

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 336**

51 Int. Cl.:

C12N 5/04 (2006.01)
C12N 5/14 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A01H 5/06 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2018 PCT/IL2018/051040**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2019 WO19053725**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2018 E 18856388 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024 EP 3684914**

54 Título: **Control de la expresión de polipéptidos DELLA en tejidos específicos**

30 Prioridad:

18.09.2017 US 201762559746 P
26.10.2017 US 201762577549 P
07.11.2017 US 201762582767 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2024

73 Titular/es:

FUTURAGENE ISRAEL LTD. (100.0%)
2 Perekis Street Park Tamar
7670202 Rehovot, IL

72 Inventor/es:

ABRAMSON, MIRON;
SINAI, TANY y
LIVNE, SIVAN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 983 336 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Control de la expresión de polipéptidos DELLA en tejidos específicos

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Se hace referencia a las solicitudes de patente provisionales estadounidenses con números de serie 62/559.746, presentada el 18 de septiembre de 2017, 62/577.549, presentada el 26 de octubre de 2017, y 62/582.767, presentada el 7 de noviembre de 2017, y todas tituladas TISSUE-SPECIFIC EXPRESSION OF DELLA POLYPEPTIDES, cuya prioridad se reivindica en la presente memoria.

Campo de la invención

Los polipéptidos DELLA desempeñan un papel importante en la regulación del nivel de expresión de la hormona giberelina en la planta. Esta descripción se refiere a composiciones, ensayos y métodos para modificar genéticamente plantas para alterar selectivamente la expresión del gen DELLA.

Antecedentes

Las giberelinas (GA) son importantes hormonas vegetales que actúan en muchos procesos fisiológicos y de desarrollo, incluida la germinación de las semillas, el alargamiento del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo de los tricomas, la maduración del polen y la inducción de la floración (Achard y Genschik, 2009). Aunque solo unas pocas GA tienen actividad biológica (Yamaguchi, 2008), muchas GA no bioactivas existen en las plantas y actúan como precursores de las formas bioactivas o son metabolitos desactivados.

La síntesis y la desactivación de las GA bioactivas están reguladas por diferentes factores. Uno de esos factores es la inhibición por retroalimentación por parte de la GA de su propia ruta de biosíntesis mediada por los polipéptidos DELLA. Los polipéptidos DELLA reciben el nombre de su dominio DELLA conservado, que consiste en ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), leucina (L), leucina (L) y alanina (A), y son un subconjunto de la familia GRAS de plantas, reguladores transcripcionales que desempeñan diversas funciones en el desarrollo de las plantas.

Como todas las proteínas GRAS, las DELLA comparten un dominio GRAS en el extremo C-terminal conservado que participa en la regulación transcripcional, pero se distingue del resto de la familia GRAS por una secuencia de extremo N-terminal específica que contiene dos dominios conservados: el dominio DELLA y un segundo dominio conservado que codifica una treonina, valina, histidina, tirosina, asparagina, prolina [TVHYNP] (Davière y Achard, 2013). En algunas plantas se puede encontrar más de uno de dicho gen DELLA. Por ejemplo, el genoma de *Arabidopsis* codifica cinco proteínas DELLA conocidas (insensibles a GA, GAI; represoras de GA1-3, RGA; tipo RGA 1, RGL1; RGL2 y RGL3) (Peng y col., 1997, Silverstone y col. 1998, Lee y col., 2002, Wen y Chang 2002, Tyler y col., 2004). El análisis fenotípico de los mutantes de DELLA en *Arabidopsis* indica que GAI y RGA controlan la expansión celular en el hipocótilo, los brotes y los tejidos de la raíz (King y col. 2001. Fu y Harberd (2003); RGL1 participa en el desarrollo floral (junto con RGA y RGL2) (Cheng y col., 2004; Tyler y col., 2004), RGL2 regula la germinación (Lee y col., 2002) y RGL3 contribuye a mantener la salud de las plantas durante el estrés ambiental (Achard y col., 2008; Wild y col., 2012).

El documento WO 2011/054998 se refiere a la alteración de la expresión de la proteína DELLA-u ortóloga para alterar el patrón de crecimiento de las plantas y el contenido de metabolitos del fruto.

Lor V.S. y col.: "Targeted Mutagenesis of the Tomato PROCERA Gene Using Transcription Activator-Like Effector Nucleases", PLANT PHYSIOLOGY, vol. 166, n.º 3, 12 de septiembre de 2014, páginas 1288-1291, describe que tanto las TALEN como el CRISPR/Cas9 son herramientas eficaces para crear mutaciones hereditarias en el tomate.

Resumen de la invención

La presente descripción proporciona composiciones, ensayos y métodos para modificar genéticamente plantas para alterar selectivamente la expresión del gen DELLA para promover el crecimiento de las plantas, manteniendo al mismo tiempo la integridad de las raíces.

Más específicamente, según la presente invención, y como se define en la reivindicación independiente 1 adjunta, se proporciona un constructo CRISPR/Cas9 que comprende un promotor unido operativamente a una secuencia de polinucleótidos, comprendiendo la secuencia de polinucleótidos al menos una secuencia de ARN guía que se dirige a un sitio diana de un gen que codifica un polipéptido DELLA de eucalipto al menos un 95 % idéntico a la Id. de sec. n.º: 1 (DELLA1), en donde el constructo reduce el nivel de expresión del polipéptido DELLA, que es al menos un 95 % idéntico a la Id. de sec. n.º: 1 (DELLA1) para alterar selectivamente la expresión de DELLA para superar la inhibición de las giberelinas sin inhibir el crecimiento de las plantas.

El promotor puede ser un promotor constitutivo. El promotor se puede seleccionar de, p. ej., el grupo que consiste en 35S CaMV, CaMV19S, SGFIMV, SVBV, FMV34S, promotor del badnavirus baciliforme de la caña de azúcar, promotor CsVMV, promotor de la actina ACT2/ACT8 de *Arabidopsis*, promotor de ubiquitina UBQ1 de *Arabidopsis*, promotor de la tiorina BTH6 de la hoja de cebada, promotor de la actina del arroz, GOS2, ciclofilina de arroz e histona H3 del maíz. El promotor puede ser un promotor específico de tejido. El promotor puede derivarse, p. ej., de un tejido seleccionado del grupo que consiste en tejido foliar, tejido troncal y tejido fotosintético. El promotor puede ser, p. ej., un promotor de RBC.

El polipéptido DELLA puede ser un polipéptido DELLA de eucalipto. El polipéptido DELLA es sustancialmente (p. ej., al menos un 95 %, 99 % o más) idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: Id. de sec. n.º: 1 (DELLA1).

También se proporcionan en la presente memoria células huésped que incluyen cualquiera de los constructos descritos anteriormente. La célula huésped puede ser, p. ej., una célula bacteriana (p. ej., *Agrobacterium*).

Además, en la presente memoria se proporcionan tejidos vegetales que incluyen cualquiera de los constructos descritos anteriormente. También se proporcionan en la presente memoria tejidos vegetales transformados con cualquiera de las células huésped descritas anteriormente. El tejido vegetal puede ser, p. ej., un tejido verde, un tejido radicular.

Se proporciona además, según la presente invención, un método para producir una planta de eucalipto con un nivel de expresión reducido de al menos un polipéptido DELLA, método que incluye expresar el constructo de la reivindicación independiente 1 adjunta en la planta.

Se proporciona además, según la presente invención, un método para producir una planta de eucalipto con un nivel de expresión reducido de al menos un polipéptido DELLA, método que incluye transformar una célula vegetal con el constructo de la reivindicación 1 adjunta, regenerar una planta a partir de la célula vegetal transformada y cultivar la planta transformada, en donde la planta transformada tiene un mayor crecimiento en comparación con una planta silvestre de la misma especie.

Los constructos de la presente invención pueden reducir el nivel de transcrito de al menos un polinucleótido DELLA endógeno en al menos un 40 %.

También se proporciona en la presente memoria un método para modificar genéticamente una planta de eucalipto con un constructo recombinante que codifica una expresión del polipéptido DELLA ubicada principalmente en las raíces de la planta, método que incluye introducir un primer casete de expresión en una planta que reduce la expresión de al menos un polipéptido DELLA endógeno en la planta, introducir un segundo casete de expresión en la planta, que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido DELLA unido operativamente a un promotor heterólogo específico para la raíz, y cultivar la planta transformada, que tiene una expresión de polipéptidos DELLA que se ubica principalmente en las raíces de la planta en comparación con una planta silvestre de la misma especie.

El primer casete de expresión puede codificar, p. ej., un ácido nucleico antisentido, un ácido nucleico sentido, un ARNip, un microARN o un ARNbc. El polipéptido DELLA endógeno puede ser un polipéptido DELLA de eucalipto. El polipéptido DELLA de eucalipto puede ser sustancialmente (p. ej., al menos un 95 %, 99 % o más) idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: Id. de sec. n.º: 1 (DELLA1), Id. de sec. n.º: 3 (DELLA2) y Id. de sec. n.º: 5 (DELLA3).

El promotor específico para la raíz se puede seleccionar, p. ej., del grupo que consiste en PsMTA, el promotor de quitinasa de clase III, el promotor del transportador de fosfato, el promotor de la acuaporina 2 intrínseca del tonoplasto, el promotor Pyk10, el promotor AtFLS5, el promotor btg26 y el 2-ODD (REO) expresado en la raíz de *Solanum lycopersicum*.

El segundo casete del polipéptido DELLA puede ser un polipéptido DELLA de *Arabidopsis thaliana*. El polipéptido DELLA de *Arabidopsis* puede ser sustancialmente (p. ej., al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más) idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: Id. de sec. n.º: 13, Id. de sec. n.º: 15, Id. de sec. n.º: 17, Id. de sec. n.º: 19 o Id. de sec. n.º: 21.

Cualquiera de los métodos descritos anteriormente puede incluir en el primer casete de expresión un polinucleótido que sea una plantilla para ambas cadenas de una molécula de ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc).

Cualquiera de los métodos descritos anteriormente puede incluir una planta diseñada mediante el método o una progenie de la planta. La planta puede incluir partes de la planta, p. ej., una célula vegetal.

Una planta puede modificarse mediante la construcción de un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido DELLA, unido operativamente a un promotor heterólogo específico para la raíz, la introducción del casete de expresión con al menos un polinucleótido DELLA endógeno en una planta que tiene una

expresión de DELLA reducida y el cultivo de la planta transgénica que tiene una expresión de polipéptidos DELLA que se ubica principalmente en las raíces de la planta en comparación con una planta silvestre de la misma especie.

También se proporciona en la presente memoria un método para producir una planta con un nivel de expresión reducido de al menos un polipéptido DELLA, comprendiendo el método: transformar una célula vegetal con un constructo CRISPR/Cas9 que comprende una o dos secuencias de ARN guía dirigidas a un gen que codifica el polipéptido DELLA, regenerar una planta a partir de la célula vegetal transformada para formar una planta transformada y cultivar la planta transformada, en donde la planta transformada tiene un mayor crecimiento en comparación con una planta silvestre de la misma especie. En una realización, la planta es una planta de eucalipto. Preferiblemente, las secuencias de ARN guía se seleccionan de la Id. de sec. n.º: 63 y la Id. de sec. n.º: 64. También se proporciona una planta diseñada mediante el método o una progenie de la planta. Se proporciona además una célula vegetal de la planta.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 Una representación esquemática de las etapas clave en la degradación de DELLA en la célula vegetal. La GA se une a su receptor insensible a la giberelina DWARF1 (GID1). La unión de GA a GID1 conduce a la formación del complejo GA-GID1-DELLA. El complejo GA-GID1-DELLA interactúa con la caja F SLEEPY1 (SLY1)/GID2. Esta interacción conduce a la poliubiquitinación de los DELLA por parte de SCFSLY1/GID2 y, a su vez, a la degradación de DELLA en el proteasoma 26S.

Figuras 2A y 2B. Juntas representan RGA de *A. thaliana* alineado con los homólogos de DELLA de *Eucalyptus grandis*.

Las Figuras 3A, 3B, 3C y 3D. 3A/1, 3A/2, 3A/3 y 3A/4 representan juntas las secuencias de proteína DELLA de *Eucalyptus grandis* identificadas, J01594, G02163 y C04156, alineadas con la biblioteca de *Eucalyptus grandis* x *urophylla* (gXu). **3B/1 y 3B/2** juntas representan la alineación de secuencias entre J01594 y DELLA1. J01594 tiene una identidad del 99 % con DELLA1. **3C/1 y 3C/2** juntas representan la alineación de secuencias entre G02163 y DELLA2. G02163 tiene una identidad del 99 % con DELLA2. **3D/1 y 3D/2** juntas representan la alineación de secuencias entre C04156 y DELLA3. C04156 tiene un 98 % de identidad con DELLA3. La identidad u homología de secuencias se determinó usando el algoritmo de alineación de secuencias Blast con los parámetros predeterminados.

Figura 4. Resultados de la RT-PCR del nivel de expresión de DELLA1, DELLA2 y DELLA3 en hojas de cultivo tisular, hojas jóvenes (en invernadero) y hojas maduras (en invernadero). DELLA1 tuvo un nivel de expresión más alto en hojas de cultivo tisular y hojas jóvenes en comparación con DELLA3. La expresión de DELLA2 no se detectó en hojas de cultivo tisular ni en hojas jóvenes, y solo se detectó un nivel de expresión bajo en hojas maduras. La actina se usó como gen de control.

Figuras 5A y 5B. Representación esquemática de los mapas de ADN-T de los constructos. Las figuras 5A y 5B representan esquemáticamente ciertos casetes de ácido nucleico no limitantes según la invención. **A1-A3**. Esquema del constructo para la regulación a la baja construido usando secuencias de uno, dos o tres genes DELLA. El casete P1 (promotor 1) a T1 (secuencia de terminación 1) codifica un ARN en forma de horquilla (ARNhp), construido fusionando al menos un elemento de ARNi (ARNi1, ARNi2, ARNi3), sintetizando la secuencia resultante como una repetición invertida e insertando una secuencia de lazo entre las respectivas secuencias sentido y de repetición invertida. P1 es el promotor constitutivo 35S o el promotor Rubisco. Los elementos ARNi1, ARNi2, ARNi3 son fragmentos de 300 bp a 400 bp derivados de un gen DELLA seleccionado del grupo de DELLA1, DELLA2 y DELLA3. L-Lazo. **B1-B3**. Esquema de la molécula de ARNhp producida por la transcripción del transgen P1 a T1. **C1-C3**. Esquema de los constructos de sobreexpresión construidos para la regulación a la baja de al menos un gen DELLA endógeno usando el casete P1-T1 y la sobreexpresión de un polipéptido DELLA en las raíces usando el casete P2 (promotor 2) - T2 (secuencia de terminación 2). P2 es un promotor de la acuaporina del eucalipto. DELLA_{OE}: secuencia de sobreexpresión del gen DELLA.

Figura 6. Verificación de la transformación. Los eventos transgénicos se analizaron mediante la PCR para detectar la presencia del constructo dirigiéndose a la secuencia de lazo del constructo de silenciamiento del ARNhp. El carril 1 es un marcador, el carril 2 es la mezcla de tampones, el carril 3 es el WT, los eventos transgénicos están en los carriles 4-15, el carril 16 es un control. Los carriles 4-7, 9-12 y 14 expresaban el segmento de lazo.

Figura 7. Altura promedio de las plantas de *Eucalyptus* gXu transformadas con el constructo ARNi DEL1 o DEL1/3.

Figura 8. Fenotipos de plantas DEL1 silvestre y transgénicas cultivadas en el invernadero.

Figuras 9A, 9B y 9C. Alineaciones de secuencia de las secuencias de DELLA de diferentes especies de eucaliptos. **9A/1 y 9A/2** juntas muestran que DELLA1 de gXu tiene un 99 % de identidad con una secuencia de DELLA parcialmente secuenciada de *Eucalyptus camaldulensis*. **9B/1 y 9B/2** juntas muestran que DELLA1 de gXu tiene un 99 % de identidad con una DELLA similar a RGA parcialmente secuenciada de *Eucalyptus globulus*. **9C/1 y 9C/2** juntas muestran que DELLA2 de gXu tiene un 97 % de identidad con una secuencia de DELLA similar a RGA de *Eucalyptus globulus*.

Figura 10. Representación esquemática de los mapas de ADN-T de los constructos. La figura 10 representa esquemáticamente ciertos constructos de edición del genoma DELLA no limitantes según la invención.

5 Figura 11. Ubicación de los ARNg en el gen de DELLA1 en el clon de *Eucalyptus grandis x urophylla*.

Figura 12. Se muestran las secuencias diana del clon de *Eucalyptus grandis x urophylla* silvestre (WT, por sus siglas en inglés) y 6 eventos de mutación en Cas9 (m1-6). Las secuencias de ARNg y motivo adyacente al protoespaciador (PAM; texto en negrita) se encuentran encima de la secuencia silvestre.

10 Figura 13 Alineación entre la secuencia de nucleótidos de DELLA1 de WT y el evento 7 que muestra una delección de 189 nt.

Definiciones

15 Como se utiliza en la presente memoria, un “gen funcional” es un gen silvestre o un gen que tiene una o más mutaciones, en comparación con el gen silvestre correspondiente, que no dan como resultado la pérdida completa de ninguna función esencial en la proteína codificada por el gen funcional, en comparación con la proteína codificada por el gen silvestre correspondiente. Como se utiliza en la presente memoria, una “proteína funcional” es una proteína silvestre o una proteína que tiene uno o más cambios de aminoácido, en comparación con la proteína silvestre correspondiente, que no dan como resultado la pérdida completa de ninguna función esencial en la proteína funcional, en comparación con la proteína silvestre correspondiente.

25 Como se utiliza en la presente memoria, un “gen completamente funcional” es un gen silvestre o un gen que tiene una o más mutaciones, en comparación con el gen silvestre correspondiente, que no dan como resultado la pérdida de ninguna función en la proteína codificada por el gen completamente funcional, en comparación con la proteína codificada por el gen silvestre correspondiente. Como se utiliza en la presente memoria, una “proteína completamente funcional” es una proteína silvestre o una proteína que tiene uno o más cambios de aminoácidos, en comparación con la proteína silvestre correspondiente, que no dan como resultado la pérdida de ninguna función en la proteína completamente funcional, en comparación con la proteína silvestre correspondiente.

30 Como se utiliza en la presente memoria, el término “gen” puede reemplazarse por “ácido nucleico que codifica proteínas”.

35 Como se utiliza en la presente memoria, el término “aproximadamente” se define como estar dentro de más o menos el 10 % de un valor o estado dado, preferiblemente dentro de más o menos el 5 % de dicho valor o estado. Como se utiliza en la presente memoria, el término “sustancialmente” significa al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más de un valor o estado dado.

40 A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En la presente memoria se describen métodos y materiales para usar en la presente invención; también se pueden usar otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica.

45 Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las figuras, y de las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

50 Las proteínas DELLA desempeñan un papel central en la regulación de las GA. Las GA son fitohormonas que regulan una amplia gama de procesos de desarrollo, que incluyen la germinación de las semillas, la expansión de las hojas, el alargamiento del tallo, la floración y el desarrollo de frutos y semillas (Sun y Gubler, 2004; Swain y Singh, 2005). El efecto de la GA en estos procesos de desarrollo varía de un tejido a otro. Como tal, es necesario ajustar el patrón de expresión de las proteínas DELLA en la planta para aumentar la altura y la biomasa de la planta sin afectar negativamente el crecimiento de las raíces.

55 Los intentos anteriores de modificar la expresión de la GA para superar la inhibición de la GA han demostrado consistentemente que modificar la expresión de la GA para promover el alargamiento del tallo tiene un efecto antagónico en las raíces. Por ejemplo, tanto las mutaciones sobreproductoras de la GA como las aplicaciones exógenas de la GA suprimieron la formación de raíces laterales y adventicias (Eriksson y col., 2000, Lo y col., 2008, Busov y col., 2010).

60 Los intentos anteriores de usar polipéptidos DELLA para superar la inhibición de la GA también han fracasado. Notablemente, se ha demostrado que las delecciones o mutaciones no sinónimas en el dominio DELLA conservado hacen que la proteína sea insensible a la degradación. Estas mutaciones no solo no superan la inhibición de la GA, sino que en realidad bloquean constitutivamente la respuesta de la GA. Además, estas mutaciones en DELLA también

inhiben el crecimiento de las plantas, lo que da como resultado un fenotipo enano indeseable (Peng y col., 1999, Harberd y col., 2009). En las plantas *Populus*, el bloqueo de la señalización de la GA mediante la expresión exógena de versiones sin DELLA de GAI y RGL1 también dio como resultado plantas enanas indeseables (Busov y col., 2006).

Esta descripción proporciona composiciones, ensayos y métodos para modificar genéticamente plantas para alterar selectivamente la expresión del gen DELLA para superar la inhibición de la GA sin inhibir el crecimiento de las plantas. La expresión selectiva de los polipéptidos DELLA en la planta puede superar la inhibición de la GA y, al mismo tiempo, evitar los problemas (p. ej., supresión de la formación de raíces) típicamente asociados con los intentos de superar la inhibición de la GA. Por lo tanto, la presente invención aumenta simultáneamente la altura de la planta y conserva la integridad del crecimiento de las raíces mediante la manipulación selectiva de los niveles de expresión de DELLA en la planta y en diferentes tejidos de la planta.

Actividad DELLA

La presente descripción se refiere a la ingeniería genética de plantas para alterar la expresión del gen DELLA y, en particular, a la regulación específica de tejido de la expresión de las proteínas DELLA.

En la presente memoria se proporcionan plantas transgénicas cuya expresión de polipéptidos que tienen actividad DELLA se ha alterado. Como se utiliza en la presente memoria, un polipéptido DELLA es un polipéptido que tiene actividad DELLA. Un polipéptido que tiene actividad DELLA significa un polipéptido capaz de formar el complejo GA-GID1-DELLA que reprime el crecimiento promovido por la giberelina (GA) (figura 1).

Las alteraciones en el nivel de expresión de los polipéptidos DELLA, en comparación con las plantas silvestre pueden incluir, p. ej., aumento o disminución del nivel de expresión de un polipéptido DELLA, aumento o disminución de la actividad DELLA, aumento o disminución del nivel de transcripción de un gen que codifica un polipéptido DELLA, expresión de polipéptidos DELLA en tejidos específicos, ausencia de expresión detectable de polipéptidos DELLA en tejidos individuales o ausencia de expresión detectable de polipéptidos DELLA en toda la planta. Se puede alterar más de un nivel de expresión del polipéptido DELLA endógeno en una célula o planta. Los polipéptidos DELLA usados, regulados o expresados en la presente invención pueden incluir polipéptidos DELLA endógenos o polipéptidos DELLA exógenos.

Como se utiliza en la presente memoria, el término polipéptido DELLA se refiere a un DELLA funcional y a fragmentos funcionales del mismo que tienen un primer dominio conservado que codifica el dominio DELLA y un segundo dominio conservado que codifica un dominio conservado de treonina, valina, histidina, tirosina, asparagina y prolina (TVHYNP). Las figuras 2A y 2B representan una alineación de aminoácidos de cuatro polipéptidos DELLA y los dominios conservados.

Los inventores han descrito en la presente memoria tres homólogos de DELLA en eucalipto.

Modificaciones de expresiones de DELLA

En la presente memoria se proporcionan métodos para modificar los fenotipos de las plantas alterando los niveles de expresión de los polipéptidos DELLA en las plantas. Los polipéptidos DELLA o polinucleótidos que codifican los polipéptidos DELLA se expresan en plantas silvestre (WT) o en plantas que tienen un nivel de expresión de DELLA alterado en comparación con el WT. Como se menciona en la presente memoria, las plantas que tienen un nivel de expresión de DELLA alterado pueden ser el resultado de mutaciones genéticas de origen natural o el resultado de la ingeniería genética de la planta. En un aspecto, la ingeniería genética de la planta incluye alterar el nivel de expresión de al menos una región codificante de DELLA presente en el genoma de una planta. La planta puede ser una planta silvestre o una planta modificada genéticamente.

Las técnicas que pueden usarse para alterar el nivel de expresión de una región codificante de DELLA incluyen, pero no se limitan a:

- i. alterar la región codificante del gen DELLA;
- ii. alterar el transcrito de la región codificante del gen DELLA, tal como alterar el transcrito de ARNm de una región codificante;
- iii. alterar la actividad de un polipéptido DELLA endógeno,
- iv. modificar la expresión temporal y/o espacial de la región codificante de DELLA colocándola transgénicamente bajo el control de un promotor no nativo; o
- v. sobreexpresar una región codificante del gen DELLA.

Técnicas de regulación a la baja de genes

El uso de ARN antisentido, ribozimas, interferencia por ARN bicatenario (ARNbc) y métodos de desactivación genética, tales como los sistemas de tipo CRISPR, TALEN y dedos de zinc, son técnicas valiosas para generar plantas con un fenotipo que es diferente en comparación con el fenotipo de una planta silvestre de la misma variedad.

Las tecnologías de ARN antisentido, ribozima y ARNbc típicamente se dirigen a los transcritos de ARN de las regiones codificantes.

La tecnología de **ARN antisentido** implica introducir en una célula una molécula de ARN que sea complementaria a la secuencia que se encuentra en un ARNm particular de una célula. Al unirse al ARNm, el ARN antisentido puede inhibir la traducción del producto génico codificado. El uso de la tecnología antisentido para reducir o inhibir la expresión de genes vegetales específicos se ha descrito, por ejemplo, en el documento EP 271988, Smith y col., 1988, Nature, 334:724-726, y Smith y col., 1990, Plant Mol. Biol., 14:369-379.

La secuencia de ácido nucleico antisentido transformada en plantas será sustancialmente idéntica a al menos una porción de la región codificante del gen o genes que se van a reprimir. Sin embargo, la secuencia no tiene que ser perfectamente idéntica para inhibir la expresión del ARNm codificado. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico antisentido o sentido que codifique solo una porción de la secuencia que codifica DELLA puede ser útil para producir una planta en la que se inhiba la expresión del gen DELLA. Para la supresión antisentido, la secuencia introducida no necesita ser de longitud completa en relación con el producto de transcripción primario o el ARNm completamente procesado. En general, un ácido nucleico antisentido con mayor homología con el ARN diana puede compensar el uso de un polinucleótido más corto. Además, el polinucleótido introducido no necesita tener el mismo patrón de intrón o exón; un ARN antisentido dirigido a segmentos no codificantes del gen o genes que se van a reprimir puede ser igualmente eficaz. En algunos aspectos, se puede usar una secuencia de al menos, p. ej., 20, 25, 30, 50, 100, 200 o más nucleótidos continuos (hasta la longitud completa del ARNm) sustancialmente idéntica a un ARNm del gen DELLA endógeno, o un complemento del mismo.

También se pueden usar **moléculas catalíticas de ARN o ribozimas** para inhibir la expresión de un gen que codifica DELLA. Una ribozima es un ARN que tiene tanto un dominio catalítico como una secuencia que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico particular. La ribozima funciona asociándose con la molécula de ácido nucleico (a través del dominio complementario de la ribozima) y, a continuación, escindiendo la molécula de ácido nucleico utilizando el dominio catalítico. Al llevar a cabo esta escisión, la ribozima no se altera en sí misma y, por lo tanto, es capaz de reciclar y escindir otras moléculas, lo que la convierte en una verdadera enzima. Se han identificado varias clases de ribozimas. Una clase de ribozimas se deriva de varios ARN circulares pequeños que son capaces de autoescindir y replicarse en las plantas. Los ARN se replican ya sea solos (ARN viroides) o con un virus auxiliar (ARN satélite). Algunos ejemplos son los ARN del viroide de la mancha solar del aguacate y los ARN satélite del virus de la mancha anular del tabaco, el virus de la raya transitoria de la alfalfa, el virus del moteado del tabaco aterciopelado, el virus del moteado de *Solanum nudiflorum* y el virus del moteado del trébol subterráneo. El diseño y el uso de ribozimas específicas de ARN diana se describen en Haseloff y col., Nature, 334:585-591 (1988).

Otro método mediante el cual se puede inhibir la expresión de un gen que codifica DELLA es mediante la **supresión de sentido** (también conocida como cosupresión). Se ha demostrado que la introducción de casetes de expresión en los que una secuencia de ácido nucleico de un gen diana se configura en la orientación de sentido con respecto al promotor y se transcribe activamente en la célula es un medio eficaz para suprimir la transcripción de los genes diana. Para un ejemplo del uso de este método para modular la expresión de genes endógenos, ver Napoli y col., The Plant Cell 2:279-289 (1990); Flavell, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91:3490-3496 (1994); Kooter y Mol, Current Opin. Biol. 4:166-171 (1993); y las patentes estadounidenses US-5.034.323, US-5.231.020 y US-5.283.184.

Para la supresión de sentido, la secuencia de ácido nucleico introducida por el casete de expresión necesita ser menos que absolutamente idéntica a la secuencia del gen diana, y tampoco es necesario que sea de longitud completa con respecto al producto de transcripción primario o al ARNm completamente procesado. Además, la secuencia introducida no necesita tener el mismo patrón de intrón o exón, y la identidad de los segmentos no codificantes será igualmente eficaz. En algunos aspectos, se usa una secuencia de los intervalos de tamaño indicados anteriormente para la regulación antisentido, es decir, 30-40, o al menos aproximadamente 20, 50, 100, 200, 500 o más nucleótidos.

La alteración de una región codificante de un gen dianadiana se puede lograr mediante la inactivación basada en el ADN de transferencia (**ADN-T**). Por ejemplo, un ADN-T puede colocarse dentro de una región codificante de polinucleótidos descrita en la presente memoria, alterando de este modo la expresión del transcrito y la proteína codificados. La inactivación basada en ADN-T se puede usar para introducir en una célula vegetal una mutación que altere la expresión de la región codificante, p. ej., disminuye la expresión de una región codificante o disminuye la actividad del polipéptido codificado por la región codificante. Por ejemplo, las mutaciones en una región codificante y/o en una región reguladora unida operativamente se pueden realizar mediante delección, sustitución o adición de uno o más nucleótidos. El uso de la inactivación basada en ADN-T se analiza, por ejemplo, en Azpiroz-Leehan y col., (1997, Trends in Genetics, 13:152 - 156). La alteración de una región codificante también se puede lograr usando métodos que incluyen transposones, recombinación homóloga y similares.

En un aspecto, el método para controlar la expresión del gen DELLA en la planta usa un ARN bicatenario (**ARNbc**) o un ácido nucleico que puede promover o conducir a la producción de un ARNbc, que puede usarse para regular a la baja un gen DELLA endógeno mediante la interferencia por ARN (ARNi). Se sabe que el ARNi es un método eficaz para la regulación a la baja de genes en plantas [ver, p. ej., Chuang, C. F. y Meyerowitz, E. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10 97: 4985 (2000); Waterhouse y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13959-13964 (1998); Tabara y col., Science 282:430-431 (1998); Matthew, Comp Funct Genom 5: 240-244 (2004); Lu y col., Nucleic Acids Res. 32(21):e171 (2004)].

Sin pretender imponer ninguna teoría, los casetes de expresión pueden introducir ARNbc en una célula que, cuando se expresan en la célula, son procesados en ARNbc cortos denominados ARN interferentes pequeños (ARNip) por una endonucleasa endógena. El ARNip media en el ARNi mediante la formación de un complejo de ribonucleasa multicomponente denominado complejo de silenciamiento por interferencia de ARN (RISC, por sus siglas en inglés), lo que conduce a la degradación del transcrito del gen diana. El silenciamiento génico postranscripcional mediante ARN bicatenario se analiza con más detalle en Hammond y col., Nature Rev Gen 2: 110-119 (2001), Fire y col., Nature 391: 806-811 (1998) y Timmons y Fire, Nature 395: 854 (1998). Los ARNip son generalmente ARNbc cortos que tienen una longitud en las plantas que va de 19 a 25 pares de bases, o de 20 a 24 pares de bases. En un aspecto, se pueden usar ARNip que tengan 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de bases y, en particular, 21 o 22 pares de bases, correspondientes al gen diana que se va a regular a la baja. Sin embargo, la invención no pretende limitarse al uso de dichos ARNip.

El ARNbc se puede formar a partir de dos cadenas de ARN separadas (sentido y antisentido) que se hibridan entre sí. Una de las cadenas de ARNbc tiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos parte de la secuencia de nucleótidos del gen diana que se va a regular a la baja y la otra cadena del ARNbc es capaz de formar pares de bases con la primera cadena. Alternativamente, el ARNbc puede ser una única molécula de polinucleótido que tiene una estructura de tallo-lazo u horquilla replegada en donde las cadenas sentido y antisentido del ARNbc se forman a partir de diferentes regiones de una única molécula de polinucleótido que es parcialmente autocomplementaria. La molécula de polinucleótido única comprende además una región de lazo entre las regiones sentido y antisentido. La naturaleza y la secuencia precisas del 'lazo' que une las dos cadenas de ARN generalmente no son importantes para la invención, excepto que no deberían afectar la capacidad de la parte bicatenaria de la molécula para mediar en el ARNi. Los ARN que tienen la estructura de horquilla son convenientes si el ARNbc se va a sintetizar mediante expresión *in vivo*, por ejemplo en una célula u organismo huésped, o mediante transcripción *in vitro*. Las características de los ARN en forma de 'horquilla' o 'tallo-lazo' para usar en el ARNi son generalmente conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, la publicación de patente internacional WO 1999/53050). En un aspecto de la invención, la estructura de lazo puede comprender secuencias de conector o secuencias adicionales como se describe a continuación.

Los polinucleótidos de ARNi pueden abarcar el ARN diana de longitud completa o pueden corresponder a un fragmento del ARN diana. En algunos casos, el fragmento tendrá menos de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos correspondientes a la secuencia diana. Además, en un aspecto, estos fragmentos tienen una longitud de al menos, p. ej., 20, 50, 100, 200, 300 o más nucleótidos. El límite superior de la longitud del ARNbc puede depender del requisito de que el ARNbc se procese dentro de la célula en fragmentos que dirijan el ARNi. La longitud elegida puede, p. ej., estar influenciada por el método de síntesis del ARN y el modo de suministro del ARN a la célula. Aunque los genes usados para el ARNi no necesitan ser completamente idénticos al gen diana, pueden ser, p. ej., al menos un 70 %, 80 %, 90 % o 95 % o más idénticos a la secuencia del gen diana. Ver, p. ej., la publicación de patente estadounidense n.º 2004/0029283.

En algunos casos, los fragmentos para usar en el ARNi serán al menos sustancialmente similares a las regiones de una proteína diana que no se encuentran en otras proteínas del organismo o pueden seleccionarse para que tengan la menor similitud posible con los transcritos de otros organismos, p. ej., se seleccionan comparándolas con las secuencias al analizar las bases de datos de secuencias disponibles públicamente.

Además, el ARNbc puede contener regiones cortas no diana que flanquean la secuencia específica de diana, siempre que dichas secuencias no afecten de manera significativa el rendimiento del ARNbc en la inhibición del ARN.

El ARNbc puede contener una o más bases sustitutas para optimizar el rendimiento en el ARNi. Será evidente para el experto en la técnica cómo hacer variar sucesivamente cada una de las bases del ARNbc y analizar la actividad de los ARNbc resultantes (p. ej., en un sistema de ensayo *in vitro* adecuado) para optimizar el rendimiento de un ARNbc dado.

El ARNbc puede contener además bases de ADN, bases no naturales, enlaces de cadena principal no naturales o modificaciones de la cadena principal de azúcar-fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad durante el almacenamiento o mejorar la resistencia a la degradación por parte de las nucleasas.

El ARNbc puede ser total o parcialmente bicatenario. Los ARNbc parcialmente bicatenarios pueden incluir salientes monocatenarios cortos en uno o ambos extremos de la porción bicatenaria. El ARNbc también puede contener regiones internas no complementarias.

En algunas constructos, los ARNbc pueden comprender secuencias adicionales y, opcionalmente, un **conector**. Las secuencias adicionales pueden incluir, por ejemplo, (i) una secuencia que facilite la producción a gran escala del constructo de ARNbc; (ii) una secuencia que produce un aumento o una disminución de la estabilidad del ARNbc; y (iii) secuencias adicionales para catalizar el procesamiento de las regiones de ARNbc. En un aspecto, el conector es una secuencia de ARN que se autoescinde condicionalmente, preferiblemente un conector sensible al pH o un conector sensible hidrófobo.

Se pueden conectar múltiples regiones de ARNbc del constructo de ARNbc directamente o mediante uno o más conectores. Un conector puede estar presente en un sitio del constructo de ARN, separando las regiones de ARNbc de otra región de interés. Se pueden conectar sin conectores múltiples regiones de ARNbc de los constructos de ARNbc.

La secuencia de conector puede promover la división de un ARNbc largo en regiones de ARNbc más pequeñas en circunstancias particulares, lo que da como resultado la liberación de regiones de ARNbc separadas en estas circunstancias y conduce a un silenciamiento génico más eficiente por parte de estas regiones de ARNbc más pequeñas. Ejemplos de conectores autoescindibles condicionalmente adecuados son las secuencias de ARN que se autoescinden en condiciones de pH alto. Los ejemplos adecuados de dichas secuencias de ARN se describen en Borda y col., Nucleic Acids Res. 31: 2595-600 (2003). Esta secuencia se origina en el núcleo catalítico de la ribozima HH16 cabeza de martillo.

Los **conectores** también pueden ubicarse en un sitio del constructo de ARNbc, separando las regiones de ARNbc de otra, p. ej., una secuencia de interés adicional, que preferiblemente proporciona alguna función adicional al constructo de ARN.

Se puede usar un intrón como conector. Un “intrón”, como se utiliza en la presente memoria, puede ser cualquier secuencia de ARN no codificante de un ARN premensajero.

También se puede usar como conector una secuencia de ARN no complementaria, que va de aproximadamente 1 par de bases a aproximadamente 10.000 pares de bases.

Los vectores de expresión que expresan continuamente ARNip en células transfectadas de forma transitoria y estable se diseñan para expresar pequeños ARN en forma de horquilla, que se procesan *in vivo* en moléculas de ARNip capaces de llevar a cabo el silenciamiento específico de gen [Brummelkamp y col., Science 296: 550-553 (2002), y Paddison y col., Genes & Dev. 16: 948-958 (2002)].

Otra forma más de suprimir la expresión de un gen vegetal endógeno es mediante la expresión recombinante del **microARN** que suprime un gen diana (p. ej., un gen que codifica DELLA). Los microARN artificiales son ARN monocatenarios (p. ej., entre 18 y 25 nucleótidos, p. ej., 21 nucleótidos), que no se encuentran normalmente en las plantas y que se procesan a partir de precursores de microARN endógenos. Sus secuencias se diseñan según los determinantes de la selección de objetivos de microARN vegetales, de modo que el microARN artificial silencia específicamente su(s) gen(es) diana previsto(s) y se describen generalmente en Schwab y col., Plant Cell 18: 1121-1133 (2006). Ver también la publicación de patente estadounidense n.º 2008/0313773.

Otro método para reducir los niveles de un producto de expresión génica de un gen de interés es emplear técnicas de **riboswitch** (ver, p. ej., las publicaciones de patente estadounidense n.ºs 2010/0286082 y 2011/0245326).

En algunos aspectos, los casetes de expresión que comprenden un gen DELLA se introducen en una planta, que tiene un fondo genético diferente al silvestre. En un aspecto, el fondo genético de la planta es diferente del silvestre al tener niveles de expresión reducidos de al menos uno de los polipéptidos DELLA de la planta. La diferencia en el fondo genético puede ser el resultado de mutaciones genéticas de origen natural o métodos de ingeniería genética tal como se describen en la presente memoria para reducir la expresión de un producto deseado.

En un aspecto, un sistema de edición génica de origen no natural para controlar la expresión del polipéptido DELLA en la planta son las tecnologías de edición del sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente intercaladas (**CRISPR**, por sus siglas en inglés). Dichas tecnologías CRISPR incluyen, pero no se limitan a, las descritas en la patente estadounidense n.º 8.697.359; publicación de patente estadounidense n.º 2014/0273235; y la publicación de patente internacional n.º WO 2013/176772.

En general, el “sistema CRISPR” se refiere colectivamente a los transcritos y otros elementos involucrados en la expresión o la dirección de la actividad de las proteínas asociadas a CRISPR (“Cas”). El sistema CRISPR puede incluir polinucleótidos que codifican el polipéptido Cas, polinucleótidos CRISPR transactivadores (“*crtra*”) (p. ej., ARN*crtra* o un ARN*crtra* parcial activo), un polinucleótido pareja de *crtra* (que abarca una “repetición directa” o una repetición directa parcial procesada con ARN*crtra* en el contexto de un sistema CRISPR endógeno), un polinucleótido guía (también denominado “espaciador” en el contexto de un sistema CRISPR endógeno) u otros polinucleótidos relacionados con el locus CRISPR.

En un aspecto, uno o más elementos de un sistema CRISPR se derivan de un sistema CRISPR de tipo I, tipo II o tipo III. Los sistemas de tipo I y tipo III utilizan un gran complejo de proteínas Cas para el direccionamiento guiado por el ARNcr. Sin embargo, el sistema de tipo II requiere solo una proteína para el reconocimiento y la escisión del ADN guiados por el ARN (Doudna y Charpentier, Science 346: 1258096-1 - 1258096-9).

En general, un sistema CRISPR se caracteriza por elementos que promueven la formación de un complejo CRISPR en el sitio de una secuencia diana (también denominado protoespaciador en el contexto de un sistema CRISPR endógeno). En el contexto de la formación de un complejo CRISPR, "secuencia diana" se refiere a una secuencia a la que una secuencia guía es complementaria, donde la hibridación entre una secuencia diana y una secuencia guía promueve la formación de un complejo CRISPR. No se requiere necesariamente una complementariedad total, siempre que haya suficiente complementariedad para provocar la hibridación y promover la formación de un complejo CRISPR. Una secuencia diana puede comprender cualquier polinucleótido, tal como polinucleótidos de ADN o ARN. En un aspecto, una secuencia diana se ubica en el núcleo o citoplasma de una célula. La secuencia diana puede estar dentro de un organelo de una célula eucariota, p. ej., una mitocondria o un cloroplasto. En un aspecto de la invención, la recombinación es una recombinación homóloga.

Típicamente, en el contexto de un sistema CRISPR endógeno, la formación de un complejo CRISPR (que comprende una secuencia guía que se hibrida con una secuencia diana y se complejan con una o más proteínas Cas) da como resultado la escisión de una o ambas cadenas en o cerca de (p. ej., dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 o más nucleótidos de) la secuencia diana. Sin pretender imponer ninguna teoría, la secuencia de crtra, que puede comprender o consistir en la totalidad o una porción de una secuencia de crtra silvestre (p. ej., aproximadamente o más de aproximadamente 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85 o más nucleótidos de una secuencia de crtra silvestre), también pueden formar parte de un complejo CRISPR, tal como mediante la hibridación a lo largo de al menos una porción de la secuencia de crtra con toda o una porción de una secuencia pareja de crtra que se une operativamente a la secuencia guía. En un aspecto, la secuencia de crtra tiene suficiente complementariedad con una secuencia pareja de crtra para hibridarse y participar en la formación de un complejo CRISPR. Al igual que con la secuencia diana, se cree que no es necesaria una complementariedad completa, siempre que sea suficiente para que sea funcional. En un aspecto, la secuencia de crtra tiene al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de complementariedad de secuencia a lo largo de la secuencia pareja de crtra cuando se alinea de manera óptima. En un aspecto, uno o más vectores que impulsan la expresión de uno o más elementos de un sistema CRISPR se introducen en una célula huésped de modo que la expresión de los elementos del sistema CRISPR dirige la formación de un complejo CRISPR en uno o más sitios diana. Por ejemplo, una enzima Cas, una secuencia guía unida a una secuencia pareja de crtra y una secuencia de crtra podrían unirse operativamente a elementos reguladores separados en vectores separados.

Una endonucleasa guiada por ARN se dirige a una secuencia de ácido nucleico específica (o sitio diana) mediante un ARN guía. El ARN guía interactúa con la endonucleasa guiada por ARN, así como con el sitio diana, de modo que, una vez dirigida al sitio diana, la endonucleasa guiada por ARN puede introducir una ruptura bicatenaria en la secuencia de ácido nucleico del sitio diana.

La endonucleasa guiada por ARN puede derivarse de un sistema asociado a CRISPR (Cas). El sistema CRISPR/Cas puede ser, p. ej., un sistema de tipo I, de tipo II o de tipo III. Los ejemplos no limitativos de proteínas de CRISPR/Cas adecuadas incluyen Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e (o CasD), Cas6, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas10d, CasF, CasG, CasH, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1 (o CasA), Cse2 (o CasB), Cse3 (o CasE), Cse4 (o CasC), Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csz1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, Cu1966, o Cpf1.

En un aspecto, la endonucleasa guiada por ARN se deriva de un sistema CRISPR/Cas de tipo II. La endonucleasa guiada por ARN puede derivarse de una proteína Cas9. La proteína Cas9 puede proceder de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus* sp., *Nocardiopsis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales bacterium*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas* sp., *Crocospaera watsonii*, *Cyanothecce* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus* sp., *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor beccsii*, *Candidatus desulfurudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Finexgoldia magna*, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochrocatium vinosum*, *Marinobacter* sp., *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsoni*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Nostoc* sp., *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, *eArthrospira* sp., *Lyngbya* sp., *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria* sp., *Petrogona mobilis*, *Thermosiphon africanus*, o *Acaryochloris marina*.

Polipéptidos DELLA

Como se utiliza en la presente memoria, el término “polipéptido DELLA” incluye polipéptidos DELLA endógenos, variantes polimórficas DELLA endógenas, alelos DELLA endógenos, mutantes DELLA endógenos, homólogos DELLA y ortólogos DELLA del polipéptido DELLA de eucalipto endógeno. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido DELLA se refiere a un gen, un preARNm, un ARNm y similares, incluyendo secuencias optimizadas por codones.

El término “endógeno” significa un ácido nucleico que codifica un polipéptido que corresponde a un polipéptido que es nativo de la planta silvestre.

El término “homólogo” significa un gen que tiene esencialmente la misma función bioquímica o una función bioquímica similar a la de otro gen.

Un polinucleótido es “heterólogo” con respecto a un organismo o una segunda secuencia de polinucleótidos si se origina a partir de una especie diferente o, si se deriva de la misma especie, está modificado con respecto a su forma o función natural. Por ejemplo, cuando se dice que un polinucleótido que codifica una secuencia de polipéptido se une operativamente a un promotor heterólogo, significa que la secuencia codificante del polinucleótido que codifica el polipéptido se deriva de una especie, mientras que la secuencia promotora se deriva de otra especie diferente; o, si ambas se derivan de la misma especie, la secuencia codificante no se asocia de forma natural con el promotor (p. ej., es una secuencia codificante modificada genéticamente, de un gen diferente en la misma especie o de un alelo de un ecotipo o variedad diferente).

Un polipéptido “sobreexpresado”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un aumento en el nivel de expresión de un polipéptido DELLA endógeno. El aumento en el nivel de expresión se puede describir como aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o más con respecto al nivel de expresión silvestre. Alternativamente, un polipéptido “sobreexpresado” puede referirse a la introducción de un polinucleótido DELLA en una célula y a la expresión del polipéptido codificado por dicho polinucleótido.

Regulación a la baja de DELLA

En un aspecto, el nivel de expresión del polipéptido DELLA endógeno se reduce en toda la planta o solo en un subconjunto de células o tejidos de la planta. El nivel de expresión del polipéptido DELLA endógeno se puede reducir según cualquier método conocido en la técnica, tal como los métodos enumerados anteriormente. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, el antisentido, el ARNip, el microARN, el ARNbc, la supresión de sentido, la mutagénesis, CRISPR y la inhibición negativa dominante.

En un aspecto, el nivel de expresión del polipéptido DELLA endógeno se reduce en la planta utilizando el ARNbc. El ARNbc se expresa en la planta, la célula vegetal o el tejido vegetal, a partir de casetes de expresión que codifican el ARN en forma de horquilla (ARNhp) que se dirigen a uno o más polinucleótidos que codifican polipéptidos DELLA endógenos.

En un aspecto, los métodos de la invención abarcan el suministro simultáneo o secuencial de dos o más ARNbc o constructos de ARN diferentes al mismo polinucleótido DELLA endógeno, para lograr una inhibición más potente de un único gen diana.

En un aspecto, los métodos de la invención abarcan el suministro simultáneo o secuencial de dos o más ARNbc o constructos de ARN diferentes a diferentes polinucleótidos DELLA endógenos, para lograr la regulación a la baja o la inhibición de múltiples genes diana.

Alternativamente, múltiples polinucleótidos DELLA endógenos se seleccionaron como diana mediante la provisión de un ARNbc que es sustancialmente complementario a una secuencia que se encuentra en múltiples secuencias diana.

En un aspecto, el nivel de expresión de uno o más polipéptidos DELLA endógenos se reduce en las plantas de eucalipto.

En un aspecto, los polipéptidos DELLA de eucalipto se seleccionan del grupo que consiste en las Id. de sec. n.º: 1, 3, 5, 7, 9 y 11.

Expresión específica en la raíz

Esta descripción proporciona plantas transgénicas y métodos para fabricar plantas transgénicas en las que los niveles de expresión del polipéptido DELLA en las raíces de la planta se mantienen, aumentan o se reducen en comparación con los niveles de expresión del polipéptido DELLA en otras partes de la planta. Según algunos aspectos, los niveles de expresión del polipéptido DELLA en las raíces de la planta se mantienen o aumentan mientras que los niveles de expresión del polipéptido DELLA en otras partes de la planta se reducen. La expresión específica de los polipéptidos DELLA en las raíces supera los problemas típicamente asociados con las plantas en las que generalmente se reduce la expresión del polipéptido DELLA de forma indiscriminada en toda la planta, incluidas las raíces, lo que puede dar como resultado una supresión de la formación de raíces laterales y adventicias.

En un aspecto, las plantas transgénicas de la presente invención contienen moléculas de polinucleótido que reducen el nivel de expresión de al menos un polipéptido DELLA endógeno en tejidos verdes.

5 En un aspecto, un casete de expresión que comprende un promotor específico para tejido verde unido operativamente a una molécula de polinucleótido se introduce en una planta de la invención de modo que, cuando se expresa en las células vegetales, reduce el nivel de expresión de al menos un polipéptido DELLA endógeno en comparación con una planta silvestre.

10 En un aspecto, la invención proporciona una planta que contiene al menos dos casetes de expresión. Un primer casete de expresión que comprende un polinucleótido que reduce el nivel de expresión de al menos un polipéptido DELLA endógeno; y un segundo casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido DELLA unido a un promotor heterólogo específico para la raíz que provoca la sobreexpresión del polipéptido DELLA en las raíces de la planta.

15 En un aspecto, la invención proporciona métodos para diseñar una planta que tiene actividad DELLA que se ubica principalmente en las raíces de la planta (p. ej., al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 99 % de la actividad DELLA en la planta se ubica en las raíces de la planta). El método comprende introducir en la planta un primer casete de expresión, que cuando se expresa en dicha planta, reduce el nivel de expresión de al menos un polipéptido DELLA endógeno; y un segundo casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido DELLA, unido operativamente a un promotor heterólogo específico para la raíz; y cultivar la planta en condiciones tales que el polinucleótido DELLA se sobreexpresen en las raíces de la planta.

25 En un aspecto, un casete de sobreexpresión de DELLA se introduce en una planta que tiene un fondo genético que es diferente al de la planta silvestre. Como se utiliza en la presente memoria, un fondo genético diferente puede referirse a una planta en la que el nivel de expresión de uno o más polinucleótidos DELLA endógenos está reducido o aumentado en comparación con una planta silvestre, en toda la planta o solo en un subconjunto de células o tejidos de la planta. El nivel de expresión alterado puede atribuirse a una planta que tiene una mutación genética de origen natural en un polinucleótido DELLA endógeno o a una planta transgénica en la que se ha modificado el nivel de expresión del polipéptido DELLA. La planta transgénica se puede modificar según cualquier método conocido en la técnica, incluidos, entre otros, los métodos enumerados anteriormente.

35 Un experto en la técnica entenderá que un polinucleótido DELLA sobreexpresado puede, pero no necesariamente, ser idéntico al polinucleótido DELLA endógeno regulado a la baja. En un aspecto, el polinucleótido DELLA es sustancialmente idéntico (p. ej., al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %) al polinucleótido DELLA endógeno regulado a la baja para evitar el silenciamiento del polinucleótido DELLA sobreexpresado (p. ej., usando diferentes codones, la secuencia de polinucleótidos DELLA sobreexpresados puede variar con respecto al polinucleótido DELLA endógeno que se reduce mientras codifica una secuencia de aminoácidos DELLA idéntica). El grado de identidad u homología de secuencia se determina usando el algoritmo de alineación de secuencias Blast.

45 En un aspecto, el polinucleótido DELLA sobreexpresado se selecciona de, p. ej., GAI (*Arabidopsis thaliana*, At1g14920); RGA (*Arabidopsis thaliana*, At2g01570); RGL1 (*Arabidopsis thaliana*, At1g66350); RGL2 (*Arabidopsis thaliana*, At3g03450); RGL3 (*Arabidopsis thaliana*, At5g17490); OsGAI1 (*Oryza sativa*, BAA90749); OsGAI2 (*Oryza sativa*, AAR31213); OsGAI3 (*Oryza sativa*, BAD82782); HvSLN1 (*Hordeum vulgare*, AAL66734); VvGAI1 (*Vitis vinifera*, AAM19210); TaGAI (*Triticum aestivum*, CAB51555); ZmGAI (*Zea mays*, CAB51557), *Populus* GAI (XP_011021384.1, XP_011002785.1) y *Hevea brasiliensis* (gb ALG02536.1).

Cuando se introducen dos o más casetes de expresión en las células vegetales, los casetes de expresión se pueden unir en un solo constructo o los casetes de expresión pueden permanecer como dos o más constructos separados.

55 En un aspecto, la planta es una planta de eucalipto.

Los términos “fragmento” y “porción” se usan indistintamente en la presente memoria.

60 El término “tejido verde”, como se utiliza en la presente memoria, incluye, pero no se limita a, tejidos fotosintéticos, hojas, tejido de la epidermis del tallo, tejidos del meristemo apical y puntas de los brotes.

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria, incluidas las secuencias de nucleótidos que son una porción de una región codificante descrita en la presente memoria, pueden unirse operativamente a una secuencia reguladora. Un ejemplo de una secuencia reguladora es un promotor.

65

El término “promotor”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de polinucleótidos capaz de dirigir la transcripción de una secuencia de ADN en una célula. Por lo tanto, los promotores usados en los constructos de polinucleótidos de la invención incluyen elementos de control transcripcional que actúan en cis y trans y secuencias reguladoras que participan en la regulación o modulación del tiempo y/o la velocidad de transcripción de un gen en una célula, tejido u órgano vegetal. Dicho promotor puede proceder de origen vegetal, bacteriano, viral, fúngico o animal. Dicho promotor puede ser constitutivo, es decir, capaz de iniciar una transcripción génica de alto nivel en una pluralidad de tejidos vegetales; específico de tejido, es decir, capaz de iniciar la transcripción génica en un tejido o tejidos vegetales específicos; inducible, es decir, capaz de iniciar la transcripción génica en respuesta a un estímulo, o; quimérico, es decir, formado por porciones de al menos dos promotores diferentes.

Los ejemplos no limitativos de promotores vegetales constitutivos incluyen los promotores CaMV35S y CaMV19S, el promotor del transcrito subgenómico del virus del mosaico de la escrofularia (sgFIMV), el promotor del virus de las bandas de las venas de la fresa (SVBV), el promotor FMV34S, el promotor del badnavirus baciliforme de la caña de azúcar, el promotor CsVMV, el promotor de actina de *Arabidopsis* ACT2/ACT8, el promotor de ubiquitina UBI1 de *Arabidopsis*, el promotor de tiorina BTH6 de hoja de cebada, el promotor de actina de arroz (Verdaguer B. y col., Plant 15 Mol. Biol. 1998 37(6):1055-67), GOS2 (de Pater y col., Plant J Nov;2(6) :837-44, 1992), ciclofilina del arroz (Bucholz y col., Plant Mol Biol. 25(5):837-43, 1994), e histona H3 del maíz (Lepetit y col., Mol. Gen. Genet. 231: 276-285, 1992).

En un aspecto, el promotor es un promotor específico de tejido. Los ejemplos no limitativos de promotores específicos de tejido incluyen los descritos en Yamamoto y col., (1997) Plant J. 12(2):255-265; Kawamata y col., (1997) Plant Cell Physiol. 38(7):792-803; Hansen y col. (1997) Mol. Gen. Genet. 254(3):337-343; Russell y col. (1997) Transgenic Res. 6(2):157-168; Rinehart y col., (1996) Plant Physiol. 112(3):1331-1341; Van Camp y col., (1996) Plant Physiol. 112(2):525-535; Canevascini y col., (1996) Plant Physiol. 112(2):513-524; Yamamoto y col., (1994) Plant Cell Physiol. 35(5):773-778; Lam (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:181-196; Orozco y col. (1993) Plant Mol. Biol. 23(6):1129-1138; Matsuoka y col., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90(20):9586-9590; y Guevara-García y col. (1993) Plant J. 4(3):495-505.

Los ejemplos de promotores que se pueden usar en esta invención incluyen, pero no se limitan a, promotores de tejido verde que incluyen promotores específicos para hojas, promotores específicos para flores, promotores específicos para frutos, promotores específicos para tallos o promotores específicos para tejido fotosintético. Los ejemplos de dichos promotores específicos de tejido incluyen, pero no se limitan a, dos proteínas de unión a la clorofila (cab1 y cab2) de la remolacha azucarera (Stahl D. J. y col., 2004 BMC Biotechnology 2004 4:31), la ribulosa-bisfosfato carboxilasa (Rubisco), codificada por rbcS (Nomura M. y col., 2000 Plant Mol. Biol. 44: 99-106), las subunidades A (gapA) y B (gapB) de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa del cloroplasto (Conley T. R. y col. 1994 Mol. Cell. Biol. 19: 2525-33; Kwon H. B. y col. 1994 Plant Physiol. 105: 357- 67), promotor del gen de *Solanum tuberosum* que codifica la proteína específica de hojas y tallos (ST-LSI) (Zaidi M. A y col., 2005 Transgenic Res. 14:289-98), genes inducibles de defensa y regulados por el tallo, tales como los promotores JAS (publicación de patente estadounidense n.º 2005/0034192), el promotor de la chalcona sintasa (Faktor y col., 1996 Plant Mol. Biol. 32: 849) promotor RJ39 de la fresa (publicación de patente internacional n.º WO 1998/31812).

En un aspecto, el promotor es un promotor específico para la raíz. Los ejemplos no limitativos de promotores específicos para la raíz incluyen PsMTA (Fordam-Skelton, A. P. y col., 1997 Plant Molecular Biology 34: 659-668.), promotor de quitinasa de clase III, promotor del transportador de fosfatos, promotor de la acuaporina 2 intrínseca del tonoplasto, promotor Pyk10, promotor AtFLS5, promotor btg26 y 2-ODD (REO) expresado en la raíz de *Solanum lycopersicum*.

Como se utiliza en la presente memoria, la frase “unido operativamente” se refiere a una posición física del elemento regulador (p. ej., promotor) y el gen de interés, de modo que la secuencia de promotor sea capaz de iniciar la transcripción del gen de interés. Por ejemplo, una secuencia de promotor puede ubicarse aguas arriba de la secuencia de ácido nucleico seleccionada en términos de la dirección de la transcripción y la traducción.

Los casetes y vectores de expresión y los métodos de cultivo *in vitro* para la transformación de células o tejidos vegetales y la regeneración de plantas son generalmente conocidos en la técnica. Ver, p. ej., Gruber y col., “Vectors for Plant Transformation”, en Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, supra, págs. 89-119.

El término “constructo” (también denominado en la presente memoria “vector de expresión”, “constructo de expresión” o “constructo de ADN”) se refiere a un constructo de ácido nucleico que contiene al menos un casete de expresión que, cuando se introduce en una célula huésped, da como resultado la transcripción y/o traducción de un ARN o polipéptido, respectivamente. Los constructos antisentido o sentido que no se traducen o no pueden traducirse se incluyen expresamente en esta definición. En el caso tanto de la expresión de transgenes como de la supresión de genes endógenos (p. ej., mediante el antisentido, el ARNi, la supresión de sentido, el sistema CRISPR), un experto reconocerá que la secuencia de polinucleótidos insertada no tiene por qué ser idéntica, sino que solo puede ser sustancialmente idéntica a la secuencia del gen del que se deriva.

Los constructos recombinantes pueden incluir opcionalmente un gen marcador seleccionable. Como se utiliza en la presente memoria, el término “gen marcador seleccionable” incluye cualquier gen que confiera un fenotipo a una

célula en la que se expresa y que facilita la identificación y/o selección de las células que se transfectan o transforman con un constructo de expresión de la invención. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen genes de resistencia contra los genes de ampicilina (Amp^r), tetraciclina (Tcr), kanamicina (Kan^r), fosfotricina y cloranfenicol (CAT). Otros genes marcadores adecuados proporcionan un rasgo metabólico, p. ej., *manA*. También se pueden usar genes marcadores visuales e incluyen, p. ej., beta-glucuronidasa (GUS), luciferasa y proteína verde fluorescente (GFP).

En un aspecto, un vector que comprende los constructos incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación e integración en procariotas, eucariotas o preferiblemente en ambas (p. ej., vectores lanzadera). Las células eucariotas adecuadas incluyen células vegetales. Las células procariotas adecuadas incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos, por ejemplo, *E. coli* o *A. tumefaciens*.

Los vectores típicos también pueden contener uno o más elementos reguladores adicionales, tales como secuencias de inicio de la transcripción y la traducción, terminadores de la transcripción y la traducción, un líder en 5' y/o un intrón para mejorar la transcripción, una región no traducida en 3' (p. ej., una secuencia que contiene una señal de poliadenilación) y una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito o señal (p. ej., un péptido de tránsito o señalización del cloroplasto). El vector de expresión también puede incluir secuencias diseñadas para mejorar la estabilidad, la producción, la purificación o el rendimiento del polipéptido expresado. Opcionalmente, también se pueden incorporar una o más secuencias de terminación de la transcripción en el constructo recombinante. El término "secuencia de terminación de la transcripción" abarca una secuencia de control en el extremo de una unidad transcripcional, que señala el procesamiento en 3' y la poliadenilación de un transcrito primario y la terminación de la transcripción. Se pueden incorporar elementos reguladores adicionales, tales como potenciadores de la transcripción o la traducción, en el constructo de expresión.

Un vector puede integrarse en el ADN genómico de una célula. Un vector también puede ser capaz de replicarse en un huésped bacteriano, p. ej. *E. coli* o *Agrobacterium tumefaciens*. Preferiblemente, el vector es un plásmido.

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden producirse *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, los métodos para la síntesis *in vitro* incluyen, pero no se limitan a, la síntesis química con un sintetizador de ADN/ARN convencional. Los proveedores comerciales de polinucleótidos sintéticos y reactivos para la síntesis *in vitro* son bien conocidos. Los métodos para la síntesis *in vitro* también incluyen, por ejemplo, la transcripción *in vitro* usando un vector de expresión circular o lineal en un sistema libre de células. Los vectores de expresión también se pueden usar para producir un polinucleótido descrito en la presente memoria en una célula, y el polinucleótido se puede aislar después de la célula.

La invención también proporciona células huésped que tienen un nivel de expresión alterado de los polipéptidos DELLA descritos en la presente memoria. Como se utiliza en la presente memoria, una célula huésped incluye la célula en la que se introdujo un polinucleótido descrito en la presente memoria y su progenie, que puede, pero no necesariamente, incluir el polinucleótido. En consecuencia, una célula huésped puede ser una célula individual o un cultivo celular.

Las células vegetales se pueden transformar de forma estable o transitoria con los constructos de ácido nucleico. Como se utiliza en la presente memoria, "transformación" se refiere a un proceso mediante el cual se inserta un polinucleótido en el genoma de una célula vegetal. Dicha inserción incluye la introducción estable en la célula vegetal y la transmisión a la progenie.

El proceso de transformación da como resultado la introducción de la secuencia de ácido nucleico en la célula para convertir la célula receptora en una célula transformada, genéticamente modificada o transgénica. En una transformación estable, la molécula de ácido nucleico puede integrarse en el genoma de la planta y, como tal, representar un rasgo estable y heredado. En la transformación transitoria, la molécula de ácido nucleico se expresa pero no se integra en el genoma de la célula.

Las plantas transgénicas descritas en la presente memoria pueden producirse usando métodos habituales. Los polinucleótidos o polipéptidos aislados pueden introducirse en una planta monocotiledónea o dicotiledónea mediante una o más técnicas utilizadas típicamente para la administración directa a células conocidas por el experto en la técnica. Dichos protocolos pueden variar según el tipo de organismo, célula, planta o célula vegetal, es decir, monocotiledónea o dicotiledónea, diana de la modificación génica. Los métodos adecuados para transformar células vegetales incluyen la microinyección (Crossway y col., (1986) Biotechniques 4:320-334; y la patente estadounidense n.º 6.300.543), la electroporación (Riggs y col., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5602-5606, transferencia génica directa (Paszowski y col., (1984) EMBO J. 3:2717-2722) y aceleración balística de partículas (ver, por ejemplo, Sanford y col., la patente estadounidense US-4.945.050; la publicación de patente internacional n.º WO 1991/10725; y McCabe y col., (1988) Biotechnology 6:923-926). Ver también Tmes y col., "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells Via Microprojectile Bombardment", págs. 197-213 en Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods. eds. O. L. Gamborg & G. C. Phillips. Springer-Verlag, Berlín Heidelberg Nueva York, 1995; patente estadounidense n.º 5.736.369 (meristemo); Weissinger y col., (1988) An. Rev. Genet. 22:421-477; Sanford y col., (1987) Particulate Science and Technology 5:27-37 (cebolla); Christou y col., (1988) Plant Physiol. 87:671-674 (soja); Datta y col., (1990) Biotechnology 8:736-740 (arroz); Klein y col., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4305-

4309 (maíz); Klein y col., (1988) *Biotechnology* 6:559-563 (maíz); la publicación de patente internacional n.º WO 1991/10725 (maíz); Klein y col., (1988) *PlantPhysiol.* 91:440-444 (maíz); Fromm y col., (1990) *Biotechnology* 8:833-839; y Gordon-Kamm y col., (1990) *Plant Cell* 2:603-618 (maíz); Hooydaas-Van Slogteren y Hooykaas (1984) *Nature* (Londres) 311:763-764; Bytebierm y col., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349 (Liliaceae); De Wet y col., (1985) en *The Experimental Manipulation of Ovule Tissue*, ed. G. P. Chapman y col., págs. 197-209. Longman, Nueva York (polen); Kaeppler y col., (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418; y Kaeppler y col., (1992) *Theor. Apple. Genet.* 84:560-566 (transformación mediada por partículas); patente estadounidense US-5.693.512 (sonicación); D'Halluin y col., (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (electroporación); Li y col., (1993) *Plant Cell Reports* 12:250-255; y Christou y Ford, (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (arroz); Osjoda y col., (1996) *Nature Biotech.* 14:745-750; transformación del maíz mediada por *Agrobacterium* (patente estadounidense US-5.981.840); métodos para bigotes de carburo de silicio (Frame y col., (1994) *Plant J.* 6:941-948); métodos láser (Guo y col., (1995) *Physiologia Plantarum* 93:19-24); métodos de sonicación (Bao y col., (1997) *Ultrasound in Medicine & Biology* 23:953-959; Finer y Finer, (2000) *LettAppl Microbiol.* 30:406-10; Amoah y col., (2001) *J Exp Bot* 52: 1135-42); métodos de polietilenglicol (Krens y col., (1982) *Nature* 296:72-77); los protoplastos de células monocotiledóneas y dicotiledóneas se pueden transformar usando electroporación (Fromm y col., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5824-5828) y microinyección (Crossway y col., (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202: 179-185).

El método más utilizado para introducir un vector de expresión en las plantas se basa en el sistema de transformación natural de *Agrobacterium*. *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, que son bacterias fitopatógenas del suelo, que transforman genéticamente las células vegetales. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, portan los genes responsables de la transformación genética de las plantas. Ver, p. ej., Kado, (1991) *Crit. Rev. Plant Sci.* 10:1. Las descripciones de los sistemas de vectores de *Agrobacterium* y los métodos para la transferencia génica mediada por *Agrobacterium* se proporcionan en Gruber y col., supra; Mild y col., supra; y Moloney y col., (1989) *Plant Cell Reports* 8:238. De manera similar, el gen puede insertarse en la región de ADN-T de un plásmido Ti o Ri derivado de *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes*, respectivamente. Por lo tanto, los casetes de expresión se pueden construir como anteriormente, usando estos plásmidos. Se conocen muchas secuencias de control que, cuando se acoplan a una secuencia codificante heteróloga y se transforman en un organismo huésped, muestran fidelidad en la expresión génica con respecto a la especificidad de tejido/órgano de la secuencia codificante original. Ver, p. ej., Benfey y Chua, (1989) *Science* 244:174-81. Las secuencias de control particularmente adecuadas para usar en estos plásmidos son los promotores de la expresión constitutiva específica para hoja del gen en las diversas plantas diana. Otras secuencias de control útiles incluyen un promotor y un terminador del gen de la nopalina sintasa (NOS). El promotor y el terminador de NOS están presentes en el plásmido pARC2, comercializado por la American Type Culture Collection y denominado ATCC 67238. Si se usa dicho sistema, el gen de virulencia (*vir*) del plásmido Ti o Ri también debe estar presente, ya sea junto con la porción de ADN-T o mediante un sistema binario donde el gen *vir* está presente en un vector separado. Dichos sistemas, vectores para usar en los mismos y métodos para transformar células vegetales se describen en la patente estadounidense n.º 4.658.082; solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 913.914, presentada el 1 de octubre de 1986, tal como se menciona en la patente estadounidense n.º 5.262.306, concedida el 16 de noviembre de 1993. Una vez contruidos, estos plásmidos se pueden colocar en *A. rhizogenes* o *A. tumefaciens* y estos vectores se utilizan para transformar células de especies vegetales, que normalmente son susceptibles a la infección por *Fusarium* o *Alternaria*. La selección de cualquiera de *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes* dependerá de la planta que se ha de transformar. En general, *A. tumefaciens* es el organismo preferido para la transformación. La mayoría de las plantas dicotiledóneas, algunas gimnospermas, y algunas plantas monocotiledóneas (p. ej., algunos miembros de Liliales y Arales) son susceptibles a la infección por *A. tumefaciens*. *A. rhizogenes* también tienen una amplia gama de huéspedes, que abarca la mayoría de las dicotiledóneas y algunas gimnospermas, que incluyen miembros de las *Leguminosae*, *Compositae* y *Chenopodiaceae*. La solicitud de patente europea n.º 0604662 describe un método para transformar monocotiledóneas usando *Agrobacterium*. La solicitud europea número 0672752 describe un método para transformar monocotiledóneas con *Agrobacterium* usando el escutelo de embriones inmaduros. Ishida y col. dan a conocer un método para transformar el maíz mediante la exposición de embriones inmaduros a *A. tumefaciens* [*Nature Biotechnology* 14:745-50 (1996)]. Una vez transformadas, estas células pueden usarse para regenerar plantas transgénicas. Por ejemplo, se pueden infectar plantas enteras con estos vectores haciendo una herida en la planta y, a continuación, introduciendo el vector en el sitio de la herida. En cualquier parte de la planta se puede hacer una herida, incluidas las hojas, los tallos y las raíces. Alternativamente, el tejido vegetal, en forma de explanto, tal como el tejido cotiledonario o los discos foliares, puede inocularse con estos vectores y cultivarse en condiciones que promuevan la regeneración de la planta. Las raíces o brotes transformados mediante inoculación de tejido vegetal con *A. rhizogenes* o *A. tumefaciens*, que contiene el gen que codifica la enzima de degradación de la fumonisina, puede usarse como fuente de tejido vegetal para regenerar plantas transgénicas resistentes a la fumonisina, ya sea mediante embriogénesis somática u organogénesis. Los ejemplos de dichos métodos para regenerar el tejido vegetal se describen en Shahin, (1985) *Theor. Apple. Genet.* 69:235-40; patente estadounidense US-4.658.082; Simpson y col., supra; y la patente estadounidense US-5.262.306.

Se han desarrollado varios métodos de transformación de plantas, denominados colectivamente transferencia génica directa, como alternativa a la transformación mediada por *Agrobacterium*. Un método de transformación de plantas generalmente aplicable es la transformación mediada por microproyectiles, donde el ADN se transporta sobre la superficie de los microproyectiles que miden aproximadamente de 1 a 4 µm. El vector de expresión se introduce en los tejidos vegetales con un dispositivo biolístico que acelera los microproyectiles a velocidades de 300 a 600 m/s, lo que es suficiente para penetrar las paredes y membranas de las células vegetales (Sanford y col., (1987) *Part. Sci.*

Technol. 5:27; Sanford, (1988) Trends Biotech 6:299; Sanford, (1990) Physiol. Plant 79:206; y Klein y col., (1992) Biotechnology 10:268).

Otro método para la administración física de ADN a las plantas es la sonicación de las células diana, tal como se describe en Zang y col., (1991) Biotechnology 9:996. Alternativamente, se han usado fusiones de liposomas o esferoplastos para introducir vectores de expresión en las plantas. Ver, p. ej., Deshayes y col., (1985) EMBO J. 4:2731; y Christou y col., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3962. También se ha descrito la captación directa de ADN en protoplastos usando la precipitación con CaCl_2 , alcohol polivinílico o poli-L-ornitina. Ver, p. ej., Hain y col., (1985) Mol. Gen. Genet. 199:161; y Draper y col., (1982) Plant Cell Physiol. 23:451.

También se ha descrito la electroporación de protoplastos y células y tejidos completos. Ver, p. ej., Don y col., (1990) Abstracts of the VIIth Int'l. Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC, A2-38, pág. 53; D'Halluin y col., (1992) Plant Cell 4:1495-505; y Spencer y col., (1994) Plant Mol. Biol. 24:51-61.

Después de una transformación estable, se lleva a cabo la propagación de la planta. El método más común de propagación de plantas es mediante semillas. Sin embargo, la regeneración por propagación de semillas tiene la deficiencia de que, debido a la heterocigosidad, hay una falta de uniformidad en el cultivo, ya que las semillas son producidas por las plantas según las variaciones genéticas regidas por las reglas mendelianas. Básicamente, cada semilla es genéticamente diferente y cada una crecerá con sus propios rasgos específicos. Por lo tanto, se prefiere que la planta transformada se produzca de modo que la planta regenerada tenga rasgos y características idénticos a los de la planta transgénica original.

Las plantas transformadas se pueden regenerar mediante micropropagación, lo que proporciona una reproducción rápida y consistente. La micropropagación es un proceso de cultivo de plantas de nueva generación a partir de una sola pieza de tejido que se ha extirpado de una planta madre o cultivar seleccionados. Este proceso permite la reproducción masiva de plantas que tienen el tejido preferido que expresa el polipéptido modificado genéticamente. Las plantas de nueva generación que se producen son genéticamente idénticas y tienen todas las características de la planta original. La micropropagación permite la producción masiva de material vegetal de calidad en un corto período de tiempo y ofrece una rápida multiplicación de cultivares seleccionados conservando las características de la planta transgénica o transformada original. Las ventajas de la clonación de plantas son la velocidad de multiplicación de las plantas y la calidad y uniformidad de las plantas producidas.

La micropropagación es un procedimiento de varias etapas que requiere la alteración del medio de cultivo o las condiciones de crecimiento entre las etapas. Por lo tanto, el proceso de micropropagación implica cuatro etapas básicas: primera etapa, cultivo inicial de tejidos; segunda etapa, multiplicación de cultivos de tejidos; tercera etapa, diferenciación y formación de plantas; y cuarta etapa, cultivo y endurecimiento en invernadero. Durante la primera etapa, o cultivo inicial de tejidos, el cultivo tisular se establece y se certifica que está libre de contaminantes. Durante la segunda etapa, se permite que el tejido cultivado inicial crezca hasta que se produzca una cantidad suficiente de muestras de tejido para cumplir con los objetivos de producción. Durante la tercera etapa, las muestras de tejido cultivadas en la segunda etapa se dividen y se cultivan en plántulas individuales. En la cuarta etapa, las plántulas se transfieren a un invernadero para que se endurezcan, donde la tolerancia de las plantas a la luz aumenta gradualmente para que puedan cultivarse en el entorno natural.

La transformación de una planta con los polinucleótidos descritos en la presente memoria puede dar como resultado que una planta transgénica muestre un fenotipo que incluye, pero no se limita a, un aumento de la biomasa en comparación con la planta silvestre, un aumento de la altura de la planta, cambios en la composición de la pared celular, una mayor tolerancia al estrés, una germinación temprana o tardía de las semillas, un aumento o una reducción del alargamiento del tallo, un aumento o una reducción de la expansión de las hojas, una maduración temprana o tardía del polen y una inducción temprana o tardía de la floración.

El fenotipo se puede evaluar por cualquier medio adecuado. Las características bioquímicas de la lignina, la celulosa, los carbohidratos y otros extractos vegetales pueden evaluarse mediante métodos analíticos estándar que incluyen espectrofotometría, espectroscopía de fluorescencia, HPLC, espectroscopía de masas, espectroscopía de masas con haz molecular, espectroscopía de infrarrojo cercano, espectroscopía de resonancia magnética nuclear y métodos de tinción de tejidos.

Los términos "regulación a la baja de la expresión génica", "nivel de expresión de polipéptidos reducido/disminuido", "silenciamiento" e "inhibición de la expresión génica" se usan indistintamente y se refieren a una reducción medible u observable de la expresión génica o a una abolición completa de la expresión génica detectable, a nivel de producto proteico y/o el producto de ARNm del gen diana. El efecto de la regulación a la baja de la expresión génica se puede calcular de manera que sea, p. ej., de al menos el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, preferiblemente el 70 %, el 80 % o incluso más preferiblemente el 90 % o el 95 % en comparación con la expresión génica normal. La regulación a la baja o la inhibición de la expresión génica en las células vegetales se puede confirmar mediante un análisis fenotípico de la planta o mediante la medición de la expresión del ARNm o las proteínas utilizando técnicas moleculares tales como la hibridación en solución de ARN, la PCR, la protección contra nucleasas, la hibridación Northern, la transcripción inversa, la monitorización de la expresión génica con una micromatriz, la unión de anticuerpos, el ensayo

por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la transferencia Western, el radioinmunoensayo (RIA), otros inmunoensayos, o la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Según un aspecto de la invención, la regulación a la baja de un gen DELLA conduce a un aumento del crecimiento. El aumento del crecimiento incluye, pero no se limita a, un mejor crecimiento, una mayor altura y un aumento de la biomasa, en comparación con el silvestre. Dependiendo del ensayo usado, el aumento del crecimiento se puede cuantificar como se describió anteriormente, como superior en aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 33 %, 50 % o 75 % en comparación con las plantas silvestre.

La expresión “región diana”, “secuencia de nucleótidos diana” o “sitio diana” del gen diana puede ser cualquier región o secuencia de nucleótidos adecuada del gen. La región diana comprende al menos 19 nucleótidos consecutivos del gen diana.

Las secuencias de ácido nucleico de los polipéptidos pueden optimizarse para la expresión en plantas. Los ejemplos de dichas modificaciones de secuencia incluyen, pero no se limitan a, la eliminación de los sitios de poliadenilación, la alteración del contenido de G/C para acercarse más al que se encuentra típicamente en la especie de planta de interés, y la eliminación de codones que se encuentran atípicamente en especies de plantas, lo que comúnmente se denomina optimización de codones.

La frase “optimización de codones” se refiere a la selección de nucleótidos de ADN apropiados para usar en un gen estructural o fragmento del mismo que se aproxime al uso de codones en la planta de interés. Por lo tanto, un gen o secuencia de ácido nucleico optimizados se refiere a un gen en el que la secuencia de nucleótidos de un gen nativo o de origen natural se ha modificado para utilizar codones estadísticamente preferidos o estadísticamente favorecidos dentro de la planta. La secuencia de nucleótidos típicamente se examina a nivel de ADN y la región codificante optimizada para la expresión en la especie vegetal se determina usando cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, como se describe en Sardana y col., 1996, Plant Cell Reports 15:677-681. En este método, la desviación estándar del uso de codones (SDCU, por sus siglas en inglés), una medida del sesgo de uso de codones, se puede calcular encontrando primero la desviación proporcional al cuadrado del uso de cada codón del gen nativo en relación con el de los genes vegetales altamente expresados, seguida de un cálculo de la desviación cuadrática promedio. La

fórmula utilizada es: $SDCU = n = \frac{1N \left[\frac{Xn - Yn}{Yn} \right]^2}{N}$, donde Xn se refiere a la frecuencia de uso del codón n en genes vegetales altamente expresados, donde Yn se refiere a la frecuencia de uso del codón n en el gen de interés y N se refiere al número total de codones en el gen de interés. Se compila una tabla del uso de codones de genes altamente expresados de plantas dicotiledóneas utilizando los datos de Murray y col. (1989, Nuc Acids Res. 17:477-498).

Un método para optimizar la secuencia de ácido nucleico según el uso de codones preferido para un tipo de célula vegetal particular se basa en el uso directo, sin realizar ningún cálculo estadístico adicional, de tablas de optimización de codones, tales como las que se proporcionan en línea en la base de datos de uso de codones a través del banco de ADN NIAS (Instituto Nacional de Ciencias Agrobiológicas) de Japón. La base de datos de uso de codones contiene tablas de uso de codones para varias especies diferentes, y cada tabla de uso de codones se ha determinado estadísticamente basada en los datos presentes en Genbank.

Al usar las tablas anteriores para determinar los codones más preferidos o más favorecidos para cada aminoácido en una especie particular (por ejemplo, eucalipto), una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés puede optimizarse con codones para esa especie particular. Esto se lleva a cabo reemplazando los codones que pueden tener una incidencia estadística baja en la especie en particular por los codones correspondientes que son estadísticamente más favorecidos.

Sin embargo, se pueden seleccionar uno o más codones menos favorecidos para eliminar los sitios de restricción existentes, para crear otros nuevos en uniones potencialmente útiles (extremos 5' y 3' para añadir casetes de terminación o péptidos señal, sitios internos que podrían usarse para cortar y empalmar segmentos para producir una secuencia de longitud completa correcta) o para eliminar las secuencias de nucleótidos que pueden afectar negativamente a la estabilidad o expresión del ARNm.

Una secuencia de nucleótidos modificada puede optimizarse total o parcialmente para el uso de codones en plantas. La construcción de genes sintéticos alterando el uso de codones se describe, por ejemplo, en la publicación de patente internacional n.º WO 1994/003282.

El término “biomasa”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere al material vegetal que se procesa para proporcionar un producto, p. ej., un biocombustible tal como etanol, o pienso para ganado, o celulosa para productos de la industria del papel y la pulpa. Dicho material vegetal puede incluir plantas enteras o partes de plantas, p. ej., tallos, hojas, ramas, brotes, raíces, tubérculos y similares.

Los términos “polipéptido” y “proteína” se usan indistintamente.

El término “correspondiente a” se refiere a secuencias que son idénticas o muy similares entre sí. Una secuencia y la secuencia que corresponde a dicha secuencia se conocen como “secuencias correspondientes”. El porcentaje de identidad de secuencia entre las secuencias correspondientes generalmente puede ser, p. ej., al menos un 80 % o un 85 % de identidad, preferiblemente al menos un 90 %, 95 %, 96 % o más preferiblemente al menos un 97 %, un 98 % o más, aún más preferiblemente al menos un 99 % o más.

El término “complementario”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a toda la complementariedad ADN-ADN, la complementariedad ARN-ARN y la complementariedad ADN-ARN. En analogía con la presente memoria, el término “equivalente de ARN” significa sustancialmente que en la(s) secuencia(s) de ADN, la base “T” puede reemplazarse por la correspondiente base “U” normalmente presente en los ácidos ribonucleicos. Dos cadenas de ácido nucleico son “sustancialmente complementarias” cuando al menos el 85 % de sus bases se aparean.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “silvestre” se refiere a una célula vegetal, semilla, componente vegetal, tejido vegetal, órgano vegetal o planta completa de origen natural que no se ha modificado genéticamente.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “fenotipo” se refiere a las propiedades visibles y fisiológicas de una planta que se producen por la interacción del genotipo y el entorno. Un rasgo, característica o rasgo distintivo del fenotipo que puede alterarse como se describe en la presente memoria modificando la expresión de al menos una región codificante en al menos una célula de una planta. La expresión modificada de al menos una región codificante puede conferir un cambio en el fenotipo de una planta transformada modificando una cualquiera o más de una serie de características o propiedades genéticas, moleculares, bioquímicas, fisiológicas, morfológicas o agronómicas de la célula vegetal transformada o la planta en su conjunto. Una posible alteración del fenotipo de una planta transgénica se determina comparando la planta transformada con una planta de la misma especie que no se ha transformada con el mismo polinucleótido (silvestre).

El término “planta”, como se utiliza en la presente memoria, abarca plantas enteras, una planta injertada, ancestros y progenie de las plantas y partes de la planta, incluidas semillas, brotes, tallos, raíces (incluidos tubérculos), rizomas, vástagos y células, tejidos y órganos vegetales. La planta puede estar en cualquier forma, incluidos cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, hojas, gametofitos, esporofitos, polen y microsporas.

Las plantas que son particularmente útiles en los métodos de la invención incluyen todas las plantas que pertenecen a la superfamilia *Viridiplantae*, en particular las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas que incluyen leguminosas forrajeras o forrajeras, plantas ornamentales, cultivos alimentarios, árboles o arbustos seleccionados de la lista que comprende, pero no se limita a, *Acacia* spp., *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Aesculus* spp., *Agathis australis*, *Albizia amara*, *Alsophila tricolor*, *Andropogon* spp., *Arachis* spp., *Areca catechu*, *Astelia fragrans*, *Astragalus cicer*, *Baikiaea plurijuga*, *Betula* spp., *Brassica* spp., *Bruguiera gymnorhiza*, *Burkea africana*, *Butea frondosa*, *Cadaba farinosa*, *Calliandra* spp., *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Capsicum* spp., *Cassia* spp., *Centrosema pubescens*, *Chacoomeles* spp., *Cinnamomum cassia*, *Coffea arabica*, *Colophospermum mopane*, *Coronilla varia*, *Cotoneaster serotina*, *Crataegus* spp., *Cucumis* spp., *Cupressus* spp., *Cyathia dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Cryptomeria japonica*, *Cymbopogon* spp., *Cynthea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Dalbergia monetaria*, *Davallia divaricata*, *Desmodium* spp., *Dicksonia squarosa*, *Dibeteropogon amplexans*, *Dioclea* spp., *Dolichos* spp., *Dorycnium rectum*, *Echinochloa pyramidalis*, *Ehaffia* spp., *Eleusine coracana*, *Eragrostis* spp., *Erythrina* spp., *Eucalyptus* spp., *Euclea schimperii*, *Eulalia villosa*, *Pagopyrum* spp., *Feijoa sellowiana*, *Fragaria* spp., *Flemingia* spp., *Freyinetia banksii*, *Geranium thunbergii*, *Ginkgo biloba*, *Glycine javanica*, *Gliricidia* spp., *Gossypium hirsutum*, *Grevillea* spp., *Guibouria coleosperma*, *Hedysarum* spp., *Hemaphysa altissima*, *Heteropogon contortus*, *Hordeum vulgare*, *Hyparrhenia rufa*, *Hypericum erectum*, *Hypophylla dissoluta*, *Indigo incamata*, *Iris* spp., *Leptarrhenia pyrolifolia*, *Lespedeza* spp., *Lettuca* spp., *Leucaena leucocephala*, *Loudetia simplex*, *Lotonus bainesii*, *Lotus* spp., *Macrotyloma axillare*, *Malus* spp., *Manihot esculenta*, *Medicago sativa*, *Metasequoia glyptostroboides*, *Musa sapientum*, *Nicotianum* spp., *Onobrychis* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp., *Peltophorum africanum*, *Pennisetum* spp., *Persea gratissima*, *Petunia* spp., *Phaseolus* spp., *Phoenix canariensis*, *Phormium cookianum*, *Photinia* spp., *Picea glauca*, *Pinus* spp., *Pisum sativum*, *Podocarpus totara*, *Pogonarthria fleckii*, *Pogonarthria squarrosa*, *Populus* spp., *Prosopis cineraria*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pterolobium stellatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Rhaphiolepis umbellata*, *Rhopalostylis sapida*, *Rhus natalensis*, *Ribes grossularia*, *Ribes* spp., *Robinia pseudoacacia*, *Rosa* spp., *Rubus* spp., *Salix* spp., *Schyzachyrium sanguineum*, *Sciadopitys veficillata*, *Sequoia sempervirens*, *Sequoiadendron giganteum*, *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Sporobolus fimbriatus*, *Stiburus alopecuroides*, *Stylosanthes humilis*, *Tadehagi* spp., *Taxodium distichum*, *Themeda triandra*, *Trifolium* spp., *Triticum* spp., *Tsuga heterophylla*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vitis vinifera*, *Watsonia pyramidata*, *Zantedeschia aethiopica*, *Zea mays*, amaranto, alcachofa, espárragos, brócoli, coles de Bruselas, repollo, colza, zanahoria, coliflor, apio, berza, lino, col rizada, lentejas, colza oleaginosa, okra, cebolla, patatas, arroz, soja, paja, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, tomate, té de calabaza, árboles. Alternativamente, en algunos aspectos de la invención se pueden usar algas y otras no *viridiplantae*.

En un aspecto, la planta es una planta leñosa.

El término “planta leñosa”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un árbol, es decir, una planta perenne que tiene un tallo alargado, duro y lignificado. Las plantas leñosas incluyen especies e híbridos de angiospermas y gimnospermas. Los ejemplos no limitativos de plantas leñosas incluyen eucalipto, álamo, pino, abeto, píceas, acacia,

liquidámbar, fresno, abedul, roble, teca, caoba, pino de azúcar y de Monterrey, árboles de nueces, p. ej., nogales y almendros, y árboles frutales, p. ej., manzanos, ciruelos, cítricos y albaricoques.

En un aspecto, la planta es una planta de eucalipto. Los ejemplos de eucalipto incluyen, sin limitación, las siguientes especies: *E. botryoides*, *E. bridgesiana*, *E. camaldulensis*, *E. cinerea*, *E. globule*, *E. grandis*, *E. gunii*, *E. nicholii*, *E. pulverulenta*, *E. robusta*, *E. rudis*, *E. saligna*, *E. tereticornis*, *E. urophylla*, *E. viminalis* y un híbrido cruzado de cualquiera de las especies anteriores, especialmente *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus urophylla*.

Ejemplos

La presente invención puede ilustrarse mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1:

A. Identificación de homólogos de DELLA en *Eucalyptus grandis*

Para identificar posibles homólogos de DELLA en el eucalipto, se alineó una secuencia de DELLA conocida de *Arabidopsis* con una base de datos del genoma del eucalipto que se encuentra en *Phytozome*, un portal de genómica comparativa de plantas (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>). La secuencia de RGA de *Arabidopsis thaliana* (número de acceso AT2G01570) se usó para buscar el genoma de *Eucalyptus grandis* en la base de datos de *Phytozome* utilizando la herramienta de búsqueda BLAST. Se identificaron tres secuencias de *Eucalyptus grandis* (números de acceso J01594, G02163 y C04156) (figuras 2A y 2B) como genes DELLA probablemente homólogos.

B. Identificación de homólogos de DELLA en el clon de *Eucalyptus grandis x urophylla*

Se llevó a cabo la secuenciación del transcriptoma de la planta de *Eucalyptus grandis x urophylla* (denominada en la presente memoria gXu). El ARN total se aisló usando el kit y protocolo de purificación de ARN Plant Total (25800, Norgen biotic corp.) y el tratamiento On-Column DNase I Digestion Set (DNASE70-1SET, Sigma). El volumen total de ARN fue de 50 µl. El ARN total se volvió a tratar después con Turbo DNase (AM1907, Ambion) para eliminar el ADN residual. El ARN purificado se mantuvo a -80 °C hasta que se realizó la secuenciación de Illumina. La secuenciación de Illumina se llevó a cabo según protocolos estándar para proporcionar transcriptomas de la planta diana.

Las secuencias de proteína J01594, G02163 y C04156 de *Eucalyptus grandis* se alinearon con la biblioteca de transcriptomas de gXu, utilizando el software de alineación ClustalW en la página de inicio de MacVector. Basándose en los motivos de GRAS y DELLA conservados, se identificaron secuencias similares a las de los *eucalyptus grandis* J01594, G02163 y C04156, en gXu, denominadas en la presente memoria DELLA1, DELLA2 y DELLA3, respectivamente (figuras 3A, 3B, 3C y 3D).

C. Expresión de DELLA de gXu en tejidos específicos

El nivel de transcrito de cada gen se midió en tres tipos diferentes de tejidos: hojas de material de cultivo tisular, hojas de hojas jóvenes en expansión y hojas maduras completamente expandidas tomadas de plantas de 3 meses cultivadas en el invernadero. Las hojas jóvenes se tomaron del primer entrenudo de las plantas cultivadas en el invernadero, mientras que las hojas maduras se tomaron del decimoquinto entrenudo de las plantas cultivadas en el invernadero.

El nivel de transcrito de los genes DELLA1, DELLA2 y DELLA3 se midió en gXu mediante RT-PCR. Para el análisis por RT-PCR, se extrajo el ARN total de las hojas de las plantas transgénicas de eucalipto utilizando el kit MasterPure (Epicentre) según el protocolo del fabricante. El ADN genómico residual se trató con DNase I libre de ribonucleasa (Ambion). El ADNc se obtuvo de 0,2 µg de ARN total utilizando el sistema RT-PCR de una etapa SuperScript III (Invitrogen) con polimerasa Platinum Taq. Para detectar los niveles de expresión de ARN de los genes DELLA, se llevó a cabo una RT-PCR utilizando pares de cebadores que generan fragmentos indicativos de los genes DELLA.

Los pares de cebadores utilizados en la RT-PCR para los genes individuales se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1: Pares de cebadores utilizados en la RT-PCR

Gen	Cebadores	Tamaño del producto
DELLA1 (Id. de sec. n.º: 2)	GTGACGATGGTGAACAG directo (Id. de sec. n.º: 27)	Aproximadamente 304 bp
	CATGCTCGCCTGCTTGAA inverso (Id. de sec. n.º: 28)	
DELLA2 (Id. de sec. n.º: 4)	CCCCGGACAACCTCCGACC directo (Id. de sec. n.º: 29)	Aproximadamente 311 bp
	CGGTCCACGAAGACCG inverso (Id. de sec. n.º: 30)	
DELLA3 (Id. de sec. n.º: 6)	CCTGAACCCGAAGATAATGAC directo (Id. de sec. n.º: 31)	Aproximadamente 312 bp

Gen	Cebadores	Tamaño del producto
	ATGCTGGCTTGCTTGAACG inverso (Id. de sec. n.º: 32)	

D. Resultados

Los resultados de la RT-PCR, como se ve en la figura 4, revelaron que DELLA1 y DELLA3 se expresan en hojas de cultivo tisular, hojas jóvenes y hojas maduras. DELLA1 tuvo un nivel de expresión más alto en hojas de cultivo tisular y hojas jóvenes en comparación con DELLA3. La expresión de DELLA2 no se detectó en hojas de cultivo tisular ni en hojas jóvenes, y solo se detectó un nivel de expresión bajo en hojas maduras.

Ejemplo 2:

A. Preparación del constructo

Los constructos para la regulación a la baja comprenden un casete de expresión que comprende un fragmento de una secuencia que codifica una secuencia diana de DELLA, la secuencia de complemento inversa del fragmento y una secuencia de lazo. La transcripción de los constructos produce un ARN en forma de horquilla (ARNhp), que tiene un tallo compuesto por el fragmento de ARNbc, formado por la hibridación de las secuencias de repetición invertida del gen diana, y una región de lazo. Los casetes de regulación a la baja y sobreexpresión se muestran en la Tabla 2. Las representaciones esquemáticas de los constructos se muestran en las figuras 5A y 5B.

Tabla 2: Casetes de regulación a la baja y sobreexpresión

Cassette n.º	Casete	Uso de casetes	Polipéptido diana de regulación a la baja (Id. de sec. n.º)	Fragmento de ARN del gen diana (Id. de sec. n.º)	secuencia de lazo (Id. de sec. n.º)	Polipéptido diana de OE (Id. de sec. n.º)	Representación esquemática (figuras 5A, 5B)	Promotor (DR/OE)	Promotor de DR/OE (Id. de sec. n.º)	Terminador	Terminador (Id. de sec. n.º)
1.	DEL1	DR	1.	23	26	-	A1, B1	35S CaMV	41	NOS	45
2.	DEL2	DR	3.	24	26	-	A1, B1	35S CaMV	41	NOS	45
3	DEL3	DR	5	25	26	-	A1, B1	35S CaMV	41	NOS	45
4	DEL1/2	DR	1/3	23/24	26	-	A2, B2	35S CaMV	41	NOS	45
5	DEL1/3	DR	1/5	23/25	26	-	A2, B2	35S CaMV	41	NOS	45
6	DEL2/3	DR	3/5	24/25	26	-	A2, B2	35S CaMV	41	NOS	45
7	DEL1/2/3	DR	1/3/5	23/24/25	26	-	A3, B3	35S CaMV	41	NOS	45
8	DEL1GT	DR	1	23	26	-	A1, B1	RBC	43	NOS	45
9	DEL2GT	DR	3	24	26	-	A1, B1	RBC	43	NOS	45
10	DEL3GT	DR	5	25	26	-	A1, B1	RBC	43	NOS	45
11	DEL1/2 GT	DR	1/3	23/24	26	-	A2, B2	RBC	43	NOS	45
12	DEL1/3 GT	DR	1/5	23/25	26	-	A2, B2	RBC	43	NOS	45
13	DEL2/3GT	DR	3/5	24/25	26	-	A2, B2	RBC	43	NOS	45
14	DEL1/2/3GT	DR	1/3/5	23/24/25	26	-	A3, B3	RBC	43	NOS	45
15	DEL1/RGA _{OE}	DR/OE	1	23	26	15	C1	35S/Acuaporina	41/44	NOS	45
16	DEL1/3/RGA _{OE}	DR/OE	1/5	23/24	26	15	C2	35S/Acuaporina	41/44	NOS	45
17	DEL1/2/3/RGA _{OE}	DR/OE	1/3/5	23/24/25	26	15	C3	35S/Acuaporina	41/44	NOS	45
18	DEL1/2/3/RGL _{OE}	DR/OE	1/3/5	23/24/25	26	19	C3	35S/Acuaporina	41/44	NOS	45

DR: Regulación a la baja OE: Sobreexpresión.

a. Constructos para la regulación a la baja con un promotor constitutivo

En las figuras 5A y 5B se muestra un esquema de la estructura de los constructos para la regulación a la baja del ARNbc que comprenden fragmentos de uno o más de los tres genes DELLA de gXu. Los constructos para la regulación a la baja contienen un casete de expresión que comprende fragmentos de al menos uno de los genes DELLA de gXu que se fusionan y sintetizan en repeticiones invertidas, separadas por una secuencia de lazo. Ver el casete P1-T1 en las figuras 5A y 5B. La transcripción de este casete (iniciado en el promotor P1 y terminado en T1) produce un ARN en forma de horquilla, que contiene una sección de ARNbc, formada por la hibridación de las secuencias de repetición invertida del fragmento del gen DELLA, y una región de lazo. Ver los esquemas B1-B3.

(i) Constructo para la regulación a la baja de DELLA1 de ARNbc (Constructo DEL1)

El constructo DEL1 se muestra esquemáticamente en la figura 5A, en los esquemas A1 y B1. El constructo DEL1 comprendía un casete de expresión que comprendía fragmentos respectivos de 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA 1 que se fusionaron y sintetizaron en repeticiones invertidas separadas por 108 pb de una secuencia de lazo. El inicio de la transcripción fue impulsado por el promotor 35S CaMV (Id. de sec. n.º: 41). La terminación de la transcripción fue proporcionada por el terminator de NOS (Id. de sec. n.º: 45). La transcripción del constructo DEL1 produjo un ARN en forma de horquilla (ARNhp) con un tallo formado por las secuencias complementarias inversas de las secuencias de 300 pb de DELLA1, para regular a la baja el correspondiente gen DELLA 1.

Las secuencias de ARNhp respectivas corresponden a los siguientes elementos: nucleótidos 1-300 y 409-708: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 23, que corresponden a 300 nucleótidos de la Id. de sec. n.º: 2. Nucleótidos 301 - 408: fragmento de lazo de 108 pb (Id. de sec. n.º: 26) basado en una secuencia de intrones aleatoria parcial. (Tabla 2, casete n.º 1).

(iii) constructo para la regulación a la baja de DELLA2 de ARNbc (constructo DEL2)

El constructo DEL2 se muestra esquemáticamente en la figura 5A, en los esquemas A1 y B1. El constructo DEL2 comprendía un casete de expresión que comprendía fragmentos respectivos de 396 pb del polinucleótido que codifica DELLA2 que se fusionaron y sintetizaron en repeticiones invertidas separadas por 108 pb de una secuencia de lazo. El inicio de la transcripción fue impulsado por el promotor 35S CaMV (Id. de sec. n.º: 41). La terminación de la transcripción fue proporcionada por el terminator de NOS (Id. de sec. n.º: 45). La transcripción del constructo DEL2 produjo un ARNhp con un tallo formado por las secuencias complementarias inversas de las secuencias de 396 pb de DELLA2, para regular a la baja el gen DELLA2 correspondiente.

Las secuencias de ARNhp respectivas corresponden a los siguientes elementos: nucleótidos 1-396 y 505-900: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 24, que corresponden a 396 nucleótidos de la Id. de sec. n.º: 4. Nucleótidos 397 - 504: Fragmento de lazo de 108 pb (Id. de sec. n.º: 26) basado en una secuencia de intrones aleatoria parcial. (Tabla 2, casete n.º 2).

(iv) Constructo para la regulación a la baja de DELLA1 y DELLA2 de ARNbc (constructo DEL1/2)

El constructo DEL1/2 se muestra esquemáticamente en la figura 5A, en los esquemas A2 y B2. El constructo DEL1/2 comprendía un casete de expresión que comprendía fragmentos respectivos de 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA1 y 396 pb del polinucleótido que codifica DELLA2 que se fusionaron y sintetizaron en repeticiones invertidas separadas por 108 pb de una secuencia de lazo. El inicio de la transcripción fue impulsado por el promotor 35S CaMV (Id. de sec. n.º: 41). La terminación de la transcripción fue proporcionada por el terminator NOS (Id. de sec. n.º: 45). La transcripción del constructo DEL1/2 produjo un ARNhp con un tallo formado por las secuencias complementarias inversas de las secuencias de DELLA, para regular a la baja los genes DELLA1 y DELLA2 correspondientes.

Las secuencias de ARNhp respectivas corresponden a los siguientes elementos: nucleótidos 1-300 y 1201-1500: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 23, correspondientes a los nucleótidos de DELLA1 de gXu, Id. de sec. n.º: 2. Nucleótidos 301-696 y 805-1200: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 24, correspondientes a los nucleótidos de DELLA2 de gXu, Id. de sec. n.º: 4. Nucleótidos 697-804: fragmento de lazo de 108 pb (Id. de sec. n.º: 26) basado en una secuencia de intrones aleatoria parcial. (Tabla 2, casete n.º 4).

(v) Constructo para la regulación a la baja de DELLA1 y DELLA3 de ARNbc (constructo DEL1/3)

El constructo DEL1/3 se muestra esquemáticamente en la figura 5A, en los esquemas A2 y B2. El constructo DEL1/3 comprendía un casete de expresión que comprendía fragmentos respectivos de 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA 1 y 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA3 que se fusionaron y sintetizaron en repeticiones invertidas separadas por 108 pb de una secuencia de lazo. El inicio de la transcripción fue impulsado por el promotor 35S CaMV (Id. de sec. n.º: 41). La terminación de la transcripción fue proporcionada por el terminator NOS (Id. de sec. n.º: 45). La transcripción del constructo DEL1/3 produjo un ARNhp con un tallo formado por las secuencias complementarias inversas de las secuencias DELLA, para regular a la baja los genes DELLA1 y DELLA3 correspondientes.

Las secuencias de ARNhp respectivas corresponden a los siguientes elementos: nucleótidos 1-300 y 1009-1308: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 23, correspondientes a 300 nucleótidos de DELLA1 de gXu, Id. de sec. n.º: 2. Nucleótidos 301-600 y 709-1008: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 25, correspondientes a 300 nucleótidos de DELLA3 de gXu, Id. de sec. n.º: 6. Nucleótidos 601-708: fragmento de lazo de 108 pb (Id. de sec. n.º: 26) basado en una secuencia de intrones aleatoria parcial. (Tabla 2, casete n.º 5).

(vi) Constructo para la regulación a la baja de DELLA1, DELLA2 y DELLA3 de ARNbc (constructo DEL1/2/3)

El constructo DEL1/2/3 se muestra esquemáticamente en la figura 5A, en los esquemas A3 y B3. El constructo DEL1/2/3 comprendía un casete de expresión que comprendía fragmentos respectivos de 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA1, 396 pb del polinucleótido que codifica DELLA2 y 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA3 que se fusionaron y sintetizaron en repeticiones invertidas separadas por 108 pb de una secuencia de lazo. El inicio de la transcripción fue impulsado por el promotor 35S CaMV (Id. de sec. n.º: 41). La terminación de la transcripción fue proporcionada por el terminator NOS (Id. de sec. n.º: 45). La transcripción del constructo DEL1/2/3 produjo un ARNhp con un tallo formado por las secuencias complementarias inversas de las secuencias de DELLA, para regular a la baja los genes DELLA1, DELLA2 y DELLA3 correspondientes.

Las secuencias de ARNhp respectivas corresponden a los siguientes elementos: nucleótidos 1-300 y 1801-2100: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 23, correspondientes a los nucleótidos de DELLA1 de gXu, Id. de sec. n.º: 2. Nucleótidos 301-696 y 1405-1800: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 24, correspondientes a los nucleótidos de DELLA2 de gXu, Id. de sec. n.º: 4. Nucleótidos 697-996 y 1105-1404: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 25, correspondientes a los nucleótidos de DELLA3 de gXu, Id. de sec. n.º: 6. Nucleótidos 997-1104: fragmento de lazo de 108 pb (Id. de sec. n.º: 26) basado en una secuencia de intrones aleatoria parcial. (Tabla 2, casete n.º 7).

b. Constructos para la regulación a la baja con un promotor específico para tejido verde

En las figuras 5A y 5B se muestra un esquema de la estructura de los constructos para la regulación a la baja del ARNbc que comprenden fragmentos de uno o más de los tres genes DELLA de gXu. Los constructos para la regulación a la baja contenían un casete de expresión que comprendía fragmentos de al menos uno de los genes DELLA de gXu que se fusionaron y sintetizaron en repeticiones invertidas, separadas por una secuencia de lazo. Ver el casete P1-T1 en las figuras 5A y 5B. La transcripción de este casete (iniciado en el promotor P1 y terminado en T1) produjo un ARN en forma de horquilla, que contenía una sección de ARNbc, formada por la hibridación de las secuencias de repetición invertida del fragmento del gen DELLA, y una región de lazo. Ver los esquemas B1-B3.

(i) Constructos para la regulación a la baja de DELLA1 de ARNbc con un promotor específico para tejido verde (constructo DEL1GT)

El constructo DEL1GT se muestra esquemáticamente en la figura 5A, en los esquemas A1 y B1. El constructo DEL1GT comprendía un casete de expresión que comprendía fragmentos respectivos de 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA1 que se fusionó y sintetizó en repeticiones invertidas separadas por 108 pb de una secuencia de lazo. El inicio de la transcripción fue impulsado por el promotor RBC (Id. de sec. n.º: 43). La terminación de la transcripción fue proporcionada por el terminator de NOS (Id. de sec. n.º: 45). La transcripción del constructo DEL1GT produjo un ARNhp con un tallo formado por las secuencias complementarias inversas de las secuencias de 300 pb de DELLA1, para regular a la baja el correspondiente gen DELLA1.

Las secuencias de ARNhp respectivas corresponden a los siguientes elementos: nucleótidos 1-300 y 409-708: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 23, que corresponden a 300 nucleótidos de la Id. de sec. n.º: 2. Nucleótidos 301 - 408: fragmento de lazo de 108 pb (Id. de sec. n.º: 26) basado en una secuencia de intrones aleatoria parcial. (Tabla 2, casete n.º 8).

(ii) Constructo para la regulación a la baja de DELLA1 y DELLA2 de ARNbc con un promotor específico para tejido verde (constructo DEL1/2GT)

El constructo DEL1/2GT se muestra esquemáticamente en la figura 5A, en los esquemas A2 y B2. El constructo DEL1/2GT comprendía un casete de expresión que comprendía fragmentos respectivos de 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA 1 y 396 pb del polinucleótido que codifica DELLA2 que se fusionaron y sintetizaron en repeticiones invertidas separadas por 108 pb de una secuencia de lazo. El inicio de la transcripción fue impulsado por el promotor RBC (Id. de sec. n.º: 43). La terminación de la transcripción fue proporcionada por el terminator de NOS (Id. de sec. n.º: 45). La transcripción del constructo DEL1/2GT produjo un ARNhp con un tallo formado por las secuencias complementarias inversas de las secuencias de DELLA, para regular a la baja los genes DELLA1 y DELLA2 correspondientes.

Las secuencias de ARNhp respectivas corresponden a los siguientes elementos: nucleótidos 1-300 y 1201-1500: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 23, correspondientes a los nucleótidos

de DELLA1 de gXu, Id. de sec. n.º: 2. Nucleótidos 301-696 y 805-1200: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 24, correspondientes a los nucleótidos de DELLA2 de gXu, Id. de sec. n.º: 4. Nucleótidos 697-804: fragmento de lazo de 108 pb (Id. de sec. n.º: 26) basado en una secuencia de intrones aleatoria parcial. (Tabla 2, casete n.º 11).

(iii) Constructo para la regulación a la baja de DELLA1, DELLA2 y DELLA3 de ARNhc con un promotor específico para tejido verde (constructo DEL1/2/3GT)

El constructo DEL1/2/3GT se muestra esquemáticamente en la figura 5A, en los esquemas A3 y B3. El constructo DEL1/2/3GT comprendía un casete de expresión que comprendía fragmentos respectivos de 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA1, 396 pb del polinucleótido que codifica DELLA2 y 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA3 que se fusionaron y sintetizaron en repeticiones invertidas separadas por 108 pb de una secuencia de lazo. El inicio de la transcripción es impulsado por el promotor RBC (Id. de sec. n.º: 43). La terminación de la transcripción la proporciona el terminator de NOS (Id. de sec. n.º: 45). La transcripción del constructo DEL1/2/3GT produjo un ARNhp con un tallo formado por las secuencias complementarias inversas de las secuencias de DELLA, para regular a la baja los genes DELLA1, DELLA2 y DELLA3 correspondientes.

Las secuencias de ARNhp respectivas corresponden a los siguientes elementos: nucleótidos 1-300 y 1801-2100: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 23, correspondientes a los nucleótidos de DELLA1 de gXu, Id. de sec. n.º: 2. Nucleótidos 301-696 y 1405-1800: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 24, correspondientes a los nucleótidos de DELLA2 de gXu, Id. de sec. n.º: 4. Nucleótidos 697-996 y 1105-1404: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 25, correspondientes a los nucleótidos de DELLA3 de gXu, Id. de sec. n.º: 6. Nucleótidos 997-1104: fragmento de lazo de 108 pb (Id. de sec. n.º: 26) basado en una secuencia de intrones aleatoria parcial. (Tabla 2, casete n.º 14).

c. Constructos para la regulación a la baja y sobreexpresión (DR/OE, por sus siglas en inglés)

Los esquemas de la estructura de los constructos de DR/OE se muestran en la figura 5B. Los constructos de DR/OE contenían tanto un casete de regulación a la baja para la regulación a la baja del nivel de expresión de uno o más polipéptidos DELLA endógenos (casete P1-T1) como un casete de sobreexpresión para la sobreexpresión de un gen DELLA en las raíces (casete P2-T2). Los casetes se muestran en la Tabla 2.

(i) Constructo para la regulación a la baja de DELLA1 y la sobreexpresión en la raíz de RGA de *Arabidopsis* (constructo DEL1/RGA_{OE})

El constructo DEL1/RGA_{OE} se muestra esquemáticamente en la figura 5B, esquema C1. El constructo comprendía el casete de expresión de regulación a la baja de DEL1 que comprendía los fragmentos respectivos de 300 pares de bases del polinucleótido que codifica DELLA1 fusionados y sintetizados en repeticiones invertidas separadas por 108 bases de una secuencia de lazo. El inicio de la transcripción fue iniciada por el promotor 35S CaMV (Id. de sec. n.º: 41). La terminación de la transcripción fue proporcionada por el terminator de NOS (Id. de sec. n.º: 45). La transcripción del constructo DEL1 produjo un ARNhp con un tallo formado por las secuencias complementarias inversas de las secuencias de 300 pb de DELLA1, para regular a la baja el gen DELLA1 correspondiente.

Las secuencias de ARNhp respectivas corresponden a los siguientes elementos: nucleótidos 1-300 y 409-708: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 23, que corresponden a 300 nucleótidos de la Id. de sec. n.º: 2. Nucleótidos 301 - 408: fragmento de lazo de 108 pb (Id. de sec. n.º: 26) basado en una secuencia de intrones aleatoria parcial. (Tabla 2, casete n.º 1).

El constructo DEL1/RGA_{OE} comprendía además el casete RGA_{OE} que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido At RGA, Id. de sec. n.º: 16. El inicio de la transcripción fue impulsado por un promotor del gen de la acuaporina (Id. de sec. n.º: 44). La terminación de la transcripción fue proporcionada por el terminator de NOS (Id. de sec. n.º: 45). (Tabla 2, casete n.º 15).

(ii) Constructo para la regulación a la baja de DELLA1/3 y sobreexpresión en la raíz de RGA de *Arabidopsis* (constructo DEL1/3/RGA_{OE}).

El constructo DEL1/3 se muestra esquemáticamente en la figura 5A, en los esquemas A2 y B2. El constructo DEL1/3 comprendía un casete de expresión que comprendía fragmentos respectivos de 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA 1 y 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA3 que se fusionaron y sintetizaron en repeticiones invertidas separadas por 108 pb de una secuencia de lazo. El inicio de la transcripción fue impulsado por el promotor 35S CaMV (Id. de sec. n.º: 41). La terminación de la transcripción fue proporcionada por el terminator de NOS (Id. de sec. n.º: 45). La transcripción del constructo DEL1/3 produjo un ARNhp con un tallo formado por las secuencias complementarias inversas de las secuencias DELLA, para regular a la baja los genes DELLA1 y DELLA3 correspondientes.

Las secuencias de ARNhp respectivas corresponden a los siguientes elementos: nucleótidos 1-300 y 1009-1308: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 23, correspondientes a 300

nucleótidos de DELLA1 de gXu, Id. de sec. n.º: 2. Nucleótidos 301-600 y 709-1008: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 25, correspondientes a 300 nucleótidos de DELLA3 de gXu, Id. de sec. n.º: 6. Nucleótidos 601-708: fragmento de lazo de 108 pb (Id. de sec. n.º: 26) basado en una secuencia de intrones aleatoria parcial. (Tabla 2, casete núm. 5).

El constructo DEL1/3/RGA_{OE} comprendía además el casete RGA_{OE} que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido At RGA, Id. de sec. n.º: 16. El inicio de la transcripción fue impulsado por el promotor del gen de la acuaporina (Id. de sec. n.º: 44). La terminación de la transcripción fue proporcionada por el terminator de NOS (Id. de sec. n.º: 45). (Tabla 2, casete n.º 15).

(iii) Constructo para la regulación a la baja de DELLA1/2/3 y sobreexpresión en la raíz de RGA de *Arabidopsis* (constructo DEL1/2/3/ RGL_{OE}).

El constructo DEL1/2/3/RGA_{OE} se muestra esquemáticamente en la figura 5B, esquema C3. El constructo DEL1/2/3 comprendía un casete de expresión que comprendía fragmentos respectivos de 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA1, 396 pb del polinucleótido que codifica DELLA2 y 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA3 que se fusionaron y sintetizaron en repeticiones invertidas separadas por 108 pb de una secuencia de lazo. La transcripción fue iniciada por el promotor 35S CaMV (Id. de sec. n.º: 41). La terminación de la transcripción fue proporcionada por el terminator de NOS (Id. de sec. n.º: 45). La transcripción del constructo DEL1/2/3 produjo un ARNhp con un tallo formado por las secuencias complementarias inversas de las secuencias de DELLA, para regular a la baja los genes DELLA1, DELLA2 y DELLA3 correspondientes.

Las secuencias de ARNhp respectivas corresponden a los siguientes elementos: nucleótidos 1-300 y 1801-2100: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 23, correspondientes a los nucleótidos de DELLA1 de gXu, Id. de sec. n.º: 2. Nucleótidos 301-696 y 1405-1800: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 24, correspondientes a los nucleótidos de DELLA2 de gXu, Id. de sec. n.º: 4. Nucleótidos 697-996 y 1105-1404: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 25, correspondientes a los nucleótidos de DELLA3 de gXu, Id. de sec. n.º: 6. Nucleótidos 997-1104: fragmento de lazo de 108 pb (Id. de sec. n.º: 26) basado en una secuencia de intrones aleatoria parcial. (Tabla 2, casete n.º 7).

El constructo DEL1/2/3/RGA_{OE} comprendía además el casete RGA_{OE} que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido At RGA, Id. de sec. n.º: 16. La transcripción fue iniciada por el promotor del gen de la acuaporina (Id. de sec. n.º: 44). La terminación de la transcripción fue proporcionada por el terminator de NOS (Id. de sec. n.º: 45). (Tabla 2, casete n.º 15).

(iv) Constructo para la regulación a la baja de DELLA1/2/3 y la sobreexpresión en la raíz de RGL2 de *Arabidopsis* (constructo DEL1/2/3-RGL_{OE})

El constructo DEL1/2/3/RGL_{OE} se muestra esquemáticamente en la figura 5B, esquema C3. El constructo DEL1/2/3 comprendía un casete de expresión que comprendía fragmentos respectivos de 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA1, 396 pb del polinucleótido que codifica DELLA2 y 300 pb del polinucleótido que codifica DELLA3 que se fusionaron y sintetizaron en repeticiones invertidas separadas por 108 pb de una secuencia de lazo. La transcripción fue iniciada por el promotor 35S CaMV (Id. de sec. n.º: 41). La terminación de la transcripción fue proporcionada por el terminator de NOS (Id. de sec. n.º: 45). La transcripción del constructo DEL1/2/3 produjo un ARNhp con un tallo formado por las secuencias complementarias inversas de las secuencias de DELLA, para regular a la baja los genes DELLA1, DELLA2 y DELLA3 correspondientes.

Las secuencias de ARNhp respectivas corresponden a los siguientes elementos: nucleótidos 1-300 y 1801-2100: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 23, correspondientes a los nucleótidos de DELLA1 de gXu, Id. de sec. n.º: 2. Nucleótidos 301-696 y 1405-1800: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 24, correspondientes a los nucleótidos de DELLA2 de gXu, Id. de sec. n.º: 4. Nucleótidos 697-996 y 1105-1404: secuencias de complemento sentido e inversas respectivas de la Id. de sec. n.º: 25, correspondientes a los nucleótidos de DELLA3 de gXu, Id. de sec. n.º: 6. Nucleótidos 997-1104: fragmento de lazo de 108 pb (Id. de sec. n.º: 26) basado en una secuencia de intrones aleatoria parcial. (Tabla 2, casete n.º 7).

El constructo DEL1/2/3/RGL_{OE} comprendía además el casete RGL_{OE} que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido At RGL2, Id. de sec. n.º: 20. La transcripción fue iniciada por el promotor del gen de la acuaporina (Id. de sec. n.º: 44). La terminación de la transcripción fue proporcionada por el terminator de NOS (Id. de sec. n.º: 45). (Tabla 2, casete n.º 16).

B. Transformación de constructos en *Eucalyptus*

Los constructos de ARN se transformaron en plantas de gXu usando un protocolo esencialmente como el descrito en Prakash y col., 2009. Brevemente, se propagaron brotes de eucalipto *in vitro* en un medio de sal basal de Murashige y Skoog (MS) que consistía en sacarosa al 3 % (p/v) y agar al 0,8 % (p/v). Todos los materiales vegetales *in vitro* se incubaron a 25 ± 2 °C utilizando un fotoperíodo de 16 h con lámparas fluorescentes de color blanco frío con una

intensidad de 30 11Em-2 s-1. A. Para la transformación se utilizó la cepa LBA 4404 de *A. tumefaciens*, que albergaba un vector binario pBI121 que contenía el gen nptII. El cultivo bacteriano recogido en la fase logarítmica tardía se sedimentó y se resuspendió en el medio de sal basal MS. Se recolectaron hojas del material *in vitro* y se usaron como explantos para experimentos de transformación. Los explantos se precultivaron en el medio de regeneración MS suplementado con 0,5 mg/1 de 6-bencilaminopurina (BAP) y 0,1 mg/1 de NAA durante 2 días. Los explantos de hoja precultivados se agitaron suavemente en la suspensión bacteriana durante 10 minutos y se secaron con papel de filtro estéril. A continuación, los explantos se cocultivaron en un medio en las condiciones de precultivo durante dos días. Después del cocultivo, los explantos se lavaron en el medio líquido MS, se secaron con papel de filtro estéril y se transfirieron a un medio de regeneración MS que contenía 0,5 mg/1 de 6-bencilaminopurina y 0,1 mg/1 de ácido 1-naftalenacético suplementado con 40 mg/1 de kanamicina y 300 mg/1 de cefotaxima. Después de 4-5 semanas de cultivo, se observó la regeneración y los explantos se transfirieron a un medio de elongación líquido (medio MS suplementado con 0,5 mg/1 de BAP, 40 mg/1 de kanamicina y 300 mg/1 de cefotaxima) sobre puentes de papel. Los brotes alargados (1,5-2 cm) se propagaron en el medio MS con 0,1 mg/1 de BAP. Los segmentos foliares se regeneraron, y los brotes alargados se analizaron mediante PCR y transferencia Western. Los brotes positivos se multiplicaron hasta 10 copias en el medio MS que contenía 0,04 mg/1 de BAP.

C. Confirmación por PCR

Para detectar la presencia de los constructos para la regulación a la baja, la PCR se llevó a cabo utilizando pares de cebadores que generan fragmentos indicativos de la presencia del segmento de lazo en el constructo de ARNhp (figura 6). Para detectar la presencia de los constructos de sobreexpresión, se llevó a cabo una PCR utilizando pares de cebadores que generan fragmentos indicativos de la presencia de los genes DELLA. Los pares de cebadores se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3: Secuencias de cebador

Gen	Cebadores	Tamaño del producto
lazo de ARNhp (Id. de sec. n.º: 26)	CGAACGAGCCGACTAATTGTCTT directo (Id. de sec. n.º: 33)	Aproximadamente 102 bp
	CGCGCGAAGATGCCACGC inverso (Id. de sec. n.º: 34)	
At RGA (Id. de sec. n.º: 16)	AGCTTAGCCGATCTCGATGC directo (Id. de sec. n.º: 35)	Aproximadamente 491 bp
	TCCACACGATAACCTTGGCC inverso (Id. de sec. n.º: 36)	
At RGL2 (Id. de sec. n.º: 20)	AGAAGGTCCTTCAATGGCGG directo (Id. de sec. n.º: 37)	Aproximadamente 342 bp
	AACGCAGAAAGACCCGGAAT inverso (Id. de sec. n.º: 38)	

Ejemplo 3 Regulación a la baja de DELLA de eucalipto expresado en las hojas

El análisis por RT PCR de gXu silvestre mostró que DELLA1 y DELLA3 se expresan en hojas de cultivo tisular, hojas jóvenes y hojas maduras. DELLA1 tuvo un nivel de expresión más alto en hojas de cultivo tisular y hojas jóvenes en comparación con DELLA3. La expresión de DELLA2 no se detectó en hojas de cultivo tisular ni en hojas jóvenes, y solo se detectó un nivel de expresión bajo en hojas maduras. Figura 4

A. Preparación del constructo para la regulación a la baja de DELLA de ARNbc, transformación y confirmación

El constructo DEL1 y el constructo DEL1/3, descritos en los ejemplos 2Aa(i) y 2Aa(iv), se prepararon como se describió anteriormente. Las plantas de eucalipto se transformaron con los constructos DEL1 o DEL1/3 tal como se describe en el ejemplo 2B. Se confirmó la expresión estable del transgen en 20 eventos para cada constructo mediante PCR como se describe en el ejemplo 2C.

B. Bioensayo vegetal: niveles de transcripción y mediciones de crecimiento

Los niveles de transcrito del cultivo tisular de cada uno de los eventos transgénicos y silvestre se midieron mediante PCR en tiempo real. La transcripción inversa se realizó usando 1 µg de ARN total, transcriptasa inversa, inhibidor de ribonucleasa y cebadores oligo dT. Se usaron cebadores específicos de gen para la amplificación por PCR de cada gen. Se prepararon una serie de diluciones de ADNc (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) y se usaron 2 µl del ADNc diluido como plantilla para la amplificación usando una mezcla rápida de SYBR en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems). Los cebadores dirigidos a un gen de referencia se usaron para normalizar los datos de expresión para cada gen. Las condiciones de la PCR fueron: 95 °C durante 20 segundos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C durante 3 segundos y 60 °C durante 30 segundos. Al final del experimento, se realizó un análisis de la cinética de disociación para comprobar la especificidad de la hibridación. Las mediciones en tiempo real se prepararon usando pares de cebadores que generan fragmentos indicativos de la presencia y expresión de los transgenes DELLA. Los pares de cebadores utilizados en la PCR en tiempo real para los genes individuales se enumeran en la Tabla 4.

Tabla 4: Secuencias de cebadores para la PCR en tiempo real

Gen	Cebadores	Tamaño del producto
DELLA1 (Id. de sec. n.º: 2)	GTGCAACGACATCTCCAGA directo (Id. de sec. n.º: 39)	Aproximadamente 96 bp
	GCGAAGGCTTCAAGAATCGC inverso (Id. de sec. n.º: 40)	

Los resultados de la PCR en tiempo real se resumen en la Tabla 5. Los resultados indican los niveles de transcrito de DELLA1 de eventos transformados con DEL1 o DEL1/3 en comparación con los niveles de transcrito de eventos silvestre.

Tabla 5: Resultados de la PCR en tiempo real de plantas transformadas con constructos DEL1 o DEL1/3

	A1	B1	A2	WT	B2	B3	B4	B5	B6	A3	A4	B7	A5	B8	A6	B9
Nivel de transcrito relativo de DELLA 1	1	0,6	0,45	1	0,5	0,785	1	0,12	0,27	0,28	0,25	0,18	0,3	0,25	0,28	0,18

Los eventos A1-A6 son plantas de gXu transformadas con el constructo DEL1. Los eventos B1-B9 son plantas de gXu transformadas con el constructo DEL1/3. Se midieron los niveles de transcrito de DELLA1 de eventos transformados con DEL1 o DEL1/3 y se compararon con los niveles de transcrito de eventos silvestre.

Para los experimentos en invernadero, se plantaron 8 réplicas para cada evento y se midieron. Los eventos transgénicos y silvestre seleccionados se cultivaron en un diseño de parcela aleatoria en el invernadero bajo una luz natural de 25-28 °C.

Mediciones de crecimiento

Después de 3 meses, se midieron la altura del dosel y el peso seco. La altura se determinó midiendo la longitud del tallo de cada planta transgénica desde la corona de la raíz hasta la parte superior. Los eventos transgénicos, en los que el nivel de transcrito de DELLA1 fue inferior al 40 %, aumentaron la altura de las plantas en comparación con las silvestre. Las mediciones de crecimiento se resumen en la figura 7 y también se muestran en la figura 8.

Ejemplo 4: Regulación a la baja de DELLA con un promotor específico para tejido verde

A. Preparación del constructo para la regulación a la baja de DELLA, transformación y confirmación

Los constructos DEL1GT, DEL1/2GT y DEL1/2/3GT se prepararon como se describe en el ejemplo 2Ab(i)-(iii). Las plantas de eucalipto se transformaron con los constructos DEL1GT, DEL1/2GT o DEL1/2/3GT como se describe en el ejemplo 2B. Se confirmó la expresión estable del transgen en 20 eventos para cada constructo mediante PCR como se describe en el ejemplo 2C.

B. Bioensayos vegetales y mediciones del crecimiento

El nivel de transcrito de DELLA1 a partir del material vegetal de cultivo tisular de los eventos transgénicos y silvestre se midió mediante la PCR en tiempo real. Los eventos con niveles de transcrito reducidos de DELLA1 en comparación con los silvestre se seleccionaron para un ensayo en invernadero.

Los eventos transgénicos y silvestre seleccionados se cultivaron en un diseño de parcela aleatoria en el invernadero bajo una luz natural de 25-28 °C. Se esperaba que las plantas transgénicas mostraran un mejor crecimiento, una mayor altura y un aumento del peso seco en comparación con las silvestre.

Ejemplo 5: Regulación a la baja de los polipéptidos DELLA endógenos y sobreexpresión de DELLA exógeno en las raíces (DR/OE)

A. Preparación, transformación y confirmación del constructo de DR/OE

Los constructos DEL1/RGA_{OE}, DEL1/3/RGA_{OE} y DEL1/2/3/RGA_{OE} se prepararon como se describe en el ejemplo 2Ac(i)-(iii). Las plantas de eucalipto se transformaron con los constructos DEL1/RGA_{OE}, DEL1/3/RGA_{OE}, DEL1/2/3/RGA_{OE} tal como se describe en el ejemplo 2B. Se confirmó la expresión estable del transgen en 20 eventos para cada constructo mediante PCR como se describe en el ejemplo 2C.

B. Bioensayos vegetales y mediciones del crecimiento

Después de 3 meses, se midieron la altura del dosel y el peso seco. La altura se determinó midiendo la longitud del tallo de cada planta transgénica desde la corona de la raíz hasta la parte superior.

Cabe destacar que las secuencias de polinucleótidos DELLA de sobreexpresión se optimizaron para el uso de codones de eucalipto según lo publicado en la base de datos de uso de codones: www.kazusa.or.jp/codon/. El uso de codones de eucalipto también se generó contando la tasa de cada codón de una biblioteca completa de transcriptomas de eucalipto. También se utilizó un software informático que incluye la opción de traducción inversa para obtener el ADN optimizado.

Ejemplo 6: Modificación de la expresión de DELLA en plantas de álamo

A. Identificación de homólogos de DELLA en *Populus trichocarpa*, *Populus tremula* y *Populus tremuloides*.

Para identificar posibles homólogos de DELLA en álamos, se alineó una secuencia de DELLA conocida de *Arabidopsis* con una base de datos del genoma de *Populus* que se encuentra en *Phytozome*, un portal de genómica comparativa de plantas (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>). La secuencia de RGA de *Arabidopsis thaliana* (Id. de sec. n.º: 15) se usó para buscar el genoma de *Populus trichocarpa* en la base de datos *Phytozome* utilizando la herramienta de búsqueda BLAST Protein-Protein. Los parámetros del algoritmo se basaron en una palabra de tamaño 3 y en la matriz BLOSUM62. Se identificaron cuatro secuencias de *Populus trichocarpa* (Id. de sec. n.º: 46, 47, 48, 49) como probables homólogos de los genes DELLA.

Se identificaron otros homólogos de DELLA alineando la secuencia de RGA de *Arabidopsis thaliana* con una base de datos del genoma de *Populus*, que se encuentra en *Popgenie*, un portal de genómica comparativa de plantas (<http://popgenie.org>). La secuencia de RGA se usó para buscar el genoma de *Populus tremula* y el genoma de *Populus tremuloides* en la base de datos *Popgenie* utilizando la herramienta de búsqueda BLAST Protein-Protein. Los parámetros del algoritmo se basaron en una palabra de tamaño 3 y en la matriz BLOSUM62. Se identificaron cuatro secuencias de *Populus tremula* (Id. de sec. n.º: 50, 51, 52, 53) y cuatro secuencias de *Populus tremuloides* (Id. de sec. n.º: 54, 55, 56, 57) como posibles homólogos de los genes DELLA.

B. Preparación del constructo

Los constructos para la regulación a la baja comprenden un casete de expresión que comprende un fragmento de una secuencia que codifica una secuencia diana de DELLA, la secuencia de complemento inversa del fragmento y una secuencia de lazo. La transcripción de los constructos produce un ARN en forma de horquilla (ARNhp), que tiene un tallo compuesto por el fragmento de ARNbc, formado por la hibridación de las secuencias de repetición invertida del gen diana, y una región de lazo.

a. Constructos para la regulación a la baja con un promotor constitutivo o un promotor específico para tejido verde

En las figuras 5A y 5B se muestra un esquema de la estructura de los constructos para la regulación a la baja de ARNbc que comprenden fragmentos de uno o más de los genes DELLA del álamo. Los constructos para la regulación a la baja contienen un casete de expresión que comprende fragmentos de al menos uno de los genes DELLA que se fusionaron y sintetizaron en repeticiones invertidas, separadas por una secuencia de lazo. Ver el casete P1-T1 en las figuras 5A y 5B. La transcripción de este casete (iniciado en el promotor P1 y terminado en T1) produjo un ARN en forma de horquilla, que contenía una sección de ARNbc, formada por la hibridación de las secuencias de repetición invertidas del fragmento del gen DELLA, y una región de lazo. Ver los esquemas B1-B3.

b. Constructos para la regulación a la baja y sobreexpresión (DR/OE)

Los esquemas de la estructura de los constructos de DR/OE se muestran en la figura 5B. Los constructos de DR/OE contenían tanto un casete de regulación a la baja para la regulación a la baja del nivel de expresión de uno o más polipéptidos DELLA endógenos (casete P1-T1) como un casete de sobreexpresión para la sobreexpresión de un gen DELLA en las raíces (casete P2-T2).

C. Transformación de constructos en álamo

La transformación se realizó usando el método de “congelación-descongelación” para la transformación directa con *Agrobacterium*. Las colonias que crecieron en el medio de selección (es decir, 50 mg l⁻¹ de rifamicina y 50 mg l⁻¹ de kanamicina) se confirmaron como transformantes mediante PCR. Cultivos de reserva bacterianos de la cepa *A. tumefaciens* LBA 4404, que contenía los nuevos constructos, se cultivaron individualmente durante la noche a 28 °C, en un agitador giratorio (200 rpm) en el medio LB con rifamicina (50 mg l⁻¹) y kanamicina (50 mg l⁻¹). Antes del cocultivo, se subcultivó 1 ml de cada cultivo bacteriano en el medio MSO + acetosiringona 100 11 µM y se cultivó a 28 °C, en un agitador rotatorio (200 rpm). Se recolectaron discos foliares de *Populus* de plantas cultivadas en cultivo tisular de cuatro semanas utilizando un barrenador de corcho. Veinte placas que contenían 25 discos foliares (7 mm²) se cultivaron conjuntamente con 30 ml de cultivo bacteriano en tubos Falcon de 50 ml durante 30 minutos a 28 °C en

un agitador rotatorio (100 rpm). Después del cocultivo, los explantos se secaron sobre papel de filtro estéril y se colocaron abaxialmente en un medio de cultivo WPM de 0,1 NAA, 0,1 BA y 0,1 TDZ. Las placas se cultivaron en la oscuridad durante dos días a temperatura ambiente. Al tercer día, los discos foliares se transfirieron al medio WPM que contenía 250 mg l⁻¹ de cefotaxima y 500 mg l⁻¹ de carbenicilina. Todas las placas se mantuvieron en la oscuridad durante dos días más. Después de este período, los explantos se transfirieron al medio de selección WPM con 250 mg l⁻¹ de cefotaxima y 500 mg l⁻¹ de carbenicilina y 25 mg l⁻¹ de higromicina. Solo se extirpó un brote por disco foliar y se colocó en un medio de selección WPM. Después de 6 semanas, los explantos se transfirieron a un medio fresco con la misma composición.

D. Confirmación de la transformación de constructos para la regulación a la baja de DELLA

Se confirmó la expresión estable del transgen en 20 eventos para cada constructo para la regulación a la baja mediante PCR.

E. Bioensayos de plantas y mediciones del crecimiento

El nivel de transcrito de DELLA a partir del material vegetal de cultivo tisular de los eventos transgénicos y silvestre se midió mediante PCR en tiempo real. Los eventos con niveles de transcrito reducidos de DELLA en comparación con los silvestre se seleccionaron para un ensayo en invernadero. Las plantas se subcultivaron y se multiplicaron en el medio WPM libre de antibióticos. Las plantas transgénicas se multiplicaron en el medio WPM hasta que aproximadamente diez plantas de cada línea tuvieron el mismo tamaño. A continuación, las plantas se trasladaron a macetas de 2 galones que contenían tierra perene (50 % de turba, 25 % de corteza fina y 25 % de piedra pómez; PH 6.0), y se mantuvieron en mesas inundables con iluminación adicional (16 h al día) y se regaron a diario con agua fertilizada. Se esperaba que las plantas transgénicas mostraran un mejor crecimiento, una mayor altura y un aumento del peso seco en comparación con las silvestre.

Ejemplo 7: Modificación de la expresión de DELLA en pasto varilla

A. Identificación de homólogos de DELLA en *Brachypodium distachyon* y *Panicum virgatum*

Para identificar posibles homólogos de DELLA en pastos varilla, se alineó una secuencia de DELLA conocida de *Arabidopsis* con las bases de datos del genoma de *Brachypodium distachyon* y *Panicum virgatum* que se encuentran en *Phytozome*, un portal de genómica comparativa de plantas (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>). La secuencia de RGA de *Arabidopsis thaliana* (Id. de sec. n.º: 15) se usó para la búsqueda en la base de datos de *Phytozome* utilizando la herramienta de búsqueda BLAST Protein-Protein. Los parámetros del algoritmo se basaron en una palabra de tamaño 3 y en la matriz BLOSUM62. Se identificaron una secuencia de *Brachypodium distachyon* (Id. de sec. n.º: 58) y dos secuencias de *Panicum virgatum* (Id. de sec. n.º: 59 y 60) como probables homólogos de los genes DELLA.

B. Preparación del constructo

Los constructos para la regulación a la baja comprendían un casete de expresión que comprendía un fragmento de una secuencia que codificaba una secuencia diana de DELLA, la secuencia de complemento inversa del fragmento y una secuencia de lazo. La transcripción de los constructos produjo un ARN en forma de horquilla (ARNhp), que tenía un tallo compuesto por el fragmento de ARNbc, formado por la hibridación de las secuencias de repetición invertida del gen diana, y una región de lazo.

C. Constructos para la regulación a la baja con un promotor constitutivo o un promotor específico para tejido verde

En las figuras 5A y 5B se muestra un esquema de la estructura de los constructos para la regulación a la baja de ARNbc que comprenden fragmentos de uno o más de los genes DELLA de *Brachypodium distachyon* y *Panicum virgatum*. Los constructos para la regulación a la baja contenían un casete de expresión que comprendía fragmentos del gen DELLA de *Brachypodium distachyon* o al menos uno de los genes DELLA de *Panicum virgatum* que se fusionaron y sintetizaron en repeticiones invertidas, separadas por una secuencia de lazo. Ver el casete P1-T1 en las figuras 5A y 5B. La transcripción de este casete (iniciado en el promotor P1 y terminado en T1) produce un ARN en forma de horquilla, que contiene una sección de ARNbc, formada por la hibridación de las secuencias de repetición invertida del fragmento del gen DELLA, y una región de lazo. Ver los esquemas B1-B3.

D. Constructos para la regulación a la baja y sobreexpresión (DR/OE)

Los esquemas de la estructura de los constructos de DR/OE se muestran en la figura 5B. Los constructos de DR/OE contenían tanto un casete de regulación a la baja para la regulación a la baja del nivel de expresión de uno o más polipéptidos DELLA endógenos (casete P1-T1) como un casete de sobreexpresión para la sobreexpresión de un gen DELLA en las raíces (casete P2-T2).

E. Transformación de los constructos

a. Transformación de *Brachypodium distachyon*

La transformación de *Brachypodium distachyon* se llevó a cabo transformando los constructos en la cepa de *A. tumefaciens* LBA 4404 mediante electroporación para las transformaciones de callos de *Brachypodium distachyon* (Handakumbura y col., 2013). Se confirmó la presencia del gen de resistencia a la higromicina en los eventos transgénicos mediante PCR, y se propagó durante tres generaciones posteriores. Se confirmó la presencia del gen de la higromicina fosfotransferasa II en la progenie T4 resultante mediante PCR, utilizando un kit de PCR Phire Plant Direct (Thermo Scientific) según las especificaciones del fabricante.

b. Transformación de *Panicum virgatum*

La transformación de *Panicum virgatum* se llevó a cabo transformando el callo embriogénico con los constructos del vector de expresión mediante una transformación mediada por *Agrobacterium* (Burris y col., 2009). La selección de antibióticos se llevó a cabo durante aproximadamente 2 meses con 30-50 mg/l de higromicina. La selección fue seguida de la regeneración del indicador de proteína fluorescente de color naranja (pporRFP; OFP), indicando secciones positivas para callos, en un medio de regeneración que contenía 400 mg/l de timentina (Li y Qu, 2011). Las plantas regeneradas se enraizaron en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) más 250 mg/l de cefotaxima (Grewal y col., 2006).

F. Confirmación de la transformación de constructos para la regulación a la baja de DELLA

Se confirmó la expresión estable del transgen en 20 eventos para cada constructo para la regulación a la baja mediante PCR.

G. Bioensayos vegetales y mediciones del crecimiento

El nivel de transcrito de DELLA a partir del material vegetal de cultivo tisular de los eventos transgénicos y silvestre se midió mediante PCR en tiempo real. Los eventos con niveles de transcrito reducidos de DELLA en comparación con los silvestre se seleccionaron para un ensayo en invernadero. Los eventos transgénicos y silvestre seleccionados se cultivaron en un diseño de parcela aleatoria en el invernadero. Se esperaba que las plantas transgénicas mostraran un mejor crecimiento, una mayor altura y un aumento del peso seco en comparación con las silvestre.

Ejemplo 8: Edición de genomas para DELLA en eucaliptos

Para generar mutantes de DELLA de eucalipto, se usaron casetes CRISPR/Cas9 dirigidos a diferentes genes DELLA para la transformación de clones de eucalipto seleccionados. Los genes DELLA en el eucalipto son genes únicos sin intrón. Para crear mutantes inactivados, se seleccionó como diana un locus genómico en los primeros 800 pb de la región codificante. Los ARNgs se diseñaron utilizando la herramienta en línea CRISTA (<http://crista.tau.ac.il/>) que utiliza un algoritmo para determinar la propensión de un sitio genómico a ser escindido por un ARNg determinado y proporciona una puntuación entre 0 y 1. En todas los constructos, se seleccionaron uno o dos ARNgs para cada gen basándose en puntuaciones altas (0,9 y superiores) y la expresión fue impulsada por el promotor U6 de *Arabidopsis* completo (Id. de sec. n.º: 75) o la versión corta modificada (Id. de sec. n.º: 76). La expresión de Cas9 de *S. pyogenes* con codones optimizados humanos (hSpCas9, Id. de sec. n.º: 77) está impulsada por el promotor CaMV 35S (Id. de sec. n.º: 74). Se añadió la señal de ubicación nuclear (SV40, Id. de sec. n.º: 78) al extremo C-terminal de la proteína. La secuencia diana de hSpCas9 tenía 20 pares de bases de longitud aguas arriba del motivo adyacente al proteospaciador (PAM) NGG. Los constructos de edición del genoma DELLA se muestran esquemáticamente en la figura 10. Para la edición del gen DELLA1 en el clon de eucalipto grandis x urophylla, se seleccionaron las secuencias guía 1 y 2 (Tabla 6). Ambas guías fueron impulsadas por el promotor U6 corto. La ubicación de las guías en el gen DELLA1 se muestra en la Figura 11.

Tabla 6: ARN guía seleccionados mediante las herramientas en línea de CRISTA

ARN guía				
n.º	Especies de eucalipto	Gen	Secuencia guía	Id. de sec. n.º:
1	Grandis / Urophylla	DELLA1	GGTCGTCGTTGAAGATGACC	63
2			GGTCCACCAGGACGACCGGC	64
3			GATCATCGAGACGCTTGACAG	65
4			TCCTCCACCCACTCAATGCC	66
5		DELLA2	CCACCACCTCTATCCCCAGA	67
6			TCCAAGATGTGGGACGAAGA	68

ARN guía				
n.º	Especies de eucalipto	Gen	Secuencia guía	Id. de sec. n.º:
7		DELLA3	GCAGCAGCAGCAATTGACGG	69
8			GCAGCAGCAGCAGCAATTGA	70
9	<i>Camaldulensis</i>	DELLA1	AGTCGTCGTTGAAGATGACC	71
10			TGTCCACCAGGACGACCGGC	72

Selección de eventos transgénicos que albergan una mutación:

El clon de *Eucalyptus grandis* x *urophylla* se transformó con un constructo que albergaba los dos primeros ARN_g de DELLA1 (Tabla 6). Se crearon un total de 10 líneas transgénicas positivas para Cas9. Las mutaciones se detectaron mediante secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés). Siete de cada diez eventos tenían una mutación en el gen diana. Los patrones de Indel diferían entre los eventos y todas las mutaciones alteran el marco de lectura de la secuencia (Figura 12). El evento 7 mostró una delección de 189 bp (Figura 13).

Otras realizaciones

Debe entenderse que, si bien la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que está definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Bibliografía

- Achard P, Gong F, Cheminant S, Alioua M, Hedden P, Genschik P (2008) The coldinducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* 20: 2117-2129
- Achard P, Genschik P (2009) Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot* 60: 1085-1092
- Azpiroz-Leehan R, Feldmann KA. T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: going back and forth. *Trends in Genetcs.* 1997;13:152-156
- Burris JN, Mann DGJ, Joyce BL, Stewart CN (2009) An improved tissue culture system for embryogenic callus production and plant regeneration in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) *BioEnergy Res.* 2:267-274
- Busov V, Meilan R, Pearce DW, Rood SB, Ma C, Tschaplinski TJ, Strauss SH. 2006. Transgenic modification of *gai* or *rgl1* causes dwarfing and alters gibberellins, root growth, and metabolite profiles in *Populus*. *Planta* 224: 288-299
- Busov V, Yordanov YS, Gou J, Meilan R, Ma C, Regan S, Strauss S (2010) Activation tagging is an effective gene tagging system in *Populus*. *Tree Genet Genomes* 7: 91-101
- Cheng H, Qin L, Lee S, Fu X, Richards DE, Cao D, Luo D, Harberd NP, Peng J (2004) Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* 131: 1055-1064
- Daviere JM, Achard P (2013) Gibberellin signaling in plants. *Development* 140: 1147-1151
- Eriksson ME, Israelsson M, Olsson O, Moritz T (2000). Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nature Biotechnology* 18: 784-788
- Flavell, RB (1994). Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3490-3496
- Fu X, Harberd NP (2003) Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 421: 740-743
- Grewal D, Gill R, Gosal SS (2006) Influence of antibiotic cefotaxime on somatic embryogenesis and plant regeneration in indica rice. *Biotechnol J* 1:1158-1162

- Harberd NP, Belfield E, Yasumura Y (2009) The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an “inhibitor of an inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* 21: 1328-1339
- 5 • Handakumbura P, Matos D, Osmont K, Harrington M, Heo K, Kafle K, Kim S, Baskin T, Hazen S (2013) Perturbation of *Brachypodium distachyon* CELLULOSE SYNTHASE A4 or 7 results in abnormal cell walls. *BMC Plant Biol* 13: 131
- 10 • Haseloff J, Gerlach WL (1988) Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* 334: 585-591.
- King K, Moritz T, Harberd N (2001) Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* 159: 767-776
- 15 • Kooter JM, Mol JNM (1993) Trans-activation of gene expression in plants. *Curr. Opin. Biotechnol* 4: 166-171
- Lee S, Cheng H, King KE, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J, Harberd NP, Peng J (2002) Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev* 16: 646-658
- 20 • Li RY, Qu RD, (2011) High throughput *Agrobacterium*-mediated switchgrass transformation. *Biomass. Bioenerg* 35:1046-1054
- 25 • Lo SF, Yang SY, Chen KT, Hsing YI, Zeevaart JA, Chen LJ, Yu SM (2008) A novel class of gibberellin 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root development in rice. *The Plant Cell* 20: 2603-2618
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- 30 • Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289
- 35 • Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP (1997) The *Arabidopsis* GAI gene defines a signalling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* 11: 3194-3205
- Peng J, Richards DE, Moritz T, Cano-Delgado A, Harberd NP (1999) Extragenic suppressors of the *Arabidopsis* gai mutation alter the dose-response relationship of diverse gibberellin responses. *Plant Physiol* 119: 1199-1208
- 40 • Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T-p (1998) The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* 10: 155-169
- 45 • Smith CJS, Watson CF, Ray J, Bird CR, Morris PC, Schuch W, Grierson D (1988) Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature* 334:724-726.
- Smith CJS, Watson CF, Morris PC, Bird CR, Seymour GB, Gray JE, Arnold C, Tucker GA, Schuch W, Harding S, Grierson D (1990) Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Mol Bio* 14: 369-379
- 50 • Sun T-p, Gubler F (2004) Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Anu Rev Plant Biol* 55 197-223
- 55 • Swain SM, Singh DP (2005) Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development. *Trends Plant Sci* 10 123-129
- Tyler L, Thomas SG, Hu J, Dill A, Alonso JM, Ecker JR, Sun TP (2004) DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135: 1008-1019
- 60 • Wen C-K, Chang C (2002) *Arabidopsis* RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* 14: 87-100
- 65 • Wild M, Davière J-M, Cheminant S, Regnault T, Baumberger N, Heintz D, Baltz R, Genschik P, Achard P (2012) The *Arabidopsis* DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. *Plant Cell* 24: 3307-3319

- Yamaguchi S (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 59: 225-251

REIVINDICACIONES

1. Un constructo CRISPR/Cas9 que comprende un promotor unido operativamente a una secuencia de polinucleótidos, comprendiendo la secuencia de polinucleótidos al menos una secuencia de ARN guía dirigida a un sitio diana de un gen que codifica un polipéptido DELLA de eucalipto al menos un 95 % idéntico a la Id. de sec. n.º: 1 (DELLA1),
 5 en donde el constructo reduce el nivel de expresión del polipéptido DELLA, que es al menos un 95 % idéntico a la Id. de sec. n.º: 1 (DELLA1) para alterar selectivamente la expresión de DELLA y superar la inhibición de las giberelinas sin inhibir el crecimiento de las plantas.
2. El constructo de la reivindicación 1, en donde al menos una secuencia de ARN guía comprende dos secuencias de ARN guía, preferiblemente en donde las secuencias de ARN guía se seleccionan de la Id. de sec. n.º: 63 y la Id. de sec. n.º: 64, o la Id. de sec. n.º: 65 y la Id. de sec. n.º: 66.
3. Una célula huésped que comprende el constructo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la célula huésped es una célula bacteriana, más preferiblemente en donde la célula huésped es un *Agrobacterium*.
4. Un tejido vegetal que comprende la célula huésped de la reivindicación 3, en donde el tejido es un tejido verde.
5. Un método para producir una planta de eucalipto con un nivel de expresión reducido de al menos un polipéptido DELLA, comprendiendo el método expresar el constructo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la planta.
6. Un método para producir una planta de eucalipto con un nivel de expresión reducido de al menos un polipéptido DELLA, comprendiendo el método:
 - a. transformar una célula vegetal con el constructo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2,
 - b. regenerar una planta a partir de la célula vegetal transformada para formar una planta transformada, y
 - c. cultivar la planta transformada, en donde la planta transformada tiene un mayor crecimiento en comparación con una planta silvestre de la misma especie.
7. Un método para modificar genéticamente una planta de eucalipto con un constructo recombinante que codifica una expresión del polipéptido DELLA localizada principalmente en las raíces de la planta, comprendiendo el método:
 - a. introducir mediante transformación un primer casete de expresión en la planta, en donde el primer casete de expresión reduce la expresión de al menos un polipéptido DELLA endógeno en la planta,
 - b. introducir mediante transformación un segundo casete de expresión en la planta, en donde el segundo casete de expresión comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido DELLA unido operativamente a un promotor heterólogo específico para raíz, y
 - c. cultivar la planta, donde la expresión de los polipéptidos DELLA en la planta se localiza principalmente en las raíces de la planta en comparación con una planta silvestre de la misma especie.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el polinucleótido que codifica un polipéptido DELLA codifica un polipéptido al menos un 95 % idéntico a la Id. de sec. n.º: 1 (DELLA1) para alterar selectivamente la expresión de DELLA y superar la inhibición de las giberelinas sin inhibir el crecimiento de la planta.
9. El método de las reivindicaciones 7 u 8, en donde el promotor específico para raíz se selecciona del grupo que consiste en PsMTA, el promotor de quitinasa de clase III, el promotor del transportador de fosfatos, el promotor de la acuaporina 2 intrínseca del tonoplasto, el promotor Pyk10, el promotor AtFLS5, el promotor btg26 y el 2-ODD (REO) expresado en la raíz de *Solanum lycopersicum*.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el polinucleótido que codifica un polipéptido DELLA unido operativamente a un promotor heterólogo específico para raíz es un polinucleótido DELLA de *Arabidopsis thaliana*, preferiblemente en donde el polipéptido DELLA de *Arabidopsis thaliana* se selecciona del grupo que consiste en las Id. de sec. n.º: 13, 15, 17, 19 y 21.
11. Una planta diseñada mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, o una progenie de la planta que tiene una expresión del polipéptido DELLA modificada en relación con la planta silvestre.
12. Una célula vegetal de la planta de la reivindicación 11 que tiene una expresión del polipéptido DELLA modificada en relación con la planta silvestre.

13. Una célula vegetal de eucalipto que comprende el constructo de la reivindicación 1.

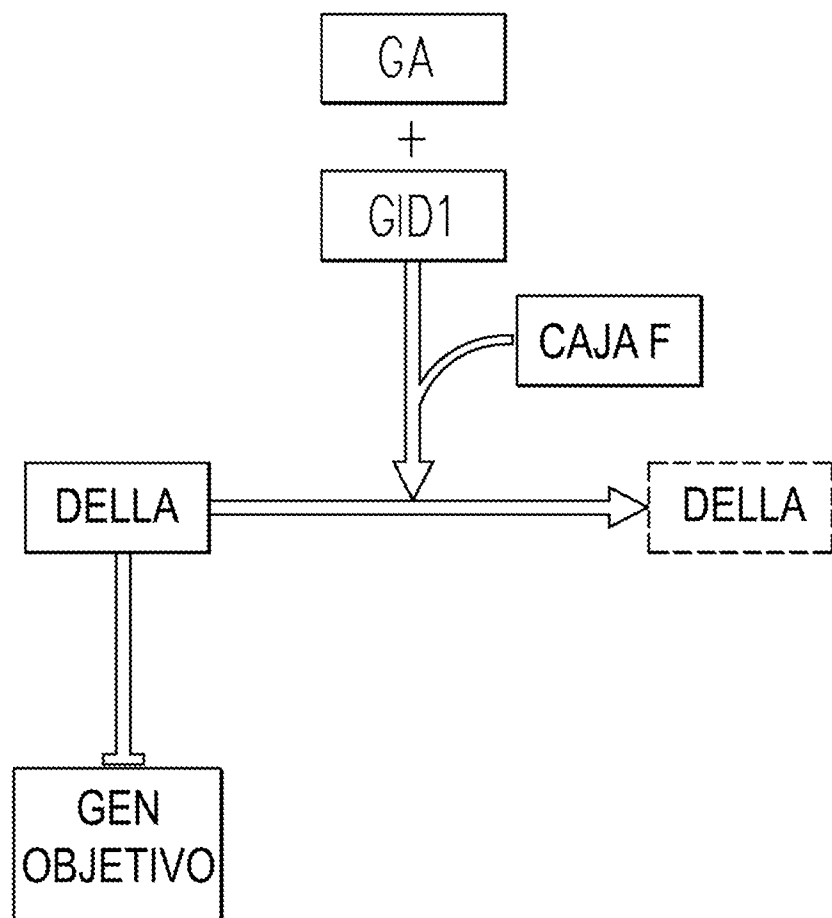


Figura 1

RGA Arabidopsis	1	MKRD	HHQFQGR	LSNHGTS	SSSS	SI	SKDK	-----
J01594	1	MKRD	HRDACSG	GGYGGGGG	GBAS	GASKGE	FPSSSESTHS	
G02163	1	MKRE	HHLYPQT	DPSTSA	AAAAGKSK	-----	-----	
C04156	1	MGPFDP	SAAAAAAAAA	SSSS	SSSS	SCSG	-----	
RGA Arabidopsis	60	AEVAL	KLEQLET	TMMSNVQ	EDGLSH	LATDT	VHYNPSBL	
J01594	61	AEVAQ	KLEQLBM	VMSAQ	EDGIS	HSYDA	VHYNPSDL	
G02163	55	AEVAQ	KLEQLBE	VMFSA	QEDGL	SHLASE	VHYNPSDL	
C04156	64	HHVAQ	RRLERLE	TALVNS	AAH-IP	HLASDA	VHYNPSDL	
RGA Arabidopsis	122	VLP	SPE	-----	-----	ICG	-----	
J01594	141	YLA	AAESSST	IAQHHR	SHLGSR	QQTQ	RTLSTQTS	APT
G02163	135	PL	FAESSS	ITTVDF	GADQRM	QSSC	GRSSQMNE	PPPE
C04156	112	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
RGA Arabidopsis	164	R	KCS	SPDS	MVTST	STSG	TQIG	GVIGTT
J01594	219	T	NGGS	NSLS	SSSSSS	SSS	-----	-----
G02163	214	R	LAST	SSS	STSS	SAV	TAKR	FK
C04156	141	DHPS	CE	PH	PQPH	QNVV	VP	-----
RGA Arabidopsis	244	VKQ	TGCLA	-----	VSQ	AGAMR	KVATY	FABALARRIYRLSP
J01594	282	VKH	IGLLA	-----	ASQ	NGAMR	KVATY	FABALARRIYRIYP
G02163	287	VKQ	IGFLA	-----	ISQ	AGAMR	KVATY	FABALARRIYRVYP
C04156	206	VEEMRA	LLTR	VDT	SRGIG	KVAGY	FIDAL	GRLLGLG
RGA Arabidopsis	322	RVH	VIDF	SMNQ	GLQWP	ALMQ	ALALR	EGGPFT
J01594	360	RVH	VIDF	GLKQ	GMQWP	ALMQ	ALALR	PGGPFA
G02163	365	RVH	VIDF	SMNQ	GLQWP	ALMQ	ALALR	PGGPFT
C04156	284	CVH	VIDF	NLMH	GLQWP	ALMQ	ALALR	PGPFLRLTGI
RGA Arabidopsis	402	AS	MLELR	PSST	EA	VAVNS	VPFLH	KELG
J01594	440	P	MLDIR	PPPE	VE	TAVNS	VPFLH	PELLA
G02163	445	AS	ILELR	PSDA	EA	VAVNS	VPFLH	KELLA
C04156	364	PW	MLQV	SEK	-----	EA	VAVNS	IMQLHRL
RGA Arabidopsis	478	DS	LEG	-----	VPNS	QDKV	MSEVYL	GKQICNL
J01594	516	DS	LEG	SGV	APPN	QDLV	MSEVYL	GKQICNV
G02163	521	DS	LEG	-----	CAST	QDK	AMSEVYL	GKQICNV
C04156	442	DS	LEAA	-----	CPVQ	PKALA	EMYLQ	REICNI
RGA Arabidopsis	555	G	YRVES	NGC	ML	GWETR	PLITTS	AWKLS
J01594	596	G	YRVEND	GC	ML	GWETR	PLIATS	AWQLA
G02163	596	G	YRVENG	GC	TL	GWETR	PLIATS	AWRL
C04156	519	G	YSVENE	GC	TL	CWF	SRPLIA	SAWQAAPT

ALA
FIG.
2B

Figura 2A

DE LA
FIGURA
2A

```

-----MMVKKKEED-----GGGNMDDELLAVLGKVRSSSEM 59
LPGSGKAKMMVMWGEDDDQDPSSGGGGGMDDELLAVLGKVRSSSDM 60
-----MWDEEDG-----CGGGGDDELLAVLGKVRSSSDM 54
-----GSAPKRHHHHHHHHFPPDLDGLLAGAGYKVRSSSEL 63

YSWLDNMLSELNPPPLPASSNG-----LDP 121
SSWVQSMLELNPPPPFQ-----QVADA 140
SSWLESMLESEFNPLPPPPGGFGGGPLSVFVAAAFPRPQPVGDF 134
ASWVDSMLESEL----- 111

-----FP-----ASDYDLKVIPONAIYQFPAIDSSSSSSNNQNK 163
QTQSQVIFND-----DSEYDLRAIPGVAAFPQGDSDPFESAARKKMK 218
IGSSGIVFDEESSSDYDLKAIPGKAVFVGRAQAQAQAQAQTR-T 213
-----SSSFSSPCLE-----SGFPDFYSPAAAALGGGWV 140

AAGESTRSVILVDSQENGVRVLVHALMACAEAIQQNNLTLEAL 243
APSESTRPVVLVDITQBTGVRLVHTLMACAEAVQQENLKLADAL 281
AAPESSRPVVLVDSQENGVRVLVHALMACADAVQQDNLSIAEAL 286
PQQQQQLTYVTALBEDSGIQLVHALMTCAESVQRGDASLAGSL 205

PQNQIDHCLSDTLQMHFYETCPYLKFAHFTANQAILBAFEK 321
NDGSLDSSCNDILQMHFYETCPYLKFAHFTANQAILBAFATAS 359
QNPPLDHSLTDALQMHFYETCPYLKFAHFTANQAILBAFEK 364
-SAPASAFENEVLYHFFYBACPYLKFAHFTANQAILBAFDGHD 283

GPPAPDNSDHLHEVGCCLAQLAEATHVEFEYRGFVANSLADLD 401
GPPQPNNTDALQQVQWKLAQLADTIGVEFEFRGPFVANSLADLE 439
GPPAPDNSDRLOEVGWKLAQLAETIHVEFEYRGFVANSLADLD 444
GPPSPDGRDVLREIGLRLAELARSVNVRFAFEGVAASRLLEDVK 363

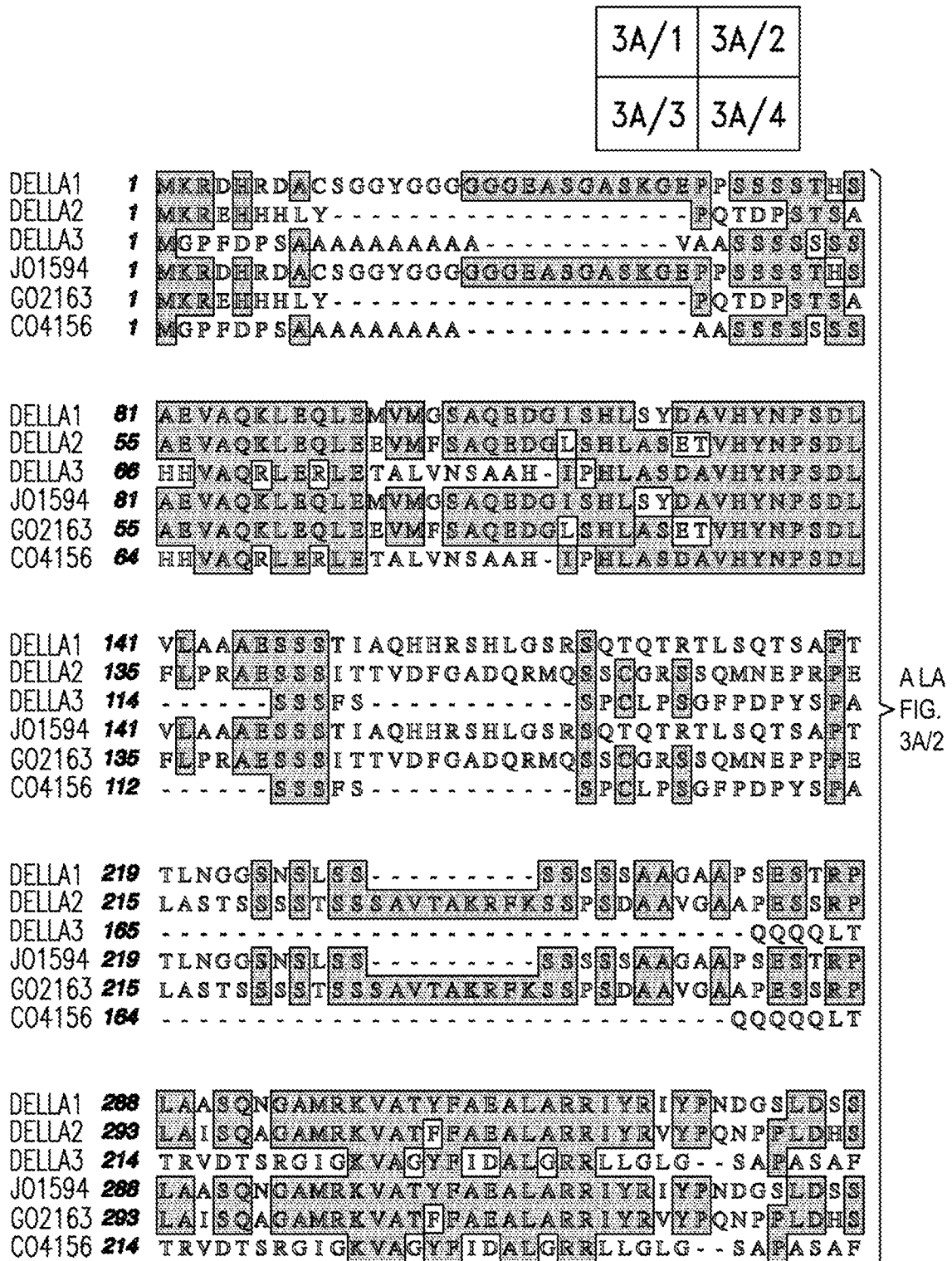
KVLGVVKQIKPVIFTYVBQESNHNNGPVFLDRFTESLHYYSTLF 477
KVLSSIKAMRPKIVTMVBQEBANHNNGPGFVDRPTEALHYYSILF 515
KVLGVVRQVRPAIVTVVBQEBANHNNGPVFVDRFNESLHYYSTLF 520
SVLPWIRSLNPKIMTVABQEBANHNRPGLDRPTEALHYYSTLF 441

VERHETLSQWGNRFSSSGLAPAHLGSNAPKQASMLLSVFNSSQ 554
VERHETLVQWQARMGSAGFDPEVHLGSNAPKQASMLLALFAGOE 595
VERHETLAQWRARLGGAGFVPAHLGSNAPKQASMLLALFAGGD 597
VERHEPLDRWRARLGRAGFRPLHLGSNAPKQASMLLTLPST-E 518

587
628
634
GVINEDENNQL 567

```

Figura 2B



ALA
FIG.
3A/2

ALA FIG. 3A/3

Figura 3A/1

DE LA
FIGURA
3A/1

```

MPGSGKAKMVMWGEBDDQDPSCGGGGGMDDELLAVLGYKVRSSDM 80
SAAAGKSK--MWDED-----GCGGGGDDELLAVLGYKVRSSDM 54
CSGGGSAPKRHHHHHH-----HHPPDLDGHLACAGYKVRSSSEL 65
LPGSGKAKMVMWGEBDDQDPSCGGGGGMDDELLAVLGYKVRSSDM 80
SAAAGKSK--MWDED-----GCGGGGDDELLAVLGYKVRSSDM 54
CSGGGSAPKRHHHHHH-----HHPPDLDGLLAGAGYKVRSSSEL 63

SSWVQSMLEFELNPPPPPP-----QQVADA 140
SSWLESMLESEFNPLPPPPGGFGGGPLSVFVAAAPPRPQPVGDP 134
ASWVDSMLESELP----- 113
SSWVQSMLEFELNPPPPPP-----QQVADA 140
SSWLESMLESEFNPLPPPPGGFGGGPLSVFVAAAPPRPQPVGDP 134
ASWVDSMLESELP----- 111

QTQSQVIFNDD--SEYDLRAIPGVAAFPQGDSDFESAARKKMK 218
IGSSGIVFDEESSSDYDLKAIPGKAVEFGRAQAQAQAQAQTRTR 214
AAALGGGWVDQ-----PSCSPHPQPHQNVVVVPCQQQ-- 164
QTQSQVIFNDD--SEYDLRAIPGVAAFPQGDSDFESAARKKMK 218
IGSSGIVFDEESSSDYDLKAIPGKAVEFGRAQAQAQAQAQTRTR 214
AAALGGGWVDH-----PSCSPHPQPHQNVVVVPCQPQP- 163

VVLVDITQETGVRLVHTLMACABAVQQENLKLADALVKHIG--L 287
VVLVDSQENGVRLVHALMACADAVQQDNLSIAEALVKQIG--F 292
VVTALEEDSGIQLVHALMTCAESVQRGDASLAGSLVEEMRALL 213
VVLVDITQETGVRLVHTLMACABAVQQENLKLADALVKHIG--L 287
VVLVDSQENGVRLVHALMACADAVQQDNLSIAEALVKQIG--F 292
VVTALEEDSGIQLVHALMTCAESVQRGDASLAGSLVEEMRALL 213

CNDILQMHPFYETCPYLKFAHFTANQAILBAFATASRVHVIDFG 367
LTDALQMHPFYETCPYLKFAHFTANQAILBAFEGKSRVHVIDFS 372
ENEVLVYHFFYEACPYLKFAHFTANQAILBAFDGHCVEVIDFN 291
CNDILQMHPFYETCPYLKFAHFTANQAILBAFATASRVHVIDFG 367
LTDALQMHPFYETCPYLKFAHFTANQAILBAFEGKSRVHVIDFS 372
ENEVLVYHFFYEACPYLKFAHFTANQAILBAFDGHCVEVIDFN 291

```

ALA FIG. 3A/4

Figura 3A/2

DE LA FIGURA 3A/1

DELLA1	368	LKQGMQWPALMQALALRPGGPPAFRLTGIGPPQPNNT
DELLA2	373	MNQGLQWPALMQALALRPGGPPTEFRLTGIGPPAPDMS
DELLA3	292	LMHGLQWPALIQALALRPRGPPLLRLTGIGPPSPDGR
JO1594	368	LKQGMQWPALMQALALRPGGPPAFRLTGIGPPQPNNT
GO2163	373	MNQGLQWPALMQALALRPGGPPTEFRLTGIGPPAPDMS
CO4156	292	LMHGLQWPALIQALALRPRGPPLLRLTGIGPPSPDGR
DELLA1	448	PEVETVAVNSVFELHPLLA----RFGAIDKVLSSIKA
DELLA2	453	SDAEAVAVNSVFELKLLA----RFGAIEKVLGVVRQ
DELLA3	372	K--EAVAVNSIMQLERLLGSDPPRDPPIGSVLPWIRS
JO1594	448	PEVETVAVNSVFELHPLLA----RFGAIDKVLSSIKA
GO2163	453	SDAEAVAVNSVFELKLLA----RFGAIEKVLGVVRQ
CO4156	372	K--EAVAVNSIMQLERLLGSDPPRDPPIGSVLPWIRS
DELLA1	524	APPNQDLVMSEVYLGRQICNVVACEGPPORVERHETLV
DELLA2	526	CASTQDKAMSEVYLKQKQICNVVACEGADRVERHETLA
DELLA3	448	CPVQPDKALAEIMYLQREICNIVGCEGAARVERHEPLD
JO1594	524	APPNQDLVMSEVYLGRQICNVVACEGPPORVERHETLV
GO2163	526	CASTQDKAMSEVYLKQKQICNVVACEGADRVERHETLA
CO4156	448	CPVQPDKALAEIMYLQREICNIVGCEGAARVERHEPLD
DELLA1	604	GCLMLGWHTRP LIATSAWQLA
DELLA2	606	GCLTEGWHTRP LIATSAWRLG
DELLA3	527	GCLTECWHSRPLIAASAWQAA
JO1594	604	GCLMLGWHTRP LIATSAWQLA
GO2163	606	GCLTEGWHTRP LIATSAWRLG
CO4156	527	GCLTECWHSRPLIAASAWQAA

ALA
FIG.
3A/4

Figura 3A/3

DE LA FIGURA 3A/2

DA	LQ	QV	GW	KLA	QLAD	TIG	VE	FE	FR	GF	VAN	SLAD	LE	PAM	LDIR	447
DR	LQ	EV	GW	KLA	QLAE	TI	HV	FE	YR	GF	VAN	SLAD	LD	ASI	LELR	452
DA	LRE	IG	LR	LA	ELAR	SVN	VR	FA	FR	GVA	ASRL	ED	VK	PW	MLQV	371
DA	LQ	QV	GW	KLA	QLAD	TIG	VE	FE	FR	GF	VAN	SLAD	LE	PAM	LDIR	447
DR	LQ	EV	GW	KLA	QLAE	TI	HV	FE	YR	GF	VAN	SLAD	LD	ASI	LELR	452
DV	LRE	IG	LR	LA	ELAR	SVN	VR	FA	FR	GVA	ASRL	ED	VK	PW	MLQV	371

MR	PK	IV	TM	VE	QE	AN	HN	GP	GF	VD	RF	TE	AL	HY	YS	SL	FD	SL	EG	SG	523
VR	FA	IV	TV	VE	QE	AN	HN	GP	VF	VD	RF	NE	SL	HY	YS	TL	FD	SL	EG	- - -	525
LN	PK	IM	TV	AE	QE	AN	HN	RP	GF	LD	RF	TE	AL	YY	YS	TL	FD	SL	EA	- - -	447
MR	PK	IV	TM	VE	QE	AN	HN	GP	GF	VD	RF	TE	AL	HY	YS	SL	FD	SL	EG	SG	523
VR	FA	IV	TV	VE	QE	AN	HN	GP	VF	VD	RF	NE	SL	HY	YS	TL	FD	SL	EG	- - -	525
LN	PK	IM	TV	AE	QE	AN	HN	RP	GF	LD	RF	TE	AL	YY	YS	TL	FD	SL	EA	- - -	447

DE LA
FIGURA
3A/3

QW	QAR	MG	SAG	FD	PV	HL	GS	NA	FK	QAS	MLL	AL	PAG	GE	GY	RVE	END	603	
QWR	ARL	GG	AG	FV	PA	HL	GS	NA	FK	QAS	MLL	AL	PAG	GD	GY	RVE	ENG	605	
RWR	ARL	GR	AG	FR	PL	HL	GS	NA	FK	QAS	MLL	TL	FS	-	TE	GY	SVE	ENE	526
QW	QAR	MG	SAG	FD	PV	HL	GS	NA	FK	QAS	MLL	AL	PAG	GE	GY	RVE	END	603	
QWR	ARL	GG	AG	FV	PA	HL	GS	NA	FK	QAS	MLL	AL	PAG	GD	GY	RVE	ENG	605	
RWR	ARL	GR	AG	FR	PL	HL	GS	NA	FK	QAS	MLL	TL	FS	-	TE	GY	SVE	ENE	526

AATQ	628	
GPSAGAAH	634	
PTVVNSPA	GVINHDDNNQL	567
AATQ	628	
GPSAGAAH	634	
PTVVNSPA	GVINHDDNNQL	567

Figura 3A/4

J01594	1	MKRDERDACSGGYGGGGGGGEASGASKGBPPSSSSSTHS
DELLA1	1	MKRDERDACSGGYGGGGGGGEASGASKGBPPSSSSSTHS
J01594	81	AEVAQKLEQLEMVMGSAQEDGISHLSYDAVHYNPSDL
DELLA1	81	AEVAQKLEQLEMVMGSAQEDGISHLSYDAVHYNPSDL
J01594	161	SRSQTQTRTLSQTSAPTQTQSQVIFNDDSEYDLRAIP
DELLA1	161	SRSQTQTRTLSQTSAPTQTQSQVIFNDDSEYDLRAIP
J01594	241	SESTRPVVLVDLTQBTGVRLVHTLMACAEAVQQENLKL
DELLA1	241	SESTRPVVLVDLTQBTGVRLVHTLMACAEAVQQENLKL
J01594	321	LDSSCNDILOMHFPYETCPYLKFAHFTANQAILBAFAT
DELLA1	321	LDSSCNDILOMHFPYETCPYLKFAHFTANQAILBAFAT
J01594	401	PNNTDALQQVGWKLAQLADTIGVEFEFRGPFVANSLAD
DELLA1	401	PNNTDALQQVGWKLAQLADTIGVEFEFRGPFVANSLAD
J01594	481	MRPKIVTMVEQEANENGPGFVDRFTEALEHYSSLFDS
DELLA1	481	MRPKIVTMVEQEANENGPGFVDRFTEALEHYSSLFDS
J01594	561	QWQARMGSAGFDPVHLGSNAFKQASMLLALFAGGEGY
DELLA1	561	QWQARMGSAGFDPVHLGSNAFKQASMLLALFAGGEGY

ALA
FIGURA
3B/2

Figura 3B/1

DE LA FIGURA 3B/1	LPGSGKAKMVMWGEDDQDPSSGGGGGGMDPELLAVLGKVRSSDM	80
	MPGSGKAKMVMWGEDDQDPSSGGGGGGMDPELLAVLGKVRSSDM	80
	SSWVQSMLPELNPPPPPPQQVADAVLAAAESSSTIAQHHRSHLG	160
	SSWVQSMLFELNPPPPPPQQVADAVLAAAESSSTIAQHHRSHLG	160
	GVAAFPQGDSDFESAARKKMKTLNGGSNSLSSSSSSSAAGAAP	240
	GVAAFPQGDSDFESAARKKMKTLNGGSNSLSSSSSSSAAGAAP	240
	ADALVKHIGLLAASONGAMRKVATYFABALARRIYRIYPNDGS	320
	ADALVKHIGLLAASONGAMRKVATYFAEALARRIYRIYPNDGS	320
	ASRVHVIDFGLKQGMQWPALMQALALRPGGPAPRLTGIGPPQ	400
	ASRVHVIDFGLKQGMQWPALMQALALRPGGPAPRLTGIGPPQ	400
	LEPAMLDIRPPEVETVAVNSVFELHPLLARPGAIDKVLSSIKA	480
	LEPAMLDIRPPEVETVAVNSVFELHPLLARPGAIDKVLSSIKA	480
	LEGSGVAPPNQDLVMSBVYLGROICNVVACEGPDERVERHETLV	560
	LEGSGVAPPNQDLVMSBVYLGROICNVVACEGPDERVERHETLV	560
	RVEENDGCLMLGWHTRPLIATSAWQLAAATC	628
	RVEENDGCLMLGWHTRPLIATSAWQLAAATC	628

Figura 3B/2

G02163	1	MKREHHHLYPQTDPSASAAAGKSKMWDEDGCGGGG
DELLA2	1	MKREHHHLYPQTDPSASAAAGKSKMWDEDGCGGGG
G02163	81	SETVHYNPSDLSSWLESMLSEFNPLPPPPGGFGGGPL
DELLA2	81	SETVHYNPSDLSSWLESMLSEFNPLPPPPGGFGGGPL
G02163	161	RSSQMNEPPPEIGSSGIVFDEESSSDYDLKAIPGKAY
DELLA2	161	RSSQMNEPPPEIGSSGIVFDEESSSDYDLKAIPGKAY
G02163	241	AVGAAPESSRPVVLVDSQENGVRVLVHALMACADAVQQ
DELLA2	241	AVGAAPESSRPVVLVDSQENGVRVLVHALMACADAVQQ
G02163	321	PQNFPLDHSLTDALQMHFYETCPYLKFAEPTANQAIL
DELLA2	321	PQNFPLDHSLTDALQMHFYETCPYLKFAEPTANQAIL
G02163	401	IGPPAPDNSDRLQEVGWKLAQLAETIHVEFEYRGFVA
DELLA2	401	IGPPAPDNSDRLQEVGWKLAQLAETIHVEFEYRGFVA
G02163	481	GVVRQVRPAIVTVVEQEANHNGPVFVDRFNESLHYYS
DELLA2	481	GVVRQVRPAIVTVVEQEANHNGPVFVDRFNESLHYYS
G02163	561	LAQWRARLGGAGFVPAHLG3NAPKQASMLLALFAGGD
DELLA2	561	LAQWRARLGGAGFVPAHLG3NAPKQASMLLALFAGGD

ALA
FIGURA
30/2

Figura 3C/1

DE LA
FIGURA
3C/1

DDELLAVLGYKVRSSDMAEVAQKLEBQLEBVMFSAQEDGLSHLA	80
DDELLAVLGYKVRSSDMAEVAQKLEBQLEBVMFSAQEDGLSHLA	80
SVPVAAAPPRPQPVGDPFLPRAESSSITTVDPGADQRMQSSCG	160
SVPVAAAPPRPQPVGDPFLPRAESSSITTVDPGADQRMQSSCG	160
FGRAQAQAQAQAQTRTRLASTSSSSTSSSAVTAKRPFKSSPSDA	240
FGRAQAQAQAQAQTRTRLASTSSSSTSSSAVTAKRPFKSSPSDA	240
DNLSIAEALVKQIGFLAISQAGAMRKVATFFAEALARRIYRVY	320
DNLSIAEALVKQIGFLAISQAGAMRKVATFFAEALARRIYRVY	320
EAPEGKSRVHVIDFSMNQGLQWPALMQALALRPGGPPTFRLTG	400
EAPEGKSRVHVIDFSMNQGLQWPALMQALALRPGGPPTFRLTG	400
NSLADLDASILELRPSDAEAVAVNSVPFELHKLLARPGAIEKVL	480
NSLADLDASILELRPSDAEAVAVNSVPFELHKLLARPGAIEKVL	480
TLFDSLEGCASTQDKAMSEVYLGKQICNVVACEGADRVERHET	560
TLFDSLEGCASTQDKAMSEVYLGKQICNVVACEGADRVERHET	560
GYRVEBENGCGCLTLGWHTRPLIATSAWRLGGPSAGAAH	634
GYRVEBENGCGCLTLGWHTRPLIATSAWRLGGPSAGAAH	634

Figura 3C/2

CO4156	1	MGPPDP S A A A A A A A A A A - - A A S S S S S S S S C S G G S A P K R H	
DELLA3	1	MGPPDP S A A A A A A A A A A A V A A S S S S S S S S C S G G S A P K R H	
CO4156	79	NSAAEI P H L A S D A V H Y N P S D L A S W V D S M L S E L P S S S P	
DELLA3	81	NSAAEI P H L A S D A V H Y N P S D L A S W V D S M L S E L P S S S P	
CO4156	159	Q Q P Q P Q Q Q Q Q L T V V T A L E B D S G I Q L V H A L M T C A E S V Q	
DELLA3	161	Q Q Q Q - - Q Q Q Q L T V V T A L E B D S G I Q L V H A L M T C A E S V Q	
CO4156	239	GLGSAPASAFENEVLYHHPYEACPYLKFAHPTANQAI	
DELLA3	239	GLGSAPASAFENEVLYHHPYEACPYLKFAHPTANQAI	
CO4156	319	G I G P P S P D G R D V L R E I G L R L A B L A R S V N V R F A F R G V A	
DELLA3	319	G I G P P S P D G R D A L R E I G L R L A B L A R S V N V R F A F R G V A	
CO4156	399	SVLPWIRSLNPKIMTVAEQ E A N H N R P G F L D R F T E A L Y	
DELLA3	399	SVLPWIRSLNPKIMTVAEQ E A N H N R P G F L D R F T E A L Y	
CO4156	479	RHEPLDRWRARLGRAGFRPLHLGSNAFKQASMLLTLP	
DELLA3	479	RHEPLDRWRARLGRAGFRPLELGSNAFKQASMLLTLP	
CO4156	559	NHDDNNNQL	567
DELLA3	559	NHDDNNNQL	567

ALA
FIG.
3D/2

Figura 3D/1

HHHHHHHPPPDLDGL	L	A	G	A	G	Y	K	V	R	S	S	E	L	H	H	V	A	Q	R	L	R	L	E	T	A	L	V	78
HHHHHHHPPPDLDGHL	A	C	A	G	Y	K	V	R	S	S	E	L	H	H	V	A	Q	R	L	R	L	E	T	A	L	V	80	
SSPCLPSGFPDPYSPAAAAALGGGWVD	H	P	S	C	S	F	H	P	Q	P	H	Q	N	V	V	V	P	158										
SSPCLPSGFPDPYSPAAAAALGGGWVD	O	P	S	C	S	F	H	P	Q	P	H	Q	N	V	V	V	P	160										
RGDASLAGSLVEEMRALLTRVDTSRGIGKVAGYFIDALGRRL	L	238																										
RGDASLAGSLVEEMRALLTRVDTSRGIGKVAGYFIDALGRRL	L	238																										
LEAPDGHDCVHVIDFNLMHGLQWPALIQALALRPRGPPLLRLT	318																											
LEAPDGHDCVHVIDFNLMHGLQWPALIQALALRPRGPPLLRLT	318																											
ASRLBDVKPWMLQVSPKEAVAVNSIMQLHRLLGSDPPRDPPPIG	398																											
ASRLBDVKPWMLQVSPKEAVAVNSIMQLHRLLGSDPPRDPPPIG	398																											
YYSTLFDSLEAACPVQPDKALAEMYLQREICNIVGCEGAARVE	478																											
YYSTLFDSLEAACPVQPDKALAEMYLQREICNIVGCEGAARVE	478																											
STEGYSVEENEGCLTLCWHSRPLIAASAWQAAPTUVVNSPAGVI	558																											
STEGYSVEENEGCLTLCWHSRPLIAASAWQAAPTUVVNSPAGVI	558																											

DE LA
FIGURA
3D/1

Figura 3D/2

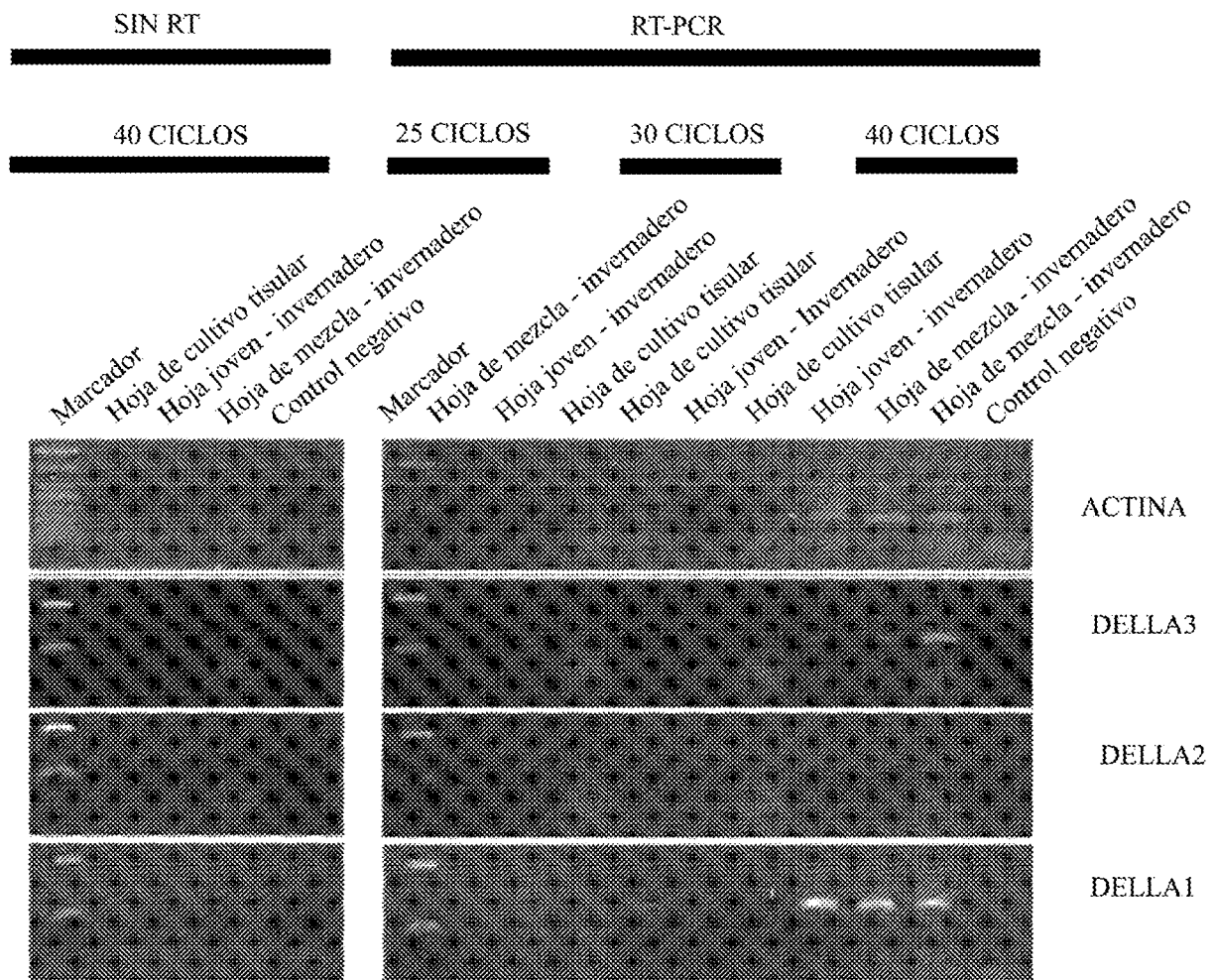
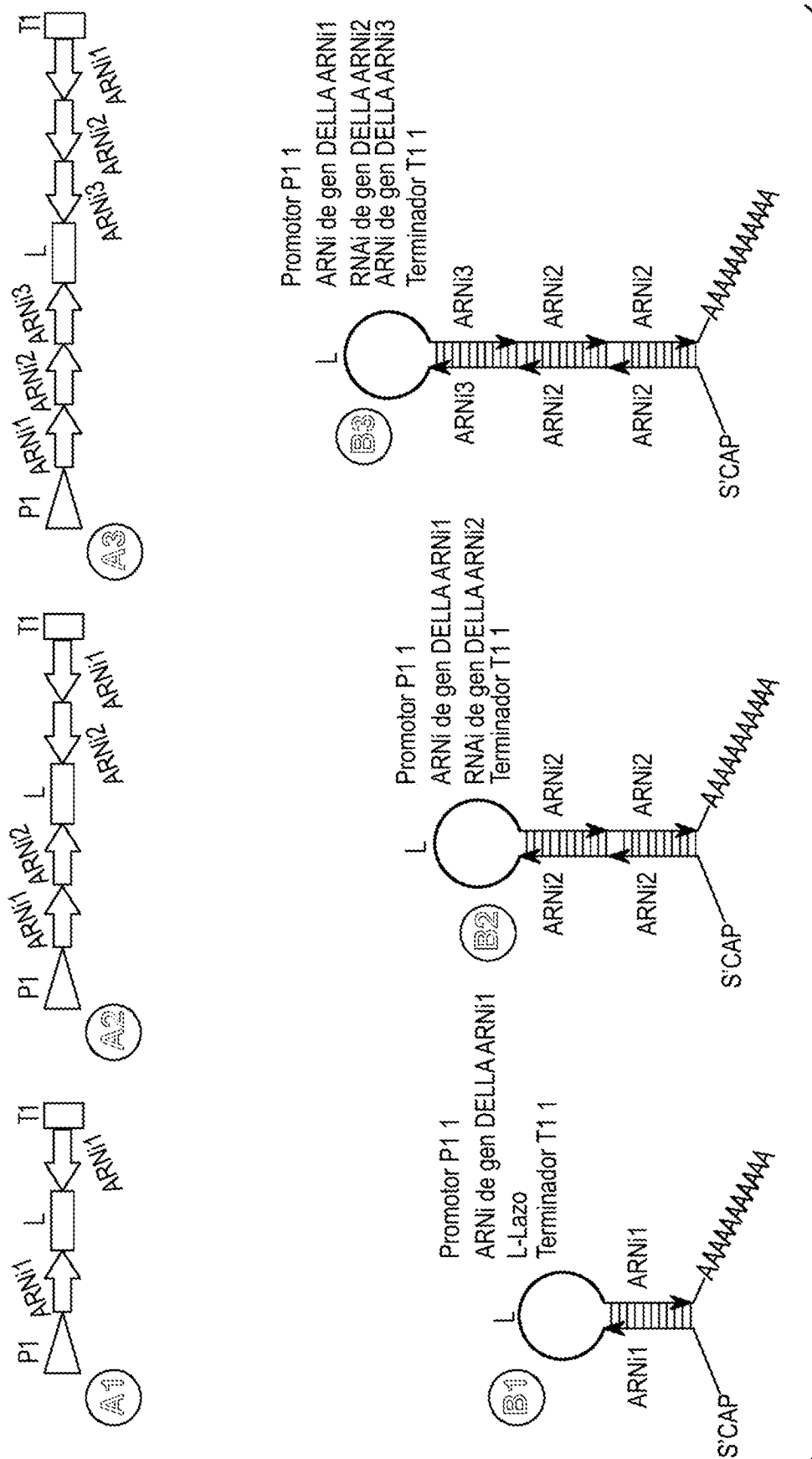


Figura 4



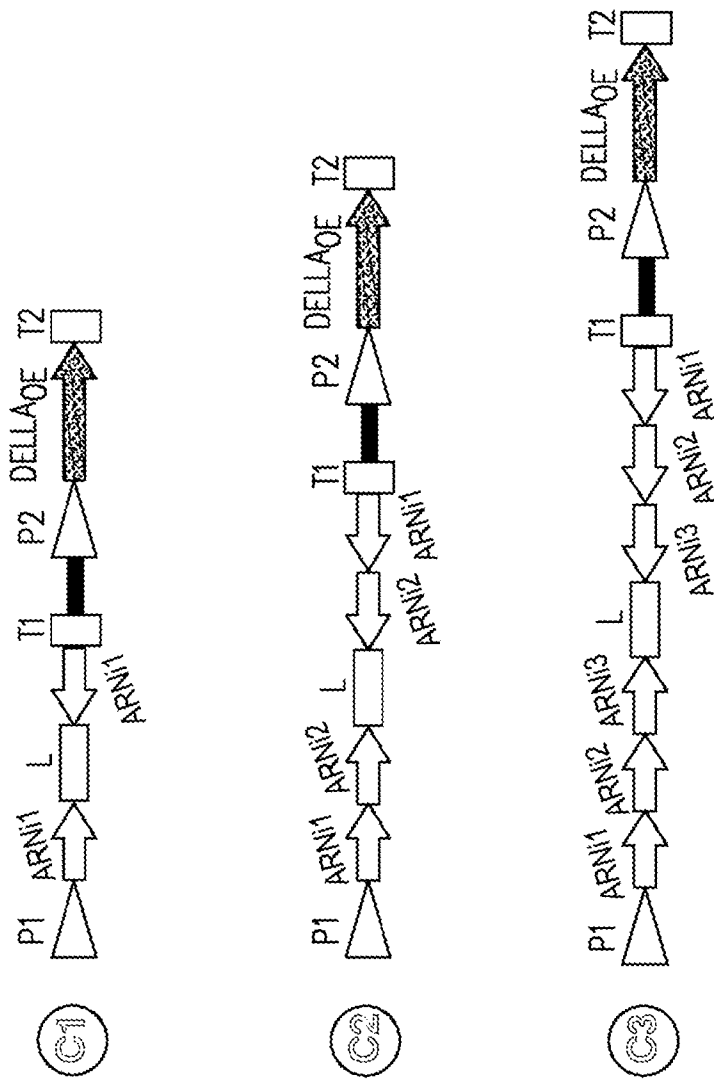
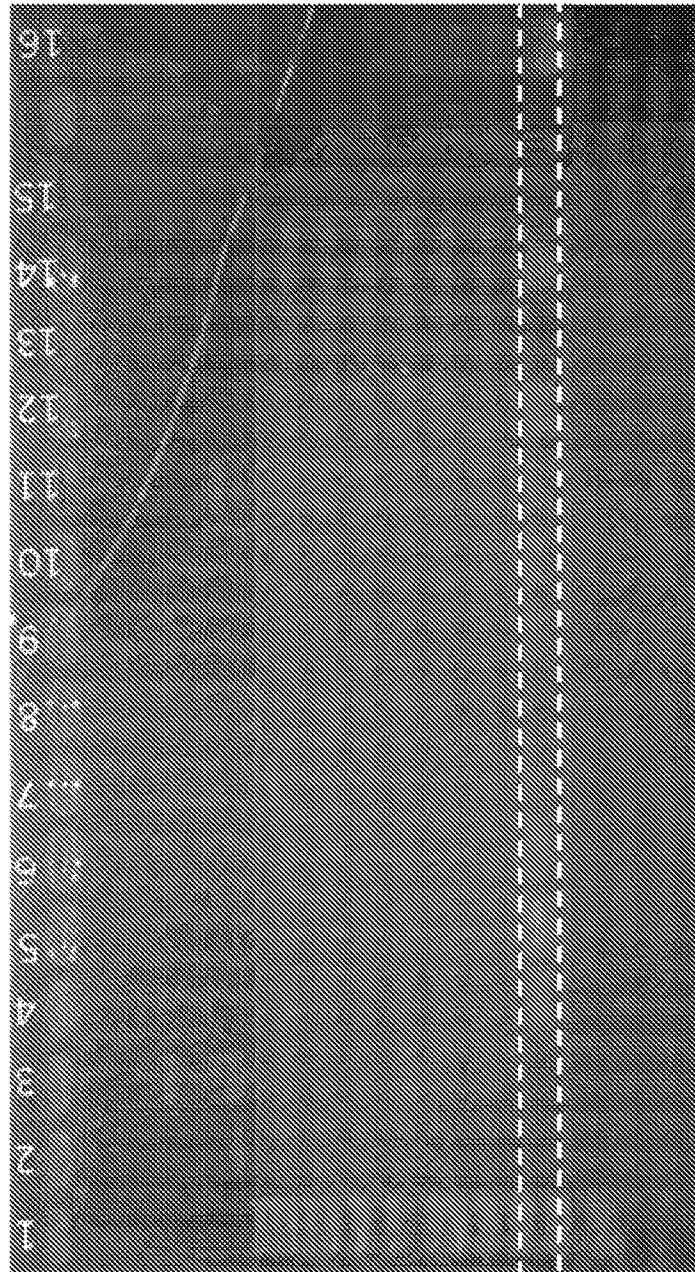


Figura 5B

Figura 6



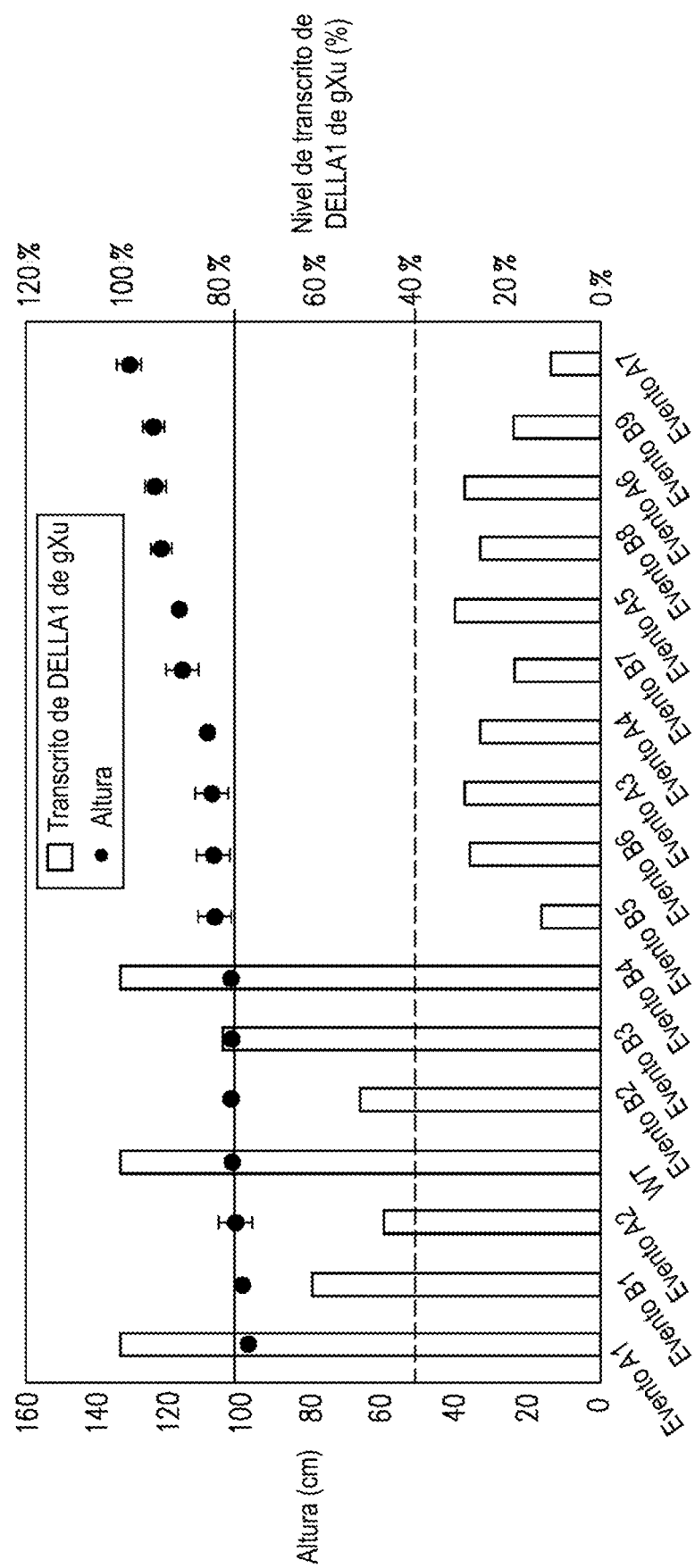
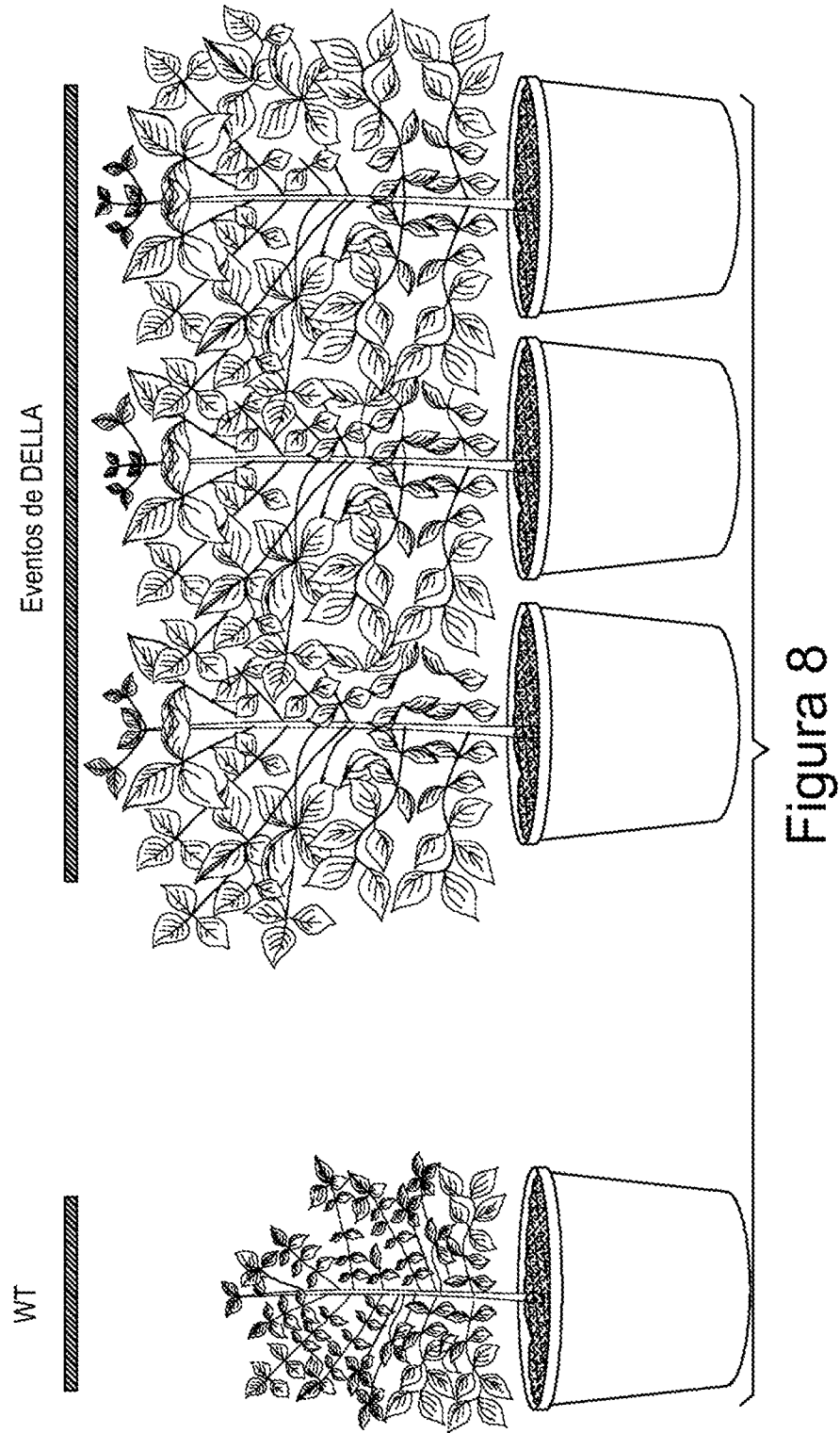


Figura 7



DELLA1_ Camaldulensis	1	MKRDHRDACSGGYGGGGGGGEASGASKOEPPSSSSSTHS
DELLA1_GXU	1	MKRDHRDACSGGYGGGGGGGEASGASKOEPPSSSSSTHS
DELLA1_ Camaldulensis	68	-----
DELLA1_GXU	81	AEVAQKLEQLMVMGSAQEDGISHLSYDAVHYNPSDL
DELLA1_ Camaldulensis	68	-----
DELLA1_GXU	161	SRSQTQTRTLSQTSAPTQTQSQVIFNDDSEYDLRAIP
DELLA1_ Camaldulensis	80	SESTRPVVLVDLTQBTGVRLVHTLMACAEAVQQENLKL
DELLA1_GXU	241	SESTRPVVLVDLTQBTGVRLVHTLMACAEAVQQENLKL
DELLA1_ Camaldulensis	160	LDSSCNDILQMHPYETCPYLKFAHFTANQAILEAFAT
DELLA1_GXU	321	LDSSCNDILQMHPYETCPYLKFAHFTANQAILEAFAT
DELLA1_ Camaldulensis	240	PNNTDALQQVGWKLALADLTIGVEFBFRGPFVANSLAD
DELLA1_GXU	401	PNNTDALQQVGWKLALADLTIGVEFBFRGPFVANSLAD
DELLA1_ Camaldulensis	320	MRPKIYTMVEQEANHNGPGFVDRPTEALHYSSSLFDS
DELLA1_GXU	481	MRPKIYTMVEQEANHNGPGFVDRPTEALHYSSSLFDS
DELLA1_ Camaldulensis	400	QWQARMGSAGPDPVHLGSNAPKQASMLLALPAGGEGY
DELLA1_GXU	561	QWQARMGSAGPDPVHLGSNAPKQASMLLALPAGGEGY

ALA
FIGURA
9A/2

Figura 9A/1

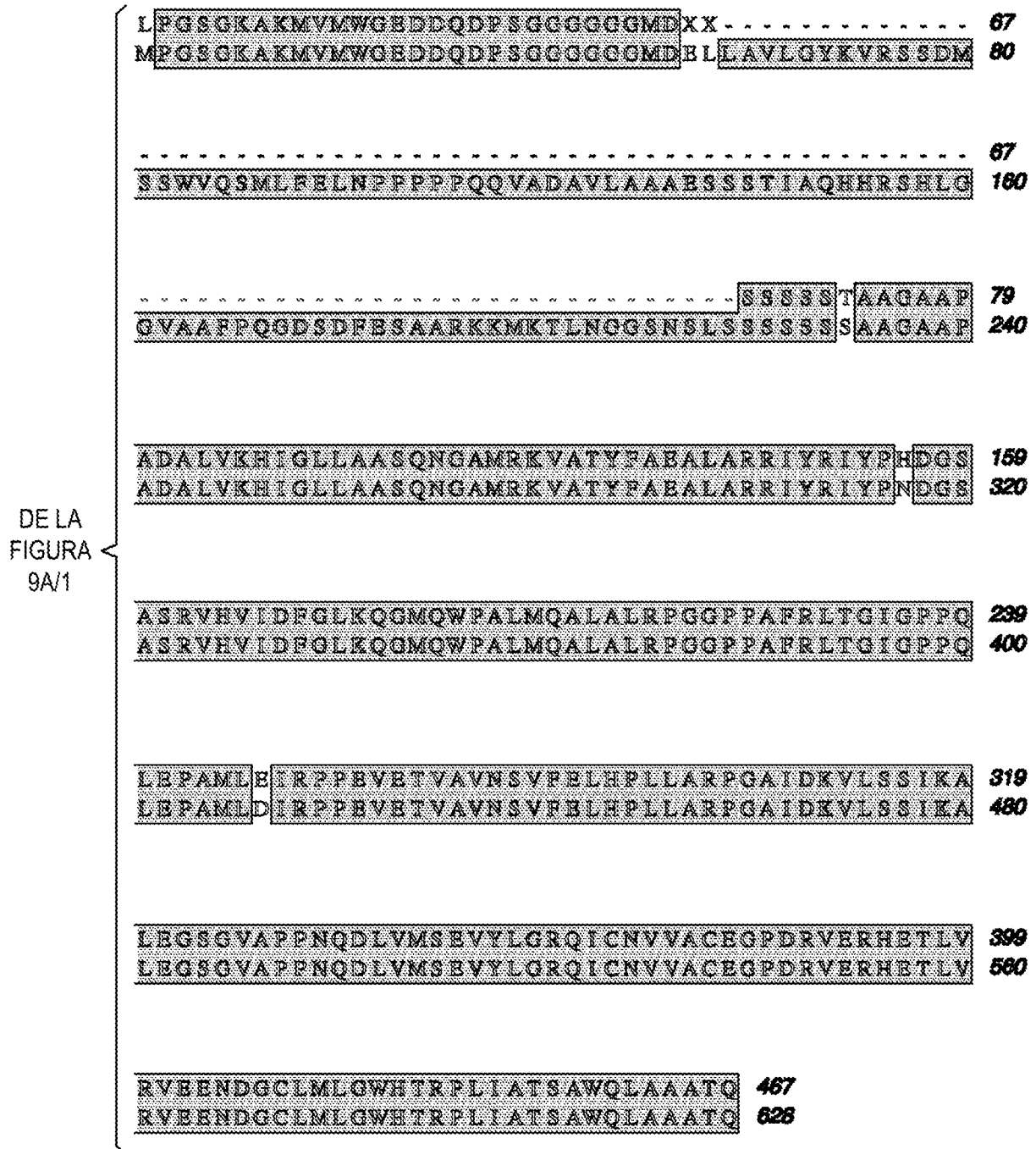


Figura 9A/2

DELLA1_Globulus	1	-----
DELLA1_GXU	1	MKRDERDACSGGYGGGGGGEASGASKGBPPSSSSSTHS
DELLA1_Globulus	1	-----
DELLA1_GXU	81	AEVAQKLEQLEBMVMGSAQBDGISELSYDAVHYNPSDL
DELLA1_Globulus	1	-----
DELLA1_GXU	161	SRSQTQTRTLSQTSAPTQTQSQVIFNDDSEYDLRAIP
DELLA1_Globulus	1	-----MACABAVQQENLKL
DELLA1_GXU	241	SESTRPVYLVDTQETGVRLVHTLMACABAVQQENLKL
DELLA1_Globulus	59	LDSSCNDILQMHPFYETCPYLKFAEFTANQAILEAFAT
DELLA1_GXU	321	LDSSCNDILQMHPFYETCPYLKFAEFTANQAILEAFAT
DELLA1_Globulus	139	PNNTDALQQVGWKLAAQLADTIGVEFEFRGPFVANSLAD
DELLA1_GXU	401	PNNTDALQQVGWKLAAQLADTIGVEFEFRGPFVANSLAD
DELLA1_Globulus	219	MRPKIVTMVBQBANHNPGVFVDRFTEALHYYSSLFDS
DELLA1_GXU	481	MRPKIVTMVBQBANHNPGVFVDRFTEALHYYSSLFDS
DELLA1_Globulus	299	QWQARMGSAGFDPVHLGSNAPFKQASMLLALFAGGEGY
DELLA1_GXU	561	QWQARMGSAGFDPVHLGSNAPFKQASMLLALFAGGEGY

ALA
FIGURA
9B/2

Figura 9B/1

DE LA
FIGURA
9B/1

MPGSGKAKMVMWGEDDQDP3GGGGGCGMDELLAVLGKVRSSDM	0	80
SSWVQSMLFELNPPPPPPQQVADAVLAAAESSSTIAQEHRSHLG	0	160
GVAAPPQGDSDFESAARKKMKTLNGGNSLSSSSSSSAAGAAP	0	240
ADALVKHIGLLAASQNGAMRKVATYFABALARRIYRIYPH	57	DGS
ADALVKHIGLLAASQNGAMRKVATYFABALARRIYRIYPN	320	DGS
ASRVHVIDFOLKQGMQWPALMQALALRPGGPPAPRLTGIGPPQ	137	
ASRVHVIDFOLKQGMQWPALMQALALRPGGPPAPRLTGIGPPQ	400	
LEPAMLDIRPPEVETVAVNSVPFELHPLL	217	SRPGAIDKVLSSIKA
LEPAMLDIRPPEVETVAVNSVPFELHPLLA	480	SRPGAIDKVLSSIKA
LEGSGVAPPNQDLVMSBVYLGQRQICNVVACEGL	297	DRVERHETLV
LEGSGVAPPNQDLVMSBVYLGQRQICNVVACEGP	560	DRVERHETLV
RVEENDGCLMLGWHTRPLIATSAWQLAAATQ	365	
RVEENDGCLMLGWHTRPLIATSAWQLAAATQ	628	

Figura 9B/2

DELLA2_Globulus	1	MKREHHHLYPQTG	PSTTSASAAAG	GKSKMWDEEDGCCGGGG
DELLA2_GxU	1	MKREHHHLYPQTD	PSTTSASAAA	GKSKMWDEEDGCCGGGG
DELLA2_Globulus	81	SETVHYNP	SDLSSWLESMLSEFNPL	PPPPQPPPPGGF
DELLA2_GxU	81	SETVHYNP	SDLSSWLESMLSEFNPL	PPPP- - - -GGF
DELLA2_Globulus	161	QSSCGRSSQMNEPRPE	IGSSGIVFDEESSSDYDLKAI	
DELLA2_GxU	156	QSSCGRSSQMNEPRPE	IGSSGIVFDEESSSDYDLKAI	
DELLA2_Globulus	239	SPSDAAVGAAP	ESSRPVVLVDSQENG	VRLVHALMACA
DELLA2_GxU	238	SPSDAAVGAAP	ESSRPVVLVDSQENG	VRLVHALMACA
DELLA2_Globulus	319	IYRVYFPQN	PPLDHS	LTDALQMHPYETCPYLKFAHFTA
DELLA2_GxU	316	IYRVYFPQN	PPLDHS	LTDALQMHPYETCPYLKFAHFTA
DELLA2_Globulus	399	FRLTGIGPP	- - - - -	
DELLA2_GxU	398	FRLTGIGPP	PAPDNSDRLQ	BVGWKLAAQLAETIHVEFEY
DELLA2_Globulus	408	- - - - -	- - - - -	
DELLA2_GxU	476	IEKVLGVVRQVR	PAIVTVVEQB	ANHNGPVFVDRFNES
DELLA2_Globulus	408	- - - - -	- - - - -	
DELLA2_GxU	558	ERHETLAQWRAR	LGGAGFVPAHLGS	NAFKQASMLLAL

ALA
FIG.
9C/2

Figura 9C/1

DE LA
FIGURA
9C/1

DDELLAVLGKVRSSDMAEVAQKLEQLBEEVMFSAQEDGI	SHLA	80
DDELLAVLGKVRSSDMAEVAQKLEQLBEEVMFSAQEDGL	SHLA	80
GGGPLSVPVAAAPPRPQPVGDPFLPRAESSSITTVDGADQRM		160
GGGPLSVPVAAAPPRPQPVGDPFLPRAESSSITTVDGADQRM		155
PGKAVFG - - RAQAQAQAQTETRLASTSSSSSTSSSAVTAKRPKS		238
PGKAVFGRAQAQAQAQTETRLASTSSSSSTSSSAVTAKRPKS		235
DAVQQDNLSIABALVKQIGFLAISQAGAMRKVATFFAEALARR		318
DAVQQDNLSIABALVKQIGFLAISQAGAMRKVATFFAEALARR		315
NQAILEAFEGKSRVHVVIDFSMNQGLQWPALMQALALRPGGPPT		398
NQAILEAFEGKSRVHVVIDFSMNQGLQWPALMQALALRPGGPPT		395
.....		407
RGFVANSLADLDASILBLRPSDABAVAVNSVFBLEKLLARPGA		475
.....		407
LHYYSTLFDSLEGCASTQDKAMSEVYLGKQICNVVACEGADRV		555
.....		407
FAGGDGYRVEENGCLTLGWHTRPLIATSAWRLGGPSAGAAH		634

Figura 9C/2

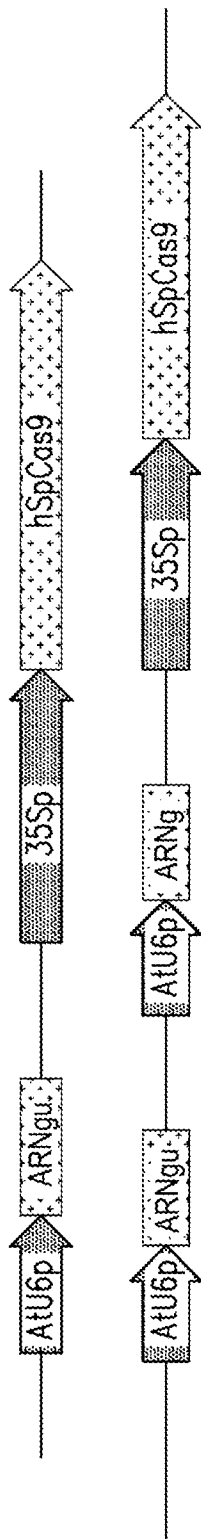


Figura 10

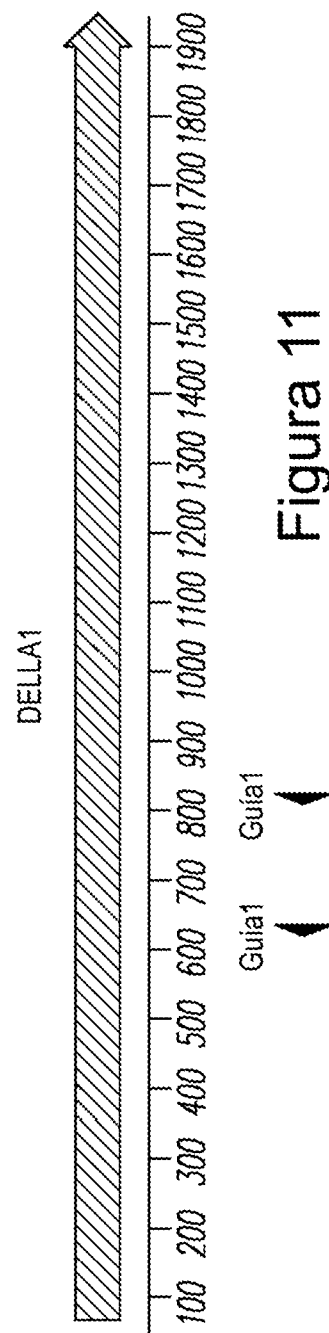


Figura 11

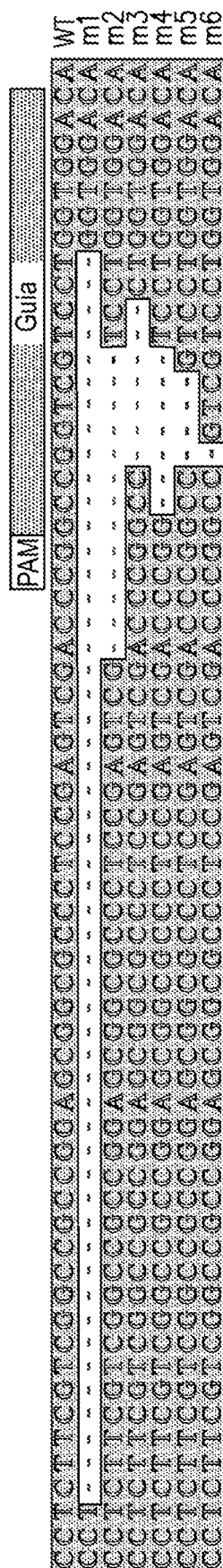


Figura 12

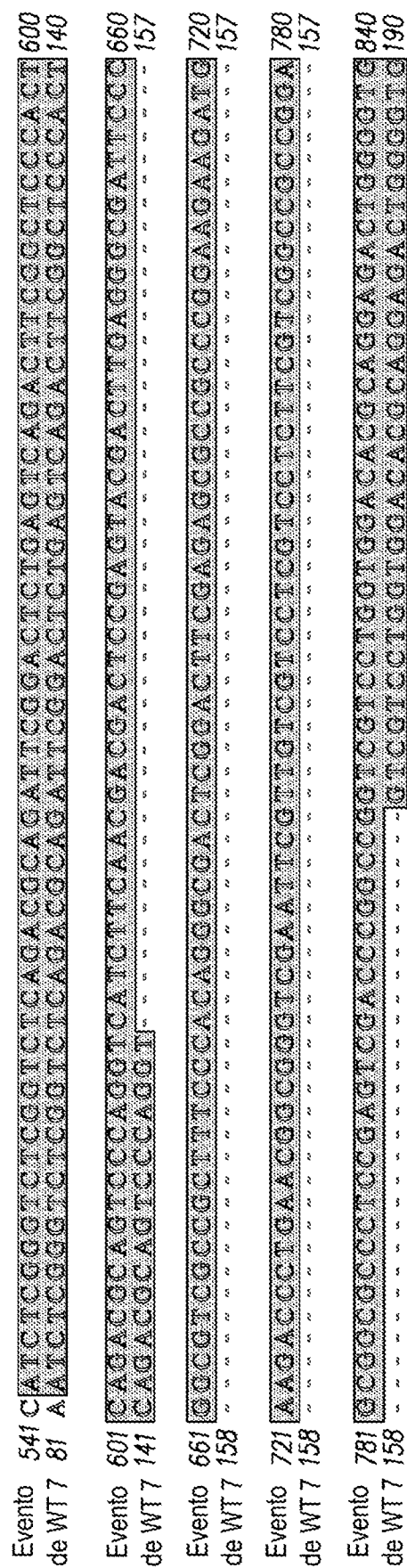


Figura 13