGATTATGCACA
GGGATGTGAAGCCACACAACGTGATGATTGACCATGAGCAGCGGAAGCTTAGGCTTATTG
ACTGGGGACTTGCCGAATTCTATCATCCTGGCAAAGAGTATAATGTGCGTGTTGCCTCTAG
GTACTTCAAGGGTCCTGAGCTGCTGGTTGATCTTCAAGATTATGATTACTCTCTCGACATG
TGGAGCTCTGGGGTGTCATGTTTGCCGGCATGATATTCGGAAGGAGCCATTCTTTTATGGG
CATGACANTTCATGATCAACTTGGTGAAGATCGCTAAGGTGTTGGGAACCTTGATGAATTG
AATTCCTATCTAACAAATACCGCTAAGTGGACCCCATTTGGAGCACCTGGTGGGGG

FIGURA 1H

Secuencia de nucleótidos de la MPK-2 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:8)

GCACGAGGAACTAACGAATTGTCATTCTATAATCCAATAGTGAATCACACGGGGGGGAA
 TAAGTTGCAAAACCATACAACGCCGGGATAGCGTTGTAGCCACCTAAAGAATTGAGAGTA
 GGCCTTACAACCTTGAGATGAAGTGTGAAGTGGTACTGCACCATATCATCAGGACCTAAGC
 TGCAATCCAGAGCCTCCCTCCAAATGAGATCCCTGATAGGCTCCTCCGAGATAGAGGGCT
 CCTCGAAGCCAAACTCGAAGGGAGATACCGAGCCAGGCTCATCGTTGATGTCATGAAGTG
 AAGCTTAAATAAGGGTGCGCCAAGGCAGCTTCCACTGTGATTCTTTTCGCTGGATCAAAG
 ACCAGCATCTTTTCAACAAGATCAAGAGCAGAACGATTAATGCCTCTGAACCTTCTGGGTT
 AAGGGAATAGGCGACTGTGCGAGGCAGGTGCTTGATATACCGCCTAGCAATTGTCGCTTCTC
 AAAAAACCAAGATCCCTATCTTCAGGAGTTCCGATGAGTTCTGTAATTAGGCGGAGCTGA
 TGCACATAGTCTCTCCAGGGAACAACGCAGATCGGTTAAGCAACTCCATGAAGATGCAC
 CCCACAGACCAAATGTCAATAGCTGCAGTGTATGCTGAACAATTCAGGAGCAGCTCTGGA
 GCTCTGTACCACTCGTTACAACATACTCAGTCATGAAATCCGTTTCAGAGAGAGTGCCTG
 CCAAGCCAAAATCTGCGATTTTCAAATCGCAATTGGCATTGACGAGAAGGTTGGTGGGCT
 TCAAGTCCCGGTGCAAGACGTTCCGCGAATGGATGTACTTCAAGCCCCGCAAGATTGAT
 ACAGAAAATACTGACAGTGGTCTTCTGTGAGAGCTTGATTTGAACGAATGATCTGGTGTA
 GGTCCGTATCCATCAACTCGTATACAATGTACACGTCGTTGAAATCTCGTGC

FIGURA 11

Secuencia de nucleótidos de la MPK-3 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:9)

CGGCACCAGCCTCGCTGGAGACCGACCATCGAAGCACCTTAAGCTCGTTTTTCATTTCGGCA
TTGCTTGCGAGCACTTCGACTTCCTAGAAATTTCAATAGACCTAATGGAATCGCCACTCCCT
AATCTTTCCGGAGAGGCCTTATCGCCGACGGCAACTGCCGAAGACGAGATTACTCAGATG
ATACTAAAAAGTGCCGCAAGGTCCGAATTAGGAATGTATGTTTCGAAGAGACAGGAATTC
TATCTTCGAAGAGCGCGGAGGCGGCGTAAGTTGCGTGGAAGCCGGTTTTGCAGAGCATC
TCCGAGATGAAGCCTGTTCATGGAATTCCACACTCCGATGGCTTACCGGGATAGTGGGTCT
CCGCCGAAGAACGCCTCTACCCCATCCTTACCTGGCCCGAAGAACATTTACCGCCACGA
CAAGTGAGTGTCCCGCAAAGGAGCAGTCCTCCGCCGAAGAACGTCTCACCACTCCCCAG
CCCGGCATTTGTAGCGCGGACTGCGATCGAAGTATTCTGCTGCATCTCAGCAAGTTCAAC
GAAATCGAGGGCAACGCGAAATCTCTTTTATATGGCGTAGTTTGTGTCTCCGACTGGACTC
CTATCTATCCCCATCGAGATAACTGATTCGGTGGATAATTTCTCCAAATTTTGGCTAACNC
AAGAANCTCAAGGGCGAAT

FIGURA 1J

Secuencia de nucleótidos de la MPK-4 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:10)

GCACGAGGTTGGTGTAAAGTTATTGATAGTGCTGTGCAATTCACAGTTTGTACTCCGGTA
GGTCCGACCTCTTCAATTGTCAGTTTAAAACTCTAAAAACATTTGAGAAAAGTGTGAA
AAATCTCCGTGAGGAAATTCCTTGTGCGCAAGACGTGAAAAAAGAAGAAAGATGGA
AATATTGTTTTGGGTATCGAAGAAGTGTTGCGATGCTGTGCAATAAGGAAAGAAAAAGTGC
AGGTAACATAAAAAGCTAGCATGGTGATGATAATATAAGACCCCGATTAACACACTTATG
GATTGTTTCATGAGCTGCACGTTCTCAGCGACAAATGGGGCTCAITGAGAAAACTCCACTT
TCTATAAGGTTGGGAAACGAGCGTTTTTTTTTTGAAGATGTTTTTCCGTCAATCTGATTTG
ATATCGTTCTCAACTTGACCACATATGACTATATAAGGAAAAGGCATTGAGAAAGTGGCG
GATTGGCGAGGTAGTTCGACCATGCTTTTGGTAAAGTCCCTTGAAGTTCAGTGGTGGATCA
GGCTTGTGGTAGTGACAGTCTCTGCACGCCATGCGAGGCTAACTTTAAGTTACAAAATCTT
GCTCAAATGGTACTCTTCCTCGTTGTACTTTTGCAGGAACGGATGTTTAAGTAAATCAGTA
GTTGATGGTCGTTCACTGGGACATTTCCGGATGCAGGATTCAATAAAAGAACAAAATTCG
GGGGAGAATTTGTCAAGGGATGCGGCTGCGGGGGGTTGATTAACATACATTCCATGAGG
ATGAAGAAATTTTGCCAACCCTCTTCCATTCCAGCTGGTTTGTATGGGAAGGTACCCAACG
CACACTCCAAAAGAGTCAATCCTAAACTCCATAGGTCACTGTCGTATGCATACGAACGCC
CCTGAAGGCGTTCTGNCGACATATATGTGCAAGTCCCAACGAACGTGTCTCGCTGGGCCA
AGGAATGAACCAACACAGCACTGACACCAAAATCAGATATTTTGACCTCACCTTGTGAT
TGATGAGGAGGTTGGAGGGCTTTATATCACGATGTATGATGTGCCTGACTTGGTGTAGGT
ATTCCAATCCCTTCAGAACTTGACTAGCAATGACGGCCAAATACGGCTCAGGTATNTGCTT
TCTGGTGC

FIGURA 1K

Secuencia de nucleótidos de la MPK-5 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:11)

TCCCCGGGCTGAGGAATTCGGCACGAGCGGTTGATCCTCACCCCTGGGAAGGACCCTGGA
ATTGAGTAGCGTGC GGAAGCTGCATCGATCCGGAAGAGACGATGAGTAGGAGAGTGAGA
AGGGGAGGTCTTCGCGTCGCGGTGCCGAAGCAAGAGACTCCCGTCAGCAAATTTTGACT
GCCAGTGGAAC TTTCCAGGATGATGATATCAAGCTCAACCACACCGGGCTTCGCGTCGTC
TCTTCAGAACCTAACCTTCCTACGCAGACGCAGTCTAGCTCCCCAGATGGGCAACTGTCA
ATAGCAGACCTGGAGTTAGTGCGGTTCTTAGGAAAGGGTGCGGGTGGAACCGGTGCAGCT
TGGTCCGGGCACAAATGGACCAATGTCAATTATGCACTGAAGGCGATACAAATGAATATCA
ACGAAACAGTGAGGAAGCAGATTGTTTCAGGAGCTGAAAATCAACCAAGTGACGCACCAG
CAGTGCCCTTATATCGTGGAATGCTTCCA CTCTCTACCACAACGGCGTCATATCCATGA
TCCTAGAGTACATGGACAGGGGCTCGTTGTCCGACATTATTAAGCAACAAAAGCAGATAC
CTGAGCCGTATTTGGCCGTCATTGCTAGTC

FIGURA 1L

Secuencia de nucleótidos de la CPK-1 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:12)

GCACCAAGCCGAGTCGGGCATTTTCGTGCGGTGTTGAGGGCTGACCCGAGCTTTGAAGAA
 GCCCCTTGGCCTTCCATCTCTCCCGAAGCCAAGGATTTTCGTGAAGCGTCTCCTGAATAAGG
 ATATGCGGAAACGCATGACTGCTGCACAAGCTTTAACTCATCCATGGATTGGAAGTAACA
 ACGTGAAGATACCTCTGGATATCTTAGTGACAGACTTGTGAGGAATTATCTTCGTGCATC
 ATCCATGAGAAAGGCTGCTTTGAAGGCCCTGTCAAAGACTTTAACCGAAGACGAGACTTT
 TTATCTACGTACTCAATTTATGCTGCTAGAACCAAGTAACAACGGTCGTGTTACTTTTGAG
 AATTTTCAGACAGGCACTGCTGAAAAATTCAACAGAGGCCATGAAAGAGTCACGGGTTTTT
 GAAATTCTGGAATCGATGGATGGTCTTCATTTTCGACCAAGCCGAGTCGGGCATTTTCGTG
 CGGTGTTGAGGGCTGACCCGAGCTTTGAAGAAGCCCCCTTGGCCTTCCATCTCTCCCGAAGC
 CAAGGATTTTCGTGAAGCGTCTCCTGAATAAGGATATGCGGAAACGCATGACTGCTGCACA
 AGCTTTAACTCATCCATGGATTGGAAGTAACAACGTGAAGATACCTCTGGATATCTTAGTG
 TACAGACTTGTGAGGAATTATCTTCGTGCATCATCCATGAGAAAGGCTGCTTTGAAGGCC
 CTGTCAAAGACTTTAACCGAAGACGAGACTTTTTATCTACGTACTCAATTTATGCTGCTAG
 AACCAAGTAACAACGGTCGTGTTACTTTTGAGAATTTTCAGACAGGCACTGCTGAAAAATT
 CAACAGAGGCCATGAAAGAGTCACGGGTTTTTGAAATTCTGGAATCGATGGATGGTCTTC
 ATTTCAAGAAAATGGACTTTTCAGAGTTCTGTGCAGCGGCCATTAGTGTCTCCAGTTAGA
 AG

FIGURA 1M

Secuencia de nucleótidos de la CPK-2 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:13)

GCACGAGCTCCTGCATCTCCCCCTCCTTCTCCTCCTCATCATTCTGGAGCCCAGCGAACTG
CGATCTGAGATTCCAACCTTGAAGGGCCTCGCGTAAGCACCGGAGCTCGTTTCTTACGCTT
TTGCGCCTCGCGATATTTGTACATTGTTTCCTCTGGTTTTATTTCGATTCCGCCTCTGAAAAT
GTGAACGGGCTGCAAGCTTGGTTTTGGAGCAACGTTGGAGCATTGAAGGGTTGCGCTCGT
CCCTGCCCATTCTCGCTTCTGCTCTGGCCTATGTCATGACGACGTGAAGGAGAGGATTTG
AGGGTTTTGCAAGTGATATAATCCTCCCCGAGGAGATTTCTGTGAGTTGATTAACCTTGGAT
CAGCGACATGGGGAACACTAGTTCGAGGGGATCGAGGAAGTCCACTCGGCAGGTGAATC
AGGGAGTCGGGTCTCAAGACACCCGAGAGAAGAATGATAGCGTCAATCCAAAGACGAGA
CAGGGTGGTAGCGTTGGCGCAAACAACTATGGCGGAAAGCACAAAGCACTGGTGCTCAGG
CCGGAGAACGATCCACCTCTGCGCCCGCTGCTCTGCCGAGGCCGAAGCCAGCATCGAGGT
CAGTATCCGGTGTTTTGGGTAAGCCGCTGTCAGATATTCGTCAATCTTACATCCTGGGACG
GGAGCTTGGCCGAGGGCAGTTCGGAGTGACTTACTTGTGTACTGACAAGATGACGAATGA
GGCGTACGCGTGCAAGAGCATCGCCAAACGGAACTGACCAGTAAGGAGGATATCGAGG
ATGTTAAGCGGGAGGTTCAAGATTATGCATCACCTGTGCGGGACACCCAATATCGTGGTGT
TAAAGGATGTGTTTCGAGGACAAGCATTCCGTGCATCTTGTGATGGAGCTCTGTGCAGGTG
GCGAGCTCTTCGATCGCATCATTGCCAAGGGGCATTACAGTGAGCGCGCCGCTGCCGATA
TGTGCAGAGTCATCGTCAATGTGGTGCACAGATGCCACTCATTAGGGGTCTTCCATCGGG
ATCTCAAGCCAGAGAATTTTCTGTTGGCCAGCAAGGCTGAGGATGCGCCTCTGAAGGCCA
CAGACTTCGGTCTGTCAACTTTCTTTAAGCCAGGAGATGTGTTCCAGGATATTGTTGGAAG
TGCGTATTACGTGGCCCTGAAGTTTTGAAGAGAAGTTATGGTCCTGAGCTGATGTTTGAAG
GTGCAGGCGTGATTGTGTACATTCTGCTGTGTGGTGTACCCCCCTTCTGGGCTGAAACTGA

FIGURA 1M, Continuación

GCAGGGTATCTTTGACGCTGTGCTCAAAGGGCACATAGACTTCGAGAACGAGTCCATGGC
CGAAAAATCTCCAACGGGGCTAAGGATTTGGTGAGGAAAATGCTAAACCCTAACGTGAAN
AT

FIGURA 2^a

Secuencia de nucleótidos de la PK-6 de longitud total de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:14)

ATCCCGGTGAGTATCACTTACGGTGGCGAAGGATGGCCTTTGGGGTAGGAGCTGGTATA
 TCGGAGTCCAACAGAAGCTTGTGCAGGACTCTTGAGTTGTGCGTGCAGGGCTGAGTGC
 CGGAAAGGTATTTCCGACGAAGAGTCAATGTGGCGTGGACAAACGTTTGAAGAGATG
 GGTGTGGATATGAAGGCTCCGGCTAAGCAGTCGCTGGGAGTCGGACTGCTCCTGTGCTCT
 GTAGTGATCCTCTCGGTGGTGAGCTCTGTGTATGGCCAAGTTCAGACAGATCCAGTGGAT
 ACTACAGGCTTAATTTCCATGTGGTATGACTTAAACAGAGTCAATCTCTCACGGGGTGG
 ACTCAAAATGCTTCTAACCCITGTGGGCAGCAGTGGTACGGCGTTGTATGTGATGGCTCTT
 CTGTCACGGAAATCAAAATTGGAAGTCGGGGTTGAATGGAAATTTAATCCTTCGTAATT
 TCAAAACGCTTTTAAAAAGCTTCGAATTTTTGTATGCTAGTAACAACAACATCGAAGGAAA
 TATTCCTCAACAGTTTCCTACGTCTCTTACTCAAATGATATTGAACAACAATAAATTGACC
 GGAGGTCTCCACAGTTTGATCAATTGGGCGCCTTGACAGTCGTAAACTTGAGCAACAAC
 AATCTGACCGGCAACATGAACCCCAACTATTTCAATGTGATCGTGAATGTGGAAACCTTC
 GATGTTTCCTATAACCAACTTGAAGGCACTCTCCCGACTCCATTCTAAACCTGGCCAAGC
 TTCGTTTCTTGAATTTGCAGAAACAATAAATTTAATGGTAAACTTCCCGACGATTTCTCTCG
 GCTGAAGAATTTGCAGACTTTCAACATTGAGAACGATCAGTTCAAGGGTAATTATCCATC
 AGGTTTACCCAGTAATAGCAGGGTTGGAGGAAATCGTCTTACATTTCCCCCACCTCCAGCC
 CCCGGCACACCTGCTCCAGGACTCCTTCTCCTTCAGGAACATCGAATGGATCATCGTCGC
 ATCTCCCTCTAGGGGCGATCATTGGAATAGCCGCTGGTGGTGCTGTGCTGCTTTTATTACT
 AGCACTCGGCATCTGTTTGTGTGTGCGTAAGCGGTCCAAGAAAGCATTGGGCGATCCAGA
 GGCCACGACCAGCAGCCGAAGACCGTGTTTACACCTCCCCTCTCCGCAAAGAGCCAGAG
 TGATCCAGCAAGAGCATAGACAAAACGACGAAACGCAACATCTTTGGCAGCAGTAAGA

FIGURA 2A, Continuación

GTGAGAAGAAAAGTTCAAAGCACAGAGTATTTGAGCCAGCTCCTCTTGACAAAGGAGCA
 GCCGACGAACCAGTGGTGAAGGCGTCTCCGCCCCTCAAGGTACTGAAGGCTCCTCCTTCA
 TTTAAGGGTATCAGCGGCCTGGGTGCTGGACATTGAAAGCAACAATTGGCAAGGTGAAC
 AAGAGCAATATTGCAGCCACCCATTCTCTGTAGCGGATCTTCAGGCAGCCACAAACAGC
 TTCTCCCAGGATAATCTGATTGGAGAAGGGAGCATGGGTGCGGTGTATCGTGCCGAGTTT
 CCCAACGGCCAGGTCTTGGCCGTGAAGAAGATCGACAGCAGCGCGTCGATGGTGCAGAA
 TGAGGATGACTTCTTGAGTGTAGTAGACAGTTTGGCTCGCCTGCAGCATGCTAATACGGCT
 GAGCTTGTGGGTTACTGTATTGAACATGACCAACGGCTGTTGGTGTACGAGTACGTGAGT
 CGTGGAACCCCTGAACGAATTGCTCCATTTCTCGGGTGAAAACACCAAGGCCCTGTCCTGG
 AATGTCCGATTAAGATTGCTTTGGGATCCGCGCGTGTCTGGAGTACTGCACGAAGTCT
 GTGCACCTCCCGTGGTTCACCACAACCTCAAATCTGCCAATATTCTGCTAGACGATGAGCT
 CAATCCTCATGTTTCGGACTGTGGACTAGCTGCCCTTGCAACCATCTGGTTCTGAACGCCAG
 GTGTCGGCACAAATGTTGGGCTCTTTCGGTTACAGTGCCCCCTGAGTACGCCATGTCTGGAA
 CCTATACCGTGAAGAGTGACGTCTACAGCTTCGGTGTTGTAATGCTGGAGCTACTCACTGG
 GCGCAAGTCTTTAGACAGCTCAAGACCACGATCCGAGCAATCTTTGGTACGATGGGCCAC
 ACCTCAATTGCACGACATCGACGCCCTTGACGAATGGTGGATCCGTCGTTGAAGGGCAT
 CTACCCTGCTAAATCACTCTCTCGGTTTGCTGATATAGTCGCCCTTTGCGTCCAGCCGGAG
 CCCGAGTTCCGACCCCCGATGTCTGAAGTGGTGCAGGCACTTGTAAGGCTGATGCAGCGT
 GCGAGTCTGAGCAAACGCAGATCGGAGTCCGCTGTTGGAATTGAGTCGAACGAGCCATCT
 GAGACTTCACTTTGAGAGTACTGAAGCGCCCACTAGCCTAATCGTGCATCTTTGGCCATCT
 CGTTTCTGAGTGGAACACAAGCTGGGTATATTCTTTGGTGGTTAAGCAACATTTTGTCA

FIGURA 2A, Continuación

ATTTGAACTTCAGCTGGAGAAGGGTCTGTAGTGTGAAGAAAACGAATGCAAAGCGTTTC
GGCGTGGATGTGCTTTGAGAACTTACAAAACTCATCAAGACTTTGAAGATCTTTGTATTGC
ATCGAATCCTTTCAATCAGTCTCGGGTAGGATCAGTTCCTCTGTATCGGATACCCTTTTCA
TCCTAACATGGGACCCTTTTAATCCAGAGGATGGAGTGCTTGAATAGTGACCTTGGTCG
AGTTAACGC

FIGURA 2B

Secuencia de nucleótidos de la PK-7 de longitud total de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:15)

ATCCCGGGAGTGGGTGGTTGGACTGTAAGGAGCTAGCGTTTATAGAGCTACAGTGC GGTTT
GCTGTGTGAGTGAGTGAGTGAGTGAGTGCGTGAGTGAGGATGTCTGTTTCTGGTATGGAC
AACTATGAGAAGCTGGAGAAGGTAGGAGAGGGGACTTACGGAAAAGGTGTATAAGGCCCCG
TGATAAACGCTCCGGGCAGCTGGTGGCGCTCAAGAAGACTAGGTTGGAGATGGAGGAAG
AAGGCGTCCCTTCCACCGCTTTGCGCGAAGTTTCGTTGCTACAAATGCTCTCCACAGCAT
GTATATCGTCAGGCTACTTTGCGTGAGCACGTCGAGAAAGGCAGCAAGCCCATGCTCTA
CTTGGTCTTTGAATATATGGACACTGATCTTAAGAAGTATATTGACTTGCACGGTCGTGGT
CCGAGCGGGAAGCCTCTGCCTCCCAAAGTGGTCCAGAGTTTCATGTATCAATTGTGCACA
GGGCTTGCCCACTGTCATGGCCACGGAGTAATGCACAGGGATCTGAAACCCCAGAATTTG
CTCGTCGACAAGCAAACCCGTCGTCTTAAGATTGCCGACCTTGGTCTCGGTCCGGGCATTCA
CAGTGCCAATGAAGAGTTACACACACGAGATTGTTACTCTATGGTACCGAGCTCCTGAAG
TTCTTCTTGAGCGACCCACTACTCTCTACCTGTGGATATCTGGTCTGTTGGGTGCATCTTC
GCTGAACTCGTCCGGAATAATGCCGCTCTTCACTGGAGACTCCGAACTTCAGCAGCTTCTTC
ACATCTTCAGGTTGCTTGGCACCCCGAATGAGACAATCTGGCCTGGTGTAGCCAGCACC
GTGATTGGCACGAGTTTCTCAATGGAGACCACAAGATCTGTCCCTTGCTGTTCCCGGACT
CAGCGCGGTTGGCTTAGACCTTCTCGCCAAAATGTTGGTATTCGAGCCCTCAAAGAGAAT
CTCTGCCAAAGCCGCCTTGAGCCATACTTATTTGCTGATGTTGATAAGACAGCAACCTAA
ACACAACAGAACAAATTCAAGAGAACCAGGTAACCTCTACCTGTCCAAGACGAAGGTAA
CGC

FIGURA 2C

Secuencia de nucleótidos de la PK-8 de longitud total de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:16)

ATCCCGGGCAACGAGAAGCATTCGAGATGGCAGATGCGAAGGAGGAACTGGCGCTGCGC
ACGGAATGCACTGGGCTGTGAGGAGTAACGACGTGGGGCTGTTAAGGACCATTCTGAA
GAAAGACAAGCAGCTCGTGAATGCTGCGGACTATGACAAGCGCACGCCCTTGACATCGC
CGCGTCCCTGGATTGTGTCCCTGTTGCTAAAGTCCTGCTTGGCGAAGGAGCAGAGTTGAAT
GCAAAAGACAGGTGGGGGAAATCTCCGAGAGGCGAGGCGGAGAGTGCAGGATACATGG
AGATGGTAAAGCTGTTGAAGGATTACGGGGCTGAGTCACACGCAGGTGCCCCGAGGGGC
CACGTTGAGAGTCTGATTACGGTTGCCCTCCGTTGCCTTCTAACC CGCACTGGGAGATCG
CTCCGTGCGAGATTGAACTTGATACCAGCGAGCTCATCGGCAAAGGCGCCTTTGGAGAGA
TTCGGAAGGCGCTTTGGCGCGGCACACCCGTCGCTGTGAAGACAATCAGACCTTCTCTGT
CCAACGACAGAATGGTCATCAAGGACTTCCAGCACGAGGTGCAATTGCTCGTAAAGGTTT
GGCACCCAAACATTGTGCAGTTCCTCGGGGCTGTTACCCGTCAAAGACCTCTCATGTTAGT
CACCGAGTTTCTGGCAGGGGGCGATTTCATCAGTTGCTGAGGAGCAACCCTAATTTGGC
TCCTGACCGCATCGTGAAGTATGCCCTCGACATAGCTCGCGGCATGTCTTACCTTACAAT
CGGAGCAAGCCCATCATCCACGCGATCTCAAACCCGAAACATCATA GTGGACGAAGA
GCATGAGCTGAAGGTCGGCGACTTCGGACTGAGCAAGCTGATCGACGTAAAGCTTATGCA
TGATGTGTACAAGATGACGGGGGGGACTGGGAGTTACAGATACATGGCGCCTGAGGTCTT
CGAACATCAACCCTACGACAAATCCGTCGACGTGTTTTCTTTGGAATGATATTATATGAG
ATGTTTGAAGGCGTCGCTCCGTTTGAGGACAAGGATGCATACGACGCTGCCACACTAGTT
GCTAGAGACGATAAGCGGCCAGAGATGAGAGCCCAAACGTATCCCCACAAATGAAGGC
ATTGATCGAGGATTGCTGGTCACCGTATACCCGAAGCGACCACCTTTTCGTCGAAATCGTC
AAAAAACTCGAGGTAATGTATGAGGATTGCTTATTGAGATTGCCCCAAAGACCGTCGTCAT

FIGURA 2C, Continuación

CTCCGCGACATCTTGCATCTTCGACGCAATCCTGCAGACTCGTGATTGATCGGGCCAAACCT
TCGAGCTGATCAATCTAAGTAGTCAATGCCTTACTGTGTCAAATTCAGCCTCCGCCGACAG
ATTGGCTATGGTTCAAGTGATTGGATTCTCTGCTTCTCCAGAGCCAGAAACGACCCCCGTG
CAATTCTTCTCCGACGACCACATTGCGACATGAAGCACCAGACTTTGGATGTAGAAGGC
ATGGTCTACATGCTTTGCTGTGAGCCTTGACGCTCTCGCAGGTTGATCTCTTTAACCAGCT
TCTAGCCTTTTCGCAATGGCTGCATCACTTAAGAAATCACCGAGTATCGTGATGCTCGTTAA
CGC

FIGURA 2D

Secuencia de nucleótidos de la PK-9 de longitud total de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:17)

aTCCCGGGCTGTGATGTCGGTGTGGTGTCTGCAAGAAATCAGATGACGTCATAAGCATG
AAAAGGTACCAGAGACGTAAAGTTCAGAGACTCGGTGCGGAGGGCCAAGTCTATTGGA
GAGAACTCTTTCAAGCAACTGAGGCCTTCCCCATTCGTGCCGCATCTCTTGGCCACCCCT
ATTGACAGTGACAATGTGGCACTCGTTCTTAATTGTGTGTTAGCTGGGCCTCTAGAACTTC
TACTTCGGTCACCTTTAGACGAGAACTCAGCTCGTTTCTGGTCGCCAACGTGGTATTAGC
CGTCGAACTTCTGCACAAGGATGGCGTTGTATATCGTGGCATCTCTCCCGATGTTCTTATG
ATAGATCGGAAAGGACGACTTCAGCTGGTTGATTTTCGGTTTGCAAAGCAAATGTCGGAT
GAGCGCACTTTCACAGTCTGTGGCATGGCTGATTCTTAGCACCCGAGATCATTCAAGGAC
AAGGTCATGGCCTGGCTTCTGACTGGTGGGCGGTAGGTGTGTTAATGTACTTCATGTTGCA
AACTGAGCTTCCATTGGATCATGGCGGGACAACGAGCTTGAAATTTTGGTAGAATAGC
CCGTCGGCAGCTTACGTTTCTTCAAGTTTCAGCCCTGAAGCGGTTGACCTCATTGACAAG
CTGCTGGTGGTGGACCCAACCAAGAGACTGGGCTGTGACAGCCATGGATCGCTTGCCATA
AGGGAACATCCTTGGTTCCGAGGTATAAACTGGGACAAGCACCTCGATTGCAGTGTGGAA
GTTCTTCAGAGATCATGACACGCCTTCAGTTGGCCATAGACTTCTTCCCGTGGATGATA
GTTATCAAGTGTTTGATCTCCAACCCGATGAAGACGATCCACCATGGCTTGATGGCTGGTG
ATAGCTTGATGGCTCGTAGATCCCCCTTCTCCAAGCATCAATGGCACAGTACCGAATGGCT
ATAACAGAAAGATGCACATTAAGTGCTCCATGAACAGATACCGTAGCGCTTAGGATTTTC
GGTCGTCACAAATGACGGCTCTCTTGAGGTTTGAATGTTGTGTACCCGATGATCTCTA
CTGGCACAAACCTCCAGGCTGAATCTTAAGGCCAGCTGTTTATAGGTGAGACGTTTACCTTG
GTTTGAAGTCTGAAAGGCAATCAATTCGCTTATGTGTGTCCCTTCCATGTGGTCATTAGGG

FIGURA 2D, Continuación

AAGGGAACCGCTGCACTAGTCAGTAAACGAACATGGCTTCAATTGTATAGCATAGCGGTA
GAGGTTTCGTACGAAATGTGGTTGCAGTCGGTGATTATAGGCGCATTCTCTGAACATGCA
CGAGAATCGTGCTCCTGAGTCTCCATCATTCAAGTGGTGCGAGCTCGC

FIGURA 2E

Secuencia de nucleótidos de la CK-1 de longitud total de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:18)

ATCCCGGGCTCACGTAGTGAAGTCTGTCTGAATTTTAGGGGATGAGAGGTAGATT
TGAAGAATACTGGTGTCTAATTTTCTGTAAATTTTTCACCTTGAGGTAGCTCATGGATTG
GGAGGTGATCGCATGAGAGCTCCTCAGAGGCAGTCTCGAGAATATCAATATAGATCATTG
GACGTCTTCACAGAGCAGCAGCAGCAGTGTGAAAAGCAGCAGCAGCAAGATGAGTATCA
GAGAACAGAATTGAAGCTCGAGACACTGCCAAAAATGTTAAGCAATGCGACCGTGTTCATC
TTCCCTCGAAGCAGTCCGGATGGACGTAGACTACGTACAGTCGCGAATAAGTATGCTGT
GGAAGGTATGGTTGGGAGTGGCGCATTCTGCAAGGTGTATCAGGGCTCCGATTGACGAA
CCACGAGGTTGTGGGCATCAAGCTGGAGGATACGAGAACTGAGCACGCTCAGTTAATGCA
CGAGTCGCGCTTGTACAACATATTGCGGGGTGGGAAGGGAGTGCCCAACATGAGATGGTT
CGGAAAAGAGCAAGACTACAATGTGATGGTGCTAGACCTATTGGGGCCGAACCTGTTGCA
CCTCTTTAAGGTGTGTGGGCTAAGGTTTTCGTTGAAGACCGTGATTATGCTCGGTTACCAA
ATGATTGACCGGGTGAATACGTGCATTCTCGAGGGCTCGTTCACCGTGACCTGAAGCCG
GATAACTTCCTCATGGGCTGCGGTGCGCAAGGAAACCAAGTGTTCATTATAGATTTTGGCT
TGGCAAAGGAGTACATGGACCCGCAACACGAAGGCATATCCCTTACCGAGATAGGAAG
AGCTTCACAGGGACGGCACGGTACGCTAGTAGGAATCAGCACAGAGGAATCGAGCACAG
TAGAAGAGATGACATAGAATCACTTGGTTACATTCTTATGTACTTTCTAAGAGGCAATTTG
CCATGGCAAGGGAAGGGCGGGCAACGCCTCACTGACCAGAAGCAACACGAGTACATGCA
CAACAAAATCAAGATGAACACCACTGTGGAGGAGCTTTGTGATGGGTATCCCACTCAATT
TGCCGACTTTTTCACACGCGCGAAGTCTAGGTTTCTACGAGCAGCCTGACTACTGTTAC
CTCCGAAGCTTGTCCGTGATCTTTTCATTGAGAAAAAATTCAGCTCGACCATGTGTACG
ACTGGACTGTGTATACTCAACTCCCCCAGAATGGCTCTCTGCAATCAGTGCGCAGCCAGA

ES 2 345 833 T3

ATTCCGCTGCTTCGTCCCATTGCAAAATCGACCTTCGAATGTATCATATTGTCCACCCTTG
ACCAAGTCGGAGTTCCGTCGTGAGGTTGTTGCGGCGAATTAGGGCTTACGTTGGGAGGAC
TAGTGGTTCATCCTCTGCTCTGGTACTAAAAATAGCACAAAGGTTGCTTACTGTTCCCTCTCT
CAAGTCTTACATGATTGTGAATGGGGGTTTATGGAGTTGAGGATGAGGCAACTAAGCAGA
GTGTAGGAAAAGAGTTGTAGACTCTCTAGTGTGTAGTGTGTAAATCAAGGCTTCTAGCAT
TGTGTCGGTAGCTTGTATGGATCAGACTAGAAATGACTTTATCCATTACAAGAATTTTTAC
TCGGAAAGCCCATGACGGTGATGATTTCAATACGTTGCACAAGCAACTTCTTCTGTAATT
GAAATAGAGGATCTGGTCTGAGTATGAGAAGATGGGCATGTTAACGC

FIGURA 2F

Secuencia de nucleótidos de la CK-2 de longitud total de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:19)

ATCCCGGGTTGTCTGAGGACGGAGAGAGAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGTTG

TTTAGGGGAGGCATGCGGGAGCAGGATTGGTGTTAAGTTCGTAAGGAGAAGGGAGTACA

TGCAAGTGCGTGCTTGTCTGGATATCGGACAGCTGGATTTGTAAATAAGCGGAGAGGAGGG

TCGTAATCAGGGGCGTACATCGATGGAGCCGCGTGTGGGAAACAAGTATCGGCTGGGA

CGGAAAATTGGGAGCGGTTCCCTTTGGGGAGATCTATCTTGGGACCAATGTTTCAGACCAAT

GAGGAGGTCGGAATAAAGCTGGAAAGCATCAAGACGAAGCATCCACAATTGCTGTACGA

GTCCAAGCTCTACCGGATACTACAAGGAGGAAGTGGGATTCCCAATATCAGATGGTTCGG

GATAGAAGGAGACTACAATGTCTTGGTTCTGGATCTGTTGGGGCCAAGTCTCGAAGACCT

TTTCAACTTCTGCAGCCGGAAGTTCTCTTTAAAGACTGTTCTCATGCTTGCTGACCAAGCTG

ATCAACAGAGTGAGATATGTGCATGCGAAAAGCTTTCTTCATAGAGACATCAAGCCTGAT

AATTTTCTAATGGGGCTTGGTAGGCGAGCAAACCAGGTCTACATTATTGATTTTGGTCTTG

CCAAGAAGTACCGCGACCCCTCCACGCATCAGCATATCCCTACAGGGAGAACA AAAAATC

TGACAGGGACTGCTCGGTATGCAAGCATCAACACTCATCTTGGTATTGAGCAAAGCAGAC

GAGATGATTTGGAATCTCTTGGATATGTGCTCATGTACTTCCTGAGAGGCAGTCTTCCATG

GCAAGGACTGAAAGCGGGAACCAAGAAGCAGAAGTACGAGAAGATCAGTGAGAAAAAA

ATGTCCACGCCCATTTGAGGTCTTTGTAAAAAATTATCCTTCAGAATTCGCCTCGTACTTCC

ACTACTGCCGGTCTTTGCGTTTTGTATGACAAACCCGACTATGCATATTTGAAAAGAATCTT

CCGTGACCTCTTTATTCGTGAGGGTTTTC AATTTGACTACGTTTTTGACTGGACAATTCTGA

AGTACCAGCAGTCAAAATTTCCGGTGGCAGTTCAACTCGACTGGGTGCTTCTGCAGGGC

AAACCAGTGGTGCACCTTGGAAGTGGGGCTACAGGAAGCCGAGACCTGCAGCGGCCCAACC

GAACCAATGGATCCTTCTCGGCGCAGGCTTCTGGAGGAGCAAATGGCTCCGGGGTTCGCA

FIGURA 2F, Continuación

AATGCTTTGGACTCATCTAAGCACAAAAGTCCTGGACTTGATGAATCTGCTAAGGATTCTG
CTCTTGCTGTTGTGTCAGAACCAGAGCGCATGCATACATCTTCGTATGCAACTCGGGGGG
GTTCTTCCTCCAGGCGAGCTGTCCTATCTAGCAGCAGGCCCTCAGGGGCATCAGCAGAAG
TCGTAGATTCTCTCGAACAGGGAGCAGTAAGCTTGGTCCCACCAGCTTACGGTCGTCAG
CAGGGATGCAGAGGAGCTCTCCAGTTACTTCGGACCCAAAGCGGATATCTAGCCGCCATC
CACAACCGCCATCTGCCAACTTGAGGATTTACGAAGCCGCTATCAAGGGAGTTGAATCAC
TTTCTGTTGAGGTGGATCAAAGCCGTTATAAGTAGGCCCAGGCTTGTGGTTATATAGCCGG
GCTCTGTCTTCTATCAAACCTCTTGTATGTAGATGAGAGTTGCTCTACATTGGCAACA
GCCTGATTGAGGGGAAAACGGTGGTTCTGTCCTACAATGGTGCTAAGACTACAGGTCTCT
CATACTTAGGAATGAATGGATCTCTATCTTGTACCATCAAACCATTGTCAGTGCTTTGTG
TGGTAGCTCTCTGCCATACGATTCTTAAGGTTAACGC

FIGURA 2G

Secuencia de nucleótidos de la CK-3 de longitud total de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:20)

GCGTTAACGGGAGGAAGGTCGGGGGAAGAGACGCTTGAGGCTGCTGAAAGGGGATTAC
 TCAGCGTCCCCACCCATTTCGTCAATCTGGCGCAGAAGATCGGAAAATCGGTCCGACGGCC
 AGGTGTTATGTCCAAGGCCCGGGTTTACACAGATGTGAATGTCCAACGTCCGAAAGATTA
 TTGGGACTACGAGGCCCTCACCGTCCAATGGGGGGACCAAGACGATTACGAGGTAGTGCG
 TAAGGTGGGGCGAGGGAAATACAGTGAGGTTTTTGAAGGTGTCAACGCCGTGAATAGTG
 AGCGTTGCGTTATGAAGATTTTGAAGCCAGTAAAGAAAAAAAAGATCAAAAGAGAGATC
 AAGATTCTGCAAAACCTTTGTGGAGGGCCCAACATTGTGAAGCTTCTGGACATTGTCCGT
 GATCAGCAATCGAAGACACCCAGCCTAATTTTGAAGTATGTGAACAATACTGATTTCAAA
 GTGCTCTACCCCACTCTTACAGACTTTGATATCCGATACTACATTCATGAGCTGCTCAAGG
 CTTTGGACTATTGCCATTCTCAAGGGATTATGCACAGGGATGTGAAGCCACACAACGTGA
 TGATTGACCATGAGCAGCGGAAGCTTAGGCTTATTGACTGGGGACTTGCCGAATTCTATC
 ATCCTGGCAAAGAGTATAATGTGCGTGTGCCTCTAGGTACTTCAAGGGTCCTGAGCTGCT
 GGTGATCTTCAAGATTATGATTACTCTCTCGACATGTGGAGCTTGGGGTGCATGTTTGCC
 GGCATGATATTTTCGGAAGGAGCCATTCTTTTATGGGCATGACAATTATGATCAAACTTGTA
 AGATTGCTAAGGTGTTGGGAACCTGATGAATTGAATTCCTATCTAAACAAATACCGCCTAG
 AGCTGGACCCCCATTGGAAGCACTGGTTGGCAGGCATAGCAGGAAACCTTGGTCAAAGT
 TCATCAATGCTGATAATCAGCGTCTGGTTGTTCCAGAGGCTGTGGATTTTTTGGATAAGCT
 TCTACGCTACGATCATCAAGACAGGCTGACTGCGAAGGAAGCTATGGCACATCCCTATTT
 TTATCCCGTGAAGGTGTGCGGAGGTTAGCAACCGTCGCAGTGCTTGATATGAATTGATATAT
 CTCATATGGGCTTTCTTGTGATTACGTCCCACCCGGCTACCAGGTTTCTCAGTTGTGCGAA
 GCGCTGAGCTCGC

FIGURA 2H

Secuencia de nucleótidos de la MPK-2 de longitud total de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:21)

ATCCCGGGCGAGCCATGGCGCCACTTGCTTCGGCGAATGGGACTGTTTGACTTCTTCGCTT
CGCCCCCGCCTCGCCCTTCACCCCTCCTCTGTTCTTGTCACAGCCTCCTCCTCCGTCTCTGTC
TGTTGGCTGGGTAAGTTTTGGGAGTGAGGAGGACGTGGTCATGGAAGAAGAGCCCCCTC
TTTTGTAGTGGAAGTGTGCGTAAATTGGACCTGGAGCCTGCCGGCTCATCGCGTTTGCTTAG
ATTGTGGGCGGGTGCTGTTGAAATTCCTTGAACTTGCTACTGGTCGGAAACGCTCGAATTG
CGACTTTGATTGAAGGTCTGTTGTTGCTGCGGTGCGGATCTTACTCAGTCTCTTCAATAG
GACCTCTGAAGCAGTATGGAGACTAGCAGTGGAAGTCCAGAAATTGAAAGTTATAAGTACT
CCGACCTACGGAGGTCAATTACGTGAAATATGTTGTGGCGGGAAGTATTTCGAAGTCACC
GCGAGGTACAAGCCACCACTTCGTCCGATTGGGCGCGGAGCTTATGGAATCGTCTGTTCA
CTCTTTGATACCGTTACGGGTGAGGAGGTGGCGGTCAAAAAGATTGGAACGCCTTCGAC
AACAGGATCGATGCGAAGCGAAGTGGTGGTGAATAAACTCCTCCGGCATATGGATCAT
GAAAACGTCGTTGCCATTACAGACATCATTTCGTCCCCCACTAGGGAGAATTTCAACGAC
GTGTACATTGTATACGAGTTGATGGATACGGACCTACACCAGATCATTTCGTTCAAATCAA
GCTCTCACAGAAGACCACTGTGAGTATTTCTGTATCAAATCTTGCGGGGCTTGAAGTACA
TCCATTTCGGCGAAGCTCTTGACCGGGACTTGAAGCCCAACCTTCTCGTCAATGCCAA
TTGCGATTTGAAAATCGCAGATTTTGGCTTGGCAGCACTCTCTGAAACGGATTTCATG
ACTGAGTATGTTGTAACGAGGTGGTACAGAGCTCCAGAGCTGCTCCTGAATTGTTTCAGCA
TACACTGCAGCTATTGACATTTGGTCTGTGGGGTGATCTTCATGGAGTTGCTTAACCGAT
CTGCGTTGTTCCCTGGGAGAGACTATGTGCATCAGCTCCGCCTAATTACAGAAGTCAATCGG
AACTCCTGAAGATAGGGATCTTGGGTTTTTGAGAAGCGACAATGCTAGGCGGTATATCAA
GCACCTGCCTCGACAGTCGCTATTCCCTTAACCCAGAAGTTCAGAGGCATTAATCGTTCT

FIGURA 2H, Continuación

GCTCTTGATCTTGTGAAAAGATGCTGGTCTTTGATCCAGCGAAAAGAATCACAGTGGAA
GCTGCCCTTGGCGCACCCCTATTTAGCTTCACTTCATGACATCAACGATGAGCCTGCCTCGG
TATCTCCCTTCGAGTTTGACTTCGAGGAGCCCCCTATCTCGGAGGAGCATATCAAGGATCT
CATTTGGAGGGAGGCTCTGGATTGCAGCTTAGGTCCTGATGATATGGTGCAGTAACTTCA
CACTTCATCTCAAGTTGTAAGGCCTACTCTCAATTCTTTAGGTGGCTACAACGCTATCCCG
GCGTTGTATGGTTTTGCAACTTATCCCCCCCCGTGTGATTACACTATTGGATTATAGAATG
ACAATTCGTTAGTTCTTTCCCTGGCGCTATATCTTTGTCTGCACATTCATCCAGCAGACA
TTGTTGCTCGGCGTTAACGC

FIGURA 2I

Secuencia de nucleótidos de la MPK-3 de longitud total de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:22)

ATCCCGGGCTTGTATTGGCTCGGATAATTTATGTTGACAATTGATTTGTGAGGCTTCGTAT
TGAGTCAGCGAGCAGGCTGAGAGTTCGGCAGCGAAGTTACACTCGACCTGGCTGAAATTT
GGAATTGAAGCGCGTGAAGCTTCATCTGTGATTTTGAGGTTGTTTGAAGTATGAGAAGA
GGTCTCTGAGCTGAGAATGTTTGCAATTTAGGGGCACCACCGGTTTGTGAGTCCCTTGC
CACTTATTACAATTGTTGGTTTACAAGCTCGACGAGTTTCAATCGAACGTAGAGTTTATG
CGGGTCGAGGATCTATGTATCCGCTCAGCGGAGAAGAGAGCCTGATGTTGCCGAAGCGAT
CGTGTGGGATTTGACTAGAAAGAGGTGGACCGCATCAGAACTATTTATTCCTTGTGAGGG
AAGGATCGAGGTTCCAATGGGTCTCACTCCGTTTTCTTGTGTACGGTTCAAGGTTATGTC
CGGGTGGTCTACCCCGACGGCCACGTGAGAAATCTGAGCAAATCTTGTAGCGTGACGAT
CTTCTTCTGGGTAATCCAGACTACTATGTCTGCGGTAGCACCCCTTACACAATCACCATC
GTATGGCAGCGGAAGAGGTGCTCGAGTATGGGGTGACCTACTTCGTTTGCACGACGCAA
ATGCCCAACCTTTCTTAGAACGTCAGCCGAAGGTAGTACATCGAGGATCCAAGATTTTGC
CACGATTTTCCAAACATGGGGTCCATGTGCGGGAGTTGCGAAGCCCGACGCATGGGAGCC
AACAGTCACGGAAGGTTTTTGATTATCATTAGTAACGATGCAGCAGCTTGAATCCATAC
GAAACGAGGGGCCAGAGCCTCACCTCGCTGGAGACCGACCATCGAAGCACCTTAAGCTCG
TTTTCATTGCGCATTTGCTTGCGAGCACTTCGACTTCCTAGAATTTCAATAGACCTAATGGA
ATCGCCACTCCCTAATCTTTCCGGAGAGGCCTTATCGCCGACGGCAACTGCCAAAGACGA
GATTACTCAGATGATACTAAAAAGTGCCGCAAGGTCCGAATTAGGAATGTATGTTTCGAA
GAGACAGGAATTCTATCTTCGAAGAGCGCGTAGGCGGCGTAAGTTTGCCTGGAAGCCGGT
TTTGCAGAGCATCTCCGAGATGAAGCCTGTATGGAATTCACACTCCGATGGCTTACCG
GGATAGTGGGTCTCCGCCGAAGAACGCCTCTACCCCATCCTTACCTGGCCCGAAGAACAT

FIGURA 2I, Continuación

TTCACCGCCACGACAAGTGAGTGTCCCGCAAAGGAGCAGTCCTCCGCCGAAGAACGTCTC
ACCACCTCCCCAGCCCGCATTTGTAGCGCGGACTGCGTCGAAGTATTCTGCTGCATCTCAG
CAAGTTCAACGAAATCGAGGCAACGCGAAATCTCTTTATATGGCGTAGTTTGTGCTCTGA
CTGAACTCCTATCTATTCCCCATCGAGATAACTGCATTGTTGGATAAAATTTCTCCAACA
TTTTTGCTCTTCATCCTCAAGCAGCTCCTCAATGGCCAGTAATATGTTACGACATTGTGCA
CAACTCCAATTACGTAGCGTTATTCTGTAACCCACGTTTCATCGAGGTATCAAGGAATGGC
GCAGTAAGCACTGCTACTTTGTGCTTTGGTATCCCGTTGTGACGAGATGTCATGTCGCACC
GTGCCTATCAGTGGGATTTTCTTGAGCGCAGATCTTGCTTCCGCAGTTTGTTCATAACGTT
TTGGTTCGTAGGGGGCCTAGACGGTACTATCAAGCAATGAGAAGTGTGCTGGTGTGGATT
TGACAGCAATCTTTTGGAGGATTGTCTTTCCTATGTAGAACATAGCGAGGACACTTGCGCC
TGGTGGGCACATCCCATAGAACATAGTGCTTCACTTCTGGGTTGTTCACTACTAGGATCAT
ATGACCTTCTCATCTATTTTCGGGCTTTGTTTCGAGCTCATGTACCATCGACTAGCGTCACT
TTGACTGCGGTGATAATCGTTTGTCAATTTAGTGGAGCTTTGTAGATGATAGATGCCATTT
GTACAGTAGCTTGGATGCTGTTTACAAGATAGCGGCAGCTAGAAGCCTTAAACCTTTAGC
TACCATGTATTATTTAAACCTATATGAAGTGAACGGCTGTGCAGATATTGCCGTTAACGC

FIGURA 2J

Secuencia de nucleótidos de la MPK-4 de longitud total de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:23)

ATCCCGGGCGGTCGAGTCGTATTAGGTGTTGTTTCATTGTAAGGGTTCGGAAGCACGGGG
CACGGCGTATATACCGTTCCTTGAACGTTGATCTCACCTTTGGAAGACCTGAATTGAGT
AGCGTGCGGAAGCTGCATCGATCCGGAAGAGACGATGAGTAGGAGAGTGAGAAGGGGAG
GTCTTCGCGTCGCGGTGCCGAAGCAAGAGACTCCCGTCAGCAAATTTTGGACTGCCAGTG
GAACTTTCCAGGATGATGATATCAAGCTCAACCACACCGGGCTTCGCGTCGTCTCTTCAGA
ACCTAACCTTCTACGCAGACGCAGTCTAGCTCCCCAGATGGGCAACTGTCAATAGCAGA
CCTGGAGTTAGTGCAGTCTTGGGAAAGGGTGCGGGTGGAACCGTGCAGCTTGTCGGCA
CAAATGGACCAATGTCAATTATGCACTGAAGGCGATACAAATGAATATCAACGAAACAGT
GAGGAAGCAGATTGTTTCAGGAGCTGAAAATCAACCAAGTGACGCACCAGCAGTGCCCTT
ATATCGTGGAATGCTTCCACTCCTTCTACCACAACGGCGTCATATCCATGATCCTAGAGTA
CATGGACAGGGGCTCGTTGTCCGACATTATTAAGCAACAAAAGCAGATACCTGAGCCGTA
TTTGGCCGTCATTGCTAGTCAAGTTCTGAAGGGATTGGAATACCTACACCAAGTCAGGCA
CATCATACATCGTGATATAAAGCCCTCCAACCTCCTCATCAATCACAAGGGTGAGGTCAA
AATATCTGATTTTGGTGTCAAGTGTGTGTTGGTTTCCTTGGCCCAGCGAGACACGTTT
GTTGGGACTTGACATATATGTCGCCAGAACGCCTTCAGGGGCGTTTCGTATGCATACGAC
AGTGACCTATGGAGTTTAGGATTGACTCTTTTGGAGTGTGCGTTGGGTACCTTCCCATACA
AACCAGCTGGAATGGAAGAGGGTTGGCAAAATTTCTTCATCCTCATGGAATGTATAGTTA
ATCAACCCCCCGCAGCCGCATCCCCTGACAAATTCTCCCCGAATTTTGTCTTTTATTGA
ATCCTGCATCCGGAATGTCCAGTGAACGACCATCACTACTGATTTACTTAAACATCCG
TTCCTGCAAAAGTACAACGAGGAAGAGTACCATTTGAGCAAGATTTTGTAACCTAAAAGTT
AGCCTCGCATGGCGTGACAGAGACTGTCACTACCACAAGCCTGATCCACCACTGAACCTCA

FIGURA 2J, Continuación

AGGGACTTTACCAAAAGCATGGTCGAACTACCTCGCCAATCCGCCACTTTCTCAATGCCTT
TTCCTTATATAGTCATATGTGGTCAAGTTGAGAACGATATCAAATCAGATTGACGGAAAA
AACATCTTCAACGCCGTTTCCCAACCTTATAGAAAAGTGGAGTTTTCTCAATGAGCCCCATT
TGTCGCTGAGAACGTGCAGCTCATGAAACAATCCATAAGTGTGTTAATCGGGGTCITTATA
TTATCATCACCATGCTAGCTTTTTATGTTACCTGCACTTTTCTTTCCITTATTGCACAGCAT
CGAACACTTCTTCGATACCCAAAACAATATTTCCATCTTCTTTCTTCTTTTTTTCACGTCTT
GCGACAAGGAATTCCTCACGGAGATTTTCAACACTTTTCTCAAATGTTTTTAGAGTTTTT
AAACTGACAATTGAAGAGGTCGGACCTACCGGACTCGC

ES 2 345 833 T3

Secuencia de nucleótidos de la MPK-5 de longitud total de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:24)

ATCCCGGGAGAGGCTGATCTGATGCTACAGTTTCGTGTGCAGCTAGTCTTTAGAGATTCCG
GCAACGCACTTGTTGAAGATCGGAACTTTCAAAATCGGTCGAGTCGTATTAGGTGTTGTT
TCATTGTAAGGGTTCGGAAGCACGGGGCACGGCGTATATACCGTTCCCTTGAACGTTGA
TCTCACCTTTGGAAGACCTGAATTGAGTAGCGTGCGGAAGCTGCATCGATCCGGAAGAGA
CGATGAGTAGGAGAGTGAGAAGGGGAGGTCTTCGCGTCGCGGTGCCGAAGCAAGAGACT
CCCGTCAGCAAATTTTGAAGTCCAGTGGAACTTTCCAGGATGATGATATCAAGCTCAACC
ACACCGGGCTTCGCGTCGTCTCTTCAGAACCTAACCTTCTACGCAGACGCAGTCTAGCTC
CCCAGATGGGCAACTGTCAATAGCAGACCTGGAGTTAGTGCGGTTCTTAGGAAAGGGTGC
GGGTGGAACCGTGCAGCTTGTCCGGCACAAATGGACCAATGTCAATTATGCACTGAAGGC
GATACAAATGAATATCAACGAAACAGTGAGGAAGCAGATTGTTTCAGGAGCTGAAAATCA
ACCAAGTGACGCACCAGCAGTGGCCTTATATCGTGGAATGCTTCCACTCCTTCTACCACAA
CGGCGTCATATCCATGATCCTAGAGTACATGGACAGGGGCTCGTTGTCCGACATTATTAA
GCAACAAAAGCAGATACCTGAGCCGTATCTGGCCGTCAATTGCTAGTCAAGTTCTGAAGGG
ATTGGAATACCTACACCAAGTCAGGCACATCATAATCGTGATATAAAGCCCTCCAACCT
CCTCATCAATCACAAGGGTGAGGTCAAAATATCTGATTTTGGTGTGTCAGTGCTGTGTTGGTT
CATTCTTGGCCAGCGAGACACGTTTCGTTGGGACTTGACATATATGTCGCCAGAACGC
CTTCAGGGGCGTTTCGTATGCATACGACAGTGACCTATGGAGTTTAGGATTGACTCTTTTGG
AGTGTGCGTTGGGTACCTTCCCATAAAACCAGCTGGAATGGAAGAGGGTTGGCAAAATT
TCTTCATCCTCATGGAATGTATAGTTAATCAACCCCCGCAGCCGCATCCCCTGACAAATT
CTCCCCGAATTTTGTCTTTTATTGAATCCTGCATCCGGAAATGTCCAGTGAACGACCA
TCAACTACTGATTTACTTAAACATCCGTTCTTGCAAAAGTACAACGAGGAAGAGTACCAT

FIGURA 2K, Continuación

TTGAGCAAGATTTTGTAAC TTAAAGTTAGCCTCGCATGGCGTGCAGAGACTGTCACTACC
ACAAGCCTGATCCACCACTGAACTTCAAGGGACTTTACCAAAAAGCATGGTCGAACTACCT
CGCCAATCCGCCAGAGCTCA

ES 2 345 833 T3

Secuencia de nucleótidos de la CPK-1 de longitud total de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:25)

ATCCCGGGTGTAGGCGGGCGAGGTTTCGATGCAATGGGGCAGTGTATGGAAAAGTTTGATG
ATGGAGGGCGAAGGGGAGGATTTGTTTGAGCGGCAGAAAGTGCAGGTTTCTAGGACGCCA
AAGCATGGATCGTGGAGCAATAGCAACCGAGGGAGCTTCAACAATGGCGGGGGGGCCTC
GCCTATGAGAGCCAAGACGTCGTTTCGGGAGCAGCCATCCGTCCCCGCGGCATCCCTCAGC
TAGTCCGCTCCCTCACTACACGAGCTCCCCAGCGCCTTCGACCCGCGACGGAACATTTTC
AAAAGGCCTTTTCCTCCTCCTTCTCCCGCGAAGCACATTTCAGTCCAGTCTCGTGAAACGGC
ATGGCGCGAAGCCGAAAGAAGGAGGGGCGATCCCTGAGGCTGTGATGGTGAGAAGCCC
TTGGATAAGCATTTTCGGCTATCACAAGAACTTCGCTACTAAGTATGAGCTGGGGCATGAA
GTGCGTTCGCGGGCACTTCGGTCACACATGTTACGCGAAAGTACGGAAGGGCGAGCATAA
GGGACAAGCCGTGGCAGTGAAGATAATCTCGAAAGCGAAGATGACGACTGCTATTGCGA
TCGAGGACGTGGGACGAGAAGTGAAAATTTTGAAGGCTCTGACGGGACACCAGAATTTG
GTTTCGATTCTACGATTCTCGGAGGACCATCTAAATGTGTACATTGTTATGGAATTATGTG
AAGGAGGTGAATTATTGGATCGAATTTTGTCTCGGGGAGGGAAGTACTCGGAGGAAGAC
GCCAAGGTTGTTGTGCGGCAGATTTTGAGCGTTGTTGCGTTTTGTACCTGCAAGGCGTTG
TTCACCGAGATCTTAAGCCTGAGAATTTTCTGTTTACCACGAAGGATGAATATGCTCAGCT
TAAGGCCATTGATTTTGGATTGTCAGATTTTCATCAAACCCGATGAAAGACTGAACGATAT
CGTTGGAAGCGCATACTACGTTGCGCCGAGGTATTGCATAGGTTATATTCAATGGAAGC
TGACGTATGGAGCATTGGAGTCATCAGTACATTTTGTTATGTGGTAGTCGACCGTTTTGG
GCGCGGACCGAGTCGGGCATTTTTCGTGCGGTGTTGAGGGCTGACCCGAGCTTTGAAGAA
GCCCTTGGCCTTCCATCTCTCCGAAGCCAAGGATTTTCGTGAAGCGTCTCCTGAATAAGG
ATATGCGGAAACGCATGACTGCTGCACAAGCTTTAACTCATCCATGGATTGGAAGTAACA

FIGURA 2L, Continuación

ACGTGAAGATACCTCTGGATATCTTAGTGACAGACTTGTGAGGAATTATCTTCGTGCATC
 ATCCATGAGAAAGGCTGCTTTGAAGGCCCTGTCAAAGACTTTAACCGAAGACGAGACTTT
 TTATCTACGTACTCAATTTATGCTGCTAGAACCAAGTAACAACGGTCGTGTTACTTTTGAG
 AATTTTCAGACAGGCACTGCTGAAAAATTCAACAGAGGCCATGAAAGAGTCACGGGTTTTT
 GAAATTCTGGAAATCGATGGATGGTCTTCATTTCAAGAAAATGGACTTTTCAGAGTTCTGTG
 CAGCGGCCATTAGTGTCTCCAGTTAGAAGCCACAGAACGATGGGAGCAGCATGCTCGCG
 CAGCTTACGACATATTTGAGAAAGAGGGTAACCGAGTCATTTATCCTGATGAACTTGCGA
 AAGAGATGGGACTAGCACCAAATGTACCAGCCCAAGTGTCTTAGATTGGATTAGACAGT
 CTGATGGTCGGCTGAGTTTCACTGGGTTCACCAAGCTGCTACATGGAATTTCCAGCCGTGC
 TATCAAAAATCTCCAGCAGTGATTCTTTGCATCGTACAGTTCGGAATGGAGTTTTTAAGCT
 CTTTTAGTTTCACTTCCGTCTTCAACTGCTGCTTCGCCTCGTCTCTGAGCTGTGATAGCGTA
 TCTCAAGCATATGCACAACCTCGCATTTTGGCTGAAGTGATTTGTACCTCACATTAGTCGG
 GCCTCTGGAACCTTCACTTATTTGGATTATTTATGTAGAAGTCCAGATCAAAAAGCGAAAA
 GGAATGGCTAGATATTGTCACAAGAAGTAACATAGTCAAATTCAGGAGCACTTAAGCACA
 CATTGAGTGCTTTTTATTGGAATTCCTTAGATATGGAAGTATGTTTCCAAGGGAAGGGTCT
 ATGAGGCAGAGAGTGGAATGTATAGACTGGCATATGGTTAAGTGATCATTGGACTGCCGT
 TCTACTCCGGTTGTCGTTAACGC

FIGURA 2M

Secuencia de nucleótidos de la CPK-2 de longitud total de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:26)

ATCCCGGGCGAACTGCGATCTGAGATTCCAACCTTGAAGGGCCTCGCGTAAGACCGGATC
TCGTTTCTTACGCTTTTGCGCCTCGCGATAATTTGTACATTGTTTCCTCTGGTTTTATTGATT
CCGCCTCTGAAAATGTGAACGGGCTGCAAGCTTGGTTTTGGAGCAACGTTGGAGCATTGA
AGGGTTGCGCTCGTCCCTGCCATTCTCGCTTCTGCTCTGGCCTATGTCATGACGACGTG
AAGGAGAGGATTTGAGGGTTTTGTAAGTGATATAATCCTCCCGAGGAGATTTCTGTGAG
TTGATTAACCTGGATCAGCGACATGGGGAACACTAGTTCGAGGGGATCGAGGAAGTCCAC
TCGGCAGGTGAATCAGGGAGTCGGGTCTCAAGACACCCGAGAGAAGAATGATAGCGTCA
ATCCAAAGACGAGACAGGGTGGTAGCGTTGGCGCAAACAACCTATGGCGGAAAGCCAAGC
AGTGGTGCTCAGGCCGGAGAACGATCCACCTCTGCGCCCGCTGCTCTGCCGAGGCCGAAG
CCAGCATCGAGGTCAGTATCCGGTGTTTTGGGTAAGCCGCTGTCAGATATTCGTCAATCTT
ACATCCTGGGACGGGAGCTTGGCCGAGGGCAGTTCGGAGTGACTTACTTGTGTACTGACA
AGATGACGAATGAGGCGTACGCGTGCAAGAGCATCGCCAAACGGAAACTGACCAGTAAG
GAGGATATCGAGGATGTTAAGCGGGAGGTTTCAGATTATGCATCACCTGTGCGGGACACCC
AATATCGTGGTGTTAAAGGATGTGTTTCGAGGACAAGCATTCCGTGCATCTTGTGATGGAG
CTCTGTGCAGGTGGCGAGCTCTTCGATCGCATCATTGCCAAGGGGCATTACAGTGAGCGC
GCCGCTGCCGATATGTGCAGAGTCATCGTCAATGTGGTGACAGATGCCACTCATTAGGG
GTCTTCCATCGGGATCTCAAGCCAGAGAAATTTCTGTTGGCCAGCAAGGCTGAGGATGCG
CCTCTGAAGGCCACAGACTTCGGTCTGTCAACTTTCTTTAAGCCAGGAGATGTGTTCCAGG
ATATTGTTGGAAGTGCGTATTACGTGGCCCTGAAGTTTTGAAGAGAAGTTATGGTCCTGA
AGCTGATGTTTGGAGTGCAGGCGTGATTGTGTACATTCTGCTGTGTGGTGTACCCCTTC
TGGGCTGAAACTGAGCAGGGTATCTTTGACGCTGTGCTCAAAGGGCACATAGACTTCGAG

FIGURA 2M, Continuación

AACGATCCATGGCCGAAAATCTCCAACGGGGCTAAGGATTTGGTGAGGAAAATGCTAAA
CCCTAACGTGAAGATACGTCTGACGGCACAGCAGGTGTTGAACCATCCATGGATGAAGGA
AGATGGTGATGCTCCAGACGTGCCACTCGACAATGCGGTGTTGACCAGACTGAAAAATTT
CTCAGCCGCCAACAAAGATGAAAAAGCTGGCGCTGAAGGTGATTGCAGAGAGTCTGTCCG
AGGAAGAGATCGTGGGGTTGAGGGAGATGTTCAAATCCATAGATACAGACAACAGCGGC
ACGGTGACGTTTCGAGGAGCTTAAGGAAGGGTTGCTGAAGCAGGGCTCAAACTTAATGA
ATCGGACATCAGGAACTAATGGAAGCTGCAGATGTCGATGGAAACGGCAAGATCGACT
TCAACGAGTTCATATCGGCAACAATGCACATGAACAAGACGGAGAAAGAGGATCACCTT
GGGCAGCATTTCATGCAATTCGACACGGACAATAGCGGGTATATCACCATCGACGAGCTTC
AGGAAGCAATGGAGAAGAATGGAATGGGAGATCCTGAGACCATCCAAGAGATCATCAGC
GAGGTGGACACAGACAACGACGGAAGAATAGACTACGACGAGTTCGTAGCCATGATGCG
CAAGGGCAATCCTGGCGCTGAAAACGGAGGAACGGTGAACAAGCCCAGACACAGGTAGT
AGCTCCTGGTTGCCAATTTGACGACGGGTTTGGCAAGGCAACAGTAGTTGTTGTTAGCTTT
CAGATTCAGGTTCGGTATTGTTTCATGCCCTCCTTTGTCTCGAACAATGGACTCTAGGCCTT
TCCAATGGAAGCTATTCCAACAGGGTTTGCATAACGTGTAGTAGAATGAAAGCATTGC
CTGGGGGGGTGTACAGTGCCTGTGATCTTGTGGAGTTCTCGTAGGATG
GCTTCGGTTGGATCTCGTTAACGC

FIGURA 3A

Secuencia de aminoácidos deducida de la PK-6 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:27)

MGVDMKAPAKQSLGVGLLLCSVVILSVSSVYGQVQTDVPVDTTGLISMWYDLKQSQSLTGW
TQNASNPCGQQWYGVVCDGSSVTEIKIGSRGLNGNFNPSYFQNAFKKLRFDASNNNIEGNIP
QQFPTSLTQMLNKNKLTGGLPQFDQLGALTVVNLSNNNLTGNMNPNYFNVIVNVETFDVSY
NQLEGLTPDSILNLAFLRFLNLQNNKFNGKLPDDFSRLKNLQTFNIENDQFTGNYPGSLPSNSR
VGGNRLTFPPPPAPGTPAPRTPSPSGTSNGSSSHLPLGAIIIGIAAGGAVLLLLLALGICLCCRKRS
KKALGDPEATSSRRPWFTPLSAKSQSDPSKSIDKTKRNI FGSSKSEKSSSKHRVFEPAPL DK
GAADPEVVKASPPVKVLKAPPSFKGISGLGAGHSKATIGKVNKSNI AATPFSVADLQAATNSF
SQDNLIGEGSMGRVYRAEFPNGQVLA VKKIDSSASMVQNEDDFLSVVDSLARLQHANTAELV
GYCIEHDQRLVYEYVSRGTLNELLHFSGENTKALSWNVRIKIALGSARALEYLHEVCAPPVV
HHNFKSANILLDELNPHVSDCGLAALAPSGSERQVSAQMLGSFGYSAPEYAMSGTYTVKSD
VYSFGVVMLELLTGRKSLDSSRPRSEQSLVRWATPQLHDIDALARMVDPSLKG IYPAKSLSRF
ADIVALCVQPEPEFRPPMSEVVQALVRLMQRASLSKRRSESAVGIESNEPSETSL*

FIGURA 3B

Secuencia de aminoácidos deducida de la PK-7 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:28)

MSVSGMDNYEKLKVGEGTYGKVYKARDKRSGQLVALKKTRLEMEEEGV PSTALREVSL LQ
MLSHSMYIVRLLC VEHVEKGSKPMLYL VFYMDTDLKKYIDLHGRGPSGKPLPPKV VQSFMY
QLCTGLAHCHGHGVMHRDLKPQNLLVDKQTRRLKIADLGLGRAFTVPMKSYTHEIVTLWYR
APEVLLGATHYSLPVDIWSVGCIFAELVRKMPLFTGDSELQQLHIFRLGTPNETTWP GVSQH
RDWHEFPQWRPQDLSLAVPGLSAVGLDLLAKMLVFEP SKRISAKAALSHTYFADV DKTAT

FIGURA 3C

Secuencia de aminoácidos deducida de la PK-8 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:29)
MADAKEELALRTEMHWAVRSNDVGLLRITLKKDKQLVNAADYDKRTPHIAASLDCVPVAK
VLLAEGAEELNAKDRWGKSPRGEAESAGYMEMVKLLKDYGAESHAGAPRGHVESLIQVAPPL
PSNRDWEIAPSEIELDTSELIGKGAEGEIRKALWRGTPVAVKTIRPSLSNDRMVIKDFQHEVQL
LVKVRHPNIVQFLGAVTRQRPLMLVTEFLAGGDLHQLLRNPNLAPDRIVKYALDIARGMSY
LHNRSKPIIHRDLKPRNIVDEEHELKVGDGFLSKLIDVKLMHDVYKMTGGTGSYRYMAPEVF
EHQPYDKSVDVFSFGMILYEMFEGVAPFEDKDAYDAATLVARDDKRPEMRAQTYPQMKAL
IEDCWSPYTPKRPPFVEIVKKLEVMYEDCLLRPKDRRHRLRDILHLRRNPADS*

FIGURA 3D

Secuencia de aminoácidos deducida de la PK-9 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:30)
MKRYQRRKVQRLGREGQVLLERTLFKQLRPSFVPHLLATPIDSDNVALVLNVCVLAGPLELLL
RSPLDENSARFLVANVVLAVELLHKDGVVYRGISPDVLMIDRKGRLQLVDFRFAKQMSDERTF
TVCGMADFLAPEIIQGQGHGLASDWAVGVLMYFMLQTELPFGSWRDNELEIFGRIARRQLT
FPSSFSPPEAVDLIDKLLVVDPTKRLGCDSHGSLAIREHPWFRGINWDKHLDCSVEVPSEIMTRLQ
LAIDFLPVDDSYQVFDLQPDDEDDPPWLDGW*

FIGURA 3E

Secuencia de aminoácidos deducida de la CK-1 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:31)

MDLGQDRMRAPQRSREYQYRSLDVFTQHEQLQKQQQDEYQRTTELKLETLPKMLSNA TV
SSSPRSSPDGRRLRTVANKYAVEGMVGSAGFCKVYQGSDLTNHEVVGIKLEDTRTEHAQLMH
ESRLYNILRGKGVPNMRWFGKEQDYNVMVLDLLGPNLLHLFKVCGLRFSLKTVMILGYQM
IDRVEYVHSRGLVHRDLKPDNFLMGCGRQGNQVFIDFLAKEYMDPATRRHIPYDRKSFTG
TARYASRNQHRGIEHSRRDDIESLGYILMYFLRGNLPWQGGGQRLTDQKQHEYMHNKIKM
NTTVEELCDGYPSQFADFLHHARSLGFYEQPDYCYLRSLFRDLFIQKKFQLDHVYDWTVYTQ
LPQNGSLQSVRSQNSAASSHLQNRPSNVSYCPPLTKSEFRREVVAAN*

FIGURA 3F

Secuencia de aminoácidos deducida de la CK-2 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:32)

MEPRVGNKYRLGRKIGSGSFGEIYLGTVNQVTNEEVGIKLESIKTKHPQLLYESKLYRILQGGTG
IPNIRWFGIEGDYNVLVLDLLGPSLEDLFNFCSRKFSLKTVMMLADQLINRVEYVHAKSFLHRD
IKPDNFLMGLGRRANQVYIDFGLAKKYRDPSTHQHIPYRENKNLTGTARYASINTHLGIEQSR
RDDLES LGYVLMYFLRGSLPWQGLKAGTKKQKYEKISEKKMSTPIEVLCKNYPSEFASYFHY
CRSLRFDDKPDYAYLKRIFRDLFIREGFQFDYVFDWTLKYQQSQISGGSSTRLGASAGQTSGA
LGTGATGSRDLQRPTEPMDPSRRRLPGGANGSGVANALDSSKHKSPGLDESAKDSALAVVSE
PERMHTSSYATRGGSSSRRAVLSSSRPSGASAEVVDSSRTGSSKLGPTSLRSSAGMQRSSPVTS
DPKRISSRHPQPPSANLRIYEA AIKGVESLSVEVDQSR YK*

FIGURA 3G

Secuencia de aminoácidos deducida de la CK-3 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:33)

MSKARVYTDVNVQRPKDYWDYEALTVQWGDQDDYEVVRKVGRGKYSEVFEGVNAVNSER
CVMKILKPVKKKKIKREIKLQNLGGPNIVKLLDIVRDQQSKTPSLIFEYVNNDFKVLPTLT
DFDIRYYIHELLKALDYCHSQGIMHRDVKPHNVMDHEQRKRLIDWGLAEFYHPGKEYNVR
VASRYFKGPELLVDLQDYDYSLDMWSLGC MFAGMIFRKEPFFYGHNDYDQLVKIAKVLGTD
ELNSYLNKYRLELDPHLEALVGRHSRKPWSKFINADNQRLVPEAVDFLDKLLRYDHQDRLT
AKEAMAHYPYFYPVKVSEVSNRRSA*

FIGURA 3H

Secuencia de aminoácidos deducida de la MPK-2 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:34)

METSSGTPELKVISTPTYGGHYVKYVVAGTDFEVTARYKPPLRPIGRGAYGIVCSLFDITVTGEE
VAVKKIGNAFDNRIDAKRTLREIKLLRMDHENVVAITDIIRPPTRENFNDVYIVYELMDTDLH
QIIRSNQALTEDHCQYFLYQILRGLKYIHSANVLHRDLKPTNLLVNANCDLKIADFG LARTLSE
TDFMTEYVVTRWYRAPELLNCSAYTAADIWSVGCIFMELLNRSALFPGRDYVHQLRLITELI
GTPEDRDLGFLRSDNARRYIKHLPRQSPIPLTQKFRGINRSALDLVEKMLVFDPAKRITVEAAL
AHPYLASLHDINDEPASVSPFEFD FEPPISEEHKDLIWREALDCSLGPDDMVQ*

FIGURA 3I

Secuencia de aminoácidos deducida de la MPK-3 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:35)

MGLTPFSCVTVQGYVRVVYPDGHVENLSKSCSVHDLGLGNPDYYVCGSTPYTTITNRMAAEEV
LEYGVITYFVCATPNAQPFLERQPKVVHRGSKILPRFSKHGVHVRELRSPTHGSQQSRKVFYH
SVTMQQLESIRNEGPEPHLAGDRPSKHLKLVFIRHCLRALRLPRISIDLMESPLPNLSGEALSPT
ATAKDEITQMILKSAARSELGMYVSKRQEFYLRARRRRKFAWKPVLSISEMKPVMEFHTP
MAYRDSGSPKKNASTPSLPGPKNISPPRQVSVQRSSPPPKNVSPPPQPAFVARTASKYSAASQ
QVQRNRGNAKSLYMA*

FIGURA 3J

Secuencia de aminoácidos deducida de la MPK-4 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:36)

MSRRVRRGGLRVAVPKQETPVSKFLTASGTFQDDDIKLNHTGLRVVSSEPNLPTQTQSSSPDG
QLSIADLELVRFLGKGAGGTVQLVRHKWNTVNYALKAIQMNETVRKQIVQELKINQVTHQ
QCPYIVECFHSFYHNGVISMILEYMDRGSLSDIKQKQIPEPYLAVIASQVLKGLEYLHQVRHI
IHRDIKPSNLLINHKGEVKISDFGVS AVL VHSLAQRDTFVGTCTYMSPERLQGRSYAYDSDLW
SLGLTLLECALGTFFYKPAGMEEGWQNFFILMECIVNQPPAAASPDKFSPEFCSFIESCIRKCPS
ERPSTTDLLKHPFLQKYNEEYHLSKIL*

FIGURA 3K

Secuencia de aminoácidos deducida de la MPK-5 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:37)
 MSRRVRRGGLRVAVPKQETPVSKFLTASGTFQDDDDIKLNHTGLRVVSSEPNLPTQTQSSSPDGG
 LSIADLELVRFLGKGAGGTVQLVRHKWNTNVNYALKAIQMNINETVRKQIVQELKINQVTHQQ
 CPYIVECFHSFYHNGVISMILEYMDRGSLSDIKQQKQIPEPYLAVIASQVLKGLEYLHQVRHHH
 RDIKPSNLLINHKGGEVKISDFGVSAVLVHSLAQRDTFVGTCTYMSPERLQGRSYAYDSDLWSL
 GLTLLECALGTFPYKPAGMEEGWQNFFILMECIVNQPPAAASPDKFSPEFCSFIESCIRKCPSERP
 STTDLLKHPFLQKYNEEEYHLSKIL*

FIGURA 3L

Secuencia de aminoácidos deducida de CPK-1 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:38)
 MGQCYGKFDDGGEGEDLFERQKVQVSRTPKHGSWSNSNRGSFNNGGGASPMRAKTSFGSSHP
 SPRHPSASPLPHYTSSPAPSTPRRNIFKRPFPPSPAKHIQSSLVKRHGAKPKEGGAIPEAVDGEK
 PLDKHFGYHKNFATKYELGHEVGRGHFGHTCYAKVRKGEHKGQAVAVKIISKAKMTTAAIE
 DVGREVKILKALTGHQNLVRFYDSCEDHLNVYVMELCEGGELLDRIISRGGKYSEEDAKVVV
 RQILSVVAFCHLQGVVHRDLKPENFLFTTKDEYAQLKAIDFGLSDFIKPDERLNDIVGSAYYVA
 PEVLHRLYSMEADVWSIGVITYILLCGSRPFWARTESGIFRAVLRADPSFEEAPWPSISPEAKDF
 VKRLLNKDMRKRMTAAQALHPWIRSNNVKIPLDILVYRLVRNYLRASSMRKAALKASKTL
 TEDETFFYLRTQFMLEPSNNGRVTFENFRQALLKNSTEAMKESRVFEILESMDGLHFKKMDFS
 EFCAAAISVLQLEATERWEQHARAAYDIFEKEGNRVITYPDELAKEMGLAPNVPAQVFLDWIRQ
 SDGRLSFTGFTKLLHGISSRAIKNLQQ*

FIGURA 3M

Secuencia de aminoácidos deducida de la CPK-2 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:39)

MGNTSSRGSRKSTRQVNQGVGSQDTREKND SVNPKTRQGGSVGANNYGGKPSSGAQAGERS
TSAPAAALPRPKPASRSVSGVLGKPLSDIRQSYILGRELGRGQFGVTYLCTDKMTNEAYACKSLA
KRKLTSKEDIEDVKREVMHHLSGTPNTVVLKDVFEKHSVHLMELCAGGELFDRILAKGH
YSERAAADMCRVIVNVVHRCHSLGVFHRDLKPENFLASKAEDAPLKATDFGLSTFFKPGDVF
QDIVGSAYYVAPEVLKRSYGPEADVWSAGVIVYILLCGVPPFWAETEQQGIFDAVLKGHIDFEN
DPWPKISNGAKDLVRKMLNPNVKIRLTAQQVLNHPWMKEDGDAPDVPLDNAVLTIRLKNFSA
ANKMKKLALKVIAESLSBEEIVGLREMFKSIDTNSGTVTFEELKEGLLKQGSKLNESDIRKLM
EAADV DGN GKIDFNEFISATMHMNKTEKEDHLWAAFMHFDTDNSGYTTIDELQEAMEKNGM
GDPETIQEIIEVDTDNDGRIDYDEFVAMMRKGNPGAENG GTVNKPRHR

Figura 5

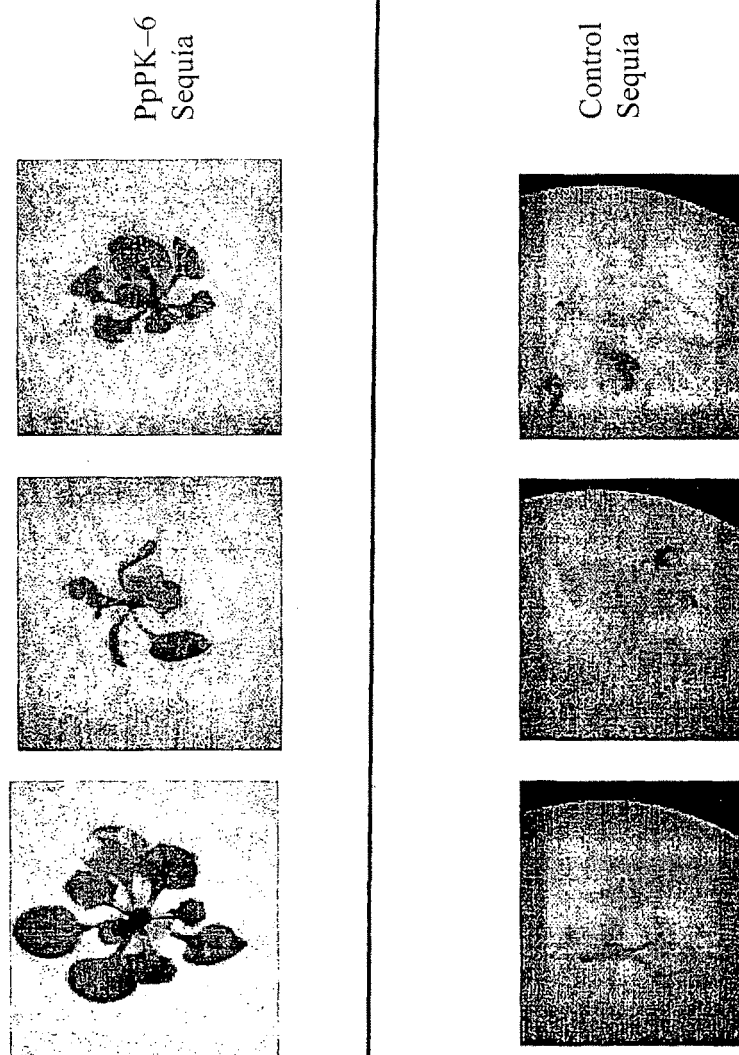


Figura 6

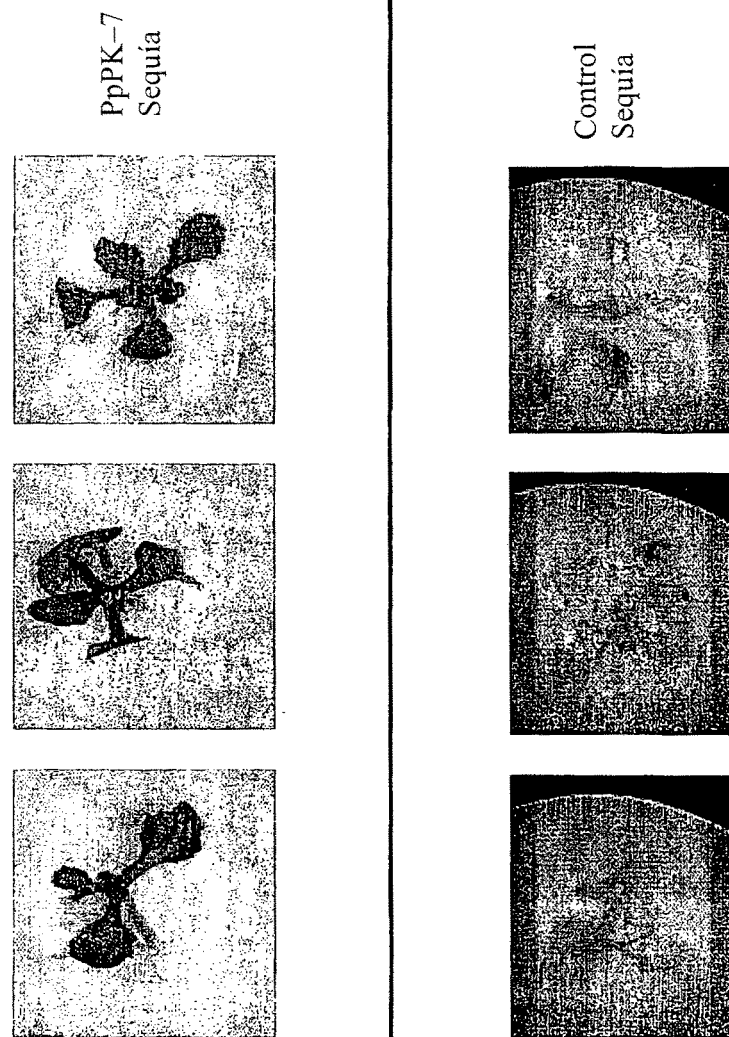


Figura 7

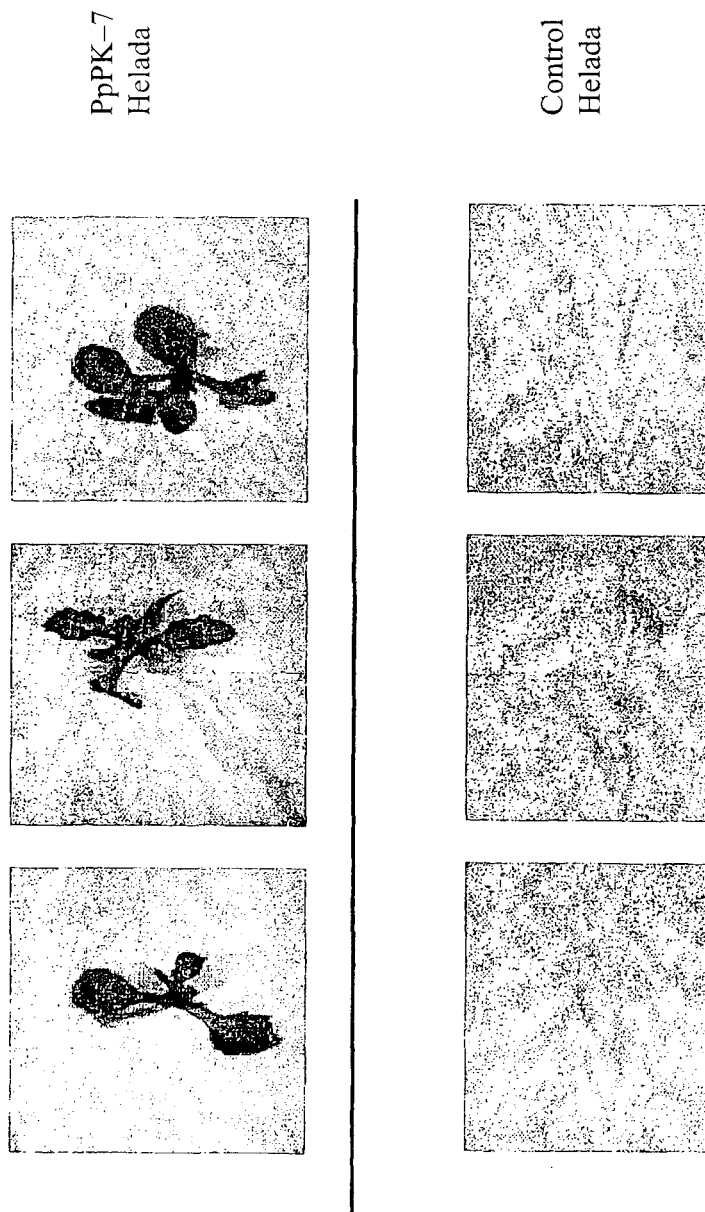
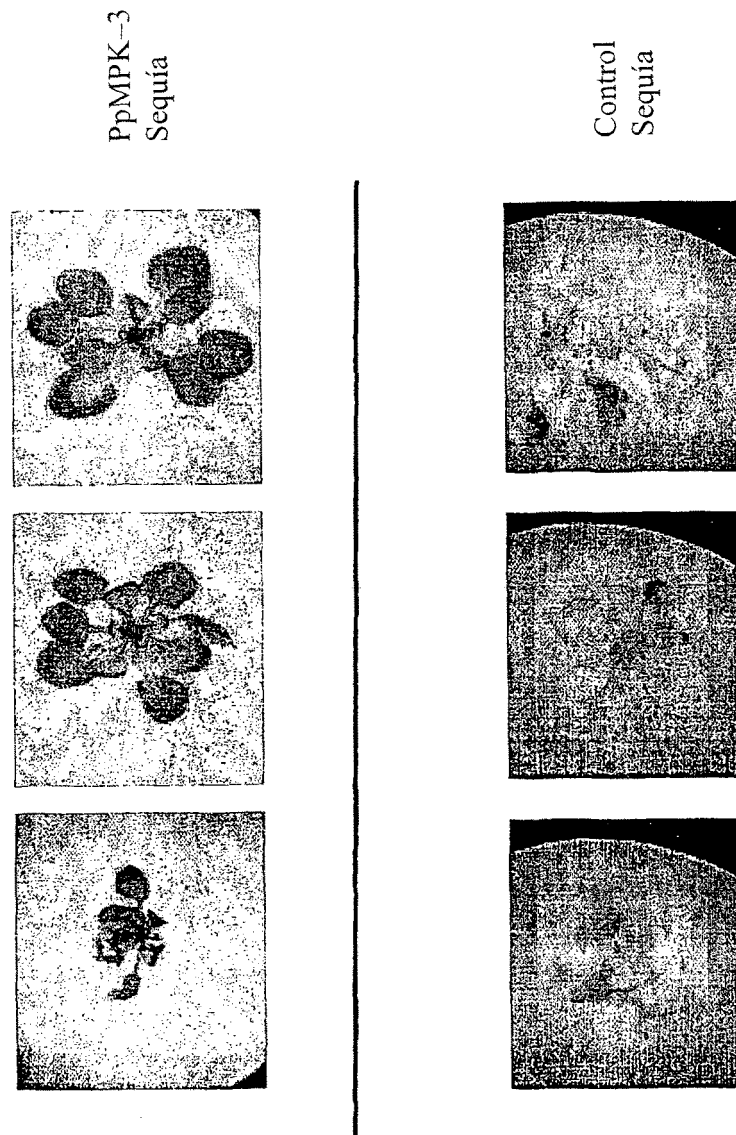
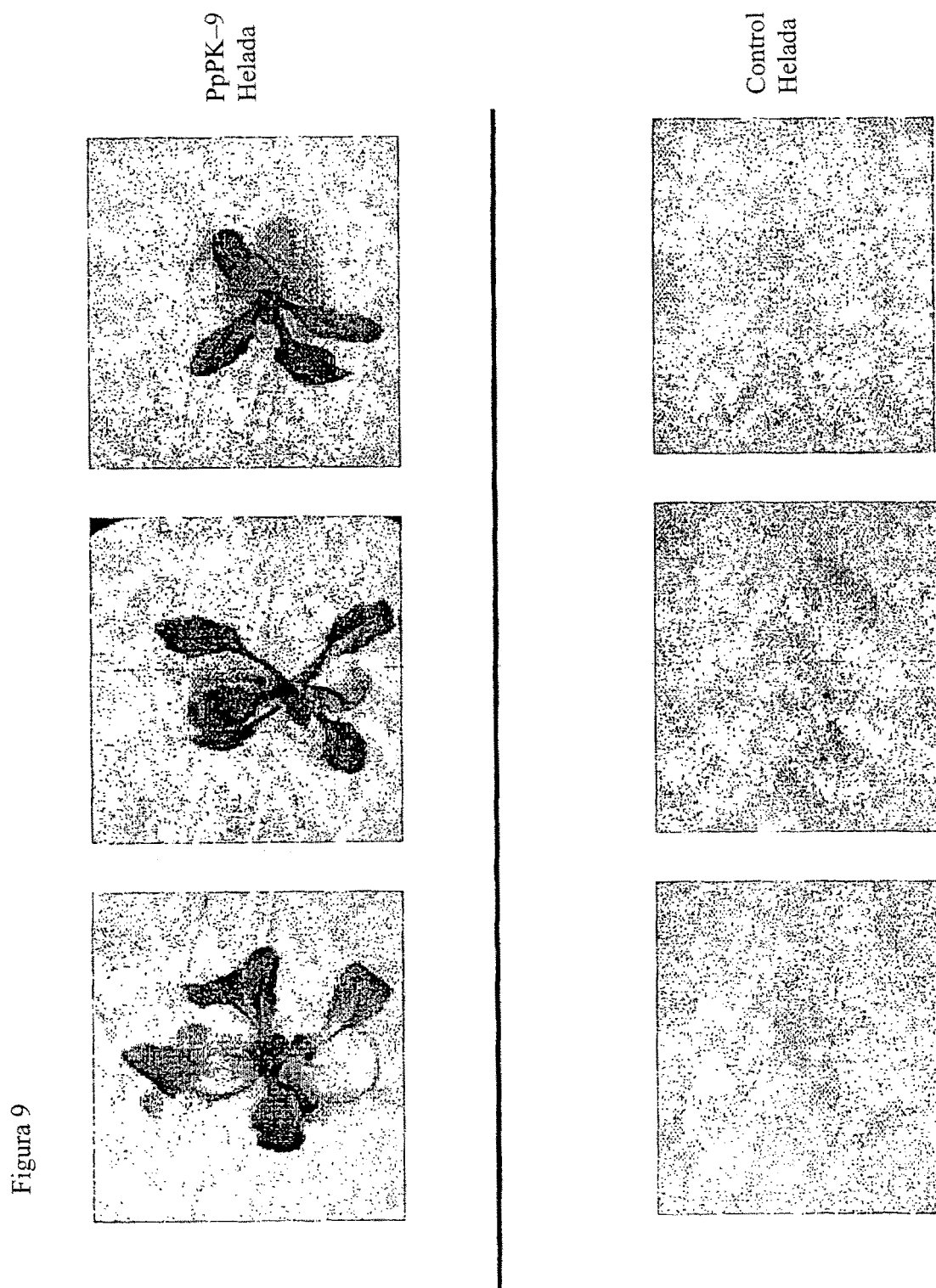
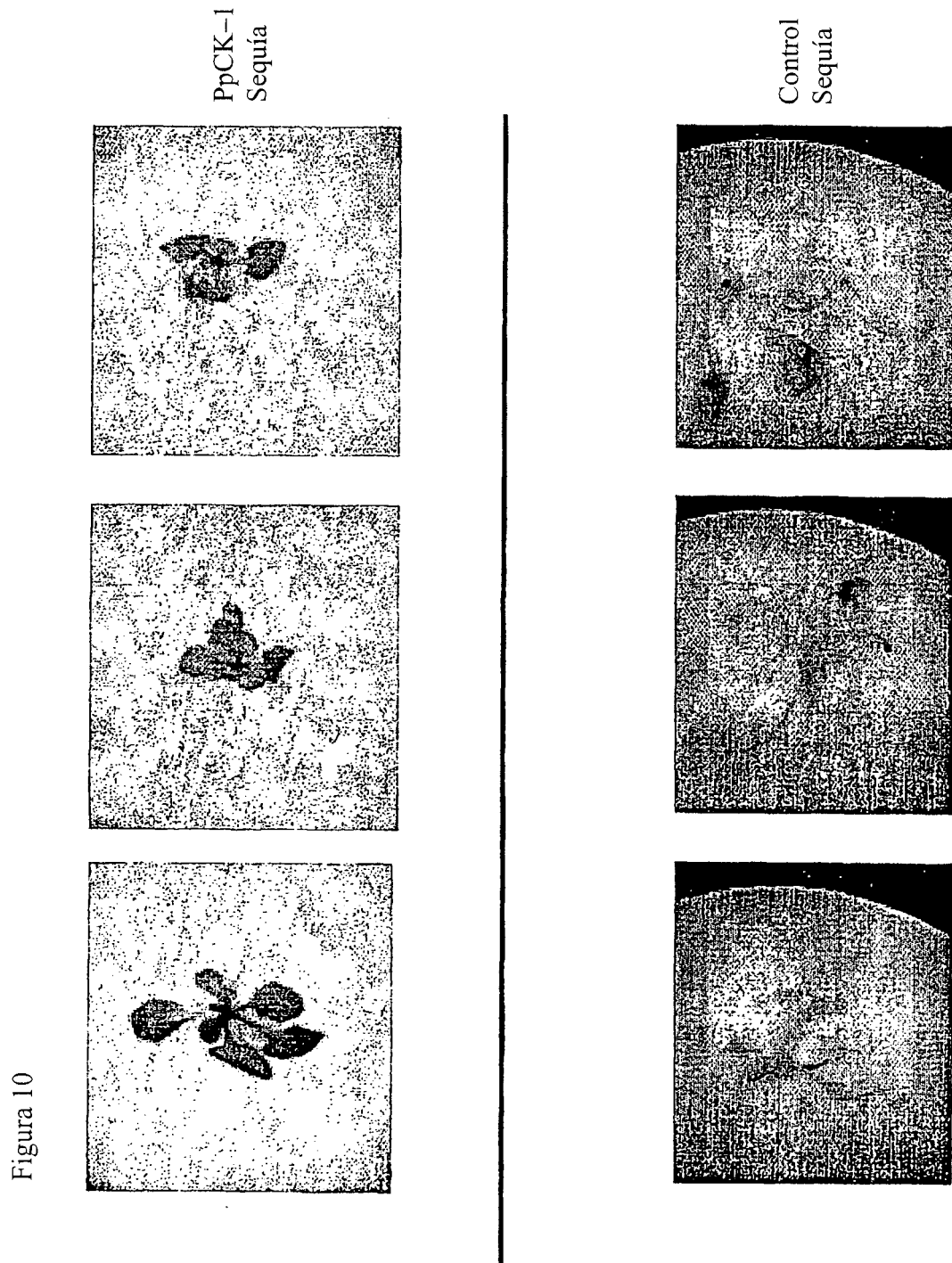
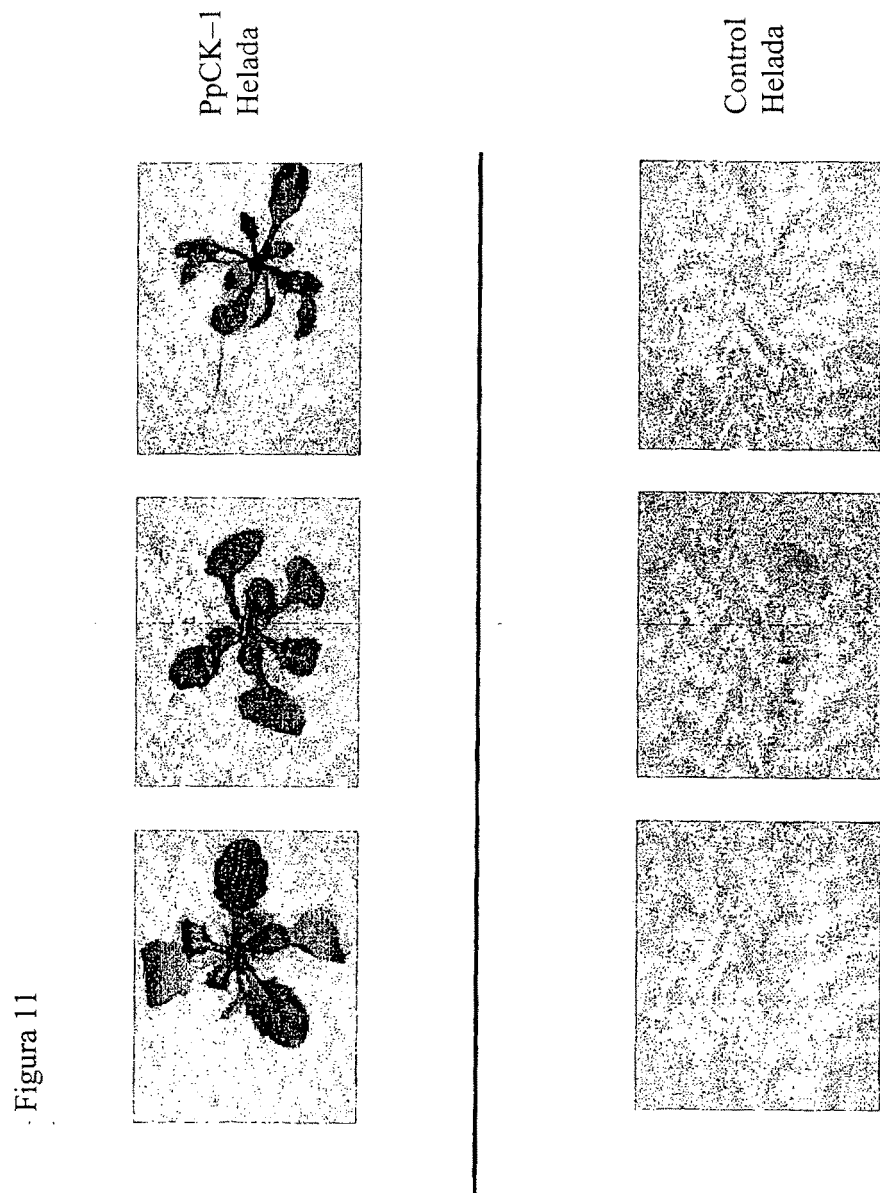


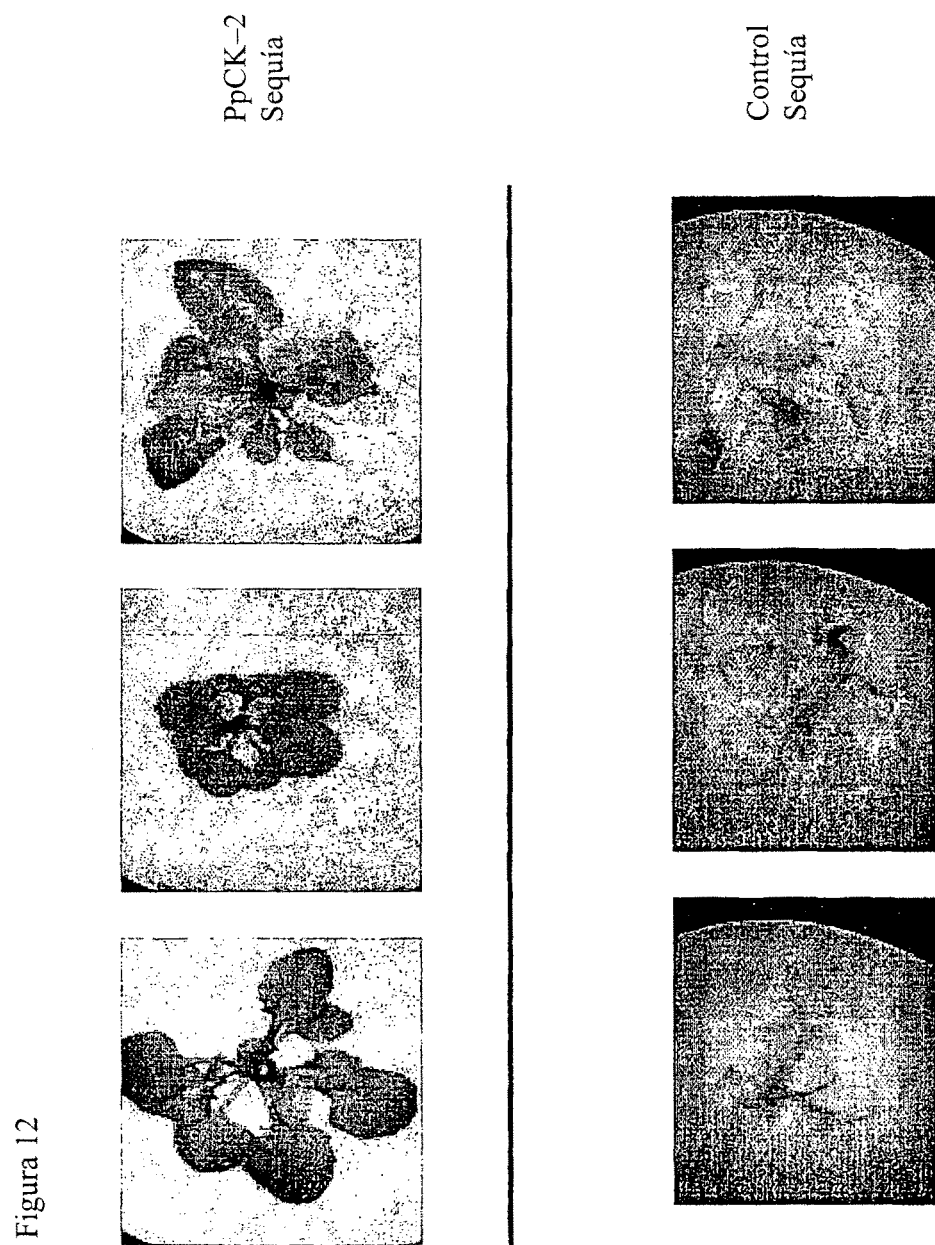
Figura 8











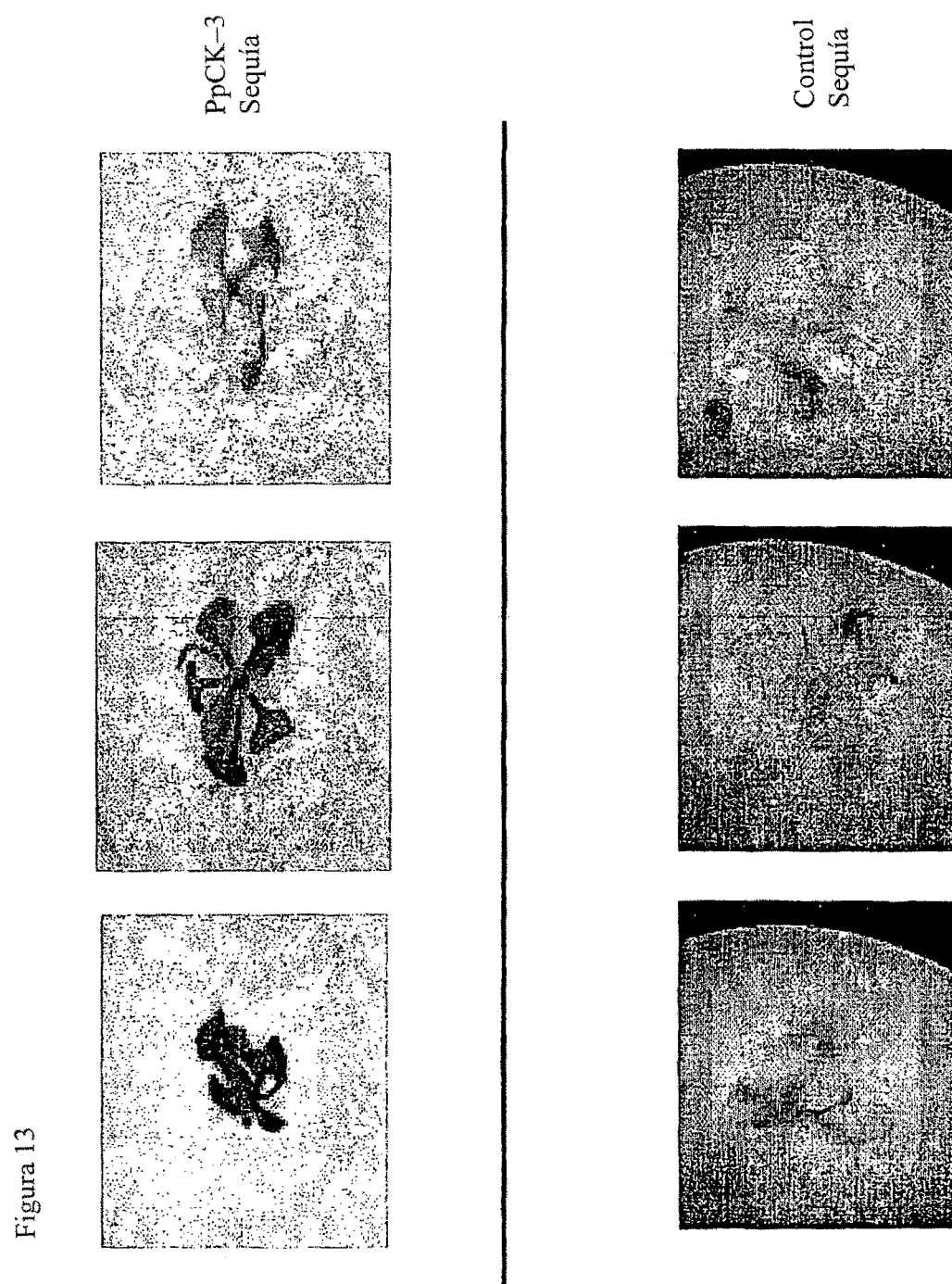


Figura 14

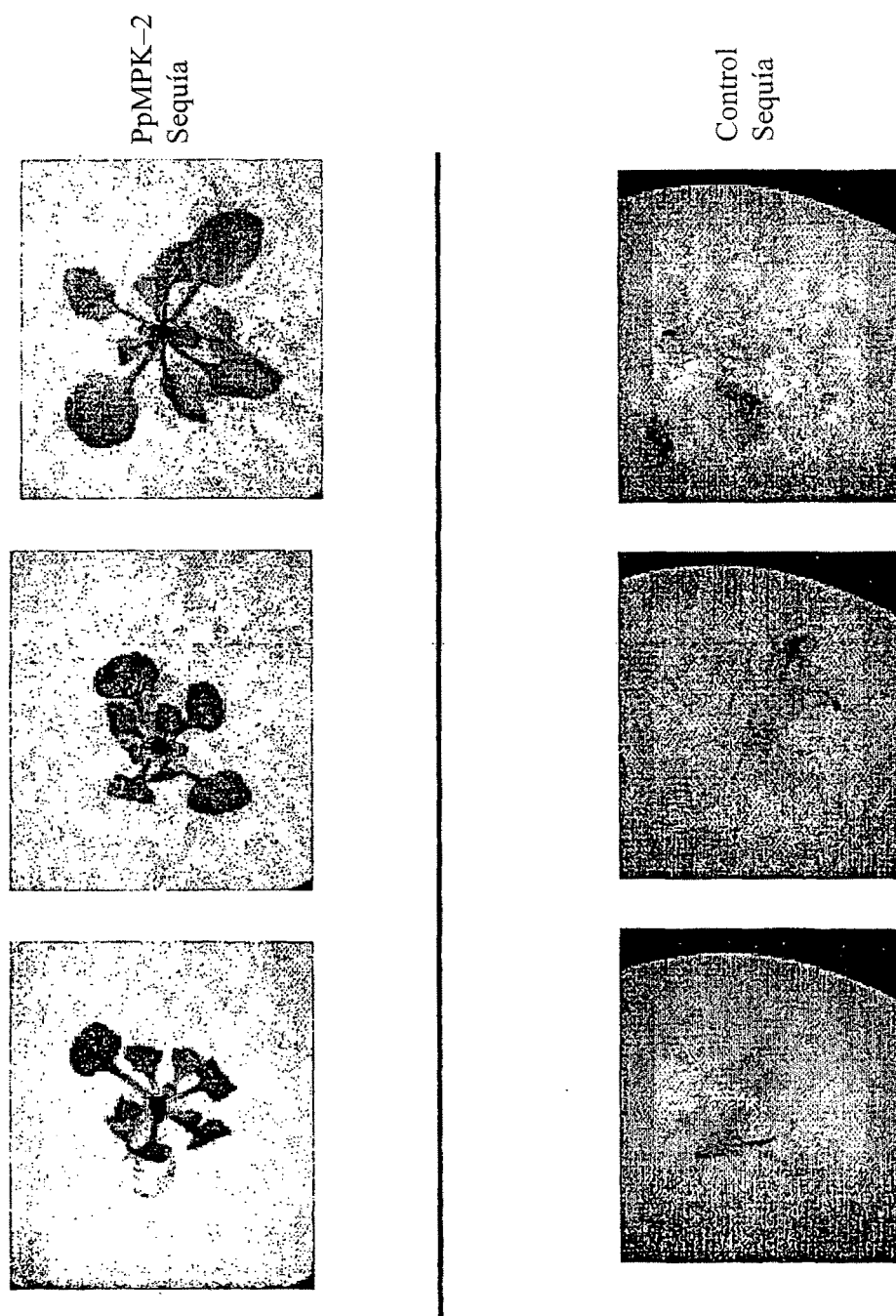
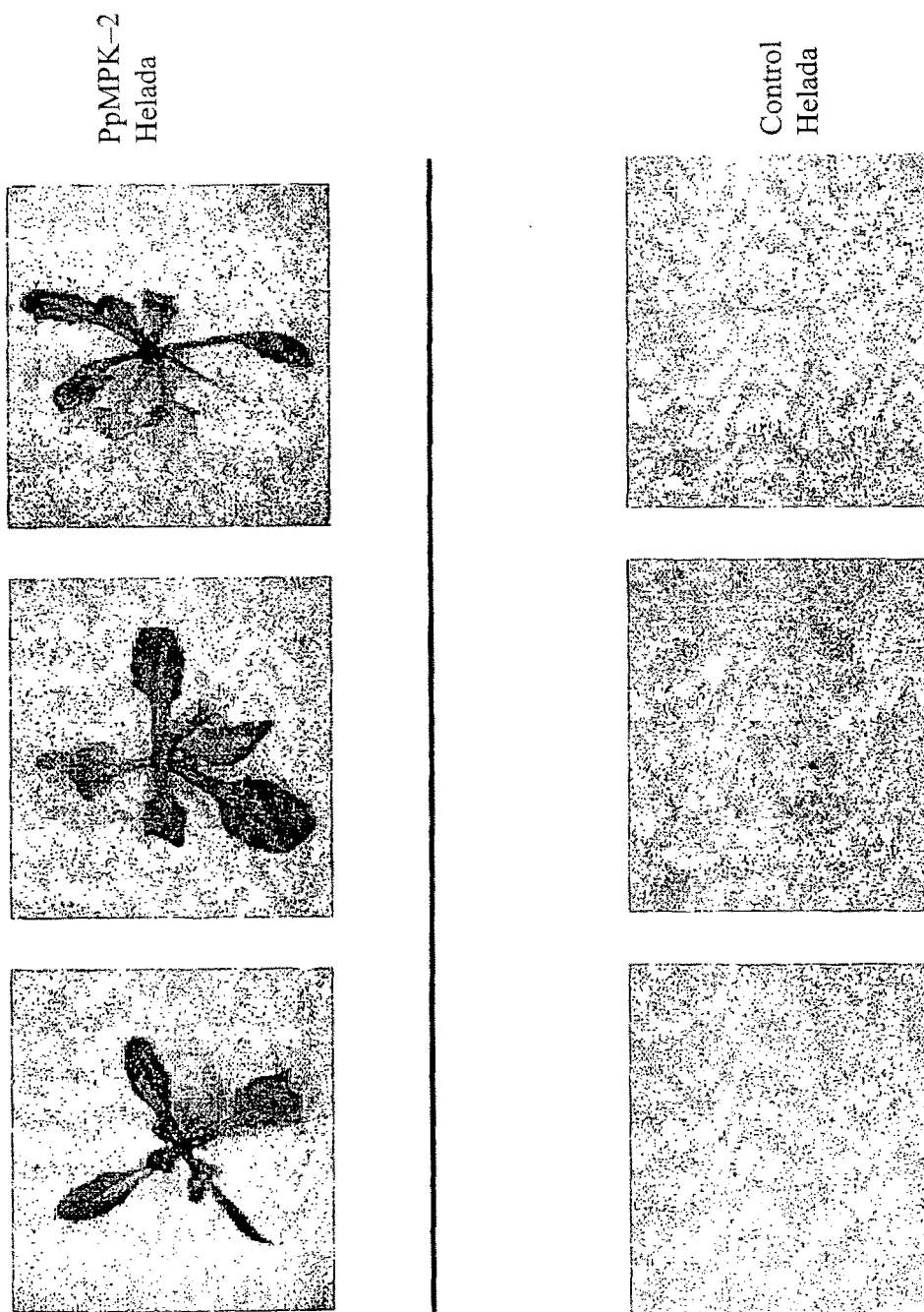


Figura 15



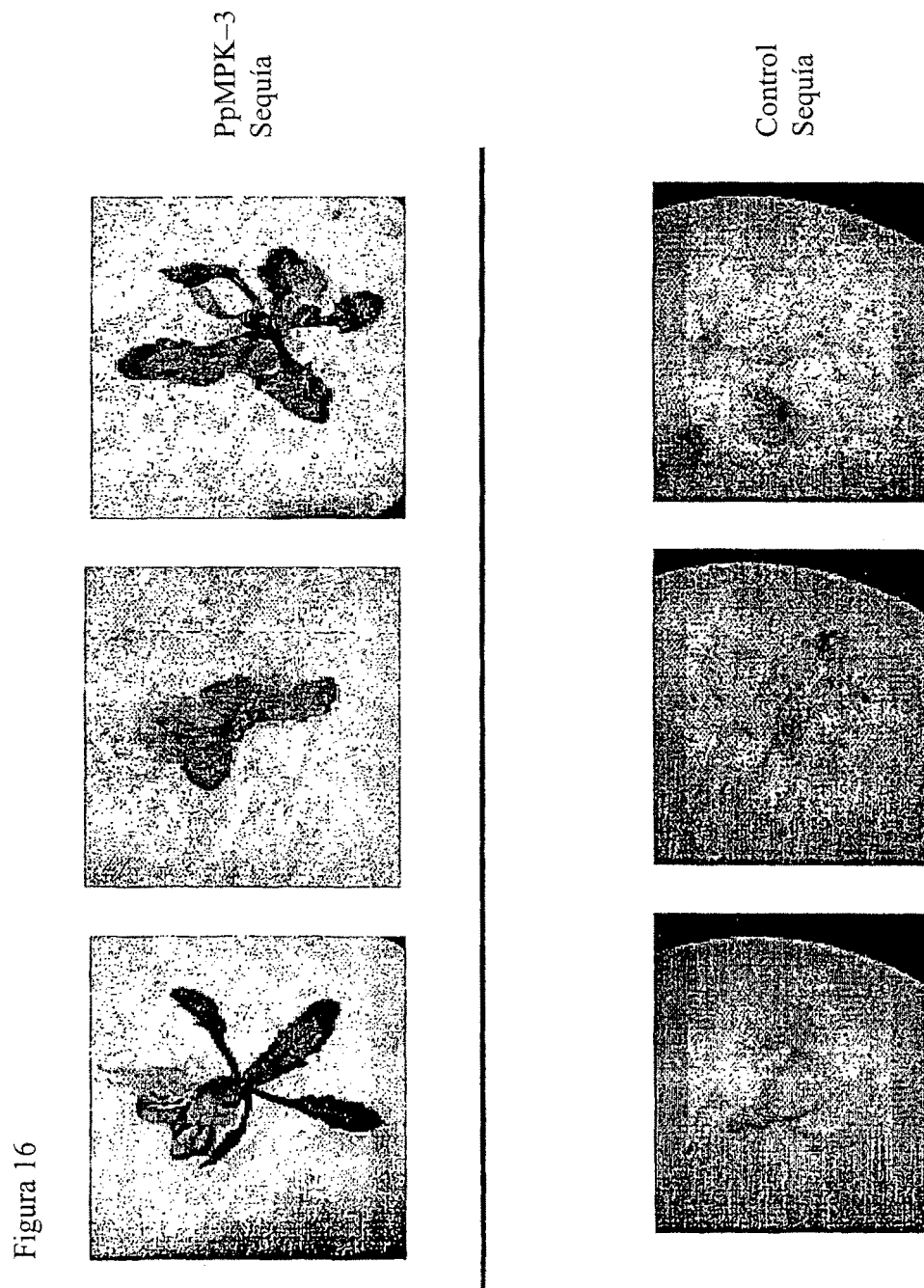


Figura 17

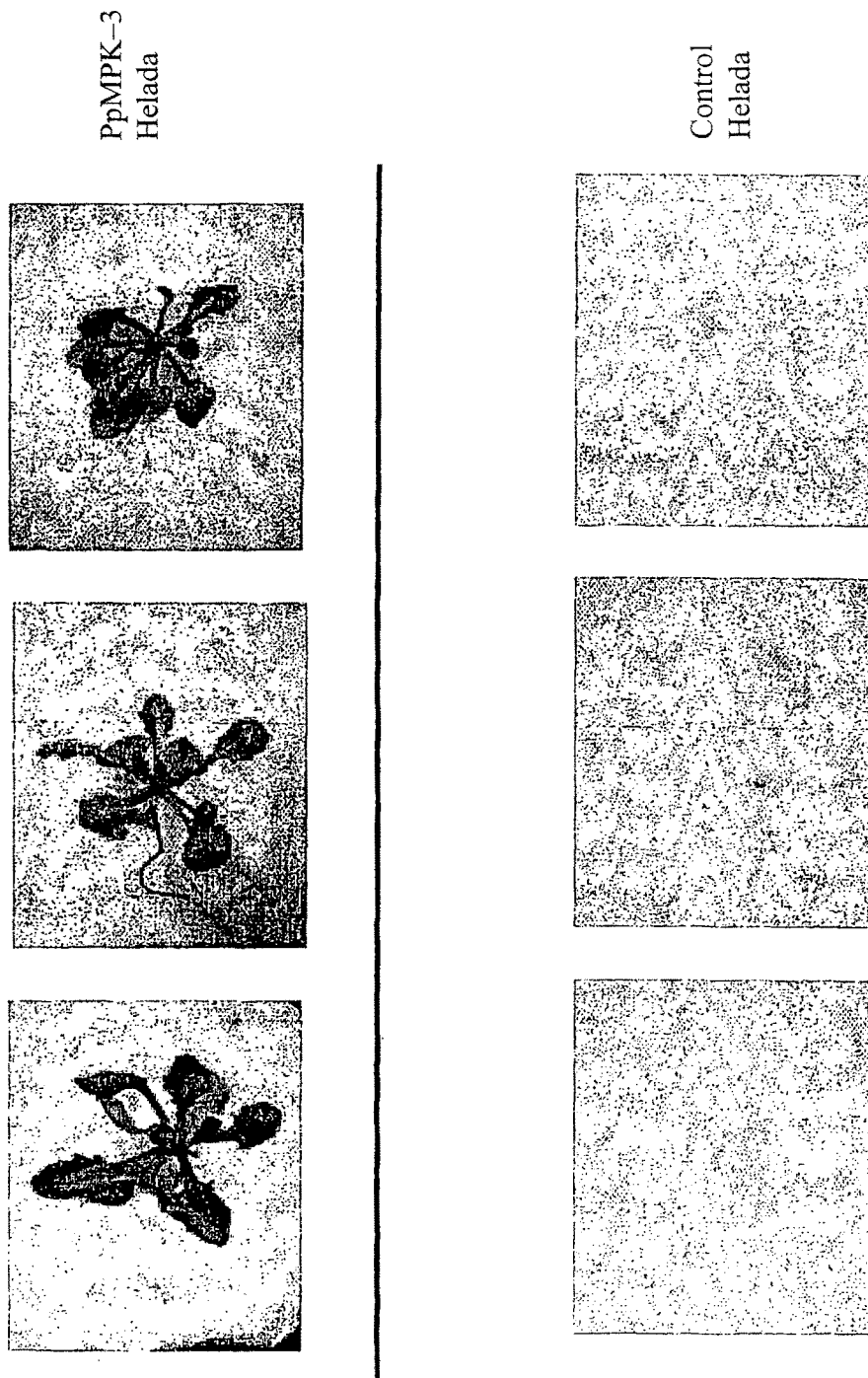


Figura 18

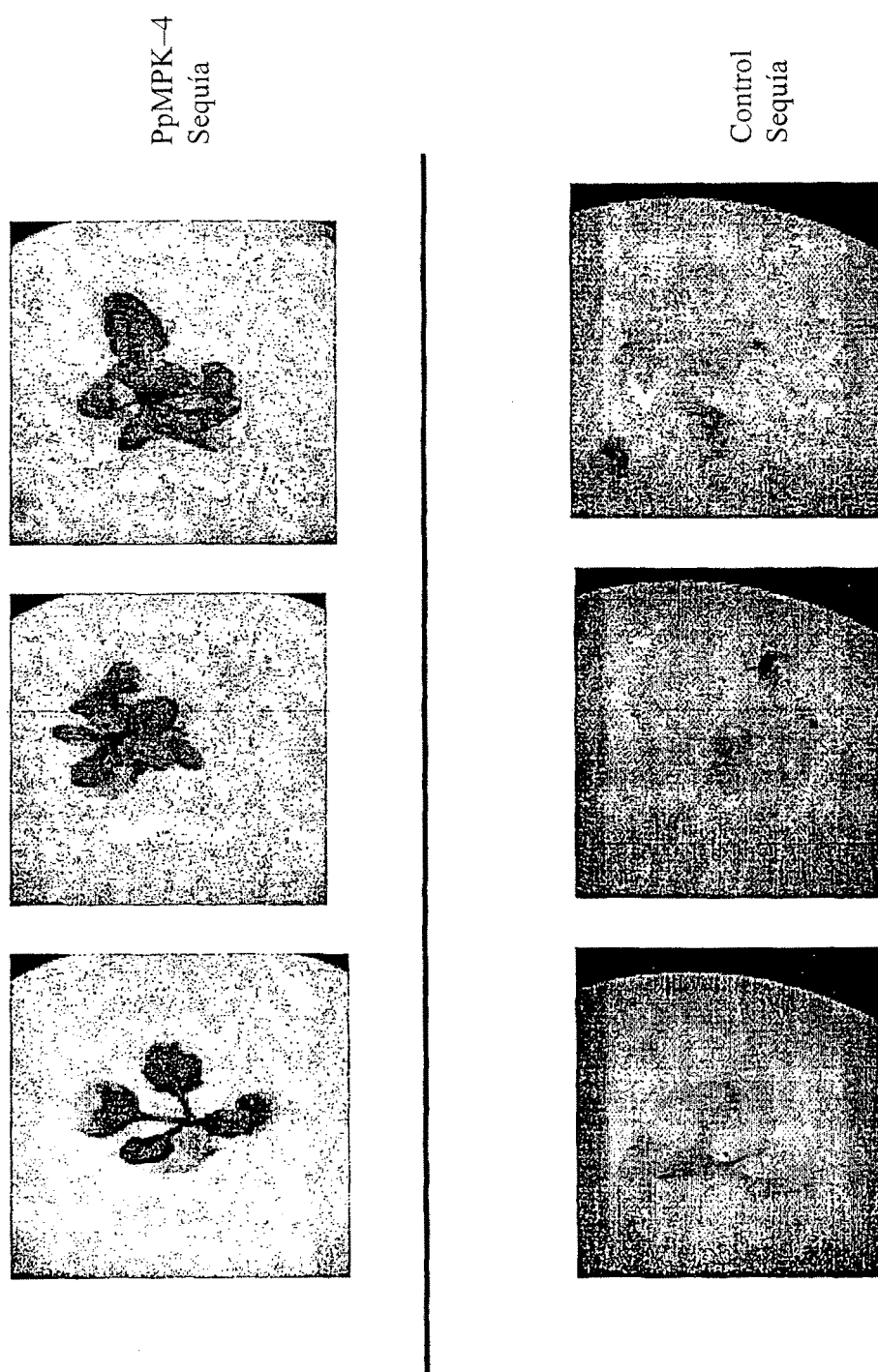


Figura 19

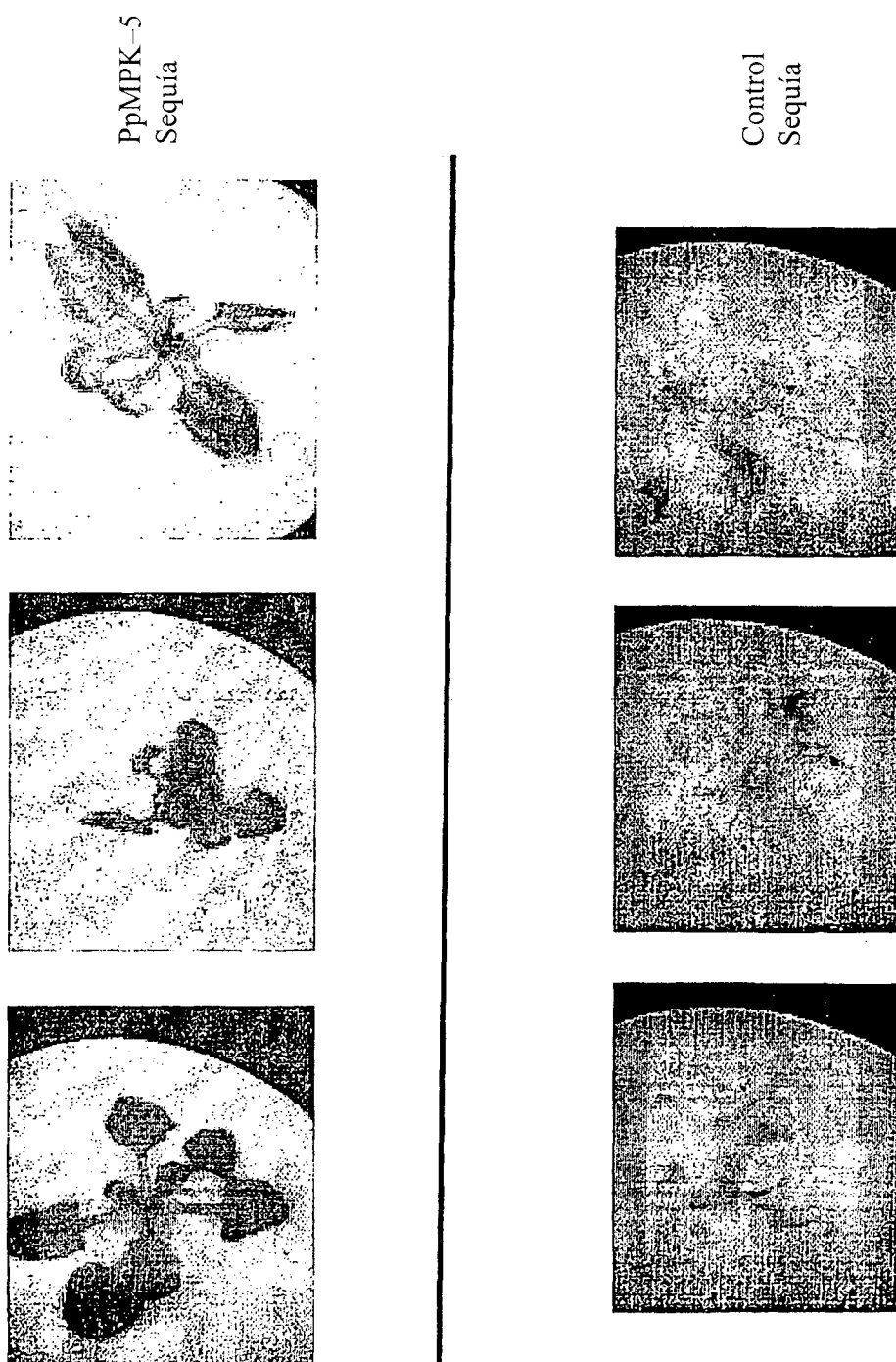


Figura 20

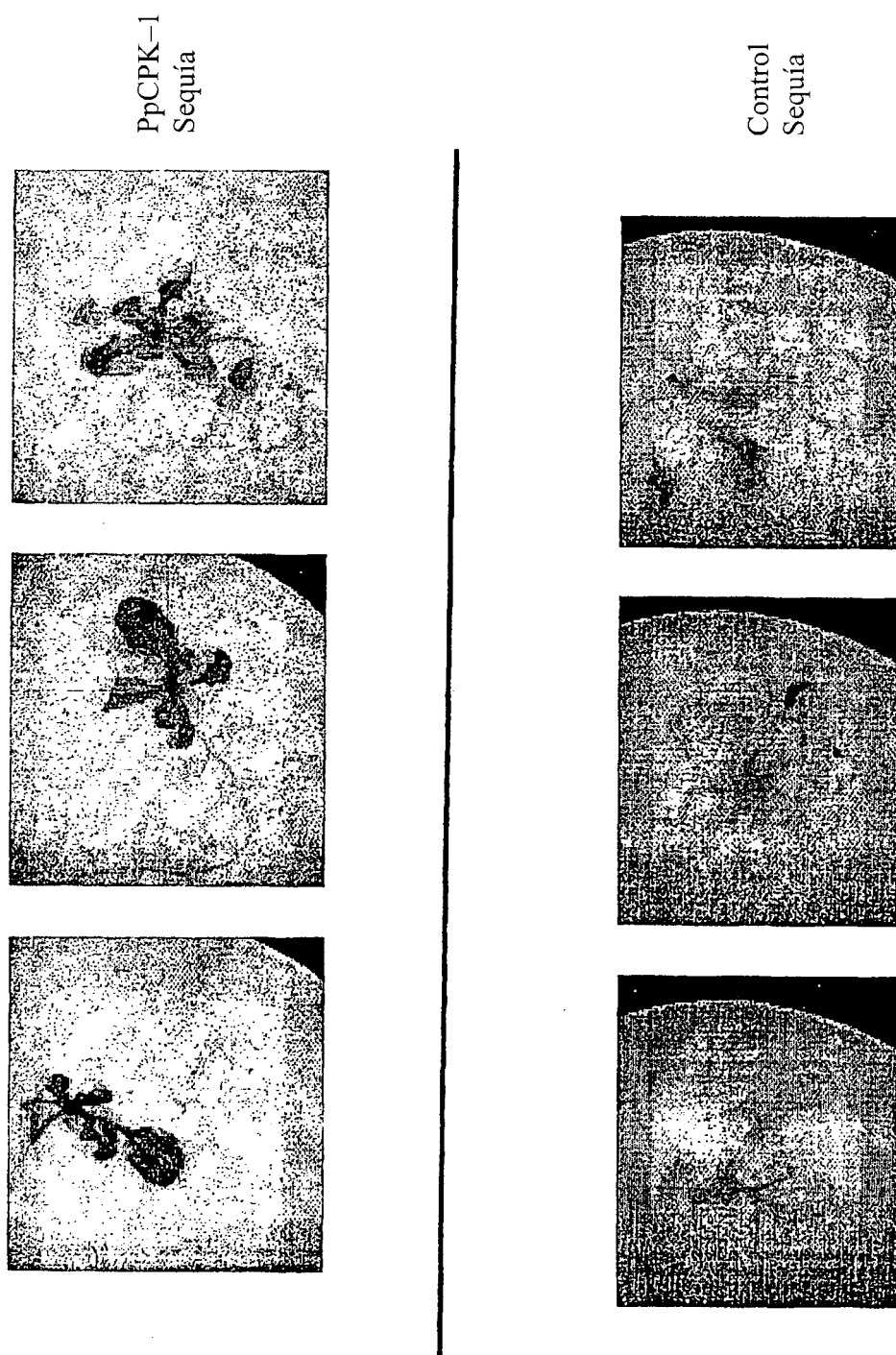
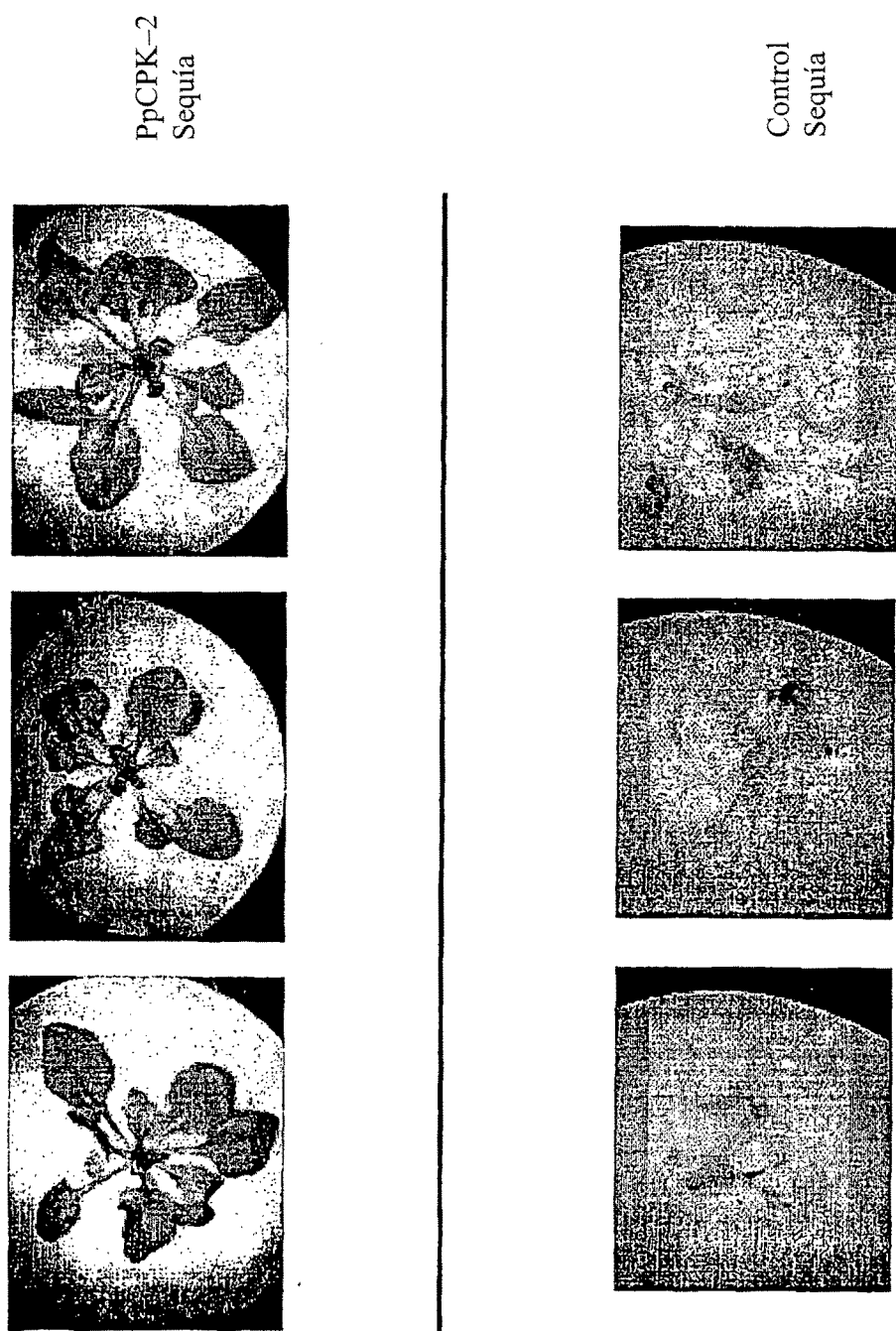


Figura 21



ES 2 345 833 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BASF PLANT SCIENCE GMBH

5 <120> PROTEÍNAS PROTEÍNA-QUNASA RELACIONADAS CON EL ESTRÉS Y MÉTODOS DE UTILIZACIÓN EN LAS PLANTAS

10 <130> 16313-0036

<140> PCT/US01/11435

<141> 2001-04-06

15 <150> 60/196,001

<151> 2000-04-07

20 <160> 128

<170> PatentIn Ver. 2.1

25 <210> 1

<211> 695

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

30 <220>

<221> base modificada

<222> (636)

35 <223> a, t, c, g, otra o desconocida

<220>

<221> base modificada

40 <222> (680)

<223> a, t, c, g, otra o desconocida

45 <400> 1

50

```
gcacgagctc aatcctcatg ttteggactg tggactagct gcccttgac catctggttc 60
tgaacgccag gtgtcggcac aaatggttggg ctctttcggg tacagtgcc ctgagtacgc 120
catgtctgga acctataccg tgaagagtga cgtctacagc ttctggtgtg taatgctgga 180
gctactcact gggcgcaagc ctttagacag ctcaagacca cgatccgagc aatctttggt 240
acgatgggcc acacctcaat tgcacgacat cgacgccctt gcacgaatgg tggatccgtc 300
gttgaagggc atctaccctg ctaaatacact ctctcggttt gctgatatag tcgccctttg 360
cgtccagccg gagcccgagt tccgaccccc gatgtctgaa gtggtgcagg cacttgtaag 420
gctgatgcag cgtgcgagtc tgagcaaacg cagatcggag tccgctgttg ggaattgagt 480
cgaacgagcc atctgagact tcacctttga gagtactgaa gcgccacta gcctaatacgt 540
gcatctttgg ccatctcgtt tctgagtggg acacaaagct gggatatatc ttggtggtt 600
aagcaaccat ttgtcccaat ttgaacttcc gctggngaag gtctgtatgt tgagaaacga 660
tgcaaacgct tcgctgggtn tgcttgaact tcaaaa 695
```

60 <210> 2

<211> 512

<212> DNA

65 <213> *Physcomitrella patens*

ES 2 345 833 T3

<400> 2	
5	ggcaagagcc gaacttcagc agctttcttca catcttcagg ttgcttggca ccccgaaatga 60 gacaatctgg cctgggtgta gccagcaccg tgattggcac gagtttcctc aatggagacc 120 acaagatctg tcccttgctg ttcccggaact cagcgcgggtt ggcttagacc ttctcgccaa 180 aatgttggtg ttcgagccct caaagagaat ctctgccaaa gccgccttga gccatactta 240 tttcgctgat gttgataaga cagcaacctt aacacaacag aacaattcaa gagaaccagg 300 taacctctac ctgtccaaga cgaaggacat ctaactcttc agtcaaaactt ggccaatcat 360 gctgattggg aattgaacca caggaacgag gtgggcaccg tggttcgctg tagcatataa 420 agtagtctgg aagacttgac atcgttagct ggcaatgcag tattttggaa atacaatttt 480 tcattaaaaa tctcctaaag attcaatatt tg 512
10	<210> 3
	<211> 651
	<212> DNA
15	<213> <i>Physcomitrella patens</i>
	<220>
	<221> base modificada
20	<222> (608)
	<223> a, t, c, g, otra o desconocida
<400> 3	
25	gcaccagact atgacaagcg cagccctctg cacatcgccg cgctccctgga ttgtgtccct 60 gttgtctaaag tctgtcttgc ggaaggagca gaggtagatg caaaagacag gtgggggaaa 120 tctccgagag gcgagggcga gaggtaggga tacatggaga tggtaaaact gttgaaggat 180 tacggggctg agtcacacgc aggtgccccg agggggccacg ttgagagtct gattcagggtt 240 gccctctcgt tgccttctaa ccgcgactgg gagatcgttc cgctcgagat tgaacttgat 300 accagcgagc tcatcgccaa aggtctcttt ggagagattc ggaaggcgct ttggcgccgc 360 acacccgtcg ctgtgaagac aatcagacct tctctgtcca acgacagaat ggtcatcaag 420 gacttccagc acgaggtgca attgctcgta aaggttcggc acccaaacat tgtgcagttc 480 ctcggggctg ttaccctgca aagacctctc atgttagtca ccgagtttct ggccgggggg 540 cgatttgcat cagttgctga ggagcaccct aaatttggtt cctgaccgca tctgtaagta 600 tgcctctnac atagctcgcg gcatgtctta cttcaccatc ggagcagccc a 651
30	
35	<210> 4
	<211> 710
	<212> DNA
	<213> <i>Physcomitrella patens</i>
40	<220>
	<221> base modificada
	<222> (54)
45	<223> a, t, c, g, otra o desconocida
<400> 4	
50	tccagcccat ttggttggcc acacacagct gttcatgagt caccgccttc aggntgaaact 60 gaagaaactg aactccgtac ggctatttta ccaaattttc aagctcgttg tcccgcctatg 120 atccaaatgg aagctcagtt tgcaacatga agtacattga acacacctac cgcccaccag 180 tcagaagcca ggccatgacc ttgtccttga atgatctcgg gtgctaagaa atcagccatg 240 ccacagactg tgaagtgctg ctcatccgac atttgctttg caaacccgaaa atcaaccagc 300 tgaagtcgtc ctttccgac tatcataaga acatcgggag agatgcccag atatacaacg 360 ccactcctgt gcagaagttc gacggctaata accacgttgg cgaccagaaa acgagctgag 420 ttctcgtcta aaggtagacc aagtagaagt tctagaggcc cagctaaca acaatttaaga 480 acgagtgcca cattgtcact gtcaataggg gtggccaaga gatgcggcac gaatggggaa 540 ggctctagtt gcttgaagaag agttctctcc aataggactt ggccctcccg accgagttct 600 tgaactttac gtctctggta ccttttcatg cttatgacgt catctgattt cttgcagagc 660
55	
60	accacaccga catcacagca atcggttgaa tagacctggt gccgatttctt 710
	<210> 5
	<211> 1271
	<212> DNA
65	<213> <i>Physcomitrella patens</i>
	<220>

ES 2 345 833 T3

<221> base modificada

<222> (619)

<223> a, t, c, g, otra o desconocida

5

<400> 5

	tatgcccatc	ttctcatact	cagaccagat	cctctatttc	aattacagaa	gaaagttgct	60
	tgtgcaacgt	attgaaatca	tcaccgtcat	gggctttccg	agtaaaaatt	cttghtaatgg	120
	ataaagtcac	ttctagtctg	atccatacaa	gtaccgaca	caatgctaga	agccttgatt	180
10	tacacactac	acactagaga	gtctacaact	cttttcctac	actctgctta	gttgccctcat	240
	cctcaactcc	ataaaccccc	attcacaatc	atgtaagact	tgagagaggg	aaacagtaag	300
	caaccttggt	ctatttttagt	accagagcag	aggatgaacc	actagtccct	ccaacgtaag	360
	ccctaattcg	cgcgaacaac	ctcacgacgg	aactccgaac	tgggtcaagg	tggaacaat	420
	gatacattcg	aaggtcgatt	ttgcaaatgg	gacgaagcag	cgggaattctg	gctgcgcact	480
	gattgcagag	agccattctg	ggggagttag	gtatacacag	tccagtctgt	cacatggtcg	540
	agctggaatt	ttttctgaat	gaaaagatca	cggacaagac	tccggaggta	cagtgtgctg	600
15	gctgctcgta	aaaacctana	cttcgcggcg	tggtgcaaaa	agtcggcaaa	ttgactggga	660
	taccatccac	aaagctccct	ccacagtggg	ggtoatcttg	attttgttgt	gcattgtactc	720
	gtgtgtcttc	tggtcagtga	gggcgttgcc	cgcccttccc	ttgcatggc	aaattgcctc	780
	ttagaaagta	cataagaatg	taacccaagt	gattctatgt	catctctctt	actgtgctcg	840
	attcctctgt	gctgattcct	actagcgtac	cgtgccgtcc	ctgtgaagct	cttccctatct	900
	cggtaaggga	tatgccttcg	tggtgcggcg	tccatgtact	cctttgccaa	gccaaaatct	960
20	ataatgaaca	cttggtttcc	ttgccgaccg	cagcccatga	ggaagttatc	cggcttcagg	1020
	tcacgggtgaa	cgagccctcg	agaatgcacg	tattccaccc	ggtaaatcat	ttggttaaccg	1080
	agcataatca	cggctcttcaa	cgaaaacott	agccacacac	ccttaaagag	gtgcaacagg	1140
	ttcgcccca	ataggtctag	caccatcaca	ttgtagtctt	ctgctgcttt	tccgaaccat	1200
	ctcatgttgg	gcactccctt	cccaccccg	aatatgttgt	acaagcgcga	ctcgtgcatt	1260
	aactctctg	c					1271

25 <210> 6

<211> 1910

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

30

<400> 6

	tttttttttt	ccaatagatt	tgcattacat	aactccaagt	tatgatattg	acaggtttagc	60
	aaacagctaa	tggtgcgaag	cagtgaacat	actaccaagg	gagagattct	cactccctag	120
	acttcaccc	cgtacgttac	ttggcgaagg	ttatgggtta	gtgataaaaa	gcttcacaag	180
35	ccggcaagca	tgctggttgc	ttctgctgca	atctaattgat	tatttccctta	ggaatcgat	240
	ggcagagagc	taccacacaa	agcactgaca	atggtttgat	ggtacaaga	tagagatcca	300
	ttcatctcta	agtatgagag	acctgtagtc	ttagcaccat	tgtaggacag	aaccaccgtt	360
	ttccctcaa	tcaggctgtt	gccaaatgta	gagcaactct	catcaacata	acaagagggt	420
	ttgatagaag	acagagcccg	gctatataac	cacaagccct	gcccctacct	tataacggct	480
	tggtatccac	tcacagaaa	gtgattcaac	tccttgata	ccggctttcg	taaatctctca	540
40	agtttgcaga	tggtgggtgt	ggatggcgcc	tagatatccg	ctttgggtcc	gaagtaactg	600
	gagagctcct	ctgcacccct	gctgacgacc	gtaagctggt	gggaccaagc	ttactgctcc	660
	ctgtttcgaga	ggaatctacg	acttctgctg	atgccctga	gggcctgctg	ctagatagga	720
	cagctcgctc	ggagggaaga	cccccccgag	ttgcatacga	agatgtatgc	atgcgctctg	780
	gttctgacac	aacagcaaga	gcagaatcct	tagcagattc	atcaagttca	ggacttttgt	840
45	gcttagatga	gtccaaagca	tttgcgacc	cggagccatt	tgctcctcca	ggaagcctgc	900
	gccgagaagg	atccattggt	tcggtggggc	gctgcaggtc	tcggcttcc	gtagcccccag	960
	ttccaaagtc	accactgggt	tgccctgcag	aagcaccag	tcgagttgaa	ctgccaccgg	1020
	aaatttggtga	ctgctgggtac	ttcagaattg	tccagtcaaa	aacgtagtca	aattgaaaac	1080
	ctgtaaaact	atttccagtt	taggcaaaac	gaagtggcac	tgtaataaac	tgaaaatcat	1140
	caaacattca	caaatctatc	gttcgttgat	agagcatagt	aaagtctgcy	cttaggatca	1200
	agtcttgata	cattacaatg	cccaagcaag	agtgaacct	acaaaagtta	cagttttcat	1260
50	accctcacga	ataaagaggt	cacggaagat	tcttttcaaa	tatgcatagt	cgggtttgtc	1320
	atcaaaacgc	aaggaccggc	agtagtgga	gtacgctcgt	gcgaattctg	aaggataatt	1380
	tttacaagg	acctcaatgg	gcgtggacat	ttgtttctc	actgatcttc	tcgtacttct	1440
	gcttcttggt	ttccgcttcc	agtccttgcc	catggaagac	tgccctctcag	gaagtacatg	1500
	agcacatctc	caagagattc	caaatacatc	cgtctgcttt	gtccaatacc	aagatgagtg	1560
	ttgatgcttg	cataccgagc	agtcctgtgc	agatttttgt	tctccctgta	gggaatatgc	1620
55	tgatgcgtgg	aagggtcgcg	gtacttcttg	gcaagaccaa	aatcaataat	gtagacctgg	1680
	tttgtctgcc	taccaagccc	cattagaana	ttatcaggct	tgatgtctct	atgaagaaag	1740
	cttttcgcat	gcacatactc	caactgtgtg	atcagctggg	cagcaagcat	gagaacagtc	1800
	tttaaaagaga	acttccggct	gcagaagttg	aaaaggctct	cgagacttgg	ccccaacaga	1860
	tccagaacca	agacattgta	gtctccttct	atcccgaacc	atcctcgtgc		1910

60 <210> 7

<211> 720

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

65

<220>

<221> base modificada

ES 2 345 833 T3

<222> (58)

<223> a, t, c, g, otra o desconocida

5 <220>

<221> base modificada

<222> (612)

<223> a, t, c, g, otra o desconocida

10

<400> 7

15

```

cgggtggggcg ctccccaata ttttatcccc ggggctgcag ggaatccggc gaccagtntt 60
tgaagggtgc aacgcgctga atagtgcgcg ttgcgttatg aagattttga agccagttaa 120
gaaaaaaaag atcaaaagag agatcaagat tctgcaaaac ctttgtggag ggcccaacat 180
tgtgaagcct ctggacattg tccgtgatca gcaatcgaag acaccagcc taatttttga 240
gtatgtgaac aatactgatt tcaaagtgc taccgccact cttacagact ttgatatccg 300
atactacatt catgagctgc tcaaggcttt ggactattgc cattctcaag ggattatgca 360
cagggatgtg aagccacaca acgtgatgat tgaccatgag cagcgggaag ttaggcttat 420
tgactgggga cttgccgaat tctatcatcc tggcaaaagag tataatgtgc gtgttgccct 480
taggtacttc aagggctcctg agctgctggt tgatcttcaa gattatgatt actctctcga 540
catgtggagc tctggggtgc atgtttgccg gcatgatatt tccggaaggag ccattctttt 600
atgggcatga canttcatga tcaacttggg gaagatcgct aaggtgttgg gaacttgatg 660
aattgaattc ctatctaaca aataccgcta agtggacccc attggagcac ctggtggggg 720

```

25

<210> 8

<211> 953

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

30

<400> 8

35

```

gcacgaggaa ctaacgaatt gtcattctat aatccaatag tgtaatcaca cgggggggaa 60
taagtgtcaa aaccatacaa cgccgggata gcgttgttagc cacctaaga attgagagta 120

```

40

```

ggccttacaa cttgagatga agtgtgaagt ggtactgcac catatcatca ggacctaagc 180
tgcaatccag agcctccctc caaatgagat ccctgatagg ctcctccgag atagagggct 240
cctcgaagcc aaactcgaag ggagataccg agccaggctc atcgttgatg tcattgaagtg 300
aagcttaaat aaggggtgcgc caaggcagct tccactgtga ttcttttccg tggatcaaag 360
accgcatctc ttccaacaag atcaagagca gaacgattaa tgccctctgaa cttctgggtt 420
aaggggaatag gcgactgtcg aggcagggtgc ttgatatacc gcctagcatt gtcgcttctc 480
aaaaaaccaa gatccctatc ttcaggagtt ccgatgagtt ctgtaattag gccgagctga 540
tgcacatagt ctctccagg gaacaacgca gatcgggtta gcaactccat gaagatgcac 600
cccacagacc aatgtcaat agctgcagtg tatgctgaac aattcaggag cagctctgga 660
gctctgtacc acctggttac aacatactca gtcatgaaat ccgtttcaga gagagtgcgt 720
gccaagccaa aatctgcgat ttccaatcg caattggcat tgacgagaag gttgggtggc 780
ttcaagtccc ggtgcaagac gttcgcgcaa tggatgtact tcaagccccg caagatttga 840
tacagaaaat actgacagtg gtcttctgtg agagcttgat ttgaacgaat gatctggtgt 900
aggtccgtat ccatcaactc gtatacaatg tacacgtcgt tgaatctcgt tgc 953

```

50

<210> 9

<211> 683

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

55

<220>

<221> base modificada

<222> (603)

60

<223> a, t, c, g, otra o desconocida

<220>

<221> base modificada

65

<222> (610)

<223> a, t, c, g, otra o desconocida

ES 2 345 833 T3

<400> 9

```

5      cggcaccagc ctcgctggag accgaccatc gaagcacctt aagctcgttt tcattcggca 60
      ttgcttgcga gcacttcgac ttccctagaat ttcaatagac ctaatggaat cgcactccc 120
      taatctttcc ggagaggcct tatcgccgac ggcaactgcc gaagacgaga ttactcagat 180
      gatactaaaa agtgccgcaa ggtccgaatt aggaatgtat gtttcgaaga gacaggaatt 240
      ctatcttcga agagcgcgga ggcgccgtaa gtttgcgtgg aagccgggtt tgcagagcat 300
      ctccgagatg aagcctgtca tggaaattcca cactccgatg gcttaccggg atagtgggtc 360
      tccgcgaag aacgcctcta ccccatcctt acctggcccg aagaacatct caccgccacg 420
      acaagtgaag gtcccgcaaa ggagcagtc tccgcgaag aacgtctcac cactcccca 480
      gccggcatt ttgtagcgg gactgcgatc gaagtattct gctgcacttc agcaagttca 540
      acgaaatcga gggcaacggc aaatctcttt tatatggcgt agtttgtgtc tccgactgga 600
10     ctctatctta tccccatcga gataactgat tcggtggata atttctccaa attttggcta 660
      acncaagaan ctcaaggcg aat                                     683

```

<210> 10

<211> 1156

15 <212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

20 <221> base modificada

<222> (923)

<223> a, t, c, g, otra o desconocida

25 <220>

<221> base modificada

<222> (1143)

30 <223> a, t, c, g, otra o desconocida

<400> 10

```

35     gcacgaggtt ggtgtaagtt attgatagt cgtgcaatt cacagttttg ctactccggt 60
      aggtcagacc tcttcaattg tcagttttaa aactctaaaa acatttgaga aaagtgttga 120
      aaaatctccg tgaggaaatt ccttgtcgca agacgtgaaa aaaagaagaa agaagatgga 180
      aatattgttt tgggtatcga agaagtgttc gatgctgtgc aataaggaaa gaaaaagtgc 240
      aggtaacata aaaagctagc atggtgatga taataataga ccccgattaa cacacttatg 300
      gattgtttca tgagctgcac gttctcagcg acaaatgggg ctcatgaga aaactccact 360
      ttctataagg ttgggaaacg agcgtttttt ttttgaagat gttttttccg tcaatctgat 420
      ttgatattcg tctcaacttg accacatatg actatataag gaaaaggcat tgagaaaagt 480
      gccgattggc gaggtagtgc gaccatgctt ttggtaaaagt ccttgaaagt tcagtgggtg 540
      atcaggcttg tggtagtgac agtctctgca cgcctatgca ggctaacttt aagttacaaa 600
      atcttgctca aatgggtact ttcctcgctt tacttttgca ggaacggatg ttttaagtaa 660
      tcagtagtgt atggtcgttc actgggacat ttccggatgc aggatccaat aaaagaacaa 720
      aattcggggg agaatttgtc aggggatgcg gctgcggggg gttgattaac tatacattcc 780
      atgaggatga agaaattttg ccaaccctct tccattccag ctggtttgta tgggaaggta 840
      cccaacgcac actccaaaag agtcaatcct aaactccata ggtcactgtc gtagcatac 900
45     gaacgcccct gaaggcgttc tgncgacata tatgtgcaag tcccacgaa cgtgtctcgc 960
      tgggccaagg aatgaaccaa cacagcactg acacaaaaat cagatatctt gacctcacc 1020
      ttgtgattga tgaggaggtt ggagggcttt atatcacgat gtatgatgtg cctgacttgg 1080
      ttaggtatt ccaatccctt cagaacttga ctagaatga cggccaaaata cggctcaggt 1140
      atntgccttc tgggtgc                                     1156

```

50 <210> 11

<211> 629

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

55 <400> 11

```

60     tccccgggct gaggaattcg gcacgagcgg ttgatctca cctttgggaa ggaccctgga 60
      attgagtagc gtgcggaagc tgcatacgatc cggaaagagac gatgagtagg agagtgagaa 120
      ggggagggtct tcgcgtcgcg gtgccgaagc aagagactcc cgtcagcaaa tttttgactg 180
      ccagtggaac tttccaggat gatgatatca agctcaacca caccgggctt cgcgtcgtct 240
      cttcagaacc taaccttcct acgcagacgc agtctagctc cccagatggg caactgtcaa 300
      tagcagacct ggagtttagt cggttcttag gaaagggtgc ggggtggaacc ggtgcagctt 360
      ggtccggcac aaatggacca atgtcaatta tgcaactgaag gcgatacaaa tgaatatcaa 420
      cgaaacagtg aggaagcaga ttgttcagga gctgaaaatc aaccaagtga cgcaccagca 480
      gtgcccttat atcgtggaat gcttccactc cttctaccac aacggcgtca tatccatgat 540
      cctagagtac atggacaggg gctcgtttgc cgacattatt aagcaacaaa agcagatacc 600
65     tgagccgtat ttggccgtca ttgctagtc                                     629

```

<210> 12

ES 2 345 833 T3

<211> 514

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

5

<400> 12

```
gcaccagccg agtcgggcat ttttcgtgcg gtgttgaggg ctgacccgag ctttgaagaa 60
gcccccttggc cttccatctc tcccgaagcc aaggatttcg tgaagcgctc cctgaataag 120
gatatgcgga aacgcgatgac tgctgcacaa gctttaactc atccatggat tcgaagtaac 180
aacgtgaaga tacctctgga tatcttagtg tacagacttg tgaggaatta tcttcgtgca 240
tcattccatga gaaaggctgc tttgaaggcc ctgtcaaaaga ctttaaccga agacgagact 300
ttttatctac gtactcaatt tatgtctgcta gaaccaagta acaacggtcg tgttactttt 360
gagaatttca gacaggcact gctgaaaaat tcaacagagg ccatgaaaga gtcacgggtt 420
```

10

15

```
tttgaatttc tggaaatcgat ggtggtctt catttcaaga aaatggactt ttcagagtcc 480
tgtgcagcgg ccattagtgt tctccagtta gaag 514
```

<210> 13

<211> 1387

20

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

25

<221> base modificada

<222> (1385)

<223> a, t, c, g, otra o desconocida

30

<400> 13

```
gcacgagctc ctgcatctcc cctcctctct cctcctctatc attctggagc ccagcgaact 60
gcgatctgag attccaactt ggaaggccct cgcgtaagca ccggagctcg tttctttacgc 120
ttttgcgcct cgcgatattt gtacattgtt tctctctggt ttattcgatt ccgcctctga 180
aaatgtgaac gggctgcaag ctgtgttttg gagcaacgtt ggagcattga agggttgcgc 240
tcgtccctgc ccattcctcg cttctgctct ggcctatgtc atgacgacgt gaaggagagg 300
atttgagggt ttgcaagtg atataatcct ccccgaggag attctctgtg gttgattaac 360
ttggatcagc gacatgggga acactagtto gaggggatcg aggaagtcca ctcggcagggt 420
gaatcaggga gtcgggtctc aagacacccg agagaagaat gatagcgtca atccaaagac 480
gagacagggt ggtagcgttg gcgcaaacaa ctatggcgga aagcacaagc agtggtgctc 540
aggccggaga acgatccacc tctgcgcccg ctgctctgcc gaggccgaag ccagcatcga 600
ggtcagtatc cgtgtgtttg ggttaagccg tgtcagatat tcttcaatct tacatcctgg 660
gacgggagct tggccgaggg cagttcggag tgaactactt gtgtactgac aagatgacga 720
atgaggcgta cgcgtgcaag agcatcgcca aacggaaact gaccagtaag gaggatctcg 780
aggatgttaa gcgggagggt cagattatgc atcacctgtc ggggacaccc aatatcgtgg 840
tgttaaaagg tgtgttcgag gacaagcatt ccgtgcattc tgtgatggag ctctgtgcag 900
gtggcgagct cttcgatcgc atcattgccca aggggcatta cagtgcgcgc gccgctgccg 960
atatgtgcag agtcatcgtc aatgtggtgc acagatgcca ctcataggg gtcttccatc 1020
gggatctcaa gccagagaat tttctgttgg ccagcaagggc tgaggatgcg cctctgaagg 1080
ccacagactt cggctctgtca actttcttta agccaggaga tgtgttccag gatattgttg 1140
gaagtgcgta ttacgtggcc cctgaagttt tgaagagaag ttatggtcct gagctgatgt 1200
ttggagtgcg ggcgtgattg tgtacattct gctgtgtggt gtacccccct tctgggctga 1260
aactgagcag ggtatctttg acgctgtgct caaagggcac atagacttcg agaacgagtc 1320
catggccgaa aatctccaac ggggctaagg atttggtgag gaaaatgcta aaccctaacc 1380
tgaanat 1387
```

50

<210> 14

<211> 2784

<212> DNA

55

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 14

```
atcccgggtg agtatcactt acgggtggcg gggatggcct ttggggtagg agctggtata 60
tgcggagtc aacagaagct tgtgcaggac tcttgagttg tgcgtgcgag ggctgagtc 120
cggaaaggta ttttccgacg aagagtcaat gtgggcgtgg acaaacgttt gaagagatgg 180
gtgtggatat gaaggctccg gctaagcagt cgcgtggagt cggactgctc ctgtgctctg 240
tagtgatcct ctcggtggtg agctctgtgt atggccaagt tcagacagat ccagtggata 300
ctacaggctt aatttccatg tggatgact taaaacagag tcaatctctc acggggtgga 360
ctcaaaatgc ttctaaccct tgtgggcagc agtggtacgg cgtgtgatgt gatggctctt 420
ctgtcacgga aatcaaaatt ggaagtcggg gtttgaattg aaatttttaat ccttcgtact 480
ttcaaaacgc ttttaaaaag cttcgaattt ttgatgctag taacaacaac atcgaaggaa 540
atattcctca acagtctcct acgtctctta ctcaaatgat attgaacaac aataaattga 600
ccggagggtc cccacagttt gatcaattgg gcgccttgac agtcgtaaac ttgagcaaca 660
```

65

ES 2 345 833 T3

```

acaatctgac cggcaacatg aaccccaact atttcaatgt gatcgtgaat gtggaaacct 720
tcgatgtttc ctataaccaa cttgaaggca ctttcccga ctccattcta aacctggcca 780
agcttcggtt cttgaatttg cagaacaata aatttaattg taaacttccc gacgatttct 840
ctcggctgaa gaatttgacg actttcaaca ttgagaacga tcagttcacg ggtaattatc 900
catcagggtt acccagtaat agcagggttg gaggaatcg tcttacattt cccccacctc 960
cagcccccg caccctgctc cccaggactc cttctccttc aggaacatcg aatggatcat 1020
cgatcgatct cctcttaggg gcgatacttg gaatagcgcg tgggtggtgct gtgctgcttt 1080
tattactagc actcggcatc tgtttgtgtt gtcgtaagcg gtccaagaaa gcattgggctg 1140
atccagaggc cagcaccagc agccgaagac cgtggttcac acctcccttc tccgcaaaga 1200
gccagagtga tcccagcaag agcatagaca aaacgacgaa acgcaacatc tttggcagca 1260
gtaagagtga gaagaaaagt tcaaagcaca gattatttga gccagctcct cttgacaaaag 1320
gagcagccga cgaaccagtg gtgaaggcgt ctcggcccggt caaggctactg aaggctcctc 1380
cttcatttaa ggggtatcagc ggcttgggtg ctggacattc gaaagcaaca attggcaagg 1440
tgaacaagag caatatttga gccaccccat tctctgtagc ggatcttcag gcagccacaa 1500
acagcttctc ccaggataat ctgattggag aagggagcat gggctgcgtg tatcgtgctg 1560
agtttcccaa cggccaggtc ttggccgtga agaagatcga cagcagcgcg tcgatgggtg 1620
agaattgagga tgactctctg agtgtagtag acagtttggc tgcctgcagc catgctaata 1680
cggctgagct tgtgggttac tgtattgaac atgaccaacg gctgttgggtg tacgagtaacg 1740
tgagtcgtgg aacctgaac gaattgtctc atttctcggg tgaanaacac aaggccctgt 1800
cctggaaagt cgcgattaag attgctttgg gatccgcgcg tgctctggag tacttgcaag 1860
aagtctgtgc acctcccggt gttcaaccaca acttcaaatc tgccaatatt ctgctagacg 1920
atgagctcaa tctcatgttt tcggactgtg gactagctgc ccttgcaaca tctggttctg 1980
aacgccaggt gtccgcacaa atgttgggct ctttcgggtt cagtgccctc gagtacgcca 2040
tgtctgggaa ctataccgtg aagagtgaac tctacagctt cgggtgttga atgctggagc 2100
tactcactgg gcgcaagtct ttagacagct caagaccacg atccgagcaa tctttggtac 2160
gatggggcac acctcaattg cagcacatcg acgcccctgc acgaatgggtg gatccgtcgt 2220
tgaaggccat ctaccctgct aaatcactct ctcggtttgc tgatatagtc gccctttcgt 2280
tccagccgga gcccgagttc cgaaccccgga tgtctgaagt ggtgcaggca cttgtaaggc 2340
tgatgcagcg tgcgagctcg agcaaacgca gatcggagtc cgctgttggg attgagtcga 2400
acgagccatc tgagacttca ctttgagagt actgaagcgc ccaactagcct aatcgtgcat 2460
ctttggccat ctctgttctg agtggaacac aagctgggta tattcttttg tgggttaagca 2520
acaatttgc acaatttgaa cttcagctgg agaaggtctc gtagtggtga agaaaacgaa 2580
tgcaaacgct ttccgctggt atgtgctttg agaacttaca aaactcatca agactttgaa 2640
gatctttgta ttgcatcgaa tctttcaat cagtctcggg taggatcagt tctctgtat 2700
cggataccct tttcatccta acctgggacc cttttaatcc agaggatgga gtgcttgga 2760
tagtgacctt ggtcaggtta acgc 2784

```

<210> 15

<211> 1088

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 15

```

atcccgaggag tgggtgggtg gactgtaagg agctagcgtt ttagagctac agtgccggtt 60
gctgtgtgag tgagtgagtg agtgagtgcg tgagtgagga tgtctgttct tgggtatggac 120
aactatgaga agctggagaa ggtaggagag gggacttacg gaaagggtga taaggcccg 180
gataaacgct ccggcgagct ggtggcgctc aagaagacta ggttggagat ggaggaagaa 240
ggcgctccct ccaccgcttt gcgcgaagtt tegtgtctac aaatgctctc ccacagcatg 300
tatatcgtca ggtacttttg cgtggagcac gtcgagaaag gcagcaagcc catgctctac 360
ttggctcttg aatatatgga cactgatctt aagaagtata ttgacttgca cggctcgtgg 420
ccgagcggga agcctctgcc tcccaaatg gtccagagtt tcatgtatca attgtgcaca 480
gggcttgccc actgtcatgg ccacggagta atgcacaggg atctgaaacc ccagaatttg 540
ctcgtcgaca agcaaacccg tctctttaag attgcgacc ttggtctcgg tcgggcattc 600
acagtgccaa tgaagagtta cacacacgag attgttactc tatggtaccg agctcctgaa 660
gttcttcttg ggcgcagcaa ctactctcta cctgtggata tctggtctgt tgggtgcac 720
ttcgtgtaac tctcccgaaa aatgcgcgtc ttcactggag actccgaact tcagcagctt 780
cttcacatct tcaggttgct tggcaccgcc aatgagacaa tctggcctgg tgttagccag 840

```

```

caccgtgatt ggcacgagtt tcttcaatgg agaccacaag atctgtccct tgctgttccc 900
ggactcagcg cggttggctt agacctctc gccaaaatgt tgggtattcga gccctcaaa 960
agaatctctg ccaaacgcgc cttgagccat acttatttct ctgatgttga taagacagca 1020
acctaaacac aacagaacaa ttcaagagaa ccaggttaacc tctacctgtc caagacgaag 1080
gttaacgc 1088

```

<210> 16

<211> 1627

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

ES 2 345 833 T3

<400> 16

```

5      atccccgggca acgagaagca ttcgagatgg cagatgcgaa ggaggaactg gcgctgcgca 60
      cggaaatgca ctgggctgtg aggagtaacg acgtggggct gttaaggacc attctgaaga 120
      aagacaagca gctcgtgaat gctgcggact atgacaagcg cacgcccttg cacatcgccg 180
      cgtccctgga ttgtgtccct gttgctaaag tcctgcttgc ggaaggagca gaggttgaatg 240
      caaaagacag gtgggggaaa tctccgagag gcgaggcgga gaggtcagga tacatggaga 300
      tggtaaagct gttgaaggat tacggggctg agtcacacgc aggtgccccg aggggccacg 360
      ttgagagtct gattcaggtt gccctccgtg tccttcttaa ccgcgactgg gagatcgctc 420
      cgtcgggagat tgaacttgat accagcgagc tcctcggcga agggcccttt ggagagattc 480
10     ggaaggcgct ttggcgcggc acaccgtcg ctgtgaagac aatcagacct tctctgtcca 540
      acgacagaat ggtcatcaag gacttccagc acgaggtgca attgctcgta aaggttcggc 600
      acccaaacat tgtgcagttc ctcggggctg ttaccctgca aagacctctc atgttagtca 660
      cagagtttct ggcagggggc gatattgcac agttgctgag gagcaaccct aatttggctc 720
      ctgaccgcat cgtgaagtat gccctcgaca tagctcgcgg catgtcttac cttcacaatc 780
      ggagcaagcc catcatccac cgcgatctca aaccccgaaa catcatagtg gacgaagagc 840
15     atgagctgaa ggtcggcgac ttcggactga gcaagctgat cgacgtaaa cttatgcatg 900
      atgtgtacaa gatgacgggg gggactggga gttacagata catggcgctt gaggctctcg 960
      aacatcaacc ctacgacaaa tccgtcgacg tgttttcttt tggaatgata ttatatgaga 1020
      tgtttgaagg cgtcgctccg tttgaggaca aggatgcata cgacgctgcc acactagtgt 1080
      ctagagacga taaggggcca gagatgagag cccaaacgta tccccacaa atgaaggcat 1140
      tgatcgagga ttgctgtgca ccgtataacc cgtatagatt gcccacagac cgtcgctcgc 1200
      aaaaactcga ggtaattgat gaggattgct tattgagatt gcccacagac cgtcgctcgc 1260
20     tcccgagcat cttgcactct cgacgcaatc ctgcagactc gtgattgata gggccacact 1320
      tcgagctgat caatctaagt agtcaatgcc ttactgtgtc aaattcagcc tccgccgaca 1380
      gattggctat ggttcaagtg attggattct ctgcttctcc agagccagaa acgaccccg 1440
      tgcaatttct tctccgacga ccacattgcg acatgaagca ccagactttg gatgtagaag 1500
      gcatggtcta catgctttgc tgtgagcctt gcacgtctcg cagggtgatc tctttaacca 1560
      gcttctagcc tttcgcaatg gctgcacac ttaagaaatc accgagatc gtgatgctcg 1620
25     ttaacgcg                                     1627

```

<210> 17

30 <211> 1441

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

35 <400> 17

```

40     atccccgggct gtgatgtcgg tgtggtgctc tgcaagaaat cagatgacgt cataagcatg 60
      aaaaggatcc agagacgtaa agttcagaga ctcggtcggg agggccaagt cctattggag 120
      agaactcttt tcaagcaact gaggccttcc ccattcgtgc cgcactctct ggccaccctt 180
      attgacagtg acaatgtggc actcgttctt aattgtgtgt tagctggggc tctagaactt 240
      ctacttcggt cacctttaga cgagaactca gctcgttttc tggtcgccaa cgtgggtatta 300
      gccgtcgaa ctttcgcaca ggaatggcgt gtatatcgtg gcatctctcc cgaatgttct 360
      atgatagatc ggaaggagc acttcagctg gttgattttc ggtttgcaaa gcaaatgtcg 420
      gatgagcgca ctttcacagt ctgtggcatg gctgatttct tagcaccgga gatcattcaa 480
45     ggacaaggtc atggcctggc tttctgactg tgggcggtag gtgtgttaat gtacttcatg 540

      ttgcaaaactg agcttccatt tggatcatgg cgggacaacg agcttgaaat ttttggtaga 600
      atagcccgtc ggcagcttac gtttccctca agtttcagcc ctgaagcggg tgacctcatt 660
      gacaagctgc tgggtgtgga cccaaccaag agactgggct gtgacagcca tggatcgctt 720
      gccataaggg aacatccttg gttccgaggt ataaactggg acaagcacct cgattgcagt 780
      gtggaagtcc cttcagagat catgacacgc cttcagttgg ccatagaact tcttcccgtg 840
50     gatgatagtt atcaagtgtt tgatctccaa ccgatgaag acgatccacc atggcttgat 900
      ggctgggtgat agcttgatgg ctctgtagat ccccttctcc aagcatcaat ggcacagtac 960
      cgaatggcta taacagaaga tgcacattaa gtgctccatg aacagatacc gtacgcctta 1020
      ggatttttcg gtcgtcacia atgacggctc tcttgtgagg ttcgaatgtt gtgtcaccgg 1080
      atgatctcta ctggcacaac cctccaggct gaactcttaag gccagctgtt ttaggtgaga 1140
      cgtttacctt ggttcgaact cacgctcgtg ttgttaagcg cgagtcgatg atgtatgaaa 1200
55     tgacgggtgt ccttgaaagt cttgaaaggg aatcaattcg cttatgtgtg tcccttccat 1260
      gtgggtcatta ggaaggggaa ccgctgcact agtcagtaaa cgaacatggc ttcaattgta 1320
      tagcatagcg gttaggtgtt cgtacgaaat gtgggtgcag tcggtgatta taggcgcat 1380
      tctctgaaca tgcacgagaa tctgtctcct gactctccat cattcagtgg tgcgagctcg 1440
      c                                     1441

```

60

<210> 18

<211> 1736

<212> DNA

65

<213> *Physcomitrella patens*

ES 2 345 833 T3

<400> 18

5	atccccgggct	cacgtagtgc	actgaactct	gtctgaattt	taggggatga	gaggtagatt	60
	tgaagaatac	tgggtgtctaa	ttttctgtta	atttttcacc	cttgaggtag	ctcatggatt	120
	tgggagggtga	tcgcattgaga	gtctctcaga	ggcagtcctg	agaatatcaa	tatatgatcat	180
	tggacgtctt	cacagagcag	cacgagcagt	tgcaaaagca	gcagcagcaa	gatgagtatc	240
	agagaacaga	attgaagctc	gagacactgc	caaaaatgtt	aagcaatgcg	accgtgtcat	300
	cttccccctcg	aagcagtcg	gatggacgta	gactacgtac	agtcgcgaat	aagtatgctg	360
	tggaaaggat	gggtgggagt	ggcgcatctt	gcaagggtga	tcaggggctcc	gatttgacga	420
	accacgaggt	tgtggggcatc	aagctggagg	atcagagaac	tgagcacgct	cagttaatgc	480
	acgagtcgcg	cttgtacaac	atattgcggg	gtgggaagg	agtgcaccaac	atgagatggg	540
10	tcggaaaaga	gcaagactac	aatgtgatgg	tgctagacct	attggggccg	aacctgttgc	600
	acctctttaa	gggtgtgtgg	ctaagggtttt	cgttgaagac	cgtgattatg	ctcggttacc	660
	aaatgattga	ccgggtggaa	tacgtgcatt	ctcgagggct	cgttcaccgt	gacctgaagc	720
	cggataactt	cctcatgggc	tcgggtcggc	aaggaaacca	agtggttcatt	atagattttg	780
	gcttggcaca	ggagtagcat	gacccggcaa	cacgaaggca	tatcccttac	cgagatagga	840
	agagctttcac	agggacggca	cggtacgcta	gtaggaatca	gcacagagga	atcgagcaca	900
	gtagaagaga	tgacatagaa	tcacttggtt	acattcttat	gtactttcta	agaggcaatt	960
15	tgccatggca	agggaaaggc	gggcaacgcc	tcactgacca	gaagcaacac	gagtacatgc	1020
	acaacaaaat	caagatgaac	accactgtgg	aggagctttg	tgatgggtat	cccagtcaat	1080
	ttgcccagtt	tttgcaccac	gcgcgaagtc	taggttttcta	cgagcagcct	gactactgtt	1140
	acctccgaag	cttcttccgt	gatcttttca	ttcagaaaaa	attccagctc	gacctgtgtg	1200
	acgactggac	tgtgtatact	caactccccc	agaatggctc	tctgcaatca	gtgcgcagcc	1260
	agaattccgc	tgtctctgcc	catttgcaaa	atcgaccttc	gaatgtatca	tattgtccac	1320
20	ccttgaccac	ctcgaggttc	cgctcgtgag	tggttcggcg	gaattagggc	ttacgttggg	1380
	aggactagt	gttcatcctc	tgctctggta	ctaaaatagc	acaagggttc	ttactgtttc	1440
	cctctctcaa	gtcttacctg	attgtgaatg	ggggtttatg	gagttgagga	tgaggcaact	1500
	aagcagagtg	taggaaaaga	gttgtagact	ctctagtgtg	tagtggtgta	atcaaggctt	1560
	ctagcattgt	gtcggtagct	tgtatggatc	agactagaaa	tgactttatc	cattacaaga	1620
	attttttact	ggaaagccca	tgacggtgat	gatttcaata	cgttgccaca	gcaactttct	1680
25	tctgtaattg	aaatagagga	tctggctctga	gtatgagaag	atgggcatgt	taacgc	1736

<210> 19

<211> 1900

30 <212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 19

35	atccccgggtt	gtcaggagacg	gagagagaag	agagagagag	agagagagag	aggtgtttgtt	60
	tagggggaggc	atgccccgagc	aggattgggtg	ttaaagttcgt	aaggagaagg	gagtagatgc	120
	aagtcgctgc	ttgttcggata	tcggacagct	ggattttgtaa	ataagcggag	aggagggtcgc	180
	gtaatcaggg	gcgtacatcg	atggagccgc	gtgtgggaaa	caagtatcgg	ctgggacgga	240
	aaattgggag	cggttcccttt	ggggagatct	atcttgggac	caatgttcag	accaatgagg	300
40	aggtcggaa	aaagctggaa	agcatcaaga	cgaagcatcc	acaattgctg	tacgagtcca	360
	agctctaccg	gatactacaa	ggaggaactg	ggattcccaa	tatcagatgg	ttcgggatag	420
	aaggagacta	caatgtcttg	gttctggatc	tggtggggcc	aagtctcgaa	gaccttttca	480
	acttctgcag	ccggaagtgc	tctttaaaga	ctgttctcat	gcttgctgac	cagctgatca	540
	acagagtggg	gtatgtgcat	gcgaaaagct	ttcttcatag	agacatcaag	cctgataatt	600
	ttctaattggg	gcttggtagg	cgagcaaac	aggctctacat	tattgatttt	ggctcttgcca	660
45	agaagtaccg	cgacctctcc	acgcatcagc	atattcccta	cagggagaa	aaaaatctga	720
	cagggaactgc	tcggtatgca	agcatcaaca	ctcatcttgg	tattgagcaa	agcagacgag	780
	atgatttggg	atctcttggg	tatgtgctca	tgtacttcc	gagaggcagt	cttccatggc	840
	aaggactgaa	agcgggaacc	aagaagcaga	agtacgagaa	gatcagtgag	aaaaaaatgt	900
	ccacgcccac	tgagggtcctt	tgtaaaaaat	atccttcaga	attcgccctcg	tacttccact	960
	actgcgcgtc	cttgcgtttt	gatgacaaac	ccgactatgc	atatttgaaa	agaatcttcc	1020
	gtgacctctt	tattcgtgag	ggttttcaat	ttgactacgt	ttttgactgg	acaatctctga	1080
50	agtaccagca	gtcacaaatt	tcgggtggca	gttcaactcg	actgggtgct	tctgcagggc	1140
	aaaccagtg	tgaccttgga	actggggcta	cagggaagccg	agacctgcag	cgggccaccg	1200
	aaccaatgga	tccttctcgg	cgcaggcttc	ctggaggagc	aaatggctcc	ggggtcgcaa	1260
	atgctttgga	ctcatctaag	cacaaaagtc	ctggacttga	tgaatctgct	aaggattctg	1320
	ctcttgctgt	tgtgtcagaa	ccagagcgca	tgcatatc	ttcgtatgca	actcgggggg	1380
	gttcttcttc	caggcgagct	gtcctatcta	gcagcaggcc	ctcaggggca	tcagcagaag	1440
	tcgtagattc	ctctcgaaca	gggagcagta	agcttgggtc	caccagctta	cggctcgtcag	1500
55	cagggatgca	gaggagctct	ccagttactt	cggacccaaa	gcggatatct	agccgccatc	1560
	cacaaccgcc	attcgcgaac	ttgaggattt	acgaagccgc	tatcaaggga	gttgaaatcac	1620
	ttctgttgga	gggtggatcaa	agccgttata	agtagcccca	ggcttgggtg	tatatagccg	1680
	ggctctgtct	tctatcaaac	cctcttggtt	tgtagatgag	agttgctcta	catttggcaa	1740
	cagcctgatt	gaggggaaaa	cgggtggtct	gtcctacaat	gggtgctaaga	ctacagggtct	1800
	ctcatactta	ggaatgaatg	gatctctatc	ttgttaccat	caaacccattg	tcagtgctttt	1860
60	gtgtggtagc	tctctgcca	acgatttcta	aggttaacgc			1900

<210> 20

<211> 1217

65 <212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

ES 2 345 833 T3

<400> 20

	gcgttaacgg	gaggaaggtc	gggggaagag	acgcttgagg	ctgctgaaag	gggattcact	60
	cagcgctccc	acccattcgt	caatctggcg	cagaagatcg	gaaaatcggg	ccgacggcca	120
	ggtgttatgt	ccaaggcccg	ggtttacaca	gatgtgaatg	tccaacgtcc	gaaagattat	180
5	tgggactacg	aggccctcac	cgctcaatgg	ggggaccaag	acgattacga	ggtagtgcgt	240
	aaggtggggc	gagggaaata	cagtgaaggt	tttgaaggtg	tcaacgccgt	gaatagttag	300
	cgttgcgtta	tgaagatttt	gaagccagta	aagaaaaaaa	agatcaaaa	agagatcaag	360
	attctgcaaa	acctttgtgg	agggcccaac	attgtgaagc	ttctggacat	tgtccgtgat	420
	cagcaatcga	agacaccocag	cctaattttt	gagtatgtga	acaatactga	tttcaaagtg	480
	ctctacccca	ctcttacaga	ctttgatata	cgatactaca	ttcatgagct	gctcaaggct	540
	ttggactatt	gccattctca	agggattatg	cacagggatg	tgaagccaca	caacgtgatg	600
10	attgaccatg	agcagcggaa	gcttaggctt	attgactggg	gacttgccga	attctatcat	660
	cctggcaaa	agtataatgt	gcgtgttgcc	tctaggtact	tcaagggctc	tgagctgctg	720
	gttgatcttc	aagattatga	ttactctctc	gacatgtgga	gcttggggty	catgtttgcc	780
	ggcatgatat	ttcggaagga	gccattcttt	tatgggcatg	acaattatga	tcaacttggt	840
	aagattgcta	agggtgtggg	aactgatgaa	ttgaattcct	atctaaacaa	ataccgccta	900
15	gagctggacc	cccatttgga	agcactgggt	ggcaggcata	gcaggaaacc	ttggtcaaa	960
	ttcatcaatg	ctgataatca	gcgtctgggt	gttccagagg	ctgtgggattt	tttggaataa	1020
	cttctacgct	acgatactca	agacaggctg	actgcgaagg	aagctatggc	acatccctat	1080
	ttttatcccg	tgaagggtgc	ggagggttagc	aaccgtcgca	gtgcttgata	tgaattgata	1140
	tatctcatat	gggcttctct	gtgattacgt	cccacccggc	taccagggtt	ctcagttgtg	1200
	cgaagcgctg	agctcgc					1217

<210> 21

<211> 1718

<212> DNA

25 <213> *Physcomitrella patens*

<400> 21

	atccccggg	agccatggcg	ccacttgcct	cgccgaatgg	gactgtttga	cttcttcgct	60
	tcgccccgcg	ctcgcccttc	accctctctc	gttcttgtca	cagcctctct	ctcgtctctc	120
30	gtctgtttgg	tgggtaagtt	ttgggagtga	ggaggacgtg	gtcatggaag	aagagcccc	180
	ctctttttgt	gtggactgtc	ggtaaaattg	acctggagcc	tgcgggtcca	tcgctgttgc	240
	ttagattgtg	ggcgggtgct	gttgaaattc	cttgaacttg	ctactgggtc	gaaacgctcg	300
	aattgcgaact	ttgattgaag	gtctgggtgt	tgtcgcggtc	gggatcttac	tcagtctctt	360
	caataggacc	tctgaagcag	tatggagact	agcagtggaa	ctccagaatt	gaaagttata	420
	agtactccga	cctacggagg	tcattacgtg	aaatatgttg	tggcgggaac	tgatttcgaa	480
35	gtcaccgcga	ggtacaagcc	accacttcgt	ccgattgggc	gcggagctta	tggaatcgtc	540
	tgttcactct	ttgataccgt	tacgggtgag	gaggtggcgg	tcaaaaagat	tggaacgcgc	600
	ttcgacaaca	ggatcgatgc	gaagcgaaca	ctgcgtgaaa	taaaactcct	ccggcatatg	660
	gatcatgaaa	acgtcgttgc	cattacagac	atcattcgtc	cccccaactag	ggagaatttc	720
	aacgacgtgt	acattgtata	cgagttgatg	gatacggacc	tacaccagat	cattcgttca	780
	aatcaagctc	tcacagaaga	ccactgtcag	tattttctgt	atcaaatctt	gcggggcttg	840
	aagtacatcc	attcggcgaa	cgtcttgac	cgggacttga	agccaccaca	ccttctcgtc	900
40	aatgccaat	gcgatttgaa	aatcgagat	tttggcttgg	cacgcactct	ctctgaaacy	960
	gatttcatga	ctgagtatgt	tgtaacgagg	tgttacagag	ctccagagct	gctcctgaat	1020
	tgttcagcat	acactgcagc	tattgacatt	tggctgtgtg	gggtgcactt	catggagtgt	1080
	cttaaccgat	ctcgcttggt	ccctgggaga	gactatgtgc	atcagctccg	cctaattaca	1140
	gaactcatcg	gaactcctga	agatagggat	cttgggtttt	tgagaagcga	caatgctagg	1200
	cgtatataca	agcaactcgc	tcgacagtcg	cctattccct	taaccagaa	gttcagagcc	1260
45	attaatcggt	ctgctcttga	tcttgttgaa	aagatgctgg	tctttgatcc	agcgaaaaga	1320
	atcacagtgt	aaagctgcct	ggcgaccctt	tatttagett	cacttcatga	catcaacgat	1380
	gagcctgcct	cgttatctcc	cttcaggttt	gacttogagg	agcccccctat	ctcggaggag	1440
	catatcaagg	atctcatctg	gagggaggct	ctggattgca	gcttaggtcc	tgatgatatg	1500
	gtgcagtaac	ttcacacttc	atctcaagtt	gtaaggccca	ctctcaattc	tttaggtggc	1560
	tacaacgcta	tccggcggtt	gtatggtttt	gcaacttatt	ccccccgctg	tgattacact	1620
	attggatttat	agaatgacaa	ttcgttagtt	cttttccctg	gcgcttatat	tttctctgca	1680
50	catttcatcc	agcagacatt	gttgcctcgg	gttaacgc			1718

<210> 22

<211> 2177

<212> DNA

55 <213> *Physcomitrella patens*

<400> 22

60	atccccgggt	tgtattggct	cggataat	atgttgacaa	ttgatttgtg	aggcttcgta	60
	ttgagtcagc	gagcaggctg	agagttcggc	agcgaagtta	cactcgacct	ggctgaaatt	120
	tggaattgaa	gcgcgtgaag	cttcatctgt	gattttggag	gttgtttgac	tgatgagaag	180
	aggctctcga	gctgagaatg	tttgcaat	aggggcacca	ccggtttgtt	ggagtccctt	240
	gccacttatt	acaattgttg	gtttacaagc	tcgacgagtt	tcaatcgaac	gtagagtttt	300
	agtcgggtcg	aggatctatg	tatcogctca	gcggagaaga	gagcctgatg	ttgcggaagc	360
65	gatcgtgtcg	gatttgacta	gaaagagggt	gacgcgatca	gaactattta	ttccttgtga	420

ES 2 345 833 T3

5 gggaaggatc gaggttccaa tgggtctcac tccgttttct tgtgtcacgg ttcaaggtta 480
 tgtccggggt gtctaccctg acggccacgt cgagaatctg agcaaattct gtagcgtgca 540
 cgatcttctt ctgggttaac cagactacta tgtctgctgg agcaccctct acacaatcac 600
 caatcgtagt gcagcggaag aggtgctcga gtatgggggt accactctcg ttgctgcaac 660
 gccaaatgcc caacttttct tagaacgtca gccgaaggta gtacatcgag gatccaagat 720
 ttgtccacga ttttccaaac atgggggtcca tgtgctgggag ttgcgaagcc cgacgcgatgg 780
 gagccaacag tcacgggaag tttttgatta tcattcagta acgatgcagc agcttgaatc 840
 catacgaaac gagggcccag agcctcacct cgtcggagac cgaccatcga agcaccctaa 900
 gctcgttttc attcggcatt gcttgcgagc acttcgactt cctagaattt caatagacct 960
 aatggaatcg ccactcccta atctttccgg agaggcctta tcgccgacgg caactgccaa 1020
 agacgagatt actcagatga tactaaaaag tgcgcgaagg tccgaattag gaatgtatgt 1080
 10 ttccaagaga caggaattct atcttcgaag agcgcgtagg cggcgtaagt ttgcgtggaa 1140
 gccggttttg cagagcatct ccgagatgaa gcctgtcatg gaattccaca ctccgatggc 1200
 ttaccgggat agtgggtctc cgccgaagaa cgctctacc ccactcttac ctggcccga 1260
 gaacatttca ccgcacagac aagtgaagtgt ccgcgaagg agcagtcctc cgccgaagaa 1320
 cgtctcacca cctcccccag ccgcatttgt agcgcggact gcgtcgaagt attctgctgc 1380
 atctcagcaa gttcaacgaa atcagaggcaa cgcgaaatct ctttatatgg cgtagtttgt 1440
 gtctcgactg aactcctatc tattccccca tcgagataac tgcattcgtt ggataaattt 1500
 15 ctccaacatt ttgtctcttc atctcgaagc agctcctcaa tggccagtaa tatgttacga 1560
 cattgtgcac aactccaatt acgtagcgtt attctgtaac ccacgttcat cgaggtatca 1620
 aggaatggcg tcctaagcac tgctactttg tgctttggta tccggttggt acgagatgct 1680
 atgtcgcacc gtgcctatca gtgggatttt cttgagcgca gatcttgcct ccgcagtttg 1740
 ttccataacg ttttgggtcg tagggggcct agacggtact atcaagcaat gagaagtgtg 1800
 ctgggttggg ttgtacagca atcttttggg ggattgtctt tccatgtag aacatagcga 1860
 ggacacttgc gcctgggtgg cacatcccat agaacatagt gcttcacttc tgggtgtgtc 1920
 20 accactagga tcatatgacc ttctcatcta ttttcgggct ttgtttcgag ctcatgtacc 1980
 atcgactagc gtcactttga ctgcggtgat aatcgtttgt caatttagtg gagctttgta 2040
 gatgatagat gccattttga cagtagcttg gatgctgttt acaagatagc ggcagctaga 2100
 agccttaaac ctttagctac catgtattat ttaaacctat atgaagtga cggctgtgca 2160
 gatattgccg ttaacgc 2177

25 <210> 23
 <211> 1731
 <212> DNA
 30 <213> *Physcomitrella patens*

<400> 23

35 atcccgggcg gtcgagtcgt attaggtgtt gtttcattgt aagggttcgg aagcacgggg 60
 caccgctgat ataccgttcc ccttgaacgt tgatctcacc tttggaagac ctgaattgag 120
 tagcgttcgg aagctgcate gatccggaag agacgatgag taggagagtg agaaggggag 180
 gtctctcgct cgcggtgccg aagcaagaga ctcccgctcag caaatttttg actgccagtg 240
 gaactttcca gtagtatgat atcaagctca accacaccgg gcttcgcgtc gtctcttcag 300
 aacctaaact tcctacgcag acgcagtcct gctccccaga tgggcaactg tcaatagcag 360
 40 acctggagtt agtgcggttc ttgggaaagg gtgcgggttg aacctgcag cttgtccggc 420
 acaaatggac caatgtcaat tatgactga aggcgataca aatgaatatc aacgaacag 480
 tgaggaagca gattgttcag gagctgaaaa tcaaccaagt gacgcaccag cagtgcctt 540
 atatcgtgga atgcttccac tccttctacc acaacggcgt catatccatg atcctagagt 600
 acatggacag gggctcgttg tccgacatta ttaagcaaca aaagcagata cctgagccgt 660
 atttggccgt cattgctagt caagttctga agggatttga atacctacac caagtacagg 720
 acatcataca tcgtgatata aagccctcca acctctcat caatcacaa ggtgaggtca 780
 45 aaatatctga ttttgggtgc agtgctgtgt tggttcattc cttggcccag cgagacacgt 840
 tcggttgggac ttgcacatat atgtcggcag aacgccttca ggggcttcg tatgcatacg 900
 acagtgcact atggagttta ggattgactc ttttggagtg tgcgttgggt acctcccat 960
 acaaacccagc ttgaatggaa gagggttggc gagggttggc gagggttggc gaattgtatg 1020
 ttaatcaacc ccccgagcc gcacccctg acaaatctc ccccgatatt tgttttttta 1080
 ttgaatccct gatccggaaa tgtccagtg aacgaccatc aactactgat ttacttaaac 1140
 50 atccgttctc gcaaaagtac aacgaggaag agtaccattt gagcaagatt ttgtaactta 1200

aagttagcct cgcattggcg gcagagactg tcactaccac aagcctgac caccactgaa 1260
 cttaacggga ctttaacaaa agcatggtcg aactacctcg ccaatccgcc actttctcaa 1320
 tgcccttttc ttatatagtc atatgtggtc aagttgagaa cgatatcaaa tcagattgac 1380
 ggaaaaaaca tcttcaacgc cgtttcccaa ccttatagaa agtggagttt tctcaatgag 1440
 55 ccccatttgt cgctgagAAC gtgcagctca tgaacaatc cataagtgtg ttaatcgggg 1500
 tctttatatta tcacacccat gctagctttt tatgttacct gcactttttc tttccttatt 1560
 gcacagcatc gaacacttct tcgataccca aaacaatatt tccatcttct tttctctttt 1620
 tttcacgtct tgcgacaagg aatttctcga cggagatttt tcaaaccttt tctcaaatgt 1680
 ttttagagtt tttaaactga caattgaaga ggtcggacct accggactcg c 1731

60 <210> 24
 <211> 1407
 <212> DNA
 65 <213> *Physcomitrella patens*

ES 2 345 833 T3

<400> 24

	atccccgggag	aggctgatct	gatgctacag	tttcgtgtgc	agctagtctt	tagagattcg	60
	ggcaacgcac	ttgttgaaga	tcggaaactt	tcaaaatcgg	tcgagtcgta	ttagggtgtg	120
	tttcattgta	agggttcgga	agcacggggc	acggcggtata	taccgttccc	cttgaacggt	180
5	gatctcacct	ttggaagacc	tgaattgagt	agcgtgcgga	agctgcatcg	atccggaaga	240
	gacgatgagt	aggagagtga	gaagggggagg	tcttcgcgtc	gcggtgccga	agcaagagac	300
	tcccgtcagc	aaatttttga	ctgccagtg	aactttccag	gatgatgata	tcaagctcaa	360
	ccacaccggg	cttcgcgtcg	tctcttcaga	acctaacctt	cctacgcaga	cgcagtctag	420
	ctccccagat	gggcaactgt	caatagcaga	cctggagtta	gtgcggttct	taggaaagg	480
	tgcgggtgga	accgtgcagc	ttgtccggca	caaattggacc	aatgtcaatt	atgcactgaa	540
	ggcgatacaa	atgaatatca	acgaaacagt	gaggaagcag	attgttcagg	agctgaaaat	600
10	caaccaagt	acgcaccagc	agtgccttta	tatcgtggaa	tgcttccact	ccttctacca	660
	caacggcgct	atatccatga	tcctagagta	catggacagg	ggctcgttgt	ccgacattat	720
	taagcaacaa	aagcagatac	ctgagccgta	tctggccgtc	attgctagtc	aagttctgaa	780
	gggattggaa	tactacacac	aagtcaggca	catcatacat	cgtgatataa	agccctccaa	840
	cctctcatc	aatcaccaag	gtgaggtcaa	aatatctgat	tttgggtgca	gtgctgtgtt	900
	gggttcatttc	ttggcccagc	gagacacgtt	cgttgggact	tgacacatata	tgctcgccaga	960
	acgccttcag	gggcgttcgt	atgcatacga	cagtgacctt	tggagtttag	gattgactct	1020
15	tttggagtgt	gcgttgggta	ccttcccata	caaacacagt	ggaatggaag	agggttggca	1080
	aaattttctc	atcctcatgg	aatgtatagt	taatcaacc	cccgacgccc	catcccccta	1140
	caaatttctc	cccgaatttt	gttcttttat	tgaatcctgc	atccggaaat	gtcccagtg	1200
	acgaccatca	actactgatt	tacttaaaaca	tcggttccgt	caaaagtaca	acgaggaaga	1260
	gtaccatttg	agcaagattt	tgttaacttaa	agttagccct	gcattggcgtg	cagagactgt	1320
	cactaccaca	agcctgatcc	accactgaac	ttcaagggac	tttaccaaaa	gcattggtcga	1380
20	actacctcgc	caatccgcca	gagctca				1407

<210> 25

<211> 2253

<212> DNA

25 <213> *Physcomitrella patens*

<400> 25

30	atccccgggtg	tagggcggg	aggttcgtatg	caatggggca	gtgttatgga	aagtttgatg	60
	atggaggcgga	aggggaggat	ttgttttgagc	ggcagaaagt	gcaggtttct	aggacgcca	120
	agcatggatc	gtggagcaat	agcaaccgag	ggagcttcaa	caatggcggg	ggggcctcgc	180
	ctatgagagc	caagacgtcg	tccgggagca	gccatccgtc	cccgccgcat	ccctcagcta	240
	gtccgctccc	tcactacacg	agctcccccag	cgccttcgac	cccgccgacg	aacattttca	300
	aaaggcccttt	tctctctcct	tctcccgcca	agcacattca	gtccagttct	gtgaaacggc	360
35	atggcgcgaa	gccgaaagaa	ggaggggcgga	tccctgaggg	tgctgatggt	gagaagccct	420
	tggataagca	tttcggctat	cacaagaact	tcgctactaa	gtatgagctg	gggcatgaag	480
	tcggtcgcgg	gcacttcggt	cacacatggt	acgcgaaagt	acggaagggc	gagcataagg	540
	gacaagccgt	ggcagtgaag	ataatctcga	aagcgaagat	gacgactgct	attgcgatcg	600
40	aggacgtggg	acgagaagt	aaaattttga	aggtcttgac	gggacaccag	aatttggttc	660
	gattctacga	ttcctgcgag	gaccatctaa	atgtgtacat	tgttatggaa	ttatgtgaag	720
	gaggtgaatt	attggatcga	attttgtctc	ggggaggga	gtactcggag	gaagacgcca	780
	aggttgtgtg	gcggcagatt	ttgagcgttg	ttgcgttttg	tcacctgcaa	ggcgttggtc	840
	accgagatct	taagcctgag	aattttctgt	ttaccacgaa	ggatgaatat	gctcagctta	900
	aggccattga	tttggattg	tcagatttca	tcaaaccgga	tgaaagactg	aacgatatcg	960
	ttggaagcgc	atactacgtt	gcgcgggagg	tattgcatag	gttatattca	atggaagctg	1020
45	acgtatggag	cattggagtc	atcacgtaca	ttttgttatg	tggtagtcca	ccgttttggg	1080
	cgccgacoga	gtcgggcatt	tttcgtgcgg	tggtgagggc	tgacccgagc	tttgaagaag	1140
	ccccttggcc	ttccatctct	ccggaagcca	aggatttctg	gaagcgtctc	ctgaataagg	1200
	atatgcggaa	acgcatgact	gctgcacaag	ctttaactca	tccatggatt	cgaagtaaca	1260
	acgtgaagat	acctctggat	atcttagtgt	acagacttgt	gaggaattat	cttcgtgcat	1320
	catccatgag	aaaggctgct	ttgaaggccc	tgtaaaagac	tttaaccgaa	gacgagactt	1380
	tttatctacg	tactcaattt	atgctgctag	aaccaagtaa	caacggctgt	gttacttttg	1440
50	agaatttcag	acaggcactg	ctgaaaaatt	caacagaggc	catgaaagag	tcacgggttt	1500
	ttgaaattct	ggaatcgatg	gatggtcttc	atttcaagaa	aatggacttt	tcagagttct	1560
	gtgcagcggc	cattagtggt	ctccagttag	aagccacaga	acgatgggag	cagcatgtct	1620
	gcgcagctta	cgacatat	gagaaagagg	gtaaccgagt	cattttatct	gatgaacttg	1680
	cgaagagat	gggactagca	ccaaatgtac	cagcccaagt	gtttctagat	tggaattagac	1740
	agtctgatgg	tggcgtgagt	ttcactgggt	tcaccaagct	gctacatgga	atttccagcc	1800
	gtgctatcaa	aaatctccag	cagtgtattct	ttgcacgtga	cagttcggaa	tggaattttt	1860
55	aaagctcttt	agtttcaact	ccgtcttcaa	ctgctgcttc	gcctcgtctc	tgagctgtga	1920
	tagcgtatct	caagcatatg	cacaactcgc	atttttgctg	aagtgtattg	tcacctcaca	1980
	ttagtccggc	ctctggaact	ttcacttatt	tggaattatt	atgtagaagt	ccagatcaaa	2040
	aagcgaaaag	gaatggctag	atattgtcac	aagaagtaac	atagtcfaat	tcaggaagc	2100
	ttaaagcac	attgagtgt	ttttattgga	attcttagat	atggaactga	tgtttccaa	2160
	ggaagggtct	atgaggcaga	gagtggaatg	tatagactgg	catatgggtta	agtgaatcatt	2220
60	ggactgccgt	tctactccgg	ttgtcgttaa	cgc			2253

<210> 26

<211> 2230

<212> DNA

65 <213> *Physcomitrella patens*

ES 2 345 833 T3

<400> 26

```

5      atccccgggcg aactcgcgac tgagattcca acttggaagg gcctcgcgta agaccggatc 60
      tcgttttcta cgcttttgcg cctcgcgata tttgtacatt gtttctctctg gttttattctg 120
      attcgcgctc tgaaaatgtg aacgggctgc aagcttggtt ttggagcaac gttggagcat 180
      tgaaggggtg cgctcgctcc tgccttctgc tctggcctat gtcattgacga 240
      cgtgaaggag aggttttgag ggttttgtaa gtgatataat cctccccgag gagatttctg 300
      tgagttgatt aacttgatc agcgacatgg ggaacactag ttcgagggga tcgaggaagt 360
      ccactcggca ggtgaatcag ggagtcgggt ctcaagacac ccgagagaag aatgatagcg 420
      tcaatccaaa gacgagacag ggtggtagcg ttggcgcaaa caactatggc ggaaagccaa 480
      gcagtgggtc tcaggccgga gaacgatcca cctctgcgcc cgctgctctg ccgagggcga 540
10     agccagcatc gaggtcagta tccgggtgtt tgggtaagcc gctgtcagat attcgtcaat 600
      cttacatcct gggacgggag cttggccgag ggcagttcgg agtgacttac ttgtgtactg 660
      acaagatgac gaatgaggcg tacgcgtgca agagcatcgc caaacggaaa ctgaccagta 720
      aggagatat cgaggatgtt aagcgggagg ttcagattat gcattcacctg tcggggacac 780
      ccaatatcgt ggtgttaaag gatgtgttcg aggacaagca ttccgtgcac cttgtgatgg 840
      agctctgtgc aggtggcgag ctcttcgacg gcattcattg caaggggcat tacagtgcgc 900
15     gccgcgctgc cgatatgtgc agagtcatcg tcaatgtggt gcacagatgc cactcattag 960
      ggggtcttcca tcgggatctc aagccagaga atttctctgt ggccagcaag gctgaggatg 1020
      cgctctgtaa ggccacagac ttcggtctgt caactttctt taagccagga gatgtgttcc 1080
      aggatattgt tggaaagtgc tattacgtgg cccctgaagt tttgaagaga agttatggtc 1140
      ctgaagctga tgtttggagt gcaggcgtga ttgtgtacat tctgctgtgt ggtgtacccc 1200
      ccttctgggc tgaactgag caggggtatct ttgacgctgt gctcaagggt cacatagact 1260

20     tcgagaacga tccatggcgg aaaatctcca acggggctaa ggatttggtg aggaatatgc 1320
      taaaccttaa cgtgaagata cgtctgacgg cacagcaggt gttgaacctt ccatggatga 1380
      aggaagatgg tgaatgctca gacgtgccac tcgacaatgc ggtgttgacc agactgaaaa 1440
      atttctcagc cgccaacaag atgaaaaagc tggcgctgaa ggtgattgca gagagtctgt 1500
      cggaggaaga gatcgtgggg ttgagggaga tgttcaaata catagataca gacaacagcg 1560
      gcacgggtgac gttcgaggag ctttaaggaa ggttgctgaa gcagggtcca aaacttaagt 1620
25     aatcggacat caggaaacta atggaagctg cagatgtcga tggaaacggc aagatcgact 1680
      tcaacgagtt catatcgcca acaatgcaca tgaacaagac ggagaaagag gatcaccttt 1740
      gggcagcatt catgcatttc gacacggaca atagcgggta tatcaccatc gacgagcttc 1800
      aggaagcaat ggagaagaat ggaatgggag atcctgagac catccaagag atcatcagcg 1860
      aggtgggacac agacaacgac ggaagaatag actacgacga gttcgtagcc atgatgcgca 1920
      agggcaatcc tggcgctgaa aacggaggaa cgggtgaacaa gccacagacac aggtagtagc 1980
      tcctggttgc caatttgacg acgggttttg caaggcaaca gtatgtgttg ttactgttca 2040
30     gattcaggtt cggatattgt catgccctcc tttgtctcga acaatggact ctaggccttt 2100
      ccaatggaaa agctattcca acagggtttg cataacgtgt agtagaatga aagcattgcc 2160
      tgggggggtg acagtgcctg tgatcttctg gagttctcgt aggatggctt cgggtggatc 2220
      tcgttaacgc                                     2230

```

35 <210> 27

<211> 749

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

40

<400> 27

```

45     Met Gly Val Asp Met Lys Ala Pro Ala Lys Gln Ser Leu Gly Val Gly
      1          5          10         15

      Leu Leu Leu Cys Ser Val Val Ile Leu Ser Val Val Ser Ser Val Tyr
      20         25         30

      Gly Gln Val Gln Thr Asp Pro Val Asp Thr Thr Gly Leu Ile Ser Met
      35         40         45

50     Trp Tyr Asp Leu Lys Gln Ser Gln Ser Leu Thr Gly Trp Thr Gln Asn
      50         55         60

      Ala Ser Asn Pro Cys Gly Gln Gln Trp Tyr Gly Val Val Cys Asp Gly
      65         70         75         80

55     Ser Ser Val Thr Glu Ile Lys Ile Gly Ser Arg Gly Leu Asn Gly Asn
      85         90         95

      Phe Asn Pro Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Phe Lys Lys Leu Arg Ile Phe
      100        105        110

      Asp Ala Ser Asn Asn Asn Ile Glu Gly Asn Ile Pro Gln Gln Phe Pro
      115        120        125

      Thr Ser Leu Thr Gln Met Ile Leu Asn Asn Asn Lys Leu Thr Gly Gly
      130        135        140

      Leu Pro Gln Phe Asp Gln Leu Gly Ala Leu Thr Val Val Asn Leu Ser
      145        150        155        160

65     Asn Asn Asn Leu Thr Gly Asn Met Asn Pro Asn Tyr Phe Asn Val Ile
      165        170        175

```

ES 2 345 833 T3

Val Asn Val Glu Thr Phe Asp Val Ser Tyr Asn Gln Leu Glu Gly Thr
 180 185 190
 Leu Pro Asp Ser Ile Leu Asn Leu Ala Lys Leu Arg Phe Leu Asn Leu
 195 200 205
 Gln Asn Asn Lys Phe Asn Gly Lys Leu Pro Asp Asp Phe Ser Arg Leu
 210 215 220
 Lys Asn Leu Gln Thr Phe Asn Ile Glu Asn Asp Gln Phe Thr Gly Asn
 225 230 235 240
 Tyr Pro Ser Gly Leu Pro Ser Asn Ser Arg Val Gly Gly Asn Arg Leu
 245 250 255
 Thr Phe Pro Pro Pro Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Pro Arg Thr Pro
 260 265 270
 Ser Pro Ser Gly Thr Ser Asn Gly Ser Ser Ser His Leu Pro Leu Gly
 275 280 285
 Ala Ile Ile Gly Ile Ala Ala Gly Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Leu
 290 295 300
 Ala Leu Gly Ile Cys Leu Cys Cys Arg Lys Arg Ser Lys Lys Ala Leu
 305 310 315 320
 Gly Asp Pro Glu Ala Thr Thr Ser Ser Arg Arg Pro Trp Phe Thr Pro
 325 330 335
 Pro Leu Ser Ala Lys Ser Gln Ser Asp Pro Ser Lys Ser Ile Asp Lys
 340 345 350
 Thr Thr Lys Arg Asn Ile Phe Gly Ser Ser Lys Ser Glu Lys Lys Ser
 355 360 365
 Ser Lys His Arg Val Phe Glu Pro Ala Pro Leu Asp Lys Gly Ala Ala
 370 375 380
 Asp Glu Pro Val Val Lys Ala Ser Pro Pro Val Lys Val Leu Lys Ala
 385 390 395 400
 Pro Pro Ser Phe Lys Gly Ile Ser Gly Leu Gly Ala Gly His Ser Lys
 405 410 415
 Ala Thr Ile Gly Lys Val Asn Lys Ser Asn Ile Ala Ala Thr Pro Phe
 420 425 430
 Ser Val Ala Asp Leu Gln Ala Ala Thr Asn Ser Phe Ser Gln Asp Asn
 435 440 445
 Leu Ile Gly Glu Gly Ser Met Gly Arg Val Tyr Arg Ala Glu Phe Pro
 450 455 460
 Asn Gly Gln Val Leu Ala Val Lys Lys Ile Asp Ser Ser Ala Ser Met
 465 470 475 480

ES 2 345 833 T3

Val Gln Asn Glu Asp Asp Phe Leu Ser Val Val Asp Ser Leu Ala Arg
 485 490 495
 Leu Gln His Ala Asn Thr Ala Glu Leu Val Gly Tyr Cys Ile Glu His
 500 505 510
 Asp Gln Arg Leu Leu Val Tyr Glu Tyr Val Ser Arg Gly Thr Leu Asn
 515 520 525
 Glu Leu Leu His Phe Ser Gly Glu Asn Thr Lys Ala Leu Ser Trp Asn
 530 535 540
 Val Arg Ile Lys Ile Ala Leu Gly Ser Ala Arg Ala Leu Glu Tyr Leu
 545 550 555 560
 His Glu Val Cys Ala Pro Pro Val Val His His Asn Phe Lys Ser Ala
 565 570 575
 Asn Ile Leu Leu Asp Asp Glu Leu Asn Pro His Val Ser Asp Cys Gly
 580 585 590
 Leu Ala Ala Leu Ala Pro Ser Gly Ser Glu Arg Gln Val Ser Ala Gln
 595 600 605
 Met Leu Gly Ser Phe Gly Tyr Ser Ala Pro Glu Tyr Ala Met Ser Gly
 610 615 620
 Thr Tyr Thr Val Lys Ser Asp Val Tyr Ser Phe Gly Val Val Met Leu
 625 630 635 640
 Glu Leu Leu Thr Gly Arg Lys Ser Leu Asp Ser Ser Arg Pro Arg Ser
 645 650 655
 Glu Gln Ser Leu Val Arg Trp Ala Thr Pro Gln Leu His Asp Ile Asp
 660 665 670
 Ala Leu Ala Arg Met Val Asp Pro Ser Leu Lys Gly Ile Tyr Pro Ala
 675 680 685
 Lys Ser Leu Ser Arg Phe Ala Asp Ile Val Ala Leu Cys Val Gln Pro
 690 695 700
 Glu Pro Glu Phe Arg Pro Pro Met Ser Glu Val Val Gln Ala Leu Val
 705 710 715 720
 Arg Leu Met Gln Arg Ala Ser Leu Ser Lys Arg Arg Ser Glu Ser Ala
 725 730 735
 Val Gly Ile Glu Ser Asn Glu Pro Ser Glu Thr Ser Leu
 740 745

<210> 28

<211> 308

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

ES 2 345 833 T3

<400> 28

5 Met Ser Val Ser Gly Met Asp Asn Tyr Glu Lys Leu Glu Lys Val Gly
1 5 10 15
Glu Gly Thr Tyr Gly Lys Val Tyr Lys Ala Arg Asp Lys Arg Ser Gly
20 25 30
10 Gln Leu Val Ala Leu Lys Lys Thr Arg Leu Glu Met Glu Glu Glu Gly
35 40 45
Val Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Val Ser Leu Leu Gln Met Leu Ser
50 55 60
15 His Ser Met Tyr Ile Val Arg Leu Leu Cys Val Glu His Val Glu Lys
65 70 75 80
Gly Ser Lys Pro Met Leu Tyr Leu Val Phe Glu Tyr Met Asp Thr Asp
85 90 95
20 Leu Lys Lys Tyr Ile Asp Leu His Gly Arg Gly Pro Ser Gly Lys Pro
100 105 110
Leu Pro Pro Lys Val Val Gln Ser Phe Met Tyr Gln Leu Cys Thr Gly
115 120 125
Leu Ala His Cys His Gly His Gly Val Met His Arg Asp Leu Lys Pro
130 135 140
25 Gln Asn Leu Leu Val Asp Lys Gln Thr Arg Arg Leu Lys Ile Ala Asp
145 150 155 160
Leu Gly Leu Gly Arg Ala Phe Thr Val Pro Met Lys Ser Tyr Thr His
165 170 175
30 Glu Ile Val Thr Leu Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Val Leu Leu Gly Ala
180 185 190
Thr His Tyr Ser Leu Pro Val Asp Ile Trp Ser Val Gly Cys Ile Phe
195 200 205
35 Ala Glu Leu Val Arg Lys Met Pro Leu Phe Thr Gly Asp Ser Glu Leu
210 215 220
Gln Gln Leu Leu His Ile Phe Arg Leu Leu Gly Thr Pro Asn Glu Thr
225 230 235 240
Ile Trp Pro Gly Val Ser Gln His Arg Asp Trp His Glu Phe Pro Gln
245 250 255
40 Trp Arg Pro Gln Asp Leu Ser Leu Ala Val Pro Gly Leu Ser Ala Val
260 265 270
Gly Leu Asp Leu Leu Ala Lys Met Leu Val Phe Glu Pro Ser Lys Arg
275 280 285
45 Ile Ser Ala Lys Ala Ala Leu Ser His Thr Tyr Phe Ala Asp Val Asp
290 295 300
Lys Thr Ala Thr
305

50

<210> 29

<211> 425

55

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

60

65

ES 2 345 833 T3

<400> 29

5	Met	Ala	Asp	Ala	Lys	Glu	Glu	Leu	Ala	Leu	Arg	Thr	Glu	Met	His	Trp	1	5	10	15
	Ala	Val	Arg	Ser	Asn	Asp	Val	Gly	Leu	Leu	Arg	Thr	Ile	Leu	Lys	Lys	20	25	30	
10	Asp	Lys	Gln	Leu	Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Tyr	Asp	Lys	Arg	Thr	Pro	Leu	35	40	45	
	His	Ile	Ala	Ala	Ser	Leu	Asp	Cys	Val	Pro	Val	Ala	Lys	Val	Leu	Leu	50	55	60	
15	Ala	Glu	Gly	Ala	Glu	Leu	Asn	Ala	Lys	Asp	Arg	Trp	Gly	Lys	Ser	Pro	65	70	75	80
	Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Ser	Ala	Gly	Tyr	Met	Glu	Met	Val	Lys	Leu	Leu	85	90	95	
	Lys	Asp	Tyr	Gly	Ala	Glu	Ser	His	Ala	Gly	Ala	Pro	Arg	Gly	His	Val	100	105	110	
20	Glu	Ser	Leu	Ile	Gln	Val	Ala	Pro	Pro	Leu	Pro	Ser	Asn	Arg	Asp	Trp	115	120	125	
	Glu	Ile	Ala	Pro	Ser	Glu	Ile	Glu	Leu	Asp	Thr	Ser	Glu	Leu	Ile	Gly	130	135	140	
25	Lys	Gly	Ala	Phe	Gly	Glu	Ile	Arg	Lys	Ala	Leu	Trp	Arg	Gly	Thr	Pro	145	150	155	160
	Val	Ala	Val	Lys	Thr	Ile	Arg	Pro	Ser	Leu	Ser	Asn	Asp	Arg	Met	Val	165	170	175	
30	Ile	Lys	Asp	Phe	Gln	His	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Val	Lys	Val	Arg	His	180	185	190	
	Pro	Asn	Ile	Val	Gln	Phe	Leu	Gly	Ala	Val	Thr	Arg	Gln	Arg	Pro	Leu	195	200	205	
35	Met	Leu	Val	Thr	Glu	Phe	Leu	Ala	Gly	Gly	Asp	Leu	His	Gln	Leu	Leu	210	215	220	
	Arg	Ser	Asn	Pro	Asn	Leu	Ala	Pro	Asp	Arg	Ile	Val	Lys	Tyr	Ala	Leu	225	230	235	240
	Asp	Ile	Ala	Arg	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	His	Asn	Arg	Ser	Lys	Pro	Ile	245	250	255	
40	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Lys	Pro	Arg	Asn	Ile	Ile	Val	Asp	Glu	Glu	His	260	265	270	
	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Asp	Phe	Gly	Leu	Ser	Lys	Leu	Ile	Asp	Val	Lys	275	280	285	
45	Leu	Met	His	Asp	Val	Tyr	Lys	Met	Thr	Gly	Gly	Thr	Gly	Ser	Tyr	Arg	290	295	300	
	Tyr	Met	Ala	Pro	Glu	Val	Phe	Glu	His	Gln	Pro	Tyr	Asp	Lys	Ser	Val	305	310	315	320
50	Asp	Val	Phe	Ser	Phe	Gly	Met	Ile	Leu	Tyr	Glu	Met	Phe	Glu	Gly	Val	325	330	335	
	Ala	Pro	Phe	Glu	Asp	Lys	Asp	Ala	Tyr	Asp	Ala	Ala	Thr	Leu	Val	Ala	340	345	350	
55	Arg	Asp	Asp	Lys	Arg	Pro	Glu	Met	Arg	Ala	Gln	Thr	Tyr	Pro	Pro	Gln	355	360	365	
	Met	Lys	Ala	Leu	Ile	Glu	Asp	Cys	Trp	Ser	Pro	Tyr	Thr	Pro	Lys	Arg	370	375	380	
60	Pro	Pro	Phe	Val	Glu	Ile	Val	Lys	Lys	Leu	Glu	Val	Met	Tyr	Glu	Asp	385	390	395	400
	Cys	Leu	Leu	Arg	Leu	Pro	Lys	Asp	Arg	Arg	His	Leu	Arg	Asp	Ile	Leu	405	410	415	
65	His	Leu	Arg	Arg	Asn	Pro	Ala	Asp	Ser								420	425		

ES 2 345 833 T3

<210> 30

<211> 283

<212> PRT

5 <213> *Physcomitrella patens*

<400> 30

10

Met Lys Arg Tyr Gln Arg Arg Lys Val Gln Arg Leu Gly Arg Glu Gly
1 5 10 15

Gln Val Leu Leu Glu Arg Thr Leu Phe Lys Gln Leu Arg Pro Ser Pro
20 25 30

15

Phe Val Pro His Leu Leu Ala Thr Pro Ile Asp Ser Asp Asn Val Ala
35 40 45

Leu Val Leu Asn Cys Val Leu Ala Gly Pro Leu Glu Leu Leu Leu Arg
50 55 60

20

Ser Pro Leu Asp Glu Asn Ser Ala Arg Phe Leu Val Ala Asn Val Val
65 70 75 80

Leu Ala Val Glu Leu Leu His Lys Asp Gly Val Val Tyr Arg Gly Ile
85 90 95

25

Ser Pro Asp Val Leu Met Ile Asp Arg Lys Gly Arg Leu Gln Leu Val
100 105 110

Asp Phe Arg Phe Ala Lys Gln Met Ser Asp Glu Arg Thr Phe Thr Val
115 120 125

30

Cys Gly Met Ala Asp Phe Leu Ala Pro Glu Ile Ile Gln Gly Gln Gly
130 135 140

His Gly Leu Ala Ser Asp Trp Trp Ala Val Gly Val Leu Met Tyr Phe
145 150 155 160

35

Met Leu Gln Thr Glu Leu Pro Phe Gly Ser Trp Arg Asp Asn Glu Leu
165 170 175

Glu Ile Phe Gly Arg Ile Ala Arg Arg Gln Leu Thr Phe Pro Ser Ser
180 185 190

40

Phe Ser Pro Glu Ala Val Asp Leu Ile Asp Lys Leu Leu Val Val Asp
195 200 205

Pro Thr Lys Arg Leu Gly Cys Asp Ser His Gly Ser Leu Ala Ile Arg
210 215 220

Glu His Pro Trp Phe Arg Gly Ile Asn Trp Asp Lys His Leu Asp Cys
225 230 235 240

45

Ser Val Glu Val Pro Ser Glu Ile Met Thr Arg Leu Gln Leu Ala Ile
245 250 255

Asp Phe Leu Pro Val Asp Asp Ser Tyr Gln Val Phe Asp Leu Gln Pro
260 265 270

50

Asp Glu Asp Asp Pro Pro Trp Leu Asp Gly Trp
275 280

55 <210> 31

<211> 417

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

60

65

ES 2 345 833 T3

<400> 31

```

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

      Glu Tyr Gln Tyr Arg Ser Leu Asp Val Phe Thr Glu Gln His Glu Gln
      20          25          30

      Leu Gln Lys Gln Gln Gln Gln Asp Glu Tyr Gln Arg Thr Glu Leu Lys
10      35          40          45

      Leu Glu Thr Leu Pro Lys Met Leu Ser Asn Ala Thr Val Ser Ser Ser
      50          55          60

      Pro Arg Ser Ser Pro Asp Gly Arg Arg Leu Arg Thr Val Ala Asn Lys
15      65          70          75          80

      Tyr Ala Val Glu Gly Met Val Gly Ser Gly Ala Phe Cys Lys Val Tyr
      85          90          95

      Gln Gly Ser Asp Leu Thr Asn His Glu Val Val Gly Ile Lys Leu Glu
20      100         105         110

      Asp Thr Arg Thr Glu His Ala Gln Leu Met His Glu Ser Arg Leu Tyr
      115         120         125

      Asn Ile Leu Arg Gly Gly Lys Gly Val Pro Asn Met Arg Trp Phe Gly
25      130         135         140

      Lys Glu Gln Asp Tyr Asn Val Met Val Leu Asp Leu Leu Gly Pro Asn
      145         150         155         160

      Leu Leu His Leu Phe Lys Val Cys Gly Leu Arg Phe Ser Leu Lys Thr
      165         170         175

30      Val Ile Met Leu Gly Tyr Gln Met Ile Asp Arg Val Glu Tyr Val His
      180         185         190

      Ser Arg Gly Leu Val His Arg Asp Leu Lys Pro Asp Asn Phe Leu Met
      195         200         205

35      Gly Cys Gly Arg Gln Gly Asn Gln Val Phe Ile Ile Asp Phe Gly Leu
      210         215         220

      Ala Lys Glu Tyr Met Asp Pro Ala Thr Arg Arg His Ile Pro Tyr Arg
      225         230         235         240

40      Asp Arg Lys Ser Phe Thr Gly Thr Ala Arg Tyr Ala Ser Arg Asn Gln
      245         250         255

      His Arg Gly Ile Glu His Ser Arg Arg Asp Asp Ile Glu Ser Leu Gly
      260         265         270

      Tyr Ile Leu Met Tyr Phe Leu Arg Gly Asn Leu Pro Trp Gln Gly Lys
45      275         280         285

      Gly Gly Gln Arg Leu Thr Asp Gln Lys Gln His Glu Tyr Met His Asn
      290         295         300

      Lys Ile Lys Met Asn Thr Thr Val Glu Glu Leu Cys Asp Gly Tyr Pro
50      305         310         315         320

      Ser Gln Phe Ala Asp Phe Leu His His Ala Arg Ser Leu Gly Phe Tyr
      325         330         335

      Glu Gln Pro Asp Tyr Cys Tyr Leu Arg Ser Leu Phe Arg Asp Leu Phe
      340         345         350

55      Ile Gln Lys Lys Phe Gln Leu Asp His Val Tyr Asp Trp Thr Val Tyr
      355         360         365

      Thr Gln Leu Pro Gln Asn Gly Ser Leu Gln Ser Val Arg Ser Gln Asn
      370         375         380

60      Ser Ala Ala Ser Ser His Leu Gln Asn Arg Pro Ser Asn Val Ser Tyr
      385         390         395         400

      Cys Pro Pro Leu Thr Lys Ser Glu Phe Arg Arg Glu Val Val Ala Ala
      405         410         415

65      Asn

```

ES 2 345 833 T3

<210> 32

<211> 484

<212> PRT

5 <213> *Physcomitrella patens*

<400> 32

10

Met Glu Pro Arg Val Gly Asn Lys Tyr Arg Leu Gly Arg Lys Ile Gly
1 5 10 15

15

Ser Gly Ser Phe Gly Glu Ile Tyr Leu Gly Thr Asn Val Gln Thr Asn
20 25 30

Glu Glu Val Gly Ile Lys Leu Glu Ser Ile Lys Thr Lys His Pro Gln
35 40 45

20

Leu Leu Tyr Glu Ser Lys Leu Tyr Arg Ile Leu Gln Gly Gly Thr Gly
50 55 60

Ile Pro Asn Ile Arg Trp Phe Gly Ile Glu Gly Asp Tyr Asn Val Leu
65 70 75 80

Val Leu Asp Leu Leu Gly Pro Ser Leu Glu Asp Leu Phe Asn Phe Cys
85 90 95

25

Ser Arg Lys Phe Ser Leu Lys Thr Val Leu Met Leu Ala Asp Gln Leu
100 105 110

Ile Asn Arg Val Glu Tyr Val His Ala Lys Ser Phe Leu His Arg Asp
115 120 125

30

Ile Lys Pro Asp Asn Phe Leu Met Gly Leu Gly Arg Arg Ala Asn Gln
130 135 140

Val Tyr Ile Ile Asp Phe Gly Leu Ala Lys Lys Tyr Arg Asp Pro Ser
145 150 155 160

35

Thr His Gln His Ile Pro Tyr Arg Glu Asn Lys Asn Leu Thr Gly Thr
165 170 175

Ala Arg Tyr Ala Ser Ile Asn Thr His Leu Gly Ile Glu Gln Ser Arg
180 185 190

40

Arg Asp Asp Leu Glu Ser Leu Gly Tyr Val Leu Met Tyr Phe Leu Arg
195 200 205

Gly Ser Leu Pro Trp Gln Gly Leu Lys Ala Gly Thr Lys Lys Gln Lys
210 215 220

45

50

55

60

65

ES 2 345 833 T3

Tyr Glu Lys Ile Ser Glu Lys Lys Met Ser Thr Pro Ile Glu Val Leu
 225 230 235 240
 Cys Lys Asn Tyr Pro Ser Glu Phe Ala Ser Tyr Phe His Tyr Cys Arg
 245 250 255
 Ser Leu Arg Phe Asp Asp Lys Pro Asp Tyr Ala Tyr Leu Lys Arg Ile
 260 265 270
 Phe Arg Asp Leu Phe Ile Arg Glu Gly Phe Gln Phe Asp Tyr Val Phe
 275 280 285
 Asp Trp Thr Ile Leu Lys Tyr Gln Gln Ser Gln Ile Ser Gly Gly Ser
 290 295 300
 Ser Thr Arg Leu Gly Ala Ser Ala Gly Gln Thr Ser Gly Ala Leu Gly
 305 310 315 320
 Thr Gly Ala Thr Gly Ser Arg Asp Leu Gln Arg Pro Thr Glu Pro Met
 325 330 335
 Asp Pro Ser Arg Arg Arg Leu Pro Gly Gly Ala Asn Gly Ser Gly Val
 340 345 350
 Ala Asn Ala Leu Asp Ser Ser Lys His Lys Ser Pro Gly Leu Asp Glu
 355 360 365
 Ser Ala Lys Asp Ser Ala Leu Ala Val Val Ser Glu Pro Glu Arg Met
 370 375 380
 His Thr Ser Ser Tyr Ala Thr Arg Gly Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala
 385 390 395 400
 Val Leu Ser Ser Ser Arg Pro Ser Gly Ala Ser Ala Glu Val Val Asp
 405 410 415
 Ser Ser Arg Thr Gly Ser Ser Lys Leu Gly Pro Thr Ser Leu Arg Ser
 420 425 430
 Ser Ala Gly Met Gln Arg Ser Ser Pro Val Thr Ser Asp Pro Lys Arg
 435 440 445
 Ile Ser Ser Arg His Pro Gln Pro Pro Ser Ala Asn Leu Arg Ile Tyr
 450 455 460
 Glu Ala Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Leu Ser Val Glu Val Asp Gln
 465 470 475 480
 Ser Arg Tyr Lys

<210> 33

<211> 333

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

ES 2 345 833 T3

<400> 33

```

5      Met Ser Lys Ala Arg Val Tyr Thr Asp Val Asn Val Gln Arg Pro Lys
      1          5          10          15

      Asp Tyr Trp Asp Tyr Glu Ala Leu Thr Val Gln Trp Gly Asp Gln Asp
          20          25          30

10     Asp Tyr Glu Val Val Arg Lys Val Gly Arg Gly Lys Tyr Ser Glu Val
      35          40          45

      Phe Glu Gly Val Asn Ala Val Asn Ser Glu Arg Cys Val Met Lys Ile
      50          55          60

      Leu Lys Pro Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Arg Glu Ile Lys Ile Leu
      65          70          75          80

15     Gln Asn Leu Cys Gly Gly Pro Asn Ile Val Lys Leu Leu Asp Ile Val
      85          90          95

      Arg Asp Gln Gln Ser Lys Thr Pro Ser Leu Ile Phe Glu Tyr Val Asn
      100         105         110

20     Asn Thr Asp Phe Lys Val Leu Tyr Pro Thr Leu Thr Asp Phe Asp Ile
      115         120         125

      Arg Tyr Tyr Ile His Glu Leu Leu Lys Ala Leu Asp Tyr Cys His Ser
      130         135         140

25     Gln Gly Ile Met His Arg Asp Val Lys Pro His Asn Val Met Ile Asp
      145         150         155         160

      His Glu Gln Arg Lys Leu Arg Leu Ile Asp Trp Gly Leu Ala Glu Phe
      165         170         175

30     Tyr His Pro Gly Lys Glu Tyr Asn Val Arg Val Ala Ser Arg Tyr Phe
      180         185         190

      Lys Gly Pro Glu Leu Leu Val Asp Leu Gln Asp Tyr Asp Tyr Ser Leu
      195         200         205

35     Asp Met Trp Ser Leu Gly Cys Met Phe Ala Gly Met Ile Phe Arg Lys
      210         215         220

      Glu Pro Phe Phe Tyr Gly His Asp Asn Tyr Asp Gln Leu Val Lys Ile
      225         230         235         240

      Ala Lys Val Leu Gly Thr Asp Glu Leu Asn Ser Tyr Leu Asn Lys Tyr
      245         250         255

40     Arg Leu Glu Leu Asp Pro His Leu Glu Ala Leu Val Gly Arg His Ser
      260         265         270

      Arg Lys Pro Trp Ser Lys Phe Ile Asn Ala Asp Asn Gln Arg Leu Val
      275         280         285

45     Val Pro Glu Ala Val Asp Phe Leu Asp Lys Leu Leu Arg Tyr Asp His
      290         295         300

      Gln Asp Arg Leu Thr Ala Lys Glu Ala Met Ala His Pro Tyr Phe Tyr
      305         310         315         320

50     Pro Val Lys Val Ser Glu Val Ser Asn Arg Arg Ser Ala
      325         330

```

55 <210> 34

<211> 375

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

60

65

ES 2 345 833 T3

<400> 34

```

5      Met Glu Thr Ser Ser Gly Thr Pro Glu Leu Lys Val Ile Ser Thr Pro
      1              5              10              15

      Thr Tyr Gly Gly His Tyr Val Lys Tyr Val Val Ala Gly Thr Asp Phe
              20              25              30

10     Glu Val Thr Ala Arg Tyr Lys Pro Pro Leu Arg Pro Ile Gly Arg Gly
      35              40              45

      Ala Tyr Gly Ile Val Cys Ser Leu Phe Asp Thr Val Thr Gly Glu Glu
      50              55              60

      Val Ala Val Lys Lys Ile Gly Asn Ala Phe Asp Asn Arg Ile Asp Ala
      65              70              75              80

15     Lys Arg Thr Leu Arg Glu Ile Lys Leu Leu Arg His Met Asp His Glu
      85              90              95

      Asn Val Val Ala Ile Thr Asp Ile Ile Arg Pro Pro Thr Arg Glu Asn
      100             105             110

20     Phe Asn Asp Val Tyr Ile Val Tyr Glu Leu Met Asp Thr Asp Leu His
      115             120             125

      Gln Ile Ile Arg Ser Asn Gln Ala Leu Thr Glu Asp His Cys Gln Tyr
      130             135             140

25     Phe Leu Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala Asn
      145             150             155             160

      Val Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Thr Asn Leu Leu Val Asn Ala Asn
      165             170             175

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

30     Thr Asp Phe Met Thr Glu Tyr Val Val Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro
      195             200             205

      Glu Leu Leu Leu Asn Cys Ser Ala Tyr Thr Ala Ala Ile Asp Ile Trp
      210             215             220

35     Ser Val Gly Cys Ile Phe Met Glu Leu Leu Asn Arg Ser Ala Leu Phe
      225             230             235             240

      Pro Gly Arg Asp Tyr Val His Gln Leu Arg Leu Ile Thr Glu Leu Ile
      245             250             255

40     Gly Thr Pro Glu Asp Arg Asp Leu Gly Phe Leu Arg Ser Asp Asn Ala
      260             265             270

      Arg Arg Tyr Ile Lys His Leu Pro Arg Gln Ser Pro Ile Pro Leu Thr
      275             280             285

45     Gln Lys Phe Arg Gly Ile Asn Arg Ser Ala Leu Asp Leu Val Glu Lys
      290             295             300

      Met Leu Val Phe Asp Pro Ala Lys Arg Ile Thr Val Glu Ala Ala Leu
      305             310             315             320

50     Ala His Pro Tyr Leu Ala Ser Leu His Asp Ile Asn Asp Glu Pro Ala
      325             330             335

      Ser Val Ser Pro Phe Glu Phe Asp Phe Glu Glu Pro Pro Ile Ser Glu
      340             345             350

55     Glu His Ile Lys Asp Leu Ile Trp Arg Glu Ala Leu Asp Cys Ser Leu
      355             360             365

      Gly Pro Asp Asp Met Val Gln
      370             375

```

<210> 35

<211> 331

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

ES 2 345 833 T3

<400> 35

```

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

      Met Gln Gln Leu Glu Ser Ile Arg Asn Glu Gly Pro Glu Pro His Leu
25     130          135          140
      Ala Gly Asp Arg Pro Ser Lys His Leu Lys Leu Val Phe Ile Arg His
      145          150          155          160
      Cys Leu Arg Ala Leu Arg Leu Pro Arg Ile Ser Ile Asp Leu Met Glu
      165          170          175
30     Ser Pro Leu Pro Asn Leu Ser Gly Glu Ala Leu Ser Pro Thr Ala Thr
      180          185          190
      Ala Lys Asp Glu Ile Thr Gln Met Ile Leu Lys Ser Ala Ala Arg Ser
      195          200          205
35     Glu Leu Gly Met Tyr Val Ser Lys Arg Gln Glu Phe Tyr Leu Arg Arg
      210          215          220
      Ala Arg Arg Arg Arg Lys Phe Ala Trp Lys Pro Val Leu Gln Ser Ile
      225          230          235          240
      Ser Glu Met Lys Pro Val Met Glu Phe His Thr Pro Met Ala Tyr Arg
40     245          250          255
      Asp Ser Gly Ser Pro Pro Lys Asn Ala Ser Thr Pro Ser Leu Pro Gly
      260          265          270
      Pro Lys Asn Ile Ser Pro Pro Arg Gln Val Ser Val Pro Gln Arg Ser
45     275          280          285
      Ser Pro Pro Pro Lys Asn Val Ser Pro Pro Pro Gln Pro Ala Phe Val
      290          295          300
      Ala Arg Thr Ala Ser Lys Tyr Ser Ala Ala Ser Gln Gln Val Gln Arg
50     305          310          315          320
      Asn Arg Gly Asn Ala Lys Ser Leu Tyr Met Ala
      325          330

```

55 <210> 36

<211> 346

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

60

65

ES 2 345 833 T3

<400> 36

```

5      Met Ser Arg Arg Val Arg Arg Gly Gly Leu Arg Val Ala Val Pro Lys
      1          5          10          15

      Gln Glu Thr Pro Val Ser Lys Phe Leu Thr Ala Ser Gly Thr Phe Gln
          20          25          30

10     Asp Asp Asp Ile Lys Leu Asn His Thr Gly Leu Arg Val Val Ser Ser
      35          40          45

      Glu Pro Asn Leu Pro Thr Gln Thr Gln Ser Ser Ser Pro Asp Gly Gln
      50          55          60

15     Leu Ser Ile Ala Asp Leu Glu Leu Val Arg Phe Leu Gly Lys Gly Ala
      65          70          75          80

      Gly Gly Thr Val Gln Leu Val Arg His Lys Trp Thr Asn Val Asn Tyr
          85          90          95

20     Ala Leu Lys Ala Ile Gln Met Asn Ile Asn Glu Thr Val Arg Lys Gln
      100         105         110

      Ile Val Gln Glu Leu Lys Ile Asn Gln Val Thr His Gln Gln Cys Pro
      115         120         125

25     Tyr Ile Val Glu Cys Phe His Ser Phe Tyr His Asn Gly Val Ile Ser
      130         135         140

      Met Ile Leu Glu Tyr Met Asp Arg Gly Ser Leu Ser Asp Ile Ile Lys
      145         150         155         160

      Gln Gln Lys Gln Ile Pro Glu Pro Tyr Leu Ala Val Ile Ala Ser Gln
          165         170         175

30     Val Leu Lys Gly Leu Glu Tyr Leu His Gln Val Arg His Ile Ile His
          180         185         190

      Arg Asp Ile Lys Pro Ser Asn Leu Leu Ile Asn His Lys Gly Glu Val
          195         200         205

35     Lys Ile Ser Asp Phe Gly Val Ser Ala Val Leu Val His Ser Leu Ala
      210         215         220

      Gln Arg Asp Thr Phe Val Gly Thr Cys Thr Tyr Met Ser Pro Glu Arg
      225         230         235         240

40     Leu Gln Gly Arg Ser Tyr Ala Tyr Asp Ser Asp Leu Trp Ser Leu Gly
          245         250         255

      Leu Thr Leu Leu Glu Cys Ala Leu Gly Thr Phe Pro Tyr Lys Pro Ala
          260         265         270

45     Gly Met Glu Glu Gly Trp Gln Asn Phe Phe Ile Leu Met Glu Cys Ile
      275         280         285

      Val Asn Gln Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro Asp Lys Phe Ser Pro Glu
      290         295         300

      Phe Cys Ser Phe Ile Glu Ser Cys Ile Arg Lys Cys Pro Ser Glu Arg
      305         310         315         320

50     Pro Ser Thr Thr Asp Leu Leu Lys His Pro Phe Leu Gln Lys Tyr Asn
          325         330         335

      Glu Glu Glu Tyr His Leu Ser Lys Ile Leu
          340         345

```

<210> 37

<211> 346

60 <212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

65

ES 2 345 833 T3

<400> 37

```

5      Met Ser Arg Arg Val Arg Arg Gly Gly Leu Arg Val Ala Val Pro Lys
      1          5          10          15

      Gln Glu Thr Pro Val Ser Lys Phe Leu Thr Ala Ser Gly Thr Phe Gln
          20          25          30

10     Asp Asp Asp Ile Lys Leu Asn His Thr Gly Leu Arg Val Val Ser Ser
      35          40          45

      Glu Pro Asn Leu Pro Thr Gln Thr Gln Ser Ser Ser Pro Asp Gly Gln
      50          55          60

15     Leu Ser Ile Ala Asp Leu Glu Leu Val Arg Phe Leu Gly Lys Gly Ala
      65          70          75          80

      Gly Gly Thr Val Gln Leu Val Arg His Lys Trp Thr Asn Val Asn Tyr
          85          90          95

20     Ala Leu Lys Ala Ile Gln Met Asn Ile Asn Glu Thr Val Arg Lys Gln
      100          105          110

      Ile Val Gln Glu Leu Lys Ile Asn Gln Val Thr His Gln Gln Cys Pro
      115          120          125

      Tyr Ile Val Glu Cys Phe His Ser Phe Tyr His Asn Gly Val Ile Ser
      130          135          140

25     Met Ile Leu Glu Tyr Met Asp Arg Gly Ser Leu Ser Asp Ile Ile Lys
      145          150          155          160

      Gln Gln Lys Gln Ile Pro Glu Pro Tyr Leu Ala Val Ile Ala Ser Gln
          165          170          175

30     Val Leu Lys Gly Leu Glu Tyr Leu His Gln Val Arg His Ile Ile His
      180          185          190

      Arg Asp Ile Lys Pro Ser Asn Leu Leu Ile Asn His Lys Gly Glu Val
      195          200          205

35     Lys Ile Ser Asp Phe Gly Val Ser Ala Val Leu Val His Ser Leu Ala
      210          215          220

      Gln Arg Asp Thr Phe Val Gly Thr Cys Thr Tyr Met Ser Pro Glu Arg
      225          230          235          240

40     Leu Gln Gly Arg Ser Tyr Ala Tyr Asp Ser Asp Leu Trp Ser Leu Gly
      245          250          255

      Leu Thr Leu Leu Glu Cys Ala Leu Gly Thr Phe Pro Tyr Lys Pro Ala
      260          265          270

      Gly Met Glu Glu Gly Trp Gln Asn Phe Phe Ile Leu Met Glu Cys Ile
      275          280          285

45     Val Asn Gln Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro Asp Lys Phe Ser Pro Glu
      290          295          300

      Phe Cys Ser Phe Ile Glu Ser Cys Ile Arg Lys Cys Pro Ser Glu Arg
      305          310          315          320

50     Pro Ser Thr Thr Asp Leu Leu Lys His Pro Phe Leu Gln Lys Tyr Asn
      325          330          335

      Glu Glu Glu Tyr His Leu Ser Lys Ile Leu
          340          345

55

```

60 <210> 38

<211> 597

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

65

ES 2 345 833 T3

<400> 38

5	Met Gly Gln Cys Tyr Gly Lys Phe Asp Asp Gly Gly Glu Gly Glu Asp
	1 5 10 15
	Leu Phe Glu Arg Gln Lys Val Gln Val Ser Arg Thr Pro Lys His Gly
	20 25 30
10	Ser Trp Ser Asn Ser Asn Arg Gly Ser Phe Asn Asn Gly Gly Gly Ala
	35 40 45
	Ser Pro Met Arg Ala Lys Thr Ser Phe Gly Ser Ser His Pro Ser Pro
	50 55 60
15	Arg His Pro Ser Ala Ser Pro Leu Pro His Tyr Thr Ser Ser Pro Ala
	65 70 75 80
	Pro Ser Thr Pro Arg Arg Asn Ile Phe Lys Arg Pro Phe Pro Pro Pro
	85 90 95
20	Ser Pro Ala Lys His Ile Gln Ser Ser Leu Val Lys Arg His Gly Ala
	100 105 110
	Lys Pro Lys Glu Gly Gly Ala Ile Pro Glu Ala Val Asp Gly Glu Lys
	115 120 125
	Pro Leu Asp Lys His Phe Gly Tyr His Lys Asn Phe Ala Thr Lys Tyr
	130 135 140
25	Glu Leu Gly His Glu Val Gly Arg Gly His Phe Gly His Thr Cys Tyr
	145 150 155 160
	Ala Lys Val Arg Lys Gly Glu His Lys Gly Gln Ala Val Ala Val Lys
	165 170 175
30	Ile Ile Ser Lys Ala Lys Met Thr Thr Ala Ile Ala Ile Glu Asp Val
	180 185 190
	Gly Arg Glu Val Lys Ile Leu Lys Ala Leu Thr Gly His Gln Asn Leu
	195 200 205

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 345 833 T3

Val Arg Phe Tyr Asp Ser Cys Glu Asp His Leu Asn Val Tyr Ile Val
 210 215 220
 Met Glu Leu Cys Glu Gly Gly Glu Leu Leu Asp Arg Ile Leu Ser Arg
 225 230 235 240
 Gly Gly Lys Tyr Ser Glu Glu Asp Ala Lys Val Val Val Arg Gln Ile
 245 250 255
 Leu Ser Val Val Ala Phe Cys His Leu Gln Gly Val Val His Arg Asp
 260 265 270
 Leu Lys Pro Glu Asn Phe Leu Phe Thr Thr Lys Asp Glu Tyr Ala Gln
 275 280 285
 Leu Lys Ala Ile Asp Phe Gly Leu Ser Asp Phe Ile Lys Pro Asp Glu
 290 295 300
 Arg Leu Asn Asp Ile Val Gly Ser Ala Tyr Tyr Val Ala Pro Glu Val
 305 310 315 320
 Leu His Arg Leu Tyr Ser Met Glu Ala Asp Val Trp Ser Ile Gly Val
 325 330 335
 Ile Thr Tyr Ile Leu Leu Cys Gly Ser Arg Pro Phe Trp Ala Arg Thr
 340 345 350
 Glu Ser Gly Ile Phe Arg Ala Val Leu Arg Ala Asp Pro Ser Phe Glu
 355 360 365
 Glu Ala Pro Trp Pro Ser Ile Ser Pro Glu Ala Lys Asp Phe Val Lys
 370 375 380
 Arg Leu Leu Asn Lys Asp Met Arg Lys Arg Met Thr Ala Ala Gln Ala
 385 390 395 400
 Leu Thr His Pro Trp Ile Arg Ser Asn Asn Val Lys Ile Pro Leu Asp
 405 410 415
 Ile Leu Val Tyr Arg Leu Val Arg Asn Tyr Leu Arg Ala Ser Ser Met
 420 425 430
 Arg Lys Ala Ala Leu Lys Ala Leu Ser Lys Thr Leu Thr Glu Asp Glu
 435 440 445
 Thr Phe Tyr Leu Arg Thr Gln Phe Met Leu Leu Glu Pro Ser Asn Asn
 450 455 460
 Gly Arg Val Thr Phe Glu Asn Phe Arg Gln Ala Leu Leu Lys Asn Ser
 465 470 475 480
 Thr Glu Ala Met Lys Glu Ser Arg Val Phe Glu Ile Leu Glu Ser Met
 485 490 495
 Asp Gly Leu His Phe Lys Lys Met Asp Phe Ser Glu Phe Cys Ala Ala
 500 505 510
 Ala Ile Ser Val Leu Gln Leu Glu Ala Thr Glu Arg Trp Glu Gln His
 515 520 525
 Ala Arg Ala Ala Tyr Asp Ile Phe Glu Lys Glu Gly Asn Arg Val Ile
 530 535 540
 Tyr Pro Asp Glu Leu Ala Lys Glu Met Gly Leu Ala Pro Asn Val Pro
 545 550 555 560
 Ala Gln Val Phe Leu Asp Trp Ile Arg Gln Ser Asp Gly Arg Leu Ser
 565 570 575
 Phe Thr Gly Phe Thr Lys Leu Leu His Gly Ile Ser Ser Arg Ala Ile
 580 585 590
 Lys Asn Leu Gln Gln
 595

60

<210> 39

<211> 549

65 <212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

ES 2 345 833 T3

<400> 39

5 Met Gly Asn Thr Ser Ser Arg Gly Ser Arg Lys Ser Thr Arg Gln Val
1 5 10 15
Asn Gln Gly Val Gly Ser Gln Asp Thr Arg Glu Lys Asn Asp Ser Val
20 25 30
10 Asn Pro Lys Thr Arg Gln Gly Gly Ser Val Gly Ala Asn Asn Tyr Gly
35 40 45
Gly Lys Pro Ser Ser Gly Ala Gln Ala Gly Glu Arg Ser Thr Ser Ala
50 55 60
15 Pro Ala Ala Leu Pro Arg Pro Lys Pro Ala Ser Arg Ser Val Ser Gly
65 70 75 80
Val Leu Gly Lys Pro Leu Ser Asp Ile Arg Gln Ser Tyr Ile Leu Gly
85 90 95
20 Arg Glu Leu Gly Arg Gly Gln Phe Gly Val Thr Tyr Leu Cys Thr Asp
100 105 110
Lys Met Thr Asn Glu Ala Tyr Ala Cys Lys Ser Ile Ala Lys Arg Lys
115 120 125
Leu Thr Ser Lys Glu Asp Ile Glu Asp Val Lys Arg Glu Val Gln Ile
130 135 140
25 Met His His Leu Ser Gly Thr Pro Asn Ile Val Val Leu Lys Asp Val
145 150 155 160
Phe Glu Asp Lys His Ser Val His Leu Val Met Glu Leu Cys Ala Gly
165 170 175

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 345 833 T3

Gly Glu Leu Phe Asp Arg Ile Ile Ala Lys Gly His Tyr Ser Glu Arg
 180 185 190
 Ala Ala Ala Asp Met Cys Arg Val Ile Val Asn Val Val His Arg Cys
 195 200 205
 His Ser Leu Gly Val Phe His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Phe Leu
 210 215 220
 Leu Ala Ser Lys Ala Glu Asp Ala Pro Leu Lys Ala Thr Asp Phe Gly
 225 230 235 240
 Leu Ser Thr Phe Phe Lys Pro Gly Asp Val Phe Gln Asp Ile Val Gly
 245 250 255
 Ser Ala Tyr Tyr Val Ala Pro Glu Val Leu Lys Arg Ser Tyr Gly Pro
 260 265 270
 Glu Ala Asp Val Trp Ser Ala Gly Val Ile Val Tyr Ile Leu Leu Cys
 275 280 285
 Gly Val Pro Pro Phe Trp Ala Glu Thr Glu Gln Gly Ile Phe Asp Ala
 290 295 300
 Val Leu Lys Gly His Ile Asp Phe Glu Asn Asp Pro Trp Pro Lys Ile
 305 310 315 320
 Ser Asn Gly Ala Lys Asp Leu Val Arg Lys Met Leu Asn Pro Asn Val
 325 330 335
 Lys Ile Arg Leu Thr Ala Gln Gln Val Leu Asn His Pro Trp Met Lys
 340 345 350
 Glu Asp Gly Asp Ala Pro Asp Val Pro Leu Asp Asn Ala Val Leu Thr
 355 360 365
 Arg Leu Lys Asn Phe Ser Ala Ala Asn Lys Met Lys Lys Leu Ala Leu
 370 375 380
 Lys Val Ile Ala Glu Ser Leu Ser Glu Glu Glu Ile Val Gly Leu Arg
 385 390 395 400
 Glu Met Phe Lys Ser Ile Asp Thr Asp Asn Ser Gly Thr Val Thr Phe
 405 410 415
 Glu Glu Leu Lys Glu Gly Leu Leu Lys Gln Gly Ser Lys Leu Asn Glu
 420 425 430
 Ser Asp Ile Arg Lys Leu Met Glu Ala Ala Asp Val Asp Gly Asn Gly
 435 440 445
 Lys Ile Asp Phe Asn Glu Phe Ile Ser Ala Thr Met His Met Asn Lys
 450 455 460
 Thr Glu Lys Glu Asp His Leu Trp Ala Ala Phe Met His Phe Asp Thr
 465 470 475 480
 Asp Asn Ser Gly Tyr Ile Thr Ile Asp Glu Leu Gln Glu Ala Met Glu
 485 490 495
 Lys Asn Gly Met Gly Asp Pro Glu Thr Ile Gln Glu Ile Ile Ser Glu
 500 505 510
 Val Asp Thr Asp Asn Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Asp Glu Phe Val Ala
 515 520 525
 Met Met Arg Lys Gly Asn Pro Gly Ala Glu Asn Gly Gly Thr Val Asn
 530 535 540
 Lys Pro Arg His Arg
 545

60 <210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

ES 2 345 833 T3

<400> 40

caggaaacag ctatgacc

18

5

<210> 41

<211> 19

<212> DNA

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 41

ctaaagggaa caaaagctg

19

20

<210> 42

<211> 18

25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 42

tgtaaaacga cggccagt

18

35

<210> 43

<211> 25

40

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

45

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 43

ccacggtctt cggctgctgg tcgtg

25

50

<210> 44

55

<211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

60

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 44

65

gcagcacagc accaccagcg gctat

25

ES 2 345 833 T3

<210> 45
 <211> 25
 <212> DNA
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador
 10
 <400> 45

 gcgcccagtg agtagctcca gcatt 25
 15
 <210> 46
 <211> 30
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador
 25
 <400> 46

 atccccgggtg agtatcaatt acggtggcga 30
 30
 <210> 47
 <211> 33
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador
 40
 <400> 47

 gcgttaactc gaccaaggtc actattccaa gca 33
 45
 <210> 48
 <211> 25
 <212> DNA
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador
 55
 <400> 48

 cggtgcccac ctcgttcctg tggtt 25
 60
 <210> 49
 <211> 31
 <212> DNA

ES 2 345 833 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 49

10 **atccccgggag tgggtggttg gactgtaagg a** **31**

<210> 50

<211> 34

15 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 50

25 **gcgttaacct tcgtcttgga caggtagagg ttac** **34**

<210> 51

<211> 25

30 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 51

40 **gactcagccc cgtaatcctt caaca** **25**

<210> 52

45 <211> 31

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 52

55 **atccccgggca acgagaagca ttcgagatgg c** **31**

<210> 53

60 <211> 33

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

ES 2 345 833 T3

	<400> 53	
	gcgttaacga gcatcacgat actcggtgat ttc	33
5	<210> 54	
	<211> 27	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 54	
20	cgacgggctaa taccacgttg gcgacca	27
	<210> 55	
	<211> 33	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 55	
35	atccccgggct gtgatgtcgg tgtgggtgctc tgc	33
	<210> 56	
40	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 56	
50	gcgagctcgc accactgaat gatggagact cagg	34
	<210> 57	
55	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
65	<400> 57	
	cgaccgcagc ccatgaggaa gttat	25

ES 2 345 833 T3

<210> 58
 <211> 33
 <212> DNA
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador
 10
 <400> 58

 atccccgggct cacgtagtgc actgaactct gtc 33
 15
 <210> 59
 <211> 33
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

 <400> 59

 30 gcggttaacat gcccatcttc tcatactcag acc 33

 <210> 60
 <211> 25
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

 <400> 60

 45 ctgcctacc aagccccatt agaaa 25

 <210> 61
 50 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

 <400> 61
 60
 atccccgggtt gtcgaggacg gagagagaag ag 32

 65 <210> 62
 <211> 33
 <212> DNA

ES 2 345 833 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 62	
10	gcgttaacct taggaatcgt atggcagaga gct	33
	<210> 63	
	<211> 25	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 63	
25	gcttcacaat gttgggccct ccaca	25
	<210> 64	
30	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 64	
40	gcgttaacgg gaggaaggct gggggaagag acg	33
	<210> 65	
45	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 65	
55	gcgagctcag cgcttcgcac aactgagaaa cct	33
	<210> 66	
60	<211> 25	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 345 833 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

5 <400> 66

acgagaaggt tgggtgggctt caagt

25

10 <210> 67

<211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

20 <400> 67

atcccggggcg agccatggcg ccacttgctt

30

25

<210> 68

<211> 33

<212> DNA

30

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

35

<400> 68

gcgttaacgc cgagcaacaa tgtctgctgg atg

33

40

<210> 69

<211> 25

<212> DNA

45

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

50

<400> 69

cccggtaagc catcggagtg tggaa

25

55

<210> 70

<211> 30

<212> DNA

60

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

65

ES 2 345 833 T3

	<400> 70	
	atccccgggct tgtattggct cggataattt	30
5	<210> 71	
	<211> 33	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 71	
20	gcgttaacgg caatatctgc acagccgttc act	33
	<210> 72	
	<211> 25	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 72	
35	gtgtctcgtc gggccaagga atgaa	25
	<210> 73	
40	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 73	
50	atccccgggcg gtcgagtcgt attaggtggt gtttc	35
55	<210> 74	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
65	<400> 74	
	gagctccggt aggtccgacc tcttcaattg	30

ES 2 345 833 T3

	<210> 75	
	<211> 26	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
10	<400> 75	
15	gacgacgcga agcccgggtgt ggttga	26
	<210> 76	
	<211> 31	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 76	
30	atccccgggag aggctgatct gatgctacag t	31
	<210> 77	
35	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223>	
	<400> 77	
45	atgagctctg gcggattggc gaggtagttc gac	33
	<210> 78	
50	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 78	
60	cggcgcaacg tagtatgcgc ttcca	25
65	<210> 79	
	<211> 27	
	<212> DNA	

ES 2 345 833 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 79	
10	cgcggtgaac aacaccttgc aggtgac	27
	<210> 80	
	<211> 25	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 80	
25	gctcgggtca gccctcaaca ccgca	25
	<210> 81	
30	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 81	
40	gttaaagctt gtgcagcagt catgc	25
45	<210> 82	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
55	<400> 82	
	atccccgggtg taggcgggcg aggttcgatg c	31
60	<210> 83	
	<211> 34	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 345 833 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

5 <400> 83

gcgttaacga caaccggagt agaacggcag tcca

34

10 <210> 84

<211> 25

<212> DNA

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

20 <400> 84

agaagcgagg aatgggcagg gacga

25

25

<210> 85

<211> 32

<212> DNA

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

35

<400> 85

atccccgggcg aactgcgata tgagattcca ac

32

40

<210> 86

<211> 34

45 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 86

55 **gcgttaacga gatccaaccg aagccatcct acga**

34

<210> 87

60 <211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

ES 2 345 833 T3

	<400> 87	
	gcgctgcaga tttcatttgg agaggacacg	30
5		
	<210> 88	
	<211> 35	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 88	
20	cgcgggccggc ctcagaagaa ctcgtcaaga aggcg	35
	<210> 89	
	<211> 25	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 89	
35	gctgacacgc caagcctcgc tagtc	25
	<210> 90	
40	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 90	
50	gcgttaactc gaccaaggtc actattccaa gca	33
55	<210> 91	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
65		

ES 2 345 833 T3

<400> 91

gcgttaacct tcgtcttgga caggtagagg ttac

34

5

<210> 92

<211> 33

<212> DNA

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 92

gcgttaacga gcatcacgat actcgggtgat ttc

33

20

<210> 93

<211> 34

25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 93

gcgagctcgc accactgaat gatggagact cagg

34

35

<210> 94

40

<211> 33

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 94

50

gcgttaacat gcccatcttc tcatactcag acc

33

55

<210> 95

<211> 33

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

60

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

65

ES 2 345 833 T3

<400> 95	
5	gcgttaacct taggaatcgt atggcagaga gct 33
<210> 96	
<211> 33	
10	<212> DNA
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
15	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador
<400> 96	
20	gcgagctcag cgcttcgcac aactgagaaa cct 33
<210> 97	
<211> 33	
25	<212> DNA
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
30	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador
<400> 97	
35	gcgttaacgg caatatctgc acagccgttc act 33
<210> 98	
40	<211> 33
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
45	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador
<400> 98	
50	gcgttaacgg caatatctgc acagccgttc act 33
<210> 99	
55	<211> 30
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
60	<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
65	

ES 2 345 833 T3

<400> 99

gagctccggg aggtccgacc tcttcaattg

30

5

<210> 100

<211> 33

<212> DNA

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 100

atgagctctg gcggattggc gaggtagttc gac

33

20

<210> 101

<211> 34

25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 101

gcgttaacga caaccggagt agaacggcag tcca

34

35

<210> 102

40

<211> 34

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

45

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 102

50

gcgttaacga gatccaaccg aagccatcct acga

34

<210> 103

55

<211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

60

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

65

ES 2 345 833 T3

	<400> 103	
	cccagtaata gcagggttgg aggaa	25
5	<210> 104	
	<211> 25	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 104	
20	ggctgcctga agatccgcta cagag	25
	<210> 105	
	<211> 25	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 105	
35	cgtcaggcta ctttgcgtgg agcac	25
	<210> 106	
40	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 106	
50	cggtgctggc taacaccagg ccaga	25
55	<210> 107	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
65		

ES 2 345 833 T3

<400> 107

atccccgggca acgagaagca ttcgagatgg c

31

5

<210> 108

<211> 33

<212> DNA

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 108

gcgttaacga gcatcacgat actcgggtgat ttc

33

20

<210> 109

<211> 25

25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 109

cgtggcatct ctcccgatgt tctta

25

35

<210> 110

40

<211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 110

50

ggccaactga aggcgtgtca tgate

25

55

<210> 111

<211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

60

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

65

ES 2 345 833 T3

	<400> 111	
	ctcgaggggt cgttcaccgt gacct	25
5		
	<210> 112	
	<211> 26	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 112	
20	cggaggtaac agtagtcagg ctgctc	26
	<210> 113	
	<211> 25	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 113	
35	ccgcgaccct tccacgcac agcat	25
	<210> 114	
40	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 114	
50	cctccaggaa gcctgcgccg agaag	25
	<210> 115	
55	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
65		

ES 2 345 833 T3

<400> 115

ggacattgtc cgtgatcagc aatcga

26

5

<210> 116

<211> 25

<212> DNA

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 116

cagcctctgg aacaaccaga cgctg

25

20

<210> 117

<211> 15

25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 117

gtcaccgcga ggtacaagcc accac

25

35

<210> 118

<211> 25

40

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

45

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 118

50

gcagctctgg agctctgtac cacct

25

<210> 119

<211> 25

55

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

60

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

65

ES 2 345 833 T3

	<400> 119	
	acggccacgt cgagaatctg agcaa	25
5		
	<210> 120	
	<211> 25	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 120	
20	cgaagtgtc gcaagcaatg ccgaa	25
	<210> 121	
	<211> 35	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 121	
35	atccccggcg gtcgagtcgt attaggtggt gtttc	35
	<210> 122	
40	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
	<400> 122	
50	gagctccggt aggtccgacc tcttcaattg	30
	<210> 123	
55	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador	
65		

ES 2 345 833 T3

<400> 123

gggcaactgt caatagcaga cctgga

26

5

<210> 124

<211> 26

<212> DNA

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 124

gcaagtccca acgaacgtgt ctcgct

26

20

<210> 125

<211> 25

25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 125

gcgaagatga cgactgctat tgcga

25

35

<210> 126

<211> 25

40

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

45

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

<400> 126

50

cgtgatgact ccaatgctcc atacg

25

<210> 127

<211> 27

55

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

60

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador

65

ES 2 345 833 T3

<400> 127	
5	gccagcatcg aggtcagtat ccggtgt 27
<210> 128	
<211> 27	
10	<212> DNA
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
15	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador
<400> 128	
20	gtctgtggcc ttcagaggcg catcctc 27
25	
30	
35	
40	
45	
50	
55	
60	
65	