



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 301 908**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04021478 .5**
86 Fecha de presentación : **09.09.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1514941**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2005**

54 Título: **Gen de resistencia al paraquat.**

30 Prioridad: **12.09.2003 JP 2003-322051**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2008

73 Titular/es: **Toyota Jidosha Kabushiki Kaisha
1, Toyota-cho
Toyota-shi, Aichi-ken 471-8571, JP
Okayama Prefecture**

72 Inventor/es: **Ito, Hisashi;
Tanaka, Yoshikazu;
Ogawa, Kenichi;
Kondo, Satoshi;
Ohto, Chikara y
Furusawa, Iwao**

74 Agente: **Isern Jara, Jaime**

ES 2 301 908 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

Gen de resistencia al paraquat.

5 **Fundamento de la invención****Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para el cribado o detección de una planta transgénica y también a un
10 método para impartir a una planta resistencia al paraquat.

Tipo de fundamento

Las plantas se encuentran expuestas habitualmente a diversas tensiones ambientales que incluyen temperaturas
15 altas y bajas, sequía, elevada intensidad luminosa, salinidad, gases contaminantes, microbios patógenos y similares. Por lo tanto, si se pueden desarrollar plantas útiles que puedan crecer suficientemente incluso en dichas condiciones ambientales, por ejemplo, cultivos, la producción de alimentos será posible incluso en regiones en las que los cultivos y cosechas no puedan crecer habitualmente debido a las tensiones ambientales, y aumentará la posibilidad de prepararse para una crisis alimenticia grave que es previsible en el futuro. Como consecuencia de ello, la producción de plantas
20 que han adquirido resistencia a dichos tipos de tensiones ambientales está en camino a nivel global. Por ejemplo, se han fabricado plantas que poseían una resistencia al frío (Nature 356, 710-703, 1992; Plant Physiol., 105, 601-605, 1994), resistencia a la sequía (Plant Physiol., 107, 125-130, 1995; Nature, 379, 683-684, 1996; Nature Biotech., 17, 287-291, 1999), resistencia a la sal (Science, 259, 508-510, 1993; Biotechnology, 14, 177-180, 1996; Plant J., 12, 133-142, 1997), resistencia a los contaminantes del aire (Plant Cell Physiol., 34, 129-135, 1993; Biotechnology, 12, 165-168, 1994), resistencia a las enfermedades (Kagaku a Seibutsu (Chemistry and Organisms), 37, 295-305, 385-392, 1999) y similares mediante técnicas de recombinación genética. Además, ya se emplean algunas plantas a las que se
25 las ha dotado de resistencia a los productos químicos para la agricultura mediante técnicas de recombinación genética (Nature, 317, 741-744, 1985; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 391-395, 1988, EMBO J., 6, 2513-2518, 1987; EMBO J., 7, 1241-1248, 1988).

Estas tensiones ambientales están íntimamente relacionadas con la generación *in vivo* de especies de oxígeno activo (radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical oxidrilo (OH^-)). Las especies de oxígeno activo son generadas por la respiración, la fotosíntesis, las tensiones ambientales y similares, y crean daños fatales a las células por una oxidación excesiva de las proteínas, ácidos nucleicos, estructura de la membrana o similares. También se ha
30 informado que una planta resistente al oxígeno activo fabricada por técnicas de recombinación genética mostraba una gran resistencia a las tensiones ambientales anteriormente mencionadas (Plant Physiol., 111, 1177-1181, 1996; FEBS Letters, 428, 47-51, 1998).

Para fabricar una planta resistente al oxígeno activo, se emplea principalmente un método en el cual un gen de la
40 especie del oxígeno activo que barre enzimas (la superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, catalasa y glutatiónreductasa y otras) se introduce en la planta.

El Paraquat es un potente herbicida no selectivo que puede matar todas las plantas ya que genera oxígenos activos de forma continuada en los fotosistemas. Por consiguiente, la resistencia al Paraquat se puede utilizar como un indicador de la resistencia a los oxígenos activos, y se ha llevado a cabo un análisis respecto al mecanismo de la resistencia del paraquat en plantas (Pestic. Biochem. Physiol., 26, 22-28, 1986; Theor. Appl. Genet. 75, 850-856, 1988; and Plant
45 Physiol., 91, 1174-1178, 1989).

Mientras tanto, un gen supresor de la apoptosis (Publicaciones de Patentes JP (Kokai) No.10-309142; No.2000-23583; y No.2002-300822), un gen que codifica una proteína homóloga a la aldosa reductasa (Publicación de Patentes JP (Kohyo) No.2001-523466) y un gen que codifica una proteína unida al hierro (ferritina) (Publicación de Patentes JP (Kohyo) No.2001-519671) se han revelado como genes que pueden impartir resistencia al paraquat. Además, en las publicaciones de patentes JP (Kokai) no.2002-281979 y no.2001-95585, la peroxidasa derivada del callo resistente al paraquat se revela como un gen capaz de impartir resistencia al paraquat.
50

“Clon de *Arabidopsis thaliana* 122632 mRNA, secuencia completa”. XP002309600 extraído o recuperado del número de acceso de EBI EM_PRO:AY084949; Nr. de acceso de la base datos AY084949 y “cromosoma 4 de ADN de *Arabidopsis thaliana*, fragmento contiguo nr. 73” XP002309601 recuperado del EBI nr. de acceso EM_PRO:AL161577. El nr. de acceso de la base de datos AL161577 revela un gen que codifica la proteína que tiene la secuencia de aminoácido conforme a SEQ ID NO.2. Ambas secuencias de aminoácidos se derivan de la *Arabidopsis thaliana*.
60

La publicación de la patente coreana nr. 10-2001-0009592 muestra un gen resistente al paraquat así como su uso en un método de cribado de una planta transformada.
65

Se había creído que si se podía aislar un gen de resistencia al paraquat que pudiera impartir fuerte resistencia al paraquat, sería útil en el desarrollo de plantas con elevada resistencia a los oxígenos activos generados en varias clases de condiciones ambientales de estrés (temperaturas altas y bajas, sequía, elevada intensidad luminosa, salinidad, gases

contaminantes, microbios patógenos y similares). Sin embargo, recientemente se ha revelado que los oxígenos activos cumplen un papel importante como una molécula reguladora del crecimiento y de la respuesta al estrés de una planta. Por lo tanto, para evitar características que influyen mucho como el rendimiento del cultivo, es importante aumentar la resistencia de una planta a las tensiones como el paraquat sin afectar a su crecimiento y a los mecanismos del control fisiológico de una planta que depende de los oxígenos activos.

Resumen de la invención

Un objetivo de la presente invención consiste en explicar los métodos definidos en las reivindicaciones 1 y 2.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una fotografía de la electroforesis del cADN derivado de un gen transformante AtMVR.

La Fig. 2 es un diagrama esquemático que muestra la posición de un gen transformante AtMVR y un no transformante en las Figs. 2B y 2C. La Fig 2B es una fotografía que muestra el crecimiento de un gen transformante AtMVR y un no transformante en un medio de cultivo 1/2MS sin paraquat. La Fig. 2C es una fotografía que muestra el crecimiento de un gen transformante AtMVR y un no transformante en un medio de cultivo 1/2MS con paraquat.

Descripción detallada de las configuraciones preferidas

La presente invención se describirá con detalle a continuación.

El gen usado en los métodos conforme a la presente invención es un gen que codifica la proteína de la (a) ó (b) siguientes:

- (a) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:2 y
- (b) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, anulación o adición de 1 a 10 aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:2 y que imparte resistencia al paraquat.

El gen que codifica la proteína descrita en el anterior (a) es un gen (después, conocido como “gen de AtMVR”) que codifica una proteína que imparte resistencia al paraquat que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:2.

Los actuales inventores realizaban una búsqueda de bases de datos que tuvieran la secuencia completa de nucleótidos de la *Arabidopsis thaliana* (por ejemplo, GenBank, EMBL, DDBJ, tair: La fuente de información de la Arabidopsis) basada en la secuencia de nucleótidos del gen AtMVR y descubrieron que existen 13 genes homólogos al gen AtMVR (AtMVR 3-1 a AtMVR 3-13) presente en el genoma de *Arabidopsis thaliana*. La secuencia de nucleótidos de cada uno de estos genes homólogos del AtMVR y la supuesta secuencia de aminoácidos codificada por el gen homólogo relevante AtMVR son representadas por los números de la SEQ ID indicados en la tabla 1 siguiente. La tabla 1 enumera además los resultados del análisis de homología entre el gen de AtMVR y cada gen homólogo de AtMVR. El análisis de homología se realizaba usando BLAST P a nivel de aminoácidos. Los aminoácidos pueden clasificarse en base a las propiedades químicas de sus cadenas laterales. En la matriz de sustitución de aminoácidos BLOSUM62 (Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 10915-10919, 1992), los aminoácidos se clasifican en: un aminoácido con un grupo mercapto (C); los aminoácidos hidrofílicos que tienen peso molecular bajo (S, T, P, A, G); los aminoácidos ácidos (N, D, E, Q); los aminoácidos básicos (H, R, K); los aminoácidos hidrofóbicos que tienen pesos moleculares bajos (M, I, L, V); y los aminoácidos aromáticos (F, Y, W). En la tabla 1, el término “Identidades” se refiere a la correspondencia del 100% en términos de aminoácidos y el término “Positivos” se refiere al valor numérico cuando los aminoácidos que tienen una puntuación positiva en la matriz de sustitución de aminoácidos BLOSUM 62 se añaden a los que tienen una correspondencia del 100% (ver Bioinformatics (en japonés), Eds. Okazaki Y.&Bono H.(publicado por Medical Science Internacional).

TABLA 1

Nombre del gen homólogo del AtMVR	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos	Identidades (%)	Positivos(%)
AtMVR3-1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	57	70
AtMVR3-2	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7	55	69
AtMVR3-3	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	39	56
AtMVR3-4	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	39	55
AtMVR3-5	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:13	37	54
AtMVR3-6	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15	36	52
AtMVR3-7	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	34	52
AtMVR3-8	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19	34	51
AtMVR3-9	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21	37	58
AtMVR3-10	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	25	44
AtMVR3-11	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	33*	51*
AtMVR3-12	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27	25	41
AtMVR3-13	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:29	22	41
*La comparación con AtMVR3-11 muestra el resultado de homología para la comparación con una secuencia parcial de AtMVR3-11.				

Tal como se muestra en la tabla 1, la homología de AtMVR con los 13 genes homólogos de AtMVR oscilaba entre el 22 y el 57% para las identidades y entre el 41 y el 70% para los positivos. Se considera que estos genes homólogos AtMVR imparten resistencia al paraquat del mismo modo que el gen de AtMVR.

Adicionalmente, el gen de AtMVR tiene homología a una proteína asociada a la senescencia, DSA 5 (número de acceso al GenBank AF082030) (Plant Molecular Biology 40, 237-248, 1999). El resultado del análisis de homología usando BLAST X indicaba que la proteína codificada por el gen AtMVR tiene una identidad del 89% a nivel de aminoácido respecto a la proteína codificada por DSA 5. Se informa que el DSA 5 es un gen que se expresa con el envejecimiento del pétalo de la liliácea (cultivo híbrido de *Hemerocallis*) (Plant Molecular Biology 40, 237-248, 1999). Sin embargo, puesto que la proteína codificada por el DSA 5 no tiene homología con ninguna proteína conocida, se desconoce que funciones tiene la proteína. De acuerdo con ello, el gen de AtMVR es un gen nuevo que imparte resistencia al paraquat.

Tal como se utiliza aquí, el término “resistencia al paraquat” se refiere a tener resistencia al paraquat. Más específicamente, el término “planta resistente al paraquat” hace referencia a una planta que requiere una mayor cantidad de paraquat que una planta no resistente, con el fin de obtener un efecto determinado del paraquat. El paraquat es un herbicida potente y no selectivo que mata todas las plantas generando de forma continuada oxígenos activos en el sistema fotoquímico. Es posible confirmar si el gen de AtMRV es un gen resistente al paraquat que imparte resistencia al paraquat examinando si un gen transformante al que se ha introducido un gen puede crecer en presencia de paraquat.

El gen que codifica la proteína descrita en el apartado (b) anterior es un gen que codifica una proteína formada por una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, anulación o adición de 1 a 10 (ó 1 a 5) respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:2 y que imparte resistencia al paraquat.

Una vez se ha determinado la secuencia de nucleótidos del gen conforme a la presente invención, es posible entonces obtener el gen conforme a la presente invención por síntesis química, o por la reacción en cadena de la polimerasa (a continuación, conocida como "RCP"), que emplea como plantilla un clon que ha sido clonado, o bien realizando la hibridación que emplea un fragmento de ADN que tiene la secuencia de nucleótidos como una prueba. Además, es posible sintetizar un mutante del gen de acuerdo con la presente invención que tenga funciones equivalentes a las anteriores a la mutación por una técnica como la mutagénesis dirigida al lugar.

Los ejemplos del método para introducir una mutación en el gen conforme a la presente invención incluyen un método conocido como el método Kunkel o el método duplex a intervalos o un método de acuerdo con dichos métodos. Por ejemplo, se puede realizar la introducción de una mutación usando un equipo para introducir una mutación (por ejemplo, Mutant-K (fabricado por TAKARA, Inc.) o Mutant-G (fabricado por TAKARA, Inc.) utilizando la mutagénesis dirigida o usando el equipo de la Mutagénesis *in vitro* con la PCR, fabricado por TAKARA, Inc.

Una proteína que imparte resistencia al paraquat conforme a la presente invención es la proteína codificada por el gen conforme a la presente invención. Por ejemplo, el gen conforme a la presente invención integrará en un vector derivado del *Escherichia coli* o similares, y el *E. coli* es transformado luego con el vector recombinante obtenido. A continuación, la proteína conforme a la presente invención se podrá obtener extrayendo la proteína sintetizada en la *E. coli*.

Además, un vector recombinante conforme a la presente invención es un vector recombinante que comprende el gen conforme a la presente invención. El vector recombinante conforme a la presente invención se puede obtener insertando el gen conforme a la presente invención en un vector apropiado. Un vector usado para insertar el gen conforme a la presente invención no se encuentra especialmente limitado siempre que sea capaz de replicarse en un huésped, y ejemplos de ello incluyen un plásmido, un vector lanzadera, y un plásmido auxiliar. Además, cuando el vector propiamente no es capaz de replicarse, se puede usar un fragmento de ADN capaz de replicarse mediante un método como la inserción en el cromosoma de un huésped.

Ejemplos de ADN plasmídico incluyen un plásmido derivado de la *E. coli* (pB1221 y similares, por ejemplo, un sistema pET como el pET30b, el sistema pBR como el pBR322 y el pBR325, el sistema pUC como el pUC118, pUC119, pUC18 y pUC 19, pBluescript, y pB1221), un derivado plasmídico del *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pUB 110 y pTP5), un plásmido derivado del *Agrobacterium tumefaciens* (por ejemplo, el sistema pBI derivado del pBIN19, pBI101 ó pBI121), un plásmido derivado de levadura (por ejemplo, el sistema YE_p como el YE_p13 o el sistema YC_p como el YC_p50) o similares. Ejemplos de ADN fágicos incluyen el bacteriófago λ (Charon 4A, Charon 21A, EMBL3, EMBL4, λ gt10, λ gt11, λ ZAP y similares). Además, también se puede utilizar un vector de un virus animal como el retrovirus o el virus de la variolovacuna, un vector del virus de una planta como el virus del mosaico de la coliflor, o un vector de un virus de un insecto como un báculo virus.

Para insertar el gen conforme a la presente invención en un vector, se puede usar un método en el cual el cADN del gen conforme a la presente invención se parte inicialmente usando un enzima de restricción apropiado y luego se inserta en un lugar o punto del enzima de restricción o un lugar de multiclonaje de un vector de ADN apropiado y se liga al vector. Además, se puede usar un método en el cual una región homóloga se disponga respectivamente en una parte de un vector y el cADN del gen conforme a la presente invención, y el vector y el cADN se conecten por un método *in vitro* usando la RCP o algo similar o bien un método *in vivo* que use levadura o algo similar.

Un vector recombinante conforme a la presente invención puede incluir también un gen exógeno o un fragmento de ADN exógeno además del gen conforme a la presente invención. Un método para insertar un gen exógeno o un fragmento de ADN exógeno en un vector es el mismo que el método para insertar un fragmento de ADN conforme a la presente invención en un vector. Cualquier gen o fragmento de ADN puede ser utilizado como un gen exógeno o un fragmento de ADN exógeno. Por consiguiente, el gen conforme a la presente invención se puede utilizar como un gen marcador selectivo para indicar la resistencia al paraquat, por ejemplo, como con un gen de resistencia antibiótica para la canamicina o higromicina o similares.

Un transformante según la presente invención es un transformante que tiene el vector recombinante conforme a la presente invención. El transformante conforme a la presente invención se pueden obtener introduciendo el vector recombinante conforme a la presente invención en un huésped. Un huésped no está limitado mientras sea capaz de expresar el gen conforme a la presente invención, sin embargo se prefiere una planta. Cuando el huésped es una planta, es posible obtener una planta transgénica del modo anteriormente descrito.

Una "planta" que se transforma en la presente invención puede ser tanto: una planta entera, un órgano de una planta (por ejemplo, hoja, pétalo, tallo, raíz o semilla), tejido de planta (por ejemplo, epidermis, floema, parénquima o xilema) o bien una célula de cultivo de planta. Los ejemplos de plantas que se pueden usar en la transformación incluyen pero no se limitan a una planta perteneciente a la familia *Poaceae*, *Brassicaceae*, *Solanaceae* o *leguminosae* (ver a continuación).

Poaceae: Oryza sativa, Zea mays

Brassicaceae: Arabidopsis thaliana

5 *Solanaceae: Nicotiana tabacum*

Leguminosae: Glycine max

10 El vector recombinante conforme a la presente invención se puede introducir en una planta mediante un método de transformación convencional como, por ejemplo, el método de electroporación, método *Agrobacterium*, método de lanzamiento de partículas o método PEG.

15 Por ejemplo, cuando se utiliza el método de electroporación, el vector recombinante conforme a la presente invención se introducen en un huésped realizando el tratamiento que usa un aparato de electroporación equipado con un controlador del pulso en unas condiciones de voltaje de 500 a 1600 V, a 25 hasta 1000 pF, durante 20 a 30 mseg.

20 Cuando se utiliza el método del lanzamiento de partículas, toda la planta, un órgano de la planta o un tejido de la misma se pueden usar sin ningún tratamiento. Se puede preparar una sección y luego usarla o bien un protoplasto. La muestra preparada se puede tratar usando un dispositivo para la transferencia de genes (por ejemplo, PDS-1000/He fabricado por Bio-Rad Inc.). Aunque las condiciones de tratamiento pueden variar dependiendo de la planta o muestra utilizada, el tratamiento se realiza normalmente a una presión de aproximadamente 450 a 2000 psi y a una distancia de aproximadamente 3 a 12 cm.

25 Un método que usa el plásmido Ti o el plásmido Ri de *Agrobacterium* tiene la ventaja de una característica por la cual cuando una bacteria perteneciente al género *Agrobacterium* infecta una planta, una parte del ADN plasmídico que posee la bacteria es transferida al genoma de la planta. Por consiguiente, este método se puede utilizar para introducir el gen conforme a la presente invención en un huésped de planta. Entre las bacterias que pertenecen al género *Agrobacterium*, cuando el *Agrobacterium tumefaciens* infecta una planta, provoca la formación de un tumor
30 que se conoce como “agalla de la corona”. Además, cuando el *Agrobacterium rhizogenes* infecta una planta, incita la generación de una raíz capilar. Estas son causadas por una región que se conoce como “región del T-ADN (ADN transferida)” de un plásmido Ti ó plásmido Ri que es transferido a una planta en el momento de la infección para ser integrado en el genoma de la planta. De acuerdo con ello, el ADN que va a ser integrado en un genoma de planta se inserta por primera vez en la región del T-ADN de un plásmido Ti o plásmido Ri, y luego el ADN puede ser integrado
35 en el genoma de la planta infectando el huésped de la planta con una bacteria del género *Agrobacterium*.

Ejemplos del método para transformar una bacteria del género *Agrobacterium* en un huésped de planta incluyen el método de electroporación anteriormente descrito, el método de lanzamiento y el método PEG, así como un método *in planta*. Ejemplos del método *in planta* incluyen un método de inoculación directa del *Agrobacterium* y un método
40 de infiltración.

El tejido tumoral o brote, la raíz capilar o algo similar que se obtiene como resultado de la transformación se puede utilizar sin tratamiento alguno para el cultivo celular, el cultivo tisular o el cultivo de los órganos. Alternativamente, se puede regenerar en un cuerpo de planta por la administración de una hormona de planta (auxina, citoquinina,
45 giberelina, ácido abscísico, etileno, brasinólida o similares) de una concentración apropiada usando un método de cultivo del tejido de la planta convencional.

El gen conforme a la presente invención se puede introducir también en una planta utilizando un virus de planta como un vector. Ejemplos de virus de plantas que se pueden usar incluyen el virus del mosaico de la coliflor. En primer
50 lugar, se inserta el genoma vírico en un vector derivado de la *E. coli* o similar para producir un recombinante, y luego se introduce el gen conforme a la presente invención en el genoma vírico. El genoma vírico modificado de esta forma se separa posteriormente del recombinante usando un enzima de restricción, y el gen conforme a la presente invención se puede introducir luego en una planta huésped por inoculación del genoma vírico en la planta huésped.

55 Además de la introducción en una planta huésped tal como se ha descrito antes, el vector recombinante según la presente invención también se puede introducir en bacterias que pertenecen al género *Escherichia* como la *E. coli*, el género *Bacillus* como el *Bacillus subtilis*, o el género *Pseudomonas* como la *Pseudomonas putida*, así como levaduras como las *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, células animales como la célula COS o la célula CHO, y células de insectos como la Sf9. Cuando se utiliza una bacteria como la *E. coli* o una levadura o algo
60 similar como un huésped, es preferible que el vector recombinante conforme a la presente invención sea capaz de una replicación autónoma en la bacteria y ello comprende un promotor, una secuencia unida al ribosoma, una secuencia de terminación de la transcripción y el gen conforme a la presente invención. Puede implicar también un gen que regule el promotor.

65 El método para introducir el vector recombinante conforme a la presente invención en una bacteria no se encuentra limitado mientras que sea un método que pueda introducir ADN en una bacteria, y por ejemplo, puede mencionarse un método que utilice calcio o el método de electroporación.

El método para introducir el vector recombinante conforme a la presente invención en la levadura no se encuentra limitada mientras sea un método que pueda introducir ADN en la levadura, y por ejemplo se pueden mencionar el método de electroporación, el método de esferoplastos y el método del acetato de litio.

5 Cuando se utiliza una célula animal como huésped, se puede usar una célula de mono COS-7, Vero, célula de ovario de hámster chino, células L de ratón o similares. El método para introducir el vector recombinante conforme a la presente invención en una célula de animal no está especialmente limitado mientras se trate de un método que pueda introducir ADN en una célula animal, y por ejemplo, se pueda mencionar el método de electroporación, el método de fosfato de calcio y el método de lipofección.

10 Cuando se utiliza una célula de insecto como un huésped, se puede usar una célula de Sf9 o algo similar. El método para introducir el vector recombinante conforme a la presente invención en una célula de insecto no se encuentra limitado mientras pueda introducir ADN en una célula de insecto, y por ejemplo, se puedan mencionar el método del fosfato de calcio, el método de lipofección y el método de electroporación.

15 Es posible conformar si el gen conforme a la presente invención se ha integrado en un huésped mediante el uso del método de RCP, el método de hibridación meridional, el método de hibridación septentrional o similar. Por ejemplo, la RCP se puede realizar después de preparar el ADN del transformante y designando un cebador de ADN específico. A continuación, el producto de amplificación se somete a la electroforesis en gel de agarosa, a la electroforesis en gel de poliacrilamida o a la electroforesis capilar o algo similar, y el producto de la misma se colorea con bromuro de etidio, solución de verde SYBR o algo similar. Luego, si se ha producido o no transformación se puede confirmar mediante la detección del producto de amplificación como una banda única. También es posible detectar el producto de amplificación después de realizar la RCP usando un cebador que previamente se habrá marcado con un colorante fluorescente o algo similar. Además, se puede emplear un método en el cual el producto de amplificación se una a una fase sólida de una microplaca o algo similar para permitir la confirmación del producto de amplificación por la reacción enzimática o de fluorescencia.

20 Un cuerpo de una planta conforme a la presente invención es aquel que tiene un vector recombinante que comprende el gen conforme a la presente invención y que tiene resistencia al paraquat. Tal como se utiliza aquí, el término "cuerpo de la planta" se refiere a una planta entera transformada con un vector recombinante que comprende el gen conforme a la presente invención. El cuerpo de la planta conforme a la presente invención se puede obtener introduciendo el anterior vector recombinante en una célula de planta o algo similar y regenerando un cuerpo de planta transgénico de la célula de la planta transgénica obtenida. Como método de regeneración se puede emplear un método en el cual las células transformadas en forma de callo son transferidas a un medio de cultivo en el cual el tipo y la concentración de hormonas se han modificado y se han podido cultivar, y un embrión adventicio se ha podido crear para obtener un cuerpo de planta completo. Ejemplos del medio de cultivo que se utilizará incluyen un medio LS y un medio MS. La introducción de un vector recombinante en una célula de planta o similar se puede efectuar mediante un método similar al método anteriormente descrito.

30 En el cuerpo de la planta conforme a la presente invención, una proteína que imparte resistencia al paraquat que es codificada por el gen conforme a la presente invención se sobreexpresa por todo el cuerpo de la planta. Así el cuerpo de la planta conforme a la presente invención puede tener resistencia al paraquat.

35 Un método de cribado para las plantas transgénicas conforme a la presente invención es un método en el cual el vector recombinante conforme a la presente invención se introduce en las plantas y la resistencia al paraquat se utiliza como indicador para el cribado en plantas transgénicas. La transformación se puede verificar empleando el gen conforme a la presente invención como un marcador selectivo para indicar la resistencia al paraquat. Ejemplos del método de cribado incluyen un método en el cual las plantas transformadas por el vector recombinante conforme a la presente invención crecen en un medio que contiene paraquat y el cribado se realiza en base a las variaciones en la vida y en la muerte así como en el crecimiento de las plantas. La concentración de paraquat usada para el cribado puede variar dependiendo de las especies y del tamaño de las plantas. Sin embargo, si se utiliza, por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* como huésped, el paraquat puede estar presente en un medio en una concentración de preferiblemente 0,1 a 3,0 μM , más preferiblemente 1,0 a 3,0 μM , y más preferiblemente de 3,0 μM . Una planta no transgénica, es decir, una planta tipo salvaje, desarrolla clorosis y muere en un medio que contiene paraquat. En contraste con ello, una planta transformada con el vector recombinante conforme a la presente invención se mantiene verde incluso en un medio que contiene paraquat. Por consiguiente, es posible verificar una diferencia clara en el crecimiento en un medio que contiene paraquat entre una planta no transgénica y una planta transformada con el vector recombinante conforme a la presente invención.

40 Cuando se emplea resistencia a antibióticos, resistencia a herbicidas como un indicador, se pueden observar falsos positivos a nivel de cribado por la existencia de una diferencia en la sensibilidad en la planta. En contraste con ello, el paraquat es un herbicida no selectivo y potente que puede matar todas las plantas. Consecuentemente, en el método de cribado de plantas transgénicas conforme a la presente invención, no se observa una positividad falsa en la etapa de cribado. Además según el método de cribado de plantas transgénicas conforme a la presente invención, la resistencia se puede confirmar efectivamente en una etapa prematura del crecimiento.

Ejemplos

La presente invención se explicará con detalle a continuación en lo que se refiere a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no pretenden limitar el objetivo técnico de la invención.

Ejemplo 1

Aislamiento del gen de resistencia al paraquat

En este ejemplo, se utilizaban las líneas de T-ADN de Weigel adquiridas en Nottingham Arabidopsis Stock Center (<http://nasc.nott.ac.uk>) como líneas de referencia de activación de la *Arabidopsis thaliana*.

(1) Detección de individuos capaces de crecer en un medio que contiene paraquat usando líneas marcadas de activación de *Arabidopsis thaliana* (líneas de T-ADN Weigel)

Semillas de líneas de T-ADN de Weigel se inoculaban de forma estéril en un medio de cultivo de 1/2 MS agar (1%)(2,3 g/l de mezcla salina de Murashige and Shook Plant (fabricada por Wako Pure Chemical Industries Ltd), 1,5 mg de clorhidrato de tiamina, 2,5 mg de ácido nicotínico, 0,25 mg de clorhidrato de piridoxina, 1,5% de sacarosa, 1% de agar) que contienen 3 pM de paraquat (viológeno de metilo, fabricado por Sigma Chemical Co.) y se cultivaban a 22°C bajo la irradiación luminosa de 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (ciclo de un fotoperiodo de 16 h/periodo de oscuridad de 8 h). Aproximadamente 10 días después del cultivo, se detectaban e identificaban los individuos que crecían en el medio que contenía paraquat.

(2) Estimación de puntos de inserción de T-ADN de las líneas marcadas de activación detectadas por el método TAIL-PCR

Semillas de las líneas de T-ADN de Weigel de las cuales los individuos originados se plantaban en un crisol que contenía vermiculita (fabricada por Asahi Kagaku Kogyo Co., Ltd) y se dejaban crecer durante aproximadamente un mes a 23°C bajo una intensidad luminosa de 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ en unas condiciones de 16 h de fotoperiodo/8 h de oscuridad.

El genoma de ADN se preparaba a partir de las hojas de individuos cultivados usando el equipo DNeasy Plant Mini (fabricado por Qiagen), y se diseñaban tres tipos de cebadores específicos (TL1:SEQ ID NO:31; TL2:SEQ ID NO:32; TL3:SEQ ID NO:33) para una secuencia izquierda de T-ADN (borde izquierdo de T-ADN:SEQ ID NO:30) de un vector marcado de activación (pSK1015:GenBank acceso nr. AF187951) usado con las líneas de T-ADN de Weigel. El TAIL-PCR (Shokubutsu nr. PCRJikken Purotokoru (Protocolos de Experimentos con la RCP para plantas), (Eds. Shimamoto K.&Sasaki T.), New Edition, 2000, pp 83-89, Shujunsha CO., Ltd., Tokyo; Genomics, 25, 674-681, 1995; Plant J., 8, 457-463, 1995) se preparaba luego usando los cebadores específicos y un cebador aleatorio 1 (SEQ ID NO:34) y la mezcla de reacción de la RCP y las condiciones de reacción descritas a continuación para amplificar el ADN del genoma próximo al T-ADN. En la SEQ ID NO: 34, n representa a, g, c o t (lugar: 1 y 11), s representa g ó c (lugar:7) y w representa a ó t (lugar: 8 y 13).

La composición de la mezcla de reacción y las condiciones de la RCP para la primera vuelta RCP se enumeran en las tablas 2 y 3.

TABLA 2

Patrón (ADN del genoma)	10 ng
10x tampón de RCP (fabricado por TAKARA BIO Inc.):	2 μl
dNTPs 2,5 mM (fabricado por TAKARA BIO Inc.):	1,6 μl
Primer cebador específico (TL1: SEQ ID NO: 31):	3 pmol
Cebador aleatorio 1 (SEQ ID NO: 34):	80 pmol
AmpliTaQ (fabricado por Applied Biosystems):	0,8 unidades
Volumen total	20 μl

ES 2 301 908 T3

TABLA 3

#1: 94°C (1 min)/95°C(1 min)
#2: 94°C (1 min/65°C(1 min)/72°C(3 min) x 5 ciclos
#3: 94°C (1 min/25°C(3 min)→a 72°C a 3 min/72°C(3 min)x 1 ciclo
#4: 94°C (30 seg/68°C(1 min)/72°C(3 min)
94°C (30 seg/68°C(1 min)/72°C(3 min)
94°C (30 seg/44°C(1 min)/72°C(3 min)x 14 ciclos
#5: 72°C(5 min)

La composición de la mezcla de reacción y las condiciones de la RCP para la segunda vuelta se enumeran en las tablas 4 y 5.

TABLA 4

Patrón (dilución de 50 veces del producto de la primera vuelta de RCP):	1 µl
10x tampón de RCP:	2 µl
250 µM dNTPs:	1,6µl
Segundo cebador específico (TL2: SEQ ID NO: 32):	4 pmol
Cebador aleatorio 1 (SEQ ID NO: 34):	60 pmol
AmpliTaQ:	0,6 unidades
Volumen total	20 µl

TABLA 5

#6: 94°C (30 seg/64°C(1 min)/72°C(3 min)
94°C (30 seg/64°C(1 min)/72°C(3 min)
94°C (30 seg/44°C(1 min)/72°C(3 min)x 10 ciclos
#5: 72°C (5 min)

La composición de la mezcla de reacción y las condiciones de la RCP para la tercera vuelta se enumeran en las tablas 6 y 7.

ES 2 301 908 T3

TABLA 6

Patrón (dilución de 50 veces del producto de la segunda vuelta de RCP): 1 µl

5	10x tampón de RCP:	10µl
	250 µM dNTPs:	1 µl
10	Tercer cebador específico (TL3: SEQ ID NO: 33):	30 pmol
	Cebador aleatorio 1 (SEQ ID NO: 34):	300 pmol
15	AmpliTaQ:	3 unidades
20	Volumen total	100 µl

TABLA 7

#7: 94°C (1 min)/44°C(1 min)/72°C(3 min)x 20 ciclos

#5: 72°C (5 min)

Seguidamente, tras someter los productos de reacción de la segunda vuelta de RCP y de la tercera vuelta de RCP a electroforesis en gel de agarosa, se verificaba la presencia o ausencia de amplificación y la especificidad de los productos de reacción.

Además, usando el cebador específico TL3 (SEQ ID NO:33), el producto de amplificación de la tercera vuelta de la RCP se secuenciaba directamente usando el equipo de ABI PRISM Dye Terminador Cycle Sequencing (Applied Biosystems) y la secuencia de nucleótidos se determinaba luego usando el analizador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Como resultado, se obtenía información de la secuencia 278-bp (SEQ ID NO: 35). En la SEQ ID NO: 35, n representa a, g, c ó t (lugar: 13, 35, 73, 108, 156, 190, 198 y 201). Se realizaba una búsqueda de la secuencia obtenida con las bases de datos que tienen la secuencia de nucleótidos completa de *Arabidopsis thaliana*, y se averiguaba que el punto de inserción se localiza en 77240 bp del clon BAC F17123.

(3) Aislamiento del cADN del gen de resistencia al paraquat

Se plantaban semillas de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0)) en un crisol que contiene vermiculita (Asahi Kagaku Kogyo Co.,Ltd) y se dejaba que crecieran durante aproximadamente un mes a 23°C bajo una intensidad de luz de 100 µE/m²/s en unas condiciones de un fotoperiodo de 16 horas y un periodo de oscuridad de 8 horas.

Tras el crecimiento, las hojas de los individuos se congelaban usando nitrógeno líquido. Posteriormente, todo el ARN se extraía usando el equipo RNeasy Plant Mini (fabricado por QIAGEN). Luego, el cADN se sintetizaba a partir de ARN total extraído usando el equipo Prestar First Strand RT-PCR (fabricado por STRATAGEN).

En base a la secuencia de un supuesto gen de marco de lectura abierto presente en un 10 kb adyacente de un gen estructural que tiene la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:35) obtenida en el (2) anterior, se diseñaban un cebador 141 dF(SEQ ID NO:36) y un cebador 141 dR(SEQ ID NO:37) para el supuesto gen estructural, y la RCP se realizaba luego usando estos cebadores y la siguiente mezcla de reacción (tabla 8) que contiene Takara EX-Taq (fabricado por TAKARA BIO Inc.) empleando el cADN anteriormente sintetizado como un patrón.

ES 2 301 908 T3

TABLA 8

	Patrón (cADN) :	50 ng
5	10xtampón Ex Taq (TAKARA BIO Inc.) :	2 µl
	dNTPs :	200 µM
10	Takara EX-Taq :	1 unidad
15	Volumen total	20 µl

Treinta ciclos de 94°C(30 seg)/55°C(30 seg)/72°C(60 seg) se empleaban como condiciones de la reacción.

El producto de amplificación se clonaba en el vector pGEM-T Easy (fabricado por Promega) y la secuencia de nucleótidos se determinaba luego usando el analizador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Como resultado de ello, se obtenía un fragmento de cADN de 857 bp (SEQ ID NO:1). Este fragmento de cADN se designaba gen AtMVR, y el vector pGEM-T Easy que contiene AtMVR se conocía como pAtMVR. La secuencia de aminoácidos codificada por el gen AtMVR se muestra en SEQ ID NO: 2.

Ejemplo 2

Búsqueda del gen homólogo al AtMVR con respecto al gen AtMVR

La búsqueda se realizaba con las bases de datos que tienen la secuencia de nucleótidos íntegra de *Arabidopsis thaliana* en base a la secuencia de nucleótidos del gen AtMVR y se observaba que además de la secuencia de nucleótidos del gen AtMVR existen 13 genes homólogos de AtMVR en el genoma de *Arabidopsis thaliana*.

Los respectivos genes homólogos de AtMVR se conocían como AtMVR3-1 a AtMVR3-13. La secuencia de nucleótidos de cada uno de los genes homólogos AtMVR y la supuesta secuencia aminoácido codificada por el gen homólogo relevante AtMVR se muestran en las SEQ ID enumeradas en la tabla 9 siguiente. La tabla 9 también menciona los resultados del análisis de homología entre el gen AtMVR y cada uno de los genes homólogos AtMVR. El análisis de homología se realizaba utilizando BLAST P a nivel aminoácido. El término "Identidades" se refiere a una correspondencia del 100% en los términos de los aminoácidos. Los aminoácidos se pueden clasificar en base a las propiedades químicas de sus cadenas laterales. En la matriz de sustitución del aminoácido BLOSUM62, los aminoácidos se clasifican en: un aminoácido con un grupo mercapto ©; aminoácidos hidrofílicos que tienen pesos moleculares bajos (S,T,P,A,G); aminoácidos acídicos (N,D,E,Q); aminoácidos básicos (H,R,K); aminoácidos hidrofóbicos que tienen pesos moleculares bajos (M,I,L,V); y aminoácidos aromáticos (F,Y,W). En la tabla 9, el término "identidades" se refiere a la correspondencia del 100% en términos de aminoácidos y el término "Positivos" se refiere al valor numérico cuando los aminoácidos que tienen una puntuación positiva en la matriz de sustitución del aminoácido BLOSUM 62 se añaden a los que tienen una correspondencia del 100%.

TABLA 9

50	Nombre del gen homólogo	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos	Identidades (%)	Positivos (%)
55	AtMVR				
	AtMVR3-1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	57	70
60	AtMVR3-2	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7	55	69
	AtMVR3-3	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	39	56
65	AtMVR3-4	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	39	55
	AtMVR3-5	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:13	37	54

ES 2 301 908 T3

AtMVR3-6	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15	36	52
AtMVR3-7	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	34	52
AtMVR3-8	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19	34	51
AtMVR3-9	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21	37	58
AtMVR3-10	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	25	44
AtMVR3-11	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	33*	51*
AtMVR3-12	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27	25	41
AtMVR3-13	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:29	22	41
*La comparación con AtMVR3-11 muestra el resultado de la comparación de homología con una secuencia parcial de AtMVR3-11.				

Tal como se muestra en la tabla 9, la homología entre AtMVR y los 13 genes homólogos de AtMVR oscilaba entre el 22 y el 57% para las identidades y entre el 41 y el 70% para los positivos.

Ejemplo 3

Construcción de un vector de expresión de AtMVR para la planta y producción de una planta transgénica de AtMVR

Las técnicas de transformación aquí aplicadas coincidían con un sistema de vectores descrito por Pellegrinescu y cols. (Biochemical Society Transactions 23, 247-250, 1995) basado en el sistema de transporte de genes de *Agrobacterium* mencionado por Hinchey y cols. (Plant Cell y Tissue Culture, pp.231-270, Eds. I.K. Vasil, T.A Thorpe, Kluwer Academic Publisher, 1994).

(1) Construcción de un vector de expresión AtMVR para plantas

La secuencia del gen AtMVR se dividía a partir del pAtMVR usando SacI/SacII y se subclonaba en pBlue/Script (STRATAGENE). Posteriormente, un fragmento que contiene la secuencia del gen AtMVR se escindía con XbaI/SacI y se introducía en el lugar XbaI/SacI que está presente corriente abajo del promotor CaMV 35S de pBI121 (fabricado por Clontech). El vector resultante se usaba a continuación como un vector de expresión de AtMVR para plantas.

(2) Producción de la planta transgénica AtMVR

El vector de expresión AtMVR para plantas fabricadas en el apartado (1) se introducía en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* por el método de electroporación (Plant Molecular Biology Manual, Segunda Edición, B.G. Stanton, A.S. Robbert, Kluwer Academia Publishers, 1994). Posteriormente, el *Agrobacterium tumefaciens* que tiene el vector de expresión AtMVR para la planta introducida en el mismo se introducía en una *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 tipo natural o de referencia, mediante un método de infiltración descrito por Clough y cols. (The Plant Journal 16:735-743, 1998).

Los transformantes se detectaban en un medio que contiene canamicina, y se fabricaba una planta de generación T3 (línea homocigótica que tiene 1 gen AtMVR introducido) por autopolinización.

Seguidamente, se analizaba la cantidad de gen AtMVR expresada introducida. Las semillas de transformante producidas tal como se han descrito y una no transformante se plantaban, respectivamente, en crisoles que contenían vermiculita (Asahi Kagaku Kogyo Co., Ltd) y se dejaba que crecieran durante aproximadamente un mes bajo una intensidad luminosa de 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ a 23°C con un fotoperiodo de 16 horas/un periodo de oscuridad de 8 horas.

Tras el crecimiento, se extraía el ARN total del transformante y de la *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 no transformante tipo natural o de referencia usando el equipo RNeasy Plant Mini (QIAGEN). Luego, 1 μg de ARN se sometía a una transcripción invertida usando el equipo ProSTAR First Strand RT-PCR (STRATAGENE). La RCP se llevaba a cabo luego usando la mezcla de reacción siguiente (tabla 10) que contiene Takara EXTaQ (TAKARA BIO) empleando 1/50 volúmenes del cADN sintetizado como un patrón y usando cebadores para el gen AtMVR (cebador 14Idl (SEQ ID NO: 38) y cebador 14Id2 (SEQ ID NO: 39)).

ES 2 301 908 T3

TABLA 10

Mezcla de reacción de la RCP:

Patrón (cADN):	50 ng
10x tampón Ex Taq (TAKARA BIO Inc.):	2 µl
dNTPs:	200 µM
Cada cebador:	0,2 µM
Takara EX-Taq:	1 unidad
Volumen total	20 µl

Treinta ciclos de 94°C(30 seg)/55°C (30 seg)/72°C(60 seg) se empleaban como condiciones de la reacción.

Los productos de amplificación se sometían a electroforesis en gel de agarosa. La figura 1 muestra los resultados de la electroforesis. Como se puede ver en la figura 1, en comparación con el no transformante, el transformante producido sobreexpresaba el gen AtMVR.

Ejemplo 4

Evaluación de la resistencia al paraquat del gen transformante AtMVR

Las semillas derivadas del gen transformante AtMVR fabricado y del no transformante (*Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 tipo de referencia o natural) se inoculaban de forma estéril en un medio de 1/2 MS agar (1%) (2,3 g/l de Murashige y Skoog Plant Salt Mixture (Wako Pure Chemical Industries Ltd.), 1,5 mg/l de clorhidrato de tiamina, 2,5 mg/l de ácido nicotínico, 0,25 mg/l de clorhidrato de piridoxina, 1,5% de sacarosa) que contienen 3 µM de paraquat (viológeno de metilo (Sigma Chemical CO.)), y se cultivaban durante ocho días a 22°C bajo una irradiación luminosa de 60 µmol/m²/s (ciclo de fotoperiodo de 16 horas/periodo de oscuridad de 8 horas). Tras el cultivo, se evaluaba el crecimiento de los individuos germinados. Los resultados se muestran en la figura 2, donde la figura 2B es una fotografía que muestra el crecimiento de un gen transformante de AtMVR y un no transformante en un medio de cultivo 1/2 MS sin paraquat, y la figura 2C es una fotografía que muestra el crecimiento de un gen transformante AtMVR y un no transformante en un medio de cultivo 1/2MS con paraquat. La figura 2A es un diagrama esquemático que muestra la posición del gen transformante AtMVR y la del no transformante en las figuras 2B y 2C.

Como se puede ver en la figura 2B, los resultados indicaban que en el medio de cultivo sin paraquat, el gen transformante AtMVR exhibía el mismo crecimiento que el no transformante. Entretanto, como se puede ver en la figura 2C, en un medio que contiene paraquat el no transformante desarrollaba clorosis y moría, es decir, el crecimiento se veía inhibido de forma notable, mientras que en contraste con ello, la plántula del gen transformante AtMVR era capaz de crecer. Por consiguiente, se confirmaba que en un medio sin paraquat, el gen transformante AtMVR exhibía el mismo crecimiento que un no transformante, independientemente de la expresión del gen AtMVR, y también que en un medio con paraquat, el gen transformante AtMVR tenía claramente mayor resistencia al paraquat que el no transformante.

Texto libre para el listado de secuencias

SEQ ID NOS: 31 a 39 son cebadores

En la SEQ ID NO: 34, n representa a, g, c ó t (lugar: 1 y 11), s representa g ó c (lugar: 7), y w representa a ó t (lugar: 8 y 13).

En la SEQ ID NO:35, n representa a, g, c, ó t (lugar: 13, 35, 73, 108, 156, 190, 198 y 201).

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención se aportan los métodos definidos en las reivindicaciones 1 y 2, respectivamente. Un gen de resistencia al paraquat en los métodos conforme a la presente invención es capaz de impartir resistencia que es específica al paraquat sin influir en la regulación del crecimiento que es sometida al control por la generación de oxígenos activos en diversos entornos.

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para el cribado o detección de una planta transgénica, que comprende introducir un ácido nucleico que codifica una proteína del siguiente (a) ó (b) y un gen exógeno o un fragmento de ADN exógeno en una planta y cribado de una planta transgénica en base a la resistencia al paraquat como un indicador:

(a) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:2 y

10 (b) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, cancelación o adición de 1 a 10 aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos tal como se describe en (a) e imparte resistencia al paraquat.

15 2. Un método para impartir resistencia al paraquat a una planta, que comprende introducir un vector recombinante que consta de un ácido nucleico que codifica una proteína de (a) o (b) siguientes en una planta e imparte resistencia al paraquat a la planta:

(a) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:2 y

20 (b) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, cancelación o adición de 1 a 10 aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos tal como se describe en (a) e imparte resistencia al paraquat.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

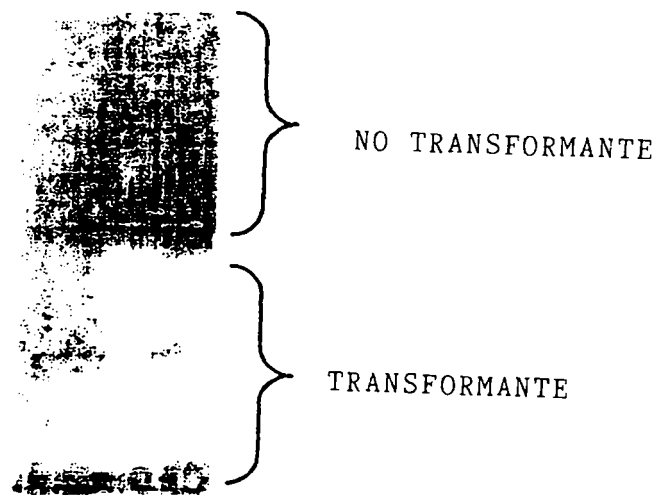
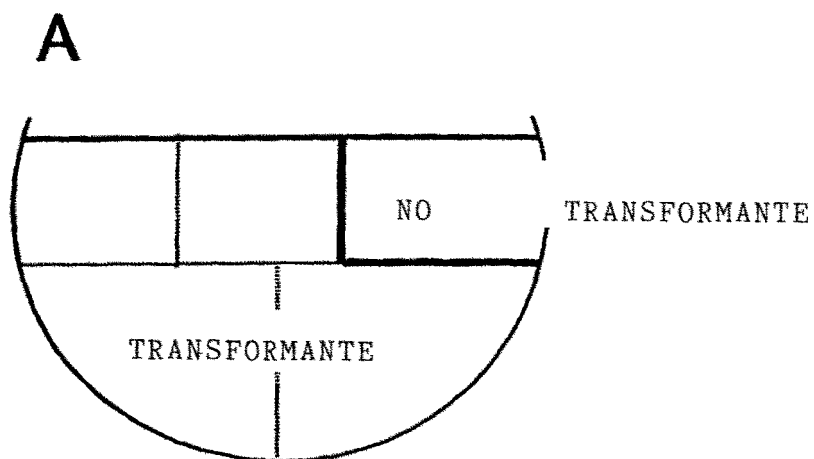


FIG. 2



ES 2 301 908 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> TOYOTA MOTOR CORPORATION
OKAYAMA PREFECTURE

<120> A PARAQUAT RESISTANCE GENE AND A VASCULAR TISSUE-AND TRICHOME-SPECIFIC PRO-
MOTER

<130> PH-2160

<140>

<141>

<150> JP 2003-322051

<151> 2003-09-12

<160> 41

<170> PatentIn Ver. 2. 1

<210> 1

<211> 855

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 1

```
ctcttcaat catcaccatg gtacgttita gtaacagtct ttaggaata ctcaacttct 60
tcgtcttctt tctctcggtt cccatactct caaccggaat ctggctcagc cttaaagcca 120
cgacgcaatg cgagagattc ctgcacaaac ccatgatcgc tctcggtgtt ttcctcalga 180
taatcgcaat cgctggagtc gttagatctt gttagcagat gacgtggctt ctctggctct 240
atctctttgt gatgttctt ttaatcctca tctctctctg ttaccacatc ttgctcttcg 300
ttgtcactag taaaggctcc ggcgaaacta tccaaggaaa agcttataag gattatagc 360
tcgaggctta ctctgatgg ttgcagagtc gtgtgaacaa cgctaagcat tgaacagca 420
ttagaagctg tctttatgag agcaagttct gttataactt ggagttagtc actgctaalc 480
acactgtttc tgatttctac aaagaagatc tcatgcttt tgagcttggt tgcctgaagc 540
ccctaatga ctgtgacttc acctacataa cttcaacaac ttggaataaa acatcaggaa 600
cacataaaaa ctcatgtgc caactttggg acaacgaaaa gcataagctt tgcataaatt 660
gcaaagcctg caaggccgtt tttctcgaca acctcaagtc cgcatggaaa agagttgcta 720
ttgtcaacat catttccctt gtactcctcg ttgtcgtcta cgctatggga tgttgcgctt 780
tccgaacaa caaagaagat agatatggcc gtccaatgg ttcaacaat tcttgatttg 840
cgccggttca agcta 855
```

ES 2 301 908 T3

<210> 2

<211> 272

<212> PRT

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 2

10	Met Val Arg Phe Ser Asn Ser Leu Val Gly Ile Leu Asn Phe Phe Val
	1 5 10 15
15	Phe Leu Leu Ser Val Pro Ile Leu Ser Thr Gly Ile Trp Leu Ser Leu
	20 25 30
20	Lys Ala Thr Thr Gln Cys Glu Arg Phe Leu Asp Lys Pro Met Ile Ala
	35 40 45
25	Leu Gly Val Phe Leu Met Ile Ile Ala Ile Ala Gly Val Val Gly Ser
	50 55 60
30	Cys Cys Arg Val Thr Trp Leu Leu Trp Ser Tyr Leu Phe Val Met Phe
	65 70 75 80
35	Phe Leu Ile Leu Ile Val Leu Cys Phe Thr Ile Phe Ala Phe Val Val
	85 90 95
40	Thr Ser Lys Gly Ser Gly Glu Thr Ile Gln Gly Lys Ala Tyr Lys Glu
	100 105 110
45	Tyr Arg Leu Glu Ala Tyr Ser Asp Trp Leu Gln Arg Arg Val Asn Asn
	115 120 125
50	Ala Lys His Trp Asn Ser Ile Arg Ser Cys Leu Tyr Glu Ser Lys Phe
	130 135 140
55	Cys Tyr Asn Leu Glu Leu Val Thr Ala Asn His Thr Val Ser Asp Phe
	145 150 155 160
60	Tyr Lys Glu Asp Leu Thr Ala Phe Glu Ser Gly Cys Cys Lys Pro Ser
	165 170 175
65	Asn Asp Cys Asp Phe Thr Tyr Ile Thr Ser Thr Thr Trp Asn Lys Thr
	180 185 190
70	Ser Gly Thr His Lys Asn Ser Asp Cys Gln Leu Trp Asp Asn Glu Lys
	195 200 205
75	His Lys Leu Cys Tyr Asn Cys Lys Ala Cys Lys Ala Gly Phe Leu Asp
	210 215 220

ES 2 301 908 T3

Asn Leu Lys Ala Ala Trp Lys Arg Val Ala Ile Val Asn Ile Ile Phe

225 230 235 240

Leu Val Leu Leu Val Val Val Tyr Ala Met Gly Cys Cys Ala Phe Arg

245 250 255

Asn Asn Lys Glu Asp Arg Tyr Gly Arg Ser Asn Gly Phe Asn Asn Ser

260 265 270

<210> 4

<211> 822

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 4

atggctcggt gtagcaaca lctcgtaggg atactcaatt tccatgatt tcttctctcg 60

atcccaatct tagctgggg aatctggcta agccaaaaag ggtaacaga gtgtgaaaga 120

ttcctagaca aaccagtgat tgccttgggt gtttcccta tgggtgtagc aatagctggt 180

ctaataagggt catgttgtag agtcacatgg ctctttggg tttatctctt tgcattgttc 240

cttttgattc tcttgtgtt ctgtataaca gttttgcct ttgttgttac taacaaagga 300

gctgggtgaag ctattgaagg aaaagggtat aaagagtata aacttgggtga ttactctact 360

tgggttacaga aacgtgttga gaatggtaaa aattggaata agattaggag ttgtcttgtg 420

gagagcaaag ttgtttctaa gcttgaagcc aagtttgtta atgttccgtt caatagtttc 480

tacaaggaac atcttactgc tcttcagctt ggttgcgtga aaccttcaga tgaatgttgt 540

ttcgagtacg taaaccaaac aacctggacc aagaacacaa cggaacaca cactaatcca 600

gactgccaaa cctgggacaa cgcaaaagaa aagctctgct tcgattgtca atcttgttaa 660

gcgggtctac tcgacaacgt caaaagcgct tggaagaaag ttgcaatcgt taacatcgtc 720

ttccttgtct tctcatcat tgtctactct gtgggttgtt gtgctttcag gaacaacaag 780

agggatgaca gtaattcccg tacttacgga tataagcctt ga 822

<210> 5

<211> 272

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

ES 2 301 908 T3

<400> 5

	Met	Ala	Arg	Cys	Ser	Asn	Asn	Leu	Val	Gly	Ile	Leu	Asn	Phe	Leu	Val
5	1				5					10					15	
	Phe	Leu	Leu	Ser	Ile	Pro	Ile	Leu	Ala	Gly	Gly	Ile	Trp	Leu	Ser	Gln
10				20						25					30	
	Lys	Gly	Ser	Thr	Glu	Cys	Glu	Arg	Phe	Leu	Asp	Lys	Pro	Val	Ile	Ala
15				35				40							45	
	Leu	Gly	Val	Phe	Leu	Met	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Gly	Leu	Ile	Gly	Ser
20			50					55					60			
	Cys	Cys	Arg	Val	Thr	Trp	Leu	Leu	Trp	Val	Tyr	Leu	Phe	Val	Met	Phe
25		65				70					75				80	
	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Val	Phe	Cys	Ile	Thr	Val	Phe	Ala	Phe	Val	Val
30					85					90					95	
	Thr	Asn	Lys	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Ile	Glu	Gly	Lys	Gly	Tyr	Lys	Glu
35				100						105					110	
	Tyr	Lys	Leu	Gly	Asp	Tyr	Ser	Thr	Leu	Gln	Lys	Arg	Val	Glu	Asn	Gly
40			115					120						125		
	Lys	Asn	Trp	Asn	Lys	Ile	Arg	Ser	Cys	Leu	Val	Glu	Ser	Lys	Val	Cys
45			130				135							140		
	Ser	Lys	Leu	Glu	Ala	Lys	Phe	Val	Asn	Val	Pro	Val	Asn	Ser	Phe	Tyr
50		145				150				155					160	
	Lys	Glu	His	Leu	Thr	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Cys	Cys	Lys	Pro	Ser	Asp
55				165					170						175	
	Glu	Cys	Gly	Phe	Glu	Tyr	Val	Asn	Pro	Thr	Thr	Trp	Thr	Lys	Asn	Thr
60				180					185					190		
	Thr	Gly	Thr	His	Thr	Asn	Pro	Asp	Cys	Gln	Thr	Trp	Asp	Asn	Ala	Lys
65			195				200						205			
	Glu	Lys	Leu	Cys	Phe	Asp	Cys	Gln	Ser	Cys	Lys	Ala	Gly	Leu	Leu	Asp
		210					215							220		

ES 2 301 908 T3

Asn Val Lys Ser Ala Trp Lys Lys Val Ala Ile Val Asn Ile Val Phe
225 230 235 240

Leu Val Phe Leu Ile Ile Val Tyr Ser Val Gly Cys Cys Ala Phe Arg
245 250 255

Asn Asn Lys Arg Asp Asp Ser Tyr Ser Arg Thr Tyr Gly Tyr Lys Pro
260 265 270

<210> 6

<211> 792

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 6

atggttcagt gtagcaacaa tctctcggga atcctcaatt tcttcacatt cctcctctca 60
atcccaattc tctccgccgg gatctggctc ggcaaaaatg cagcaaccga atgcgaacgt 120
tictctgaca aaccaatggg cgtactcgga atcttctca tgttcgtctc aatcgccgga 180
ctcgtcgggtg ctgttgccg tgtctcttgc ctctcttggc ttacctctt cgctatgttc 240
ctctcattc tctcgggtt ctgttcaca atcttcgtt tgcagtcac aaaccgcggc 300
gccggtgagg ttatatcgga tgcagggtat aaagagtatc atgtcgccga ttactctaata 360
tggttgcaga aacgtgtcaa caatgctaag aattgggaac ggaicaggag ttgtttgatg 420
tactctgacg ttgtctccac ttatcgtact cgttatgcca gcattaacgt tgaagatttc 480
tacaaatcia atcttaatgc tcttcagtct ggttgttgtt agccgtccaa tgactgtaac 540
ttcacctatg tgaacccgac tacttggaca aagactcctg gtccatacaa aaacgaggac 600

tgtaatgtgt gggacaacaa accaggaact ctctgctacg actgtgaagc ctgcaaggct 660
ggtctgcttg acaacatcaa gaactcatgg aaaaaggtag ctaagggtcaa cattgtcttc 720
ctcataatcc tcattatcgt ctactctgtt ggttgttgtt cgltcaggaa caacaggaaa 780
cgcagttggt aa 792

ES 2 301 908 T3

<210> 7

<211> 263

<212> PRT

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 7

```

10      Met Val Gln Cys Ser Asn Asn Leu Leu Gly Ile Leu Asn Phe Phe Thr
        1           5           10           15

15      Phe Leu Leu Ser Ile Pro Ile Leu Ser Ala Gly Ile Trp Leu Gly Lys
        20           25           30

25      Asn Ala Ala Thr Glu Cys Glu Arg Phe Leu Asp Lys Pro Met Val Val
        35           40           45

30      Leu Gly Ile Phe Leu Met Phe Val Ser Ile Ala Gly Leu Val Gly Ala
        50           55           60

35      Cys Cys Arg Val Ser Cys Leu Leu Trp Leu Tyr Leu Phe Ala Met Phe
        65           70           75           80

45      Leu Leu Ile Leu Leu Gly Phe Cys Phe Thr Ile Phe Ala Phe Ala Val
        85           90           95

```

ES 2 301 908 T3

Thr Asn Arg Gly Ala Gly Glu Val Ile Ser Asp Arg Gly Tyr Lys Glu

100

105

110

5

Tyr His Val Ala Asp Tyr Ser Asn Trp Leu Gln Lys Arg Val Asn Asn

115

120

125

10

Ala Lys Asn Trp Glu Arg Ile Arg Ser Cys Leu Met Tyr Ser Asp Val

130

135

140

15

Cys Ser Thr Tyr Arg Thr Arg Tyr Ala Ser Ile Asn Val Glu Asp Phe

145

150

155

160

20

Tyr Lys Ser Asn Leu Asn Ala Leu Gln Ser Gly Cys Cys Lys Pro Ser

165

170

175

25

Asn Asp Cys Asn Phe Thr Tyr Val Asn Pro Thr Thr Trp Thr Lys Thr

180

185

190

35

Pro Gly Pro Tyr Lys Asn Glu Asp Cys Asn Val Trp Asp Asn Lys Pro

195

200

205

40

Gly Thr Leu Cys Tyr Asp Cys Glu Ala Cys Lys Ala Gly Leu Leu Asp

210

215

220

45

Asn Ile Lys Asn Ser Trp Lys Lys Val Ala Lys Val Asn Ile Val Phe

225

230

235

240

50

Leu Ile Phe Leu Ile Ile Val Tyr Ser Val Gly Cys Cys Ala Phe Arg

245

250

255

55

Asn Asn Arg Lys Arg Ser Trp

260

60

65

ES 2 301 908 T3

<210> 8

<211> 984

<212> DNA

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 8

```

10      atgagatcga gaagtaacct tataggctc ataaacttct tcactttcct cctgtcgatt 60
      cctatcctcg gcggtggaat atggccttagc agccgagcta acitcaaccga ttgcctcaga 120
15      ttccctccagt ggccactcat tatcatcgga atatcaatca tggtcataatc tttagccgga 180
      atcgccggag cttgtttacca aaacaagttc ctcattgtggc ttacctttt caccatgttc 240
20      ttgttaatcg ctgctcttat aggattcaca atcttcgctt acgtagttag tgataaaggc 300
      tcaggccggt ttgtgatgaa ccgtcgggat ctgtattatt atctcaatga ttattccggt 360
      tggttaaagg accgtgtcac agataatgga tatggagag atatcggatc gtgtgttaga 420
25      gattctggag ttgttaagaa gattggaaga gatttaaatg gtgttccaga aactgtctcat 480
      atgttttact tcagaaatct ttctcctgtt gattccggat gttgcaagcc gccaacagat 540
30      tgtggctata cgtacgtgaa cgagacagtg tggattccgg gaggagaaat ggtgggaccg 600
      aaccggact gtatgtttgt gaacaatgac cagagactac tctgtttacca atgcagctct 660
35      tgtaaagccg gtgttcttgg tagcttgaaa aagagttaga gaaaagctc ggtgatcaac 720
      atcgtggttg tgatcatact tgttatcttc tatgtcatcg cgtgtcggc ttaccagaat 780
40      gttaaagagga tgtataatga cgaaccggtc ggtgaggcta ggtgaccaa tctcatccta 840
      gtcattttca aatttaagga gattttggtc cagttttctc tcggaattgt gtttttatta 900
45      ctttttaatg gtttaatggt ctgttgttgt aatgataaat ttgcttttag tgttttcttc 960
      ttggatatg ttacatatgc atga                                     984

```

50 <210> 9

<211> 327

<212> PRT

55 <213> *Arabidopsis thaliana*

60

65

ES 2 301 908 T3

<400> 9

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

ES 2 301 908 T3

	130	135	140	
5	Cys Lys Lys Ile Gly Arg Asp Leu Asn Gly Val Pro Glu Thr Ala His			
	145	150	155	160
10	Met Phe Tyr Phe Arg Asn Leu Ser Pro Val Glu Ser Gly Cys Cys Lys			
15		165	170	175
20	Pro Pro Thr Asp Cys Gly Tyr Thr Tyr Val Asn Glu Thr Val Trp Ile			
	180	185	190	
25	Pro Gly Gly Glu Met Val Gly Pro Asn Pro Asp Cys Met Leu Trp Asn			
	195	200	205	
30	Asn Asp Gln Arg Leu Leu Cys Tyr Gln Cys Ser Ser Cys Lys Ala Gly			
	210	215	220	
35	Val Leu Gly Ser Leu Lys Lys Ser Trp Arg Lys Val Ser Val Ile Asn			
40	225	230	235	240
45	Ile Val Val Val Ile Ile Leu Val Ile Phe Tyr Val Ile Ala Cys Ala			
	245	250	255	
50	Ala Tyr Gln Asn Val Lys Arg Met Tyr Asn Asp Glu Pro Val Gly Glu			
	260	265	270	
55	Ala Arg Met Thr Asn Leu Ile Leu Val Ile Phe Lys Phe Lys Glu Ile			
	275	280	285	
60	Leu Val Gln Phe Phe Phe Gly Ile Val Phe Leu Leu Leu Phe Asn Gly			
65				

ES 2 301 908 T3

290

295

300

5

Leu Met Val Cys Cys Cys Asn Asp Lys Phe Ala Phe Ser Val Phe Phe

10

305

310

315

320

15

Phe Gly Tyr Val Thr Tyr Ala

325

<210> 10

20 <211> 858

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

25 <400> 10

atgagaacaa gcaaccatct cataggttta gtcaacttcc tcactttcct cctctcaata 60
 ccaatcctcg gcggtggaat atggttaagc agccgagcta actccaccga ctgtttaaga 120
 ttccittcaat ggcctctcat cgtcatcgga atctcaatca tggtcgtatc tttagctigga 180
 ttcgctggag ctgtttaccg taacaagttc cttatgtggc tatacctagt agtcatgctt 240
 ctcatcatcg ctgctcttat cggtttcatc atcttcgctt acgcggttac agataaagga 300
 tccggtcgaa ccgtacttaa ccggggttat ctgtactatt atcttgaaga ttactctggg 360
 tggltgaaag atcgagtttc tgatgatagc tattggggta aaattagttc ttgtcttaga 420
 gattctggtg ctgttagaaa gattggaaga aattttaatg gtgtacctga aactgctgat 480
 atgttcttcc ttagaagact tagccctggt gagtccggtt gtigcaagcc accaacagat 540
 tgcggttttt catagtgaa tgagaccgga tgggacacga gaggagggat gataggaccg 600
 aaccaggact gtatggtgtg gagcaacgac cagagcatgc tctgttatca gtgtagtctt 660
 tgtaaagctg gtgttcttgg gagtttgaag aagagtigga gaaaagiatc ggtgatcaac 720
 attgtggtag ttatcattct agttatcttt tacgttatcg cttatgcagc ttataggaat 780
 gtcaagagga tcgataacga tgaaccggct ggtgaagcta ggaatgacaaa atcacatcct 840
 agtcatittcc atctttga 858

60

<210> 11

<211> 285

65 <212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

ES 2 301 908 T3

<400> 11

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

ES 2 301 908 T3

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

ES 2 301 908 T3

<210> 12

<211> 849

<212> DNA

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 12

```

10      atgtacagat tcagcaacac agttatfggg gtcctaaacc ttctcacctt actagcctcg 60
      attccaatca tcggaaccgc ttataacaag gcaagaagca gcacgacatg tgaaaacttc 120
15      ctccagacgc cgctacttgt tataggattc atcatactca tagtttccct tgcgggattc 180
      ataggagcct gcttcaacgt ggcatgggct ctttgggtgt acttagiggt catgatcttc 240
20      ctcatcgcta ccctaattggg tctaacgcta ttgtgtctgg tggtagcgag ccaaggaggt 300
      ggagtggaag tgccagggag gatttataaa gattataggc ttggagacta tcatccatgg 360
      ttgagagaga gatttaggga tcctgagtat tggaaacctt ttagaagctg tatcttgagt 420
25      tccaagactt gtactaagat tgagtccttg actacacttg attatttcca aagagacatg 480
      acttcgttc agtcgggatg ttgtaagcca ccgacggcgt gtacgtacga agctggagta 540
30      gtggacggag gaggagattg cttcagatgg aacaatggag tggagatggt atgctacgag 600
      tgcgatgctt gcaaggctgg tgttctcgaa gagatccgtc tcgactggag aaagttatcg 660
35      gttgtcaaca ttctcgtcct cgtccctcctc atcgcggtct acgccgtgg ttgctgcgcc 720
      ttccacaaca ctgccacgc agctcatcct taccatccat ctgatgataa ccgatgacc 780
40      agagtcgctc ctctgtggga ctattactgg tggagatggt ggcacgaaaa gaaagagcag 840
      ctttactaa

```

849

45 <210> 13

<211> 282

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

50

55

60

65

ES 2 301 908 T3

<400> 13

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

ES 2 301 908 T3

	145	150	155	160
5				
	Thr Ser Val Gln Ser Gly Cys Cys Lys Pro Pro Thr Ala Cys Thr Tyr			
10		165	170	175
15	Glu Ala Gly Val Val Asp Gly Gly Gly Asp Cys Phe Arg Trp Asn Asn			
	180	185	190	
20				
	Gly Val Glu Met Leu Cys Tyr Glu Cys Asp Ala Cys Lys Ala Gly Val			
	195	200	205	
25				
	Leu Glu Glu Ile Arg Leu Asp Trp Arg Lys Leu Ser Val Val Asn Ile			
30	210	215	220	
35	Leu Val Leu Val Leu Leu Ile Ala Val Tyr Ala Ala Gly Cys Cys Ala			
	225	230	235	240
40				
	Phe His Asn Thr Arg His Ala Ala His Pro Tyr His Pro Ser Asp Asp			
	245	250	255	
45				
	Asn Arg Met Thr Arg Val Arg Pro Arg Trp Asp Tyr Tyr Trp Trp Arg			
50	260	265	270	
55	Trp Trp His Glu Lys Lys Glu Gln Leu Tyr			
	275	280		

60 <210>14
 <211> 810
 <212> DNA
 <213> *Arabidopsis thaliana*

65

ES 2 301 908 T3

<400> 14

```

5      atgccittaa gcaacaatgt aattgggtgc ataaacttca tcaccgtcct cctctccatt 60
      ccggtcacgc gcgccggaat ctggctagcc ataggaacag taaactcatg cgicaagctt 120
      ctccaatggc cagtaataat cctcggagtc ttaatcctct tagtgggtct cgctggtttc 180
10     aatggagggg tttggagaat cacatggctt ctgttgtttt acttaatcgc catgcttatt 240
      ctcatgttac ttttgggttg cctgtcggga ttattttaca tggttaccat aagaggctct 300
15     gggtatccag aaccaagtag agcttatctt gagtatagtc ttcaagattt cctcggtttg 360
      ttacgtagaa gagttcagag atcttataaa tgggaaagga ttctgtacttg tttagtaca 420
20     actaccattt gccctgaact aaatcagaga tacactttgg ctcaagattt cttcaatgct 480
      catcttgatc ccattcaatc tggttgctgc aagccccaa caaatgtgg attcacattt 540
25     gttaatccta cttattggat aagtcccata gatagtcttg ctgatatgga ttgtctaaat 600
      tggagcaatg accaaaacac tttgtgttac acttgtgatt ctgttaaagc cggcttgctc 660
      gcaaataatta aggtagattg gttaaagcg gatacttttc tactcttggc gcctatcgga 720
30     ttgattatcg tctacattat cgggtgctgc gcattccgta atgcggaaac tgaggatatt 780
      ttcaggaagt acaagcaggg ttatacttga                                     810

```

35

<210> 15

<211> 269

40 <212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

45

50

55

60

65

ES 2 301 908 T3

<400> 15

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

ES 2 301 908 T3

Ser Ala Asp Met Asp Cys Leu Asn Trp Ser Asn Asp Gln Asn Thr Leu
195 200 205

Cys Tyr Thr Cys Asp Ser Cys Lys Ala Gly Leu Leu Ala Asn Ile Lys
210 215 220

Val Asp Trp Leu Lys Ala Asp Ile Phe Leu Leu Leu Ala Leu Ile Gly
225 230 235 240

Leu Ile Ile Val Tyr Ile Ile Gly Cys Cys Ala Phe Arg Asn Ala Glu
245 250 255

Thr Glu Asp Ile Phe Arg Lys Tyr Lys Gln Gly Tyr Thr
260 265

<210> 16

<211> 813

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 16

atggcgtag cgaataactt aacggcgata ctcaacttac tagcgtagt ctgttccata 60
ccaataacgg cgtcaggtat atggctagct tcaaagccag acaacgagtg tgtcaatctc 120
ctccgttggc ccgttgtcgt cctcggcggt ctcatcctcg tcgtclccgc cacaggcttc 180
atcggcgcc tacaaglataa ggaaactcta ctggcggtt acttgtctg tatggcgata 240
ttgatcggac ttttgtcgtt ggttcttata ttgcattcg tcgtgacccg gcccgatgga 300
tcgtatcggg ttccgggtag aggttataaa gaggataggc ttgaagggtt ctggaattgg 360
ctlaaggaga acgttgttga ttccaagaac tggggaaggc taagggttgg ttgtgctgat 420

ES 2 301 908 T3

actaatgitt gicctaaact caaccaagaa ttcataccg ccgatacagtt ctctcctcc 480
 tctaagaatca ctctctcca giccggtgc tgcaaaccac caaccgatg tggctacaac 540
 5 ttigtgaacc caacactgig gctaaatcca accaataatgg ctgcagacgc agactgttac 600
 ttaaggagca atgaccaaag ccagctitgt tacaatigca actcatgcaa agctggttta 660
 10 ttgggaaacc ttagaaaaga atggcgtaaa gcaaattca tactatcat cacagtcgtt 720
 gtctcatat gggtttatgt tatgtctgt agcgcttta ggaatgctca gactgaggat 780
 15 ctctccgca aatacaaaaca aggttgggtc taa 813

<210> 17
 20 <211> 270
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 25 <400> 17

Met Ala Leu Ala Asn Asn Leu Thr Ala Ile Leu Asn Leu Leu Ala Leu
 30 1 5 10 15

Leu Cys Ser Ile Pro Ile Thr Ala Ser Gly Ile Trp Leu Ala Ser Lys
 35 20 25 30

Pro Asp Asn Glu Cys Val Asn Leu Leu Arg Trp Pro Val Val Val Leu
 40 35 40 45

Gly Val Leu Ile Leu Val Val Ser Ala Thr Gly Phe Ile Gly Ala Tyr
 45 50 55 60

Lys Tyr Lys Glu Thr Leu Leu Ala Val Tyr Leu Cys Cys Met Ala Ile
 55 65 70 75 80

60

65

ES 2 301 908 T3

Leu Ile Gly Leu Leu Leu Val Val Leu Ile Phe Ala Phe Val Val Thr

85

90

95

5

Arg Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Val Pro Gly Arg Gly Tyr Lys Glu Tyr

100

105

110

10

Arg Leu Glu Gly Phe Ser Asn Trp Leu Lys Glu Asn Val Val Asp Ser

115

120

125

15

Lys Asn Trp Gly Arg Leu Arg Ala Cys Leu Ala Asp Thr Asn Val Cys

130

135

140

20

Pro Lys Leu Asn Gln Glu Phe Ile Thr Ala Asp Gln Phe Phe Ser Ser

145

150

155

160

30

Ser Lys Ile Thr Pro Leu Gln Ser Gly Cys Cys Lys Pro Pro Thr Ala

165

170

175

35

Cys Gly Tyr Asn Phe Val Asn Pro Thr Leu Trp Leu Asn Pro Thr Asn

180

185

190

40

Met Ala Ala Asp Ala Asp Cys Tyr Leu Trp Ser Asn Asp Gln Ser Gln

195

200

205

45

Leu Cys Tyr Asn Cys Asn Ser Cys Lys Ala Gly Leu Leu Gly Asn Leu

210

215

220

55

Arg Lys Glu Trp Arg Lys Ala Asn Leu Ile Leu Ile Ile Thr Val Val

225

230

235

240

60

65

ES 2 301 908 T3

Val Leu Ile Trp Val Tyr Val Ile Ala Cys Ser Ala Phe Arg Asn Ala

245

250

255

Gln Thr Glu Asp Leu Phe Arg Lys Tyr Lys Gln Gly Trp Val

260

265

270

<210> 18

<211> 816

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 18

```

atgtttcgag ttagcaattt catggttggc ctagcaaaca cattggtgat gtagtgggc 60
gcttcggcca ttggttattc gatttacatg ttcggtcacc aaggcgtcac tgatttgaa 120
tctgccattc ggataccact tctcacgacc ggacatcacc tcttcttggc gtctttgctc 180
ggagtgattg gatcttgttt caaggagaat ttggcaatgg tttctactt gatcataattg 240
tttgggggca ttgttgcatc gatgattttc tccatatttc tcttcttgt gaccaacaaa 300
ggagccgggc gtgtgggtgc cggtcgaggg tataaagagt accggacggt ggatttctcg 360
acgtggctta atgggttcgt tgggtgggaag agatgggttg ggataaggtc ttgtttggct 420
gaggctaacc ttgtgatga tttagatgat ggtcgtgtta gtcagatcgc tgatgcgttt 480
tatcacaaga acttgtctcc catccagtca ggttgttgta agccaccatc ggattgcaac 540
ttcgagttca gaaacgcgac gttctggata ccgccgagca aaaacgaaac ggcagttgcg 600
gaaaacgggg actgtggtag gtggagcaac gtgcaaacag agttatgttt caactgcaac 660
gcatgcaaag cgggtgtgtt agcgaacata agagagaagt ggaggaatct tcttgitttc 720
aacatttgc tctcattct cctcataacc gtctattcct gcggttgctg tgctcgtcgt 780
aacaatcgga cggctaggaa aagtattct gtctga 816

```

<210> 19

<211> 271

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

ES 2 301 908 T3

<400> 19

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

ES 2 301 908 T3

	130	135	140	
5	Cys Asp Asp Leu Ser Asp Gly Arg Val Ser Gln Ile Ala Asp Ala Phe			
	145	150	155	160
10				
	Tyr His Lys Asn Leu Ser Pro Ile Gln Ser Gly Cys Cys Lys Pro Pro			
15		165	170	175
20				
	Ser Asp Cys Asn Phe Glu Phe Arg Asn Ala Thr Phe Trp Ile Pro Pro			
	180	185	190	
25				
	Ser Lys Asn Glu Thr Ala Val Ala Glu Asn Gly Asp Cys Gly Thr Trp			
	195	200	205	
30				
	Ser Asn Val Gln Thr Glu Leu Cys Phe Asn Cys Asn Ala Cys Lys Ala			
35	210	215	220	
40				
	Gly Val Leu Ala Asn Ile Arg Glu Lys Trp Arg Asn Leu Leu Val Phe			
	225	230	235	240
45				
	Asn Ile Cys Leu Leu Ile Leu Leu Ile Thr Val Tyr Ser Cys Gly Cys			
	245	250	255	
50				
	Cys Ala Arg Arg Asn Asn Arg Thr Ala Arg Lys Ser Asp Ser Val			
55	260	265	270	

60 <210> 20
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> *Arabidopsis thaliana*

65

ES 2 301 908 T3

<400> 20

5 atgagcaata cagtgalagg attcttgaat atcctaacac taatttcctc catagttcia 60
 ttaggatcag ctctatggat gggtaggagc aaaacgacat gcgagcattt tcttcagaag 120
 ccacttttga tcttaggcct agctaicttg atcttgtcag tagctggctt agtcgggtgca 180
 10 tgttgtgacg tggcttgggt ctgttgggtg tactcttctt tcatggcttt catcatagtc 240
 gcactcatgg gtttgacctt gtttggattc atagtacta gccatagtgg tgggtgtggtt 300
 15 gtcgatggta gggttttaaa agagttaaag ctigaagcat atcacccctg gcttaagaca 360
 agggtagtag atactaatta ttgggttact ataaagactt gtctcttggg ctacagtcact 420
 20 tgttccaagc tcgtcttttg gactcctctt gattatctcc aaaaagactt atctcctctt 480
 cagctgttta ctgtgttggc tgttgcgctt ttaaaaacgc caaacgccct caacattacg 540
 gcttccctta tggacgttac ggcatgtcca aatccagacc tggatgggaa cagtcctggt 600
 25 ttgttctctt ttctaatagca acaattattt ttattatttt cgcggcatgt aggtcaaggt 660
 ggtggcatgg gagagatcgg tattagttaa aaatatttat gttaa 705

<210> 21

<211> 234

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 21

40 Met Ser Asn Thr Val Ile Gly Phe Leu Asn Ile Leu Thr Leu Ile Ser
 1 5 10 15
 45 Ser Ile Val Leu Leu Gly Ser Ala Leu Trp Met Gly Arg Ser Lys Thr
 50 20 25 30
 55 Thr Cys Glu His Phe Leu Gln Lys Pro Leu Leu Ile Leu Gly Leu Ala

60

65

ES 2 301 908 T3

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

ES 2 301 908 T3

195

200

205

5

Leu Phe Leu Leu Phe Ser Arg His Val Gly Gln Gly Gly Gly Met Gly

210

215

220

10

Glu Ile Gly Ile Ser Glu Lys Tyr Leu Cys

15

225

230

<210> 22

20

<211> 795

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

25

<400> 22

30

atgctccggc taagcaacgc cgccgtaata acaaccaatg caattctcgc attgatcggc 60
 ctccgcgcctc tatctttttc cgtctacgtc tacgttcaag gcccatcaca gtgtcaacgt 120
 ttccgttcaaa accctctcat tgaactgcg gctctcctct tcttcattctc giccttaggc 180
 cttatcgctg ctctctacgg tagccacatc atcatcacac tctatctctt ctcccttttc 240
 ctctccattc ttctgcttct tgtcctctct gcttttatct tctctgtcac gaatcccacc 300
 gccggaaaag cgttatccgg tagaggaata ggcaatgtca agaccggaga ttatcagaac 360
 tggatcggga accatttccct tcttggggaag aattgggaag ggatcaccaa atgtttgtct 420
 gattctaggg tttgtaaaag gtttggtcca cgtgacattg actttgactc caaacatctc 480
 tctaattgtac agtttgggtg ttgtcgacct cccgtagaat gttgggttcga atcaaagaat 540
 gccacgtggt ggacagtcc tgcacagcg actacggcga ttatagggga ttgtaaggca 600
 tggagtaaca cgcagagaca gttatgttac gcgtgcgagt cgtgtaagat tggagtttta 660
 aaagggataa gaaaaagatg gaggatactt attgtcgtca atctccttct tctccttctc 720
 gtccgtttttc ttactcgtg tggcgtgtgc gtgagaaaga acaatcgtgt tccatggaag 780
 cgccggttct tctaa 795

60

<210> 23

<211> 264

<212> PRT

65

<213> *Arabidopsis thaliana*

ES 2 301 908 T3

<400> 23

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

ES 2 301 908 T3

Gly Lys Asn Trp Glu Gly Ile Thr Lys Cys Leu Ser Asp Ser Arg Val
 130 135 140
 5
 Cys Lys Arg Phe Gly Pro Arg Asp Ile Asp Phe Asp Ser Lys His Leu
 145 150 155 160
 10
 Ser Asn Val Gln Phe Gly Cys Cys Arg Pro Pro Val Glu Cys Gly Phe
 165 170 175
 15
 Glu Ser Lys Asn Ala Thr Trp Trp Thr Val Pro Ala Thr Ala Thr Thr
 180 185 190
 20
 Ala Ile Ile Gly Asp Cys Lys Ala Trp Ser Asn Thr Gln Arg Gln Leu
 195 200 205
 25
 Cys Tyr Ala Cys Glu Ser Cys Lys Ile Gly Val Leu Lys Gly Ile Arg
 210 215 220
 30
 Lys Arg Trp Arg Ile Leu Ile Val Val Asn Leu Leu Leu Ile Leu Leu
 225 230 235 240
 35
 Val Val Phe Leu Tyr Ser Cys Gly Cys Cys Val Arg Lys Asn Asn Arg
 245 250 255
 40
 Val Pro Trp Lys Arg Arg Phe Phe
 260
 45
 50
 55

<210> 24

<211> 654

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

ES 2 301 908 T3

<400> 24

```

5      atgatigatt ttcctttgaa gtatcttgcc gtgctcctga tcgttttgat cgcgattctt 60
      gtctttaccg tactggcggt catlgttaaca aacaatgggt ctagccatac taaccctgggt 120
      ttaaggatca aggagtataa gctgaatgat tacagctcat ggtttctaaa acagcttaac 180
10     aacaccagta actggataag actaaagagt tgtcttggtt aatccgagca atgtcggaag 240
      ctttccaaga aatacaagac catcaaacag ttgaaatccg cagaattaac cccgatagaa 300
15     gctggatgtt gtcgaccacc atctgagtgt ggttatcctg cggatgaatgc ttcttactat 360
      gacttgagct ttcatlcat aagttctaac aaagattgta agctttacaa gaatttgagg 420
20     actatcaagt gctacaactg tgattcttgc aaagctggag ttgctcagta catgaaaacc 480
      gagtggcgac ttgttgcgat ctccaatgtg gtccgttttg ttgtcttgat aagctctctt 540
25     cttagcacga gatitgactc tgaacaaagt ttggcccttt taaacgggtt agtgcaaatt 600
      tccaacataa ccttttaaaga ttgccaaacc acaacagtac caaaacagtt ttaa      654

```

30 <210> 25

<211> 217

<212> PRT

35 <213> *Arabidopsis thaliana*

40

45

50

55

60

65

ES 2 301 908 T3

<400> 25

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

ES 2 301 908 T3

Leu Leu Asn Gly Leu Val Gln Ile Ser Asn Ile Thr Phe Lys Asp Cys

195

200

205

5

Gln Thr Thr Thr Val Pro Lys Gln Phe

10

210

215

<210> 26

15 <211> 837

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

20 <400> 26

```

atggcgagag ataaagaaga tcaaaacaat gagaatcctt caattgtcca gaacatgtca 60
tttccattca acaccatttt ctgatctca agcgcaatct tcctcgtcac agccgctttc 120
tggttcgtag ccgcatgac attacattac aggaccgatg aatgtaaccg gttcgtcaca 180
actcccggaa taticataag ctctcattg ctgctatgt cctcactgg attctacgca 240
gcttacttca aatccgattg tccttttcca atccacttct ttatcttctt ctgttgatg 300
ttcgttgtcg tgtctaaagc aatctttgtc atctttctac ataaggagac caatcctaga 360
ttgtttcctg ggaccaagat ttatgagttt aggtacgagg attactcagg atgggttagt 420
agattgggtca tcaaagacga tgaatgggtat cgtacaagga gatgcttgt taaggacaat 480
gttttgtaaca ggctaaacca taagatgcca gcttctgagt ttatcagat gaatctaact 540
cctatacagt cgggttggtg caaaccacca cticattgtg gattgaatta cgagaaacca 600
aataattgga cagtttcaag atattataac aatttagaag ttgattgcaa gagatggaac 660
aattctgcag atacattatg cttcgattgt gattcatgta aagctgtgat tattgctgat 720
gtacataata cticattttc cataacagtt aacattatc atatcatctt tagtctttgt 780
atcggcattga ccggttggtt tgcctggtta aggatccttc gagaaagtca gaaatag 837

```

55 <210> 27

<211> 278

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

60

65

ES 2 301 908 T3

<400> 27

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

ES 2 301 908 T3

	130	135	140	
5	Lys Asp Asp Glu Trp Tyr Arg Thr Arg Arg Cys Leu Val Lys Asp Asn			
	145	150	155	160
10				
	Val Cys Asn Arg Leu Asn His Lys Met Pro Ala Ser Glu Phe Tyr Gln			
15		165	170	175
20	Met Asn Leu Thr Pro Ile Gln Ser Gly Cys Cys Lys Pro Pro Leu Ser			
	180	185	190	
25				
	Cys Gly Leu Asn Tyr Glu Lys Pro Asn Asn Trp Thr Val Ser Arg Tyr			
	195	200	205	
30				
	Tyr Asn Asn Leu Glu Val Asp Cys Lys Arg Trp Asn Asn Ser Ala Asp			
35	210	215	220	
40	Thr Leu Cys Phe Asp Cys Asp Ser Cys Lys Ala Val Ile Ile Ala Asp			
	225	230	235	240
45				
	Val His Asn Thr Ser Phe Ser Ile Thr Val Asn Ile Ile His Ile Ile			
	245	250	255	
50				
	Phe Ser Leu Cys Ile Gly Met Thr Gly Trp Phe Ala Trp Leu Arg Ile			
55	260	265	270	
60	Leu Arg Glu Ser Gln Lys			
	275			

ES 2 301 908 T3

<210> 28

<211> 816

<212> DNA

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 28

```

10      atgggaacat tgatggcact tgtgaacatt ttagccgctg gtgtccttcc gatcttcaact 60
      ttctgtctct cacttacact cctcggctac gcagtggtggc ttctttacat gcgtagctac 120
15      gactgcgaag atattctcgg tctgccacgt gtccagacgc tagctagtgt cggctcttctc 180
      gcggtgtttg ttgtcagcaa cgcagctctg tttttgcggc ggaagtttcc gatgcctgca 240
20      ctgttggtga tgggtgggtgt ctgttgttta atgcttttca tcggtttggc gtaigccgga 300
      gtaaaigaga tgcaaagccg gcggtttccg gcgacaagga tgtggttcaa gctcaaaatc 360
      atggacgac atgtgacctg gaacaatatc aaatcgtgtg tctatgataa aggagcttgc 420
25      aacgacctca ttacggatc tccaaatgaa aaaccttaca atagaagaaa aatgccacca 480
      atcaagaatg gatgttgtat gccaccagag acatgtaaca tggacgcgat aaacgcgacg 540
30      ttttgggtaca gaagaaaaga cgaaggacca cgtcgtcta tgaacctaat gtacggigtat 600
      gagatgatgg tgggaaggat tagcgactgt caactatgga ggaacgatig gagcatttta 660
      tgctatgati gtagatcttg taagttcgga ttcalaagat cggtaaggag gaaatgggtg 720
35      cagctcggtt tcttcttgat cgtcatttcc attcttcttc tcatgtctca tctcttgatc 780
      ttcttggcta ctttttggga acgatccaag ggtag                                     816

```

40

<210> 29

<211> 271

45 <212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

50

55

60

65

ES 2 301 908 T3

<400> 29

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

ES 2 301 908 T3

5 Ile Asn Ala Thr Phe Trp Tyr Arg Arg Lys Asp Glu Gly Pro Pro Ser
 180 185 190
 10 Ser Met Asn Leu Met Tyr Gly Asp Glu Met Met Val Gly Arg Ile Ser
 195 200 205
 15 Asp Cys Gln Leu Trp Arg Asn Asp Trp Ser Ile Leu Cys Tyr Asp Cys
 210 215 220
 20 Arg Ser Cys Lys Phe Gly Phe Ile Arg Ser Val Arg Arg Lys Trp Trp
 25 225 230 235 240
 30 Gln Leu Gly Ile Phe Leu Ile Val Ile Ser Ile Leu Leu Leu Met Ser
 245 250 255
 35 His Leu Leu Ile Phe Leu Ala Thr Phe Trp Glu Arg Phe Lys Gly
 260 265 270
 40
 45 <210> 30
 <211> 24
 <212> DNA
 <213>
 <400> 30
 50 gcggcagcgg cggcaggata tatt 24
 55 <210> 31
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial : cebador
 65 <400> 31
 tgctttgcc tataaatagc acgg 24

ES 2 301 908 T3

	<210> 32	
	<211> 23	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial : cebador	
10	<400> 32	
	cgctgaggac atctacattt ttg	23
15	<210> 33	
	<211> 22	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> base modificada	
25	<400> 33	
	tcccgacat gaagccattt ac	22
30	<210> 34	
	<211> 16	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> base modificada	
40	<222> 1 y 11	
	<223> n representa g ó c	
45	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> 7	
	<223> s representa g ó c	
50	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> 8 y 13	
55	<223> w representa a ó t	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial : cebador	
60	<400> 34	
	ngtcgaswga nawgaa	16
65	<210> 35	
	<211> 278	

ES 2 301 908 T3

<212> DNA

<213>

5 <220>

<221> base modificada

<222> 13, 35, 73, 108, 156, 190, 198 y 201

<223> n representa a, g, c ó t

10

<400> 35

tgtaggcaaac tcngagtagg aatggagaat ccaancgttt gggctcttct caaggaagaa 60

15

agtagcgact gcncattgta ttgctccgaa taaacacatc catgctgnta aagagaggtt 120

atctggatag taggcagaga ttggaaccia gggttntgtt gaaacaaaac tcacatttct 180

20

tgtaagacan gaaacatnca ncaacaaaaa gtttagactt ttgatttatt taatgaagtt 240

acctgaagta taagccaaaa ggaccaacaa agagtgc t 278

<210> 36

25

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial : cebador

35

<400> 36

cttcttcaat catcaccatg

20

<210> 37

40

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial : cebador

50

<400> 37

tagcttgaac cggcgcaaat

20

<210> 38

55

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial : cebador

65

<400> 38

gtacgtttta gtaacagtct

20

ES 2 301 908 T3

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial : cebador
10
<400> 39

15 gattagcagt gactaactcc 20

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65