



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 307 491**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

C07K 16/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00901244 .4**

86 Fecha de presentación : **28.01.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1144662**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2001**

54

Título: **Métodos y medios para la modificación de características de la planta usando la vernalización gen VRN2.**

30

Prioridad: **28.01.1999 GB 9901927**

73

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

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

72

Inventor/es: **Dean, Caroline y**
Gendall, Anthony

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 307 491 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

Métodos y medios para la modificación de características de la planta usando la vernalización gen *VRN2*.

5 La presente invención se refiere, de manera general, a la modificación de las características de las plantas, especialmente a la respuesta a la vernalización, época de floración, forma de la hoja y/o respuesta de evasión de sombreado y ha surgido en base a la clonación del gen *VRN2*, los alelos mutantes de *Arabidopsis thaliana* y la identificación de homólogos en otras especies.

10 En diferentes formas de realización, la presente invención asegura la manipulación de la época de floración y/o demás características de las plantas. Por ejemplo, regulando la expresión del gen *VRN2* a la suba o a la baja. La presente invención también se refiere a la modificación del alcance de la alteración de una característica relevante de la planta a través del uso de los alelos de los genes, mutantes y variantes.

15 Las plantas deben incorporar una gran cantidad de señales del entorno para maximizar su éxito reproductivo. Parte de esta incorporación debe incluir la percepción de las estaciones para garantizar la floración de la planta durante la estación correcta (para la que está adaptada) y para sincronizar su floración con otros miembros de su misma especie, aumentando así las posibilidades de la fertilización cruzada. La *Arabidopsis thaliana* se utiliza como planta modelo puesto que responde a una amplia variedad de estímulos del entorno que se observan en diversas especies. La floración
20 en cepas naturales (ecotipos) de la *Arabidopsis* puede potenciarse durante días largos (fotoperiodo aumentado) o mediante vernalización, un tratamiento por refrigeración prolongado que simula el frío del invierno. Si bien hoy en día se comprenden muchos aspectos de la respuesta del fotoperiodo, la ruta de vernalización ha recibido una atención relativamente menor. Los inventores han utilizado un mutante de una floración tardía de *Arabidopsis* sensible a la vernalización (el mutante del *fca*) como fondo en el cual aislar los mutantes que exhiben una respuesta a la
25 vernalización reducida, los mutantes del VRN.

Wilson y Dean (Seminars in Cell and Developmental Biology, 7 435-440, 1996) analizaron los dos loci que participan en la vernalización, el FCA y el FRI. El documento también describe la generación y análisis de las plantas de *Arabidopsis thaliana* del mutante del “*vrn*” de floración tardía en un fondo del *fca-1* mutante. Se trazó un mapa de
30 la mutación del *vrn1-1* en el cromosoma 3, mientras que el *vrn2-1* de mutación demostró estar ligado al *fca-1* en el cromosoma 4.

Chandler, Wilson y Dean (The Plant Journal, 10(4) 637-644, 1996) también describieron la generación de plantas mutantes con una respuesta reducida a la vernalización y, particularmente, que se refieren a la mutación del *vrn1*.

35 Levy y Dean (The Plant Cell, 10, pág. 1973-1999, Dic. 1998) analizaron los factores que regulan la transición de una planta a la floración y propusieron que los mutantes del *vrn1* y *vrn2* no perciben el frío o no transducen la señal fría a través de la ruta de respuesta a la vernalización.

40 La entrada número Z97342 a la base de datos de EMBL desveló secuencias a partir del cromosoma 4 de *A. thaliana*, incluyendo una proteína hipotética con una leve similitud a la ubiquinol-citocromo c reductasa (Bevan, M. y col.)

El documento WO96/38560 (John Innes Centre) desvela los ácidos nucleicos del FCA de *A. thaliana* y *Brassica napus* y su uso en la influencia sobre las características de floración de la planta.

45 La vernalización es la estimulación a baja temperatura de la floración. También puede ser considerada como el aspecto frío de la temporada de invierno, que incluye además una reducción de las horas de luz solar. Muchas especies de plantas que crecen en climas templados o más frescos tienen un requisito obligatorio de vernalización para su floración. Estas plantas germinan típicamente en otoño y durante el invierno como plantas vegetativas, y florecen
50 en condiciones más leves en primavera. La vernalización actúa así como un indicador que permite que las plantas perciban las estaciones y se adapten a los tiempos de floración, maximizando sus posibilidades de una reproducción con éxito.

Son numerosas las especies cuya floración es importante para la producción vegetal. Esencialmente, todos los cultivos que crecen de semillas, siendo ejemplos importantes los cereales, arroz y maíz, probablemente el más importante
55 (desde el punto de vista de la agronomía) en zonas con clima más cálido. También el trigo, cebada, avena y centeno en climas más templados. Productos importantes de semillas incluyen planta de colza, caña de azúcar, maíz, girasol, soja y sorgo. Muchas cosechas que se recogen por sus raíces crecen, por supuesto, anualmente de semillas y la producción de semillas de cualquier tipo depende mucho de la capacidad de floración, polinización y producción de semillas de la
60 planta. En la horticultura, el control de los tiempos de floración es importante. Las plantas hortícolas cuya floración se puede controlar son: lechuga, endibia y hortalizas del género brásica, incluyendo repollo, brócoli y coliflor y claveles y geranios.

La *Arabidopsis thaliana* es una planta de día largo facultativa, que florece temprano en días largos y tardíamente
65 en días cortos. Debido a que tiene un genoma pequeño y bien caracterizado, se transforma y regenera relativamente de manera fácil y tiene un ciclo de crecimiento rápido. La *Arabidopsis* es una planta modelo ideal para estudiar su floración y control.

Además de la clonación del gen VRN2, los inventores han encontrado de forma inesperada que el VRN2 es un factor de transcripción, que en sí mismo abre numerosas vías interesantes para la aplicación de la presente invención. Sin una teoría de apoyo o sin ninguna limitación al alcance de la presente invención, es posible que el VRN2 se solicite para una respuesta a la vernalización normal porque actúa como regulador de genes que, en última instancia, provocan la transición de un crecimiento vegetativo a uno reproductivo. En dicho modelo, una molécula fría o en dirección 3' que participa en una percepción fría puede regular la actividad o expresión de la proteína del VRN2 que, a su vez, puede regular la expresión de una gran cantidad de genes que, en última instancia, provocan la floración. Además, el fenotipo de evasión de sombreado exhibido por el mutante del *vrn2-1* (como se demuestra experimentalmente a continuación) es un indicador que el VRN2 también participa en la regulación de la forma de la hoja, particularmente en respuesta al aumento de la luz roja lejana. En forma conjunta, estos dos procesos afectados por una deficiencia o reducción de la actividad del VRN2 proporcionan varios enfoques de interés agronómico.

En primer lugar, la expresión forzada del VRN2 (por ejemplo, bajo el control de un promotor fuerte y constitutivo como por ejemplo el promotor Ca MV 35 S) en un fondo silvestre puede utilizarse para alterar el requisito de vernalización de una planta antes de su floración. Debido a que una gran cantidad de cultivos comerciales de diversas especies, incluyendo trigo (diploide), cebada y caña de azúcar tienen un requisito de vernalización para su floración, la modificación de este requisito, mediante la reducción de la duración de la vernalización necesaria, el cambio de temperatura óptima o la anulación del requisito, es de utilidad agronómica. Por ejemplo, una cosecha de invierno que se puede cultivar y dejar en el suelo durante un periodo más breve que lo habitual (es decir, una reducción del tiempo de vernalización) puede obtener beneficios de la reducción del riesgo de daños asociados con las duras condiciones climáticas del invierno, puesto que las cosechas están expuestas a las condiciones del invierno durante un periodo breve de tiempo.

En segundo lugar, el descenso del nivel de regulación de la expresión del VRN2 (por ejemplo mediante un ADNc del VRN2 antisentido) puede utilizarse para recapitular la reducción del fenotipo de evasión de sombreado observado en los mutantes del *vrn2-1*. Lo que se puede utilizar en situaciones en las que la recolección de la cosecha es un problema. Según la evidencia experimental aquí presentada sobre el fenotipo de los mutantes del *vrn2-1*, se espera que dichas plantas exhiban una respuesta menor a dichas condiciones y que produzcan hojas que son básicamente normales; es decir, como si no hubieran crecido en condiciones densas. El fenotipo de evasión de sombreado normal es una reducción del tamaño de la hoja, lo que reduce el sombreado en condiciones muy densas. Los mutantes del *vrn2-1* que no producen VRN2 presentan una reducción menor en el tamaño de la hoja en condiciones que normalmente provocarían el fenotipo de evasión de sombreado. Por lo tanto, este efecto puede reproducirse, por ejemplo, utilizando un ADNc del VRN2 para regular la expresión del VRN2 a la baja, previniendo o reduciendo la respuesta de evasión de sombreado aún en condiciones muy densas.

En tercer lugar, los dominios individuales aislados de la proteína del VRN2 pueden utilizarse por derecho propio. La capacidad de unión del ADN de los dedos de zinc del VRN2 puede utilizarse para dirigir o controlar la expresión del gen de una manera precisa. Los dedos de zinc del VRN2 pueden reconocer las secuencias de ADN específicas que representan los elementos de sus genes diana normales. La expresión de los genes diana del VRN2 se puede controlar mediante la creación de proteínas de fusión que comprenden el dominio del VRN2 de capacidad de unión del ADN (dedos de zinc) y una activación o represión del dominio a partir de una proteína heteróloga. Lo que permite un control exacto de la expresión de estos genes que son generalmente diana del VRN2. Dado que estos genes, solos o en combinación, controlan en última instancia la transición a la floración (generalmente después de la vernalización), también se puede utilizar su expresión dirigida en otras condiciones para obtener cambios en la floración y/o en una o más características de la planta. La expresión de (habitualmente sensibles a la luz roja lejana) genes diana también puede controlarse utilizando proteínas de fusión del VRN2 que contienen los dedos de zinc del VRN2. Además, se puede utilizar el uso del dominio de los dedos de zinc del VRN2 en experimentos habituales SELEX o de un híbrido para revelar los genes diana o secuencias de ADN habitualmente unidas por el VRN2.

El dominio de activación ácida del VRN2 puede utilizarse para regular la actividad de una proteína de fusión, incluyendo una proteína con capacidad de unión al ADN de especificidad conocida y el dominio de activación del VRN2. Lo que permite la regulación de los genes diana de las demás proteínas con capacidad de unión al ADN que participan en la floración o de los genes diana en procesos completamente no relacionados.

Los inventores han clonado, caracterizado y manipulado el gen del VRN2 de *Arabidopsis thaliana* (los tipos *Columbia* y *Landsberg erecta*) e identificaron alternativamente formas mutantes y de ajuste, también homólogas en otras especies.

Teniendo en cuenta el trabajo experimental de los inventores, un primer aspecto de la presente invención proporciona un aislado de ácido nucleico que codifica un polipéptido, incluyendo una secuencia aminoacídica del VRN2 que se muestra en la presente memoria descriptiva (por ejemplo, el identificador de secuencia N°: 2 y el identificador de secuencia N°: 5), que pueden incluir una secuencia codificadora presentada en este documento (por ejemplo, el identificador de secuencia N°: 1 y el identificador de secuencia N°: 4).

Se han identificado formas alélicas y formas alternativamente de ajuste del gen. Dichos polipéptidos y ácido nucleico codificador (por ejemplo, como en el identificador de secuencia N°: 8, codificado por el identificador de secuencia N°: 7) se proporcionan también como un aspecto de la invención, puesto que son polipéptidos y un ácido nucleico que incluyen las mutaciones identificadas en la presente memoria descriptiva.

ES 2 307 491 T3

5 El ácido nucleico según la presente invención puede tener la secuencia del gen del VRN2 de *Arabidopsis thaliana*, como se indica en el identificador de secuencia N°: 3 (secuencia genómica de *Landsberg erecta*), identificador de secuencia N°: 4 o identificador de secuencia N°: 6 (secuencia genómica de *Columbia*) o ser un mutante, variante, derivado, alelo o un homólogo de la secuencia proporcionada, según se define en las reivindicaciones.

10 Un mutante, variante, derivado, alelo u homólogo según la presente invención tiene la capacidad de afectar la característica física de una planta, especialmente la respuesta a la vernalización, tiempo de floración, forma de hoja y/o respuesta de evasión de sombreado, según lo analizado.

15 Los polinucleótidos que no son 100% idénticos a las secuencias mostradas en este documento, pero que están incluidos dentro del alcance de la invención, se pueden obtener de diversas maneras.

20 Se pueden obtener otras variantes del VRN2 (por ejemplo, formas alélicas) del gen descrito en este documento midiendo con sondas las genotecas del ADN genómico a partir de plantas o células de *Arabidopsis thaliana*.

25 Además, se pueden obtener otros homólogos, monocotiledóneos o dicotiledóneos, de plantas. Dichas secuencias se pueden obtener realizando u obteniendo genotecas de cADN a partir de la división de células o tejidos o de genotecas de ADN genómico a partir de otras especies de plantas y midiendo con sondas dichas genotecas que comprenden todo o parte de un ácido nucleico de la invención en condiciones de rigor medio a alto (por ejemplo, para la hibridación en una incubación durante la noche en soporte sólido (filtro) a 42°C en una solución con 50% de formamida, 5xSSC (750 mM NaCl, 75 mM de citrato de sodio), 50 mM de fosfato sódico (pH7,6), 5x de solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón, seguida de un lavado en 0,03M de cloruro de sodio y 0,03M de citrato de sodio (es decir, 0,2x SSC) desde alrededor de 50°C a alrededor de 60°C).

30 De este modo, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que se hibrida a la secuencia nucleotídica mostrada en una figura en este documento en las condiciones de hibridación y lavado antes mencionadas. Dicho ácido nucleico es adecuado para su uso como sonda para la detección del gen VRN2; por ejemplo, en la transferencia Southern.

35 Las secuencias adecuadas de la sonda y el cebador se describen en este documento.

40 De forma alternativa, los polinucleótidos de la invención se pueden obtener mediante mutagénesis dirigida de las secuencias mostradas en las figuras o sus variantes alélicas. Esto puede ser útil donde, por ejemplo, se necesitan cambios imperceptibles en los codones para las secuencias a fin de optimizar las preferencias de codones para una célula huésped en particular, en la que se expresan las secuencias de polinucleótidos. Se recomiendan otros cambios en las secuencias para introducir centros de reconocimiento de enzimas de restricción o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos. También se recomiendan más cambios para representar cambios de codificación particulares necesarios para proporcionar, por ejemplo, sustituciones conservativas.

45 En el contexto de la clonación, es necesario que uno o más fragmentos de genes se ligen para generar una secuencia de codificación completa. Asimismo, cuando no se obtiene una molécula de ácido nucleico de codificación completa, se puede utilizar una molécula más pequeña que represente parte de toda la molécula para obtener clones completos. Se pueden preparar prospectos a partir de clones de cADN parciales y se pueden utilizar para examinar las genotecas de cADN. Los clones completos aislados se pueden subclonar en vectores de expresión y la actividad se puede valorar mediante transfección en células huésped adecuadas; por ejemplo, con un plásmido indicador.

50 Las secuencias de control de transcripción del gen VRN2 se encuentran a 5' hacia el marco de lectura abierto del gen y se obtienen mediante sondas de la genoteca del ADN genómico con un ácido nucleico de la invención. Lo que se realiza mediante la selección de un clon que se hibrida en condiciones de rigor medio a alto y mediante la secuenciación del clon a 5' hacia el marco de lectura abierto del gen. En los casos en que sólo una pequeña parte de la secuencia está presente en la región a 5', se puede utilizar esta secuencia para colocar una sonda nuevamente en la genoteca hacia la ruta del genoma un poco más en dirección 5'. El análisis de la región en dirección 5' revela regiones de control para la expresión del gen incluyendo regiones de control comunes a diversos genes (por ejemplo, cajas TATA y CAAT) y demás regiones, habitualmente ubicadas de 1 a 10.000, como por ejemplo 1 a 1000 ó 50 a 500 nucleótidos en dirección 5' del inicio de la transcripción.

55 Para confirmar que dichas regiones son regiones de control del gen, se pueden enlazar con un gen indicado (como por ejemplo b-galactosidasa) y evaluado en cualquier sistema *in vitro* o *in vivo* adecuado. Por ejemplo, la construcción de la región de control (por ejemplo, que comprende 50 a 500 nucleótidos en dirección 5' del inicio de la transcripción) y el gen indicador se pueden utilizar para producir una planta transgénica. Y el patrón de la expresión, espacial y embriológicamente, se puede comparar con el del gen VRN2. En los casos en los que se encuentran patrones de expresión similares, la construcción comprende sustancialmente todas las regiones de control del gen silvestre.

60 El identificador de secuencia N°: 3 y el identificador de secuencia N°: 6 muestran la secuencia nucleotídica de la región genómica del VRN2 que incluye un promotor, respectivamente para los ecotipos *Landsberg erecta* y *Columbia* de la *Arabidopsis thaliana* y también elementos regulatorios a 3'.

ES 2 307 491 T3

La región de control puede mutar para identificar regiones específicas responsables del control de la transcripción. Lo que también se puede lograr mediante varias técnicas muy conocidas, incluyendo los ensayos de registro gráfico de protección de la desoxirribonucleasa I en los que la región de control entra en contacto con un extracto de una célula en la que se expresa activamente el gen *VRN2* y se determinan las regiones de la región de control que enlazan factores en ese extracto.

El ácido nucleico aislado, que comprende dichas regiones de control y que se obtiene mediante dicho método, forma un nuevo aspecto de la presente invención.

Como se indicó anteriormente, los cambios en una secuencia para producir un mutante, variante o derivado pueden realizarse mediante una o más adiciones, inserciones, supresiones o sustituciones de uno o más nucleótidos en el ácido nucleico, lo que provoca la adición, inserción, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos en el polipéptido codificado. Por supuesto, se incluyen los cambios en el ácido nucleico que no afectan la secuencia aminoacídica codificada (“degenerativamente equivalente”).

Las secuencias nucleotídicas preferentes según la presente invención se incluyen en este documento. Por ejemplo consulte el identificador de secuencia N°: 1 y el identificador de secuencia N°: 4, de los cuales las respectivas secuencias aminoacídicas previstas codificadas de los polipéptidos según la presente invención se presentan en el identificador de secuencia N°: 2 y el identificador de secuencia N°: 5.

Una secuencia aminoacídica mutante, alélica, variante o derivada según la presente invención puede incluir, en una secuencia presentada en este documento, un cambio único en un aminoácido con respecto a la secuencia presentada con el respectivo identificador de secuencia N°: o en la respectiva figura, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ó 9 cambios, aproximadamente 10, 15, 20, 30, 40 ó 50 cambios o más de aproximadamente 50, 60, 70, 80 ó 90 cambios. Además de uno o más cambios en la secuencia aminoacídica presentada en la figura correspondiente, una secuencia aminoacídica mutante, alélica, variante o derivada puede incluir aminoácidos adicionales en el extremo C terminal y/o extremo N terminal.

Una secuencia relacionada con una secuencia específicamente presentada en la presente memoria descriptiva comparte la homología con dicha secuencia. La homología puede darse en la secuencia nucleotídica y/o a nivel de la secuencia aminoacídica. El ácido nucleico y/o secuencias de aminoácidos comparten, al menos, el 70% de homología con la secuencia codificadora o la secuencia codificada mediante una secuencia nucleotídica presentada en este documento, por ejemplo el identificador de secuencia N°: 2 o el identificador de secuencia N° 5, preferentemente al menos alrededor del 80% de homología, más preferentemente al menos alrededor del 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología.

Como bien se entiende, la homología en el nivel de los aminoácidos es, generalmente, en términos de similitud o identidad de aminoácidos. La similitud permite una “modificación conservativa”. Es decir, la sustitución de un residuo hidrófobo como por ejemplo isoleucina, valina, leucina o metionina por otro o la sustitución de un residuo polar por otro, como por ejemplo arginina por lisina, ácido glutamínico por ácido aspártico o glutamina por asparagina. La similitud puede ser según la definición y determinación del programa TBLASTN, de Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-10, que es de uso estándar en la técnica y es preferente, ya sea de los programas estándar BestFit o GAP, que son parte del Wisconsin Package, Versión 8, septiembre 1994, (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.U., Wisconsin 53711). BestFit realiza una alineación óptima del mejor segmento de similitud entre las dos secuencias. Las alineaciones óptimas se encuentran introduciendo espacios para maximizar el número de coincidencias con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Advances in Applied Mathematics* (1981) 2, pág. 482-489). GAP utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch que alinea dos secuencias completas que maximizan el número de coincidencias y minimizan el número de espacios. Generalmente, se utilizan los parámetros predeterminados con una penalización por creación de espacio en blanco = 12 y una penalización por extensión de espacio en blanco = 4.

La homología está, generalmente, por encima de la longitud completa de la secuencia correspondiente presentada en este documento.

En formas de realización muy preferentes, todas las homologías porcentuales a las que se hace referencia en este documento se refieren a una identidad de secuencia porcentual.

En este contexto, la identidad de la secuencia aminoacídica porcentual (%) con respecto a la secuencia de referencia particular se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia, después de la alineación de las secuencias y de la introducción de espacios en blanco, en caso de ser necesario, para lograr la identidad de secuencia porcentual máxima y sin tener en cuenta las sustituciones conservativas como parte de la identidad de la secuencia.

Los valores de identidad % utilizados en este documento se pueden determinar mediante WU-BLAST-2 que se obtuvo a partir de [Altschul y col., *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>]. WU-BLAST-2 utiliza diversos parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se definen como valores predeterminados. Los parámetros regulables se establecen con los siguientes valores: extensión de solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0,125, umbral de palabra (T) = 11. Los parámetros HSPS y HSPS2 son valores dinámicos y se establecen con el programa, dependiendo de la composición de la secuencia y composición particulares

ES 2 307 491 T3

de la base de datos particular frente a la secuencia de interés que se busca. Sin embargo, los valores se pueden ajustar para aumentar la sensibilidad.

5 Un valor de identidad de una secuencia aminoacídica % se determina mediante el número de residuos idénticos coincidentes dividido por el número total de residuos de la secuencia “más larga” en la región alineada. La secuencia “más larga” es la que tiene los residuos más reales en la región alineada (se ignoran los espacios introducidos mediante WU-Blast-2 para maximizar la puntuación de alineación).

10 De manera similar, la identidad de la secuencia de ácidos nucleicos porcentual (%) con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos de referencia se define como el porcentaje de residuos de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de nucleótidos en la secuencia de referencia. Los valores de identidad se pueden determinar mediante el módulo BLASTN de WU-BLAST-2 fijado para los parámetros predeterminados, con una extensión de solapamiento y fracción de solapamiento fijados en 1 y 0,125, respectivamente.

15 El ácido nucleico según la presente invención puede estar formado esencialmente por o estar formado por la secuencia codificadora correspondiente. El ácido nucleico según la presente invención puede incluir un promotor u otra secuencia regulatoria (según lo analizado en otro punto de este documento) y dicha secuencia regulatoria puede ser heteróloga a la secuencia codificadora. Es decir, que no se enlaza operativa y naturalmente. El ácido nucleico según la presente invención puede ser un ADNc, puede no tener uno o más intrones espontáneos o puede presentarse en una forma no espontánea. Se puede incluir una secuencia codificadora según la presente invención con una molécula de ácido nucleico más grande de menos de aproximadamente 10.000 nucleótidos, menos de aproximadamente 5.000 o menos de aproximadamente 2.000 nucleótidos.

25 También proporcionado por un aspecto de la presente invención, hay un ácido nucleico que incluye o está formado por esencialmente una secuencia de nucleótidos como complementos de una secuencia nucleotídica que se hibrida con cualquier secuencia de codificación de este documento. Otro punto de vista es que, según este aspecto, el ácido nucleico se puede hibridar con una secuencia nucleotídica como complemento de cualquier secuencia de codificación de este documento. Por supuesto, el ADN tiene generalmente una cadena doble y las técnicas de transferencia por adsorción como por ejemplo la hibridación Southern se realizan, con frecuencia, después de la separación de las cadenas sin una distinción entre las cadenas que se hibridan. Preferentemente, el ácido nucleico que se hibrida (o su complemento) codifica un producto capaz de influenciar una característica física de una planta, particularmente una respuesta a la vernalización, época de floración, forma de la hoja y/o respuesta de evasión de sombreado; por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana*. Las condiciones preferentes para la hibridación son conocidas por los expertos en la materia, pero generalmente son lo suficientemente rigurosas como para que haya una hibridación positiva entre las secuencias de interés a la exclusión de otras secuencias.

30 El ácido nucleico, que puede contener un ADN que codifica un polipéptido incluyendo la secuencia aminoacídica del VRN2 u otro polipéptido desvelado en la presente memoria descriptiva, como genómico o ADNc, puede presentarse en la forma de un vector recombinante y, preferentemente, de replicación. Por ejemplo, un plásmido, cósmido, fago o vector binario de *Agrobacterium*. El ácido nucleico puede estar bajo el control de un promotor apropiado u otros elementos regulatorios para la expresión en una célula huésped, como por ejemplo una célula microbiana, bacteriana o de la planta. El ADN genómico puede contener su propio promotor o demás elementos regulatorios y el ADNc puede estar bajo el control de un promotor apropiado u otros elementos regulatorios para la expresión en una célula huésped.

45 Un vector que incluye un ácido nucleico según la presente invención no necesita incluir un promotor u otra secuencia regulatoria, particularmente si el vector se utilizará para introducir el ácido nucleico en las células para la recombinación en el genoma.

50 Los expertos en la materia pueden construir vectores y protocolos de diseño para la expresión de un gen recombinante. Los vectores adecuados se pueden seleccionar o construir con secuencias regulatorias apropiadas, incluyendo secuencias de promotores, fragmentos de terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias de intensificadores, genes de marcadores y demás secuencias según sea necesario. Para obtener más información consulte, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2nd edition, Sambrook y col, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Diversas técnicas y protocolos para la manipulación del ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión de genes y el análisis de proteínas se describen detalladamente en Current Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel y col. eds., John Wiley & Sons, 1992. Los procedimientos y vectores específicos anteriormente utilizados con gran éxito en plantas son descritos por Bevan (Nucl. Acids Res. 12, 8711-8721 (1984)) y Guerineau y Mullineaux (1993) (Plant transformation and expression vectors. En: Plant Molecular Biology Labfax (Croy RRD ed) Oxford, BIOS Scientific Publishers, pág. 121-148).

65 Se pueden utilizar marcadores genéticos de selección formados por genes quiméricos que confieren fenotipos de selección, como por ejemplo la resistencia a los antibióticos como la kanamicina, higromicina, fosfotricina, clorsulfuron, metotrexato, gentamicina, espectinomicina, imidazolidinona y glifosato.

Las moléculas y vectores de ácido nucleico según la presente invención se pueden proporcionar aislados y/o purificados a partir de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea o libre o sustancialmente libres de ácido nucleico o genes de las especies de interés u origen que no sean la secuencia que codifica un polipéptido con

la función requerida. El ácido nucleico según la presente invención puede incluir un ADNc, ARN, ADN genómico y puede ser total o parcialmente sintético. El término "aislado" incluye todas estas posibilidades. Cuando se especifica una secuencia de ADN, por ejemplo, con referencia a una figura (a menos que el contexto requiera lo contrario) se incluye el equivalente al ARN, sustituyendo U por T en los casos en que ocurra.

5

Si se introduce un gen seleccionado en una célula, se deben tener en cuenta determinadas consideraciones conocidas por los expertos en la materia. El ácido nucleico que se introducirá debe ensamblarse en una construcción que contenga elementos regulatorios eficaces que son los que realizarán la transcripción. Debe existir un método para transportar la construcción a la célula. Una vez que la construcción se encuentra en la membrana de la célula, se producirá o no la integración en el material cromosómico endógeno. Finalmente, en lo que respecta a las plantas, el tipo de célula diana debe ser uno que permita la regeneración de las células en plantas completas.

10

Las plantas transformadas con el segmento de ADN que contiene la secuencia pueden producirse mediante técnicas estándar para la manipulación genética de las plantas. El ADN se puede transformar en células de plantas utilizando cualquier tecnología adecuada, como un vector plásmido Ti desactivado transportado por el *Agrobacterium* que explota su capacidad de transferencia del gen natural (EP-A-270355, EP-A-0116718, NAR 12(22) 8711-87215 1984), bombardeo con partículas o microproyectiles (EE.UU. 5100792, EP-A-444882, EP-A-434616), microinyección (documentos WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083, EP 175966, Green y col. (1987) *Plant Tissue and Cell Culture*, Academic Press), electroporación (EP 290395, WO 8706614), otras formas de entrada directa del ADN (DE 4005152, WO 9012096, EE.UU. 4684611), entrada del ADN mediada por un liposoma (por ejemplo, Freeman y col. *Plant Cell Physiol.* 29: 1353 (1984)) o el método con vórtice (por ejemplo, Kindle, PNAS EE.UU. 87: 1228 (1990d)). Los métodos físicos para la transformación de células de plantas se analizan en Oard, 1991, *Biotech. Adv.* 9: 1-11.

15

20

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

25

30

35

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

40

En los casos en que *Agrobacterium* no es eficaz, se prefieren el bombardeo con microproyectiles, la electroporación y la entrada directa de ADN. Alternativamente, se puede utilizar una combinación de diferentes técnicas para intensificar la eficiencia del proceso de transformación. Por ejemplo, bombardeo con micropartículas revestidas de *Agrobacterium* (EP-A-486234) o bombardeo con microproyectiles para inducir una lesión seguida del cultivo conjunto con *Agrobacterium* (EP-A-486233).

45

Después de la transformación, una planta se puede regenerar a partir de células únicas, tejido calloso o discos de hojas, procedimientos estándar en la técnica. Casi cualquier planta se puede regenerar completamente a partir de las células, tejidos y órganos de la planta. Las técnicas disponibles se analizan en Vasil y col., *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol I, II y III, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press, 1984 y Weissbach y Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989.

50

La elección particular de una tecnología de transformación se determinará mediante su eficiencia para transformar determinadas especies de plantas así como la experiencia y preferencia de la persona que realiza la invención con una metodología particular de su elección. Será evidente para los expertos en la materia que la elección particular de un sistema de transformación para introducir un ácido nucleico en las células de las plantas no es esencial o no es una limitación para la invención. Tampoco lo es la técnica elegida para la regeneración de la planta.

55

60

Un gen VRN2, sus versiones modificadas (alelos, mutantes, variantes y sus derivados) y otros ácidos nucleicos en este documento (incluyendo especies homólogas) se pueden utilizar para modificar la respuesta a la vernalización, época de floración, forma de la hoja y/o respuesta de evasión de sombreado en una planta transgénica. Un ácido nucleico (por ejemplo, un vector) descrito en la presente memoria descriptiva se puede utilizar para la producción de una planta transgénica. Dicha planta puede tener un fenotipo modificado, particularmente en términos de respuesta a la vernalización, época de floración, forma de la hoja y/o respuesta de evasión de sombreado en comparación con un tipo silvestre (es decir, una planta que es silvestre para el VRN2 o su correspondiente homólogo).

65

ES 2 307 491 T3

La invención también incluye una célula huésped transformada con un ácido nucleico o un vector según la presente invención, especialmente una planta o una célula microbiana. De este modo, se proporciona una célula huésped como célula de una planta, incluyendo un ácido nucleico heterólogo según la presente invención. En la célula, el ácido nucleico se puede incorporar en el cromosoma. Puede haber más de una secuencia nucleotídica heteróloga por genoma haploide.

Asimismo y según la invención, se proporciona una célula de la planta con su ácido nucleico genómico incorporado, particularmente un ácido nucleico heterólogo bajo el control operativo de una secuencia regulatoria para el control de la expresión. La secuencia codificadora puede estar enlazada operativamente a una o más secuencias regulatorias que pueden ser heterólogas o extrañas a ese gen; por ejemplo, no asociadas naturalmente con el gen para su expresión. El ácido nucleico según la invención se puede colocar bajo el control de un promotor del gen inducible externamente para colocar la expresión bajo el control del usuario.

Un promotor inducible adecuado es el promotor del gen GST-II-27 que ha demostrado que puede ser inducido por determinados compuestos químicos que se pueden aplicar a las plantas en crecimiento. El promotor es funcional en monocotiledóneas y dicotiledóneas. Por lo tanto, puede utilizarse para controlar la expresión del gen en una variedad de plantas modificadas genéticamente, incluyendo cosechas de campo como canola, girasol, tabaco, caña de azúcar, algodón; cereales como trigo, cebada, arroz, maíz, sorgo; frutas como tomates, mangos, melocotones, manzanas, peras, fresas, bananas y melones y verduras como zanahoria, lechuga, repollo y cebolla. El promotor del GST-II-27 es también adecuado para su uso en diversos tejidos, incluyendo raíces, hojas, tallos y tejidos reproductivos.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para la creación de dicha célula de la planta que incluye la introducción de un ácido nucleico o un vector adecuado incluyendo la secuencia de nucleótidos en una célula de la planta y que causa o permite la recombinación entre el vector y el genoma de la célula de la planta para introducir la secuencia de nucleótidos en el genoma. La invención se extiende a las células de las plantas que contienen un ácido nucleico según la invención como resultado de la introducción del ácido nucleico en una célula ancestral.

El término “heterólogo” puede utilizarse para indicar que el gen o secuencia de nucleótidos en cuestión se ha introducido en dichas células de la planta (o de un ancestro de la misma) mediante ingeniería genética; es decir, mediante intervención humana. Se puede proporcionar una célula de una planta transgénica; es decir, transgénica para el ácido nucleico en cuestión. El transgen puede ser un vector extra genómico o incorporado en el genoma, preferentemente de forma estable. Un gen heterólogo puede sustituir un gen endógeno equivalente. Es decir, uno que habitualmente realice la misma o similar función. O la secuencia introducida puede ser adicional al gen endógeno u otra secuencia. Una ventaja de la introducción de un gen heterólogo es la capacidad de colocar la expresión de una secuencia bajo el control de un promotor de elección para que pueda influenciar la expresión, según la preferencia. Además, se pueden utilizar mutantes, variantes y derivados del gen silvestre; por ejemplo, con una mayor o menor actividad que el silvestre en lugar del gen endógeno. El ácido nucleico heterólogo, exógeno o extraño a una célula de la planta puede ser natural en células de ese tipo, variedad o especie. De este modo, el ácido nucleico puede incluir una secuencia codificadora o derivada de un tipo en particular de célula, especie o variedad de la planta ubicada en el contexto de una célula de la planta de un tipo, especie o variedad diferente de la planta. Otra posibilidad es colocar una secuencia de ácidos nucleicos en una célula en la que ésta o un homólogo se encuentren naturalmente, pero en la que la secuencia de ácidos nucleicos esté ligada y/o sea adyacente al ácido nucleico que no es natural en la célula o células de este tipo, especie o variedad de la planta, como las enlazadas operativamente a uno o más secuencias regulatorias, como una secuencia de un promotor, para el control de la expresión. Una secuencia en una planta u otra célula huésped puede ser heteróloga, exógena o extraña.

También se proporcionan las plantas que incluyen una célula de la planta según la invención junto con cualquier parte o propágulo de la misma, semilla, progenie propio o híbrido y descendientes. Una planta según la presente invención puede ser una que no se reproduzca en una o más propiedades. Se pueden excluir las variedades de las plantas, particularmente las variedades registradas en los “Plant Breeders’ Rights” (derechos del obtentor). Debe destacarse que una planta no necesita considerarse una “variedad de planta” simplemente porque contiene en su genoma un transgen de forma estable, introducido en una célula de la planta o un ancestro de la misma.

Además de una planta, la presente invención proporciona cualquier clon de dicha planta, semilla, progenie propio o híbrido y descendientes y cualquier parte de éstos como puede ser un esqueje o semilla. La invención proporciona cualquier propágulo de la planta que pueda utilizarse para la reproducción o propagación, sexual o asexual, incluyendo esquejes, semillas, etc. También incluida en la invención está la planta que es un progenie, clon o descendiente generado sexual o asexualmente a partir de dicha planta o cualquier parte o propágulo de dicha planta, progenie, clon o descendiente.

La invención además proporciona un método para influenciar o afectar la característica física de una planta, particularmente la respuesta a la vernalización, época de floración, forma de la hoja y/o respuesta de evasión de sombreado, incluyendo un método para provocar o permitir la expresión de una secuencia nucleotídica heteróloga, según lo analizado en las células de la planta.

La invención además proporciona un método para inducir la expresión a partir de un ácido nucleico que codifica un polipéptido del VRN2, un mutante, variante, alelo o derivado de la secuencia o un homólogo, según la divulgación en la presente memoria descriptiva, en las células de una planta (produciendo, por lo tanto, el polipéptido codificado)

ES 2 307 491 T3

después de un paso anterior de introducción del ácido nucleico en una célula de la planta o de un ancestro de la misma. Dicho método puede influenciar o afectar una característica de la planta, como puede ser la respuesta a la vernalización, época de floración, forma de la hoja y/o respuesta de evasión de sombreado. Lo que se puede utilizar junto con cualquier otro gen, como por ejemplo los transgenes que participan en la floración (por ejemplo, *FCA*) u otra característica o propiedad deseada fenotípicas.

La presente invención también incluye el producto de la expresión de cualquier secuencia nucleotídica desvelada y los métodos de realización del producto de la expresión mediante la expresión a partir de un ácido nucleico de codificación y, por lo tanto, en condiciones adecuadas, que se puede dar en células huésped adecuadas. Después de la expresión, el producto se puede aislar a partir del sistema de expresión y se puede utilizar según se desee, por ejemplo, en la formulación de una composición que incluye, al menos, un componente adicional.

Se puede utilizar una proteína purificada según la presente invención o un fragmento, mutante, derivado o variante de la misma; por ejemplo, producidos de forma recombinante mediante la expresión a partir de un ácido nucleico de codificación para crear anticuerpos que emplean técnicas estándar. Se pueden utilizar los anticuerpos y polipéptidos que comprenden los fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos para la identificación de homólogos a partir de otras especies, como se analizará posteriormente, también para la identificación de complejos con una proteína del *VRN2*.

Los métodos de producción de anticuerpos incluyen la inmunización de un mamífero (por ejemplo: un ser humano, ratón, rata, conejo, caballo, cabra, oveja o mono) con la proteína o un fragmento de la misma. Los anticuerpos se pueden obtener a partir de animales inmunizados, utilizando diversas técnicas conocidas. Estos anticuerpos se pueden detectar utilizando, preferentemente, la unión del anticuerpo a un antígeno de interés. Por ejemplo, se pueden utilizar las técnicas de inmunotransferencia tipo Western o de inmunoprecipitación (Armitage y col, 1992, *Nature* 357: 80-82). Los anticuerpos pueden ser poli o monoclonales.

Como una alternativa o complemento para la inmunización de un mamífero, los anticuerpos con especificidad de capacidad de unión correspondiente se pueden obtener a partir de una genoteca producida de forma recombinante formada por dominios variables de inmunoglobulina expresada. Por ejemplo, utilizando un bacteriófago lambda o bacteriófago filamentoso que muestra los dominios de unión de la inmunoglobulina funcional en sus superficies. Consulte, por ejemplo, el documento WO92/01047.

Los anticuerpos creados para un polipéptido o péptido se pueden utilizar para la identificación y/o aislamiento de polipéptidos homólogos y, posteriormente, los genes de codificación. De este modo, la presente invención proporciona un método para la identificación y aislamiento de un polipéptido con la función deseada (según las formas de realización en la presente memoria descriptiva) que comprende los polipéptidos candidatos para la detección con un polipéptido que comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo (por ejemplo: un anticuerpo completo o un fragmento adecuado como scFv, Fab) que es capaz de enlazar un polipéptido o un fragmento, variante o derivado del mismo según la presente invención o, preferentemente, tiene una especificidad de unión para dicho polipéptido. Los miembros específicos con capacidad de unión como por ejemplo anticuerpos y polipéptidos que comprenden los dominios de unión de antígenos de anticuerpos que se enlazan y que son preferentemente específicos para un polipéptido o mutante, variante o derivado del mismo según la invención representan otros aspectos de la presente invención, particularmente en forma aislada y/o purificada, como lo hacen el uso y métodos que los utilizan.

Los polipéptidos candidatos para la detección pueden, por ejemplo, ser los productos de una genoteca de expresión creada utilizando un ácido nucleico derivado de una planta de interés o pueden ser el producto de un proceso de purificación a partir de una fuente natural. Un polipéptido encontrado para enlazar el anticuerpo se puede aislar y, después, puede estar sujeto a la secuenciación aminoacídica. Se puede utilizar cualquier técnica adecuada para secuenciar el polipéptido total o parcialmente (por ejemplo, se puede secuenciar un fragmento del polipéptido). Se puede utilizar información de la secuencia aminoacídica para obtener un ácido nucleico que codifica el polipéptido, por ejemplo, mediante el diseño de uno o más oligonucleótidos (por ejemplo: una mezcla de degeneración de oligonucleótidos) para su uso como sondas o cebadores en la hibridación de un ácido nucleico candidato o mediante la búsqueda de base de datos de secuencias por ordenador, que se analizarán posteriormente.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para la identificación y clonación de homólogos del *VRN2* a partir de especies de plantas que no sean *Arabidopsis thaliana* cuyo método emplea secuencias nucleotídicas derivadas del método que se presenta en este documento. Según lo analizado anteriormente, las secuencias derivadas de éstos pueden utilizarse para la identificación y clonación de otras secuencias. La información de las secuencias nucleotídicas proporcionada en la presente memoria descriptiva, o parte de ella, puede utilizarse en una búsqueda en bases de datos para encontrar secuencias homólogas, productos de expresión que pueden analizarse para comprobar su capacidad de influencia sobre la característica de una planta. Pueden tener la capacidad de alterar la respuesta a la vernalización, época de floración, forma de la hoja y/o respuesta de evasión de sombreado de una planta. Alternativamente, se pueden detectar genotecas de ácido nucleico utilizando técnicas muy conocidas por los expertos en la materia y secuencias homólogas identificadas y analizadas.

La presente invención también se extiende a un ácido nucleico que codifica un homólogo del *VRN2* que se obtiene utilizando una secuencia nucleotídica derivada de lo presentado en la presente memoria descriptiva.

ES 2 307 491 T3

La información de la secuencia para el gen *VRN2* de *Arabidopsis thaliana* permite la obtención de secuencias homólogas de otras especies de plantas. En particular, los homólogos se pueden aislar fácilmente a partir de especies relacionadas y comercialmente importantes con un requisito de vernalización o que muestran alguna respuesta a la vernalización. Incluyen todos los miembros de Brassicaceae y demás dicotiledóneas incluyendo tabaco, caña de azúcar, guisantes y apio. Las monocotiledóneas incluidas en esta categoría son los cereales arroz, trigo y cebada.

De este modo, incluidas en el alcance de la presente invención se encuentran las moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias aminoacídicas homólogas al *VRN2* de *Arabidopsis thaliana*. La homología puede darse en la secuencia nucleotídica y/o a nivel de la secuencia aminoacídica, como ya se ha analizado anteriormente. Un homólogo a partir de una especie que no sea la *Arabidopsis thaliana* codifica un producto que causa un fenotipo similar al causado por el gen *VRN2*, generalmente que incluye la capacidad de modificar la respuesta a la vernalización, época de floración, forma de la hoja y/o respuesta de evasión de sombreado en una planta como en la *Arabidopsis thaliana*. Además, los mutantes, derivados o alelos de estos genes pueden haber alterado (es decir, aumentado o disminuido) la actividad o capacidad en comparación con el gen silvestre.

Los homólogos del gen *VRN2* también se pueden identificar a partir de plantas de cosechas monocotiledóneas económicamente importantes, incluyendo los cereales arroz, trigo y cebada. Aunque los genes que codifican la misma proteína en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas muestran relativamente poca homología a nivel de nucleótidos, se conservan las secuencias aminoacídicas. Por lo tanto, es posible utilizar las bases de datos de secuencias públicas para identificar secuencias de clones de cADN de *Arabidopsis*, arroz o maíz que se obtuvieron en programas de secuenciación aleatoria y que comparten la homología con el gen de interés, como ha ocurrido con otros genes aislados a partir de *Arabidopsis* (por ejemplo CO; WO 96/14414). Por supuesto, los mutantes, derivados y alelos de estas secuencias se incluyen en el alcance de la presente invención en los mismos términos analizados anteriormente para el gen *VRN2* de *Arabidopsis thaliana*.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la identificación o un método para la clonación de un homólogo del *VRN2*; por ejemplo, a partir de una especie que no sea *Arabidopsis thaliana*, el método que emplea una secuencia nucleotídica derivada de cualquiera de los métodos presentados en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, dicho método puede emplear un oligonucleótido o oligonucleótidos que comprenden o están formados por una secuencia o secuencias conservadas entre o que codifican una secuencia o secuencias conservadas entre las secuencias de las figuras 8a u 8b o una secuencia o secuencias conservadas entre las secuencias del identificador de secuencia N°: 2 y el identificador de secuencia N°: 5 o secuencias de codificación del identificador de secuencia N°: 1 y el identificador de secuencia N°: 4, para buscar homólogos. De este modo, se proporciona un método para la obtención de ácido nucleico, que comprende la hibridación de un oligonucleótido o una molécula de ácido nucleico que comprende dicho oligonucleótido hacia un ácido nucleico diana/candidato. El ácido nucleico diana o candidato puede, por ejemplo, estar comprendido por una genoteca de cADN o una genómica que se obtiene a partir de un organismo que se sabe o se cree que contiene dicho ácido nucleico, ya sea monocotiledóneo o dicotiledóneo. Se puede identificar una hibridación con éxito y el ácido nucleico diana/candidato aislado para una mayor investigación y/o uso.

La hibridación puede incluir un estudio con sondas del ácido nucleico y la identificación de una hibridación positiva en condiciones adecuadamente restrictivas (según las técnicas conocidas) y/o uso de oligonucleótidos como cebadores en un método de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena por la polimerasa. Para el caso de los estudios con sondas, las condiciones preferentes son aquéllas que son tan restrictivas como para que haya una trama simple con un número reducido de hibridaciones identificadas como positivas, que se pueden investigar más adelante. Es muy conocido en la técnica el hecho de aumentar el rigor de la hibridación gradualmente hasta que sólo resten pocos clones positivos.

Por ejemplo, se puede realizar una detección inicialmente en condiciones con una temperatura de aproximadamente 37°C o más, una concentración de formamida de aproximadamente menos de 50% y una concentración de sal de moderada a baja (por ejemplo, citrato salino estándar (“SSC”, por sus siglas en inglés) = 0,15 M de cloruro de sodio; 0,15 M de citrato de sodio; pH 7).

Alternativamente, una temperatura de aproximadamente 50°C o más y una alta concentración de sal (por ejemplo, “SSPE” = 0,180 M de cloruro de sodio; 9 mM de fosfato de hidrógeno disódico; 9 mM de dihidrógeno-fosfato de sodio; 1 mM de EDTA de sodio; pH 7.4). Preferentemente, la detección debe realizarse a aproximadamente 37°C, una concentración de formamida de aproximadamente el 20% y una concentración de sal de aproximadamente 5 X SSC o una temperatura de aproximadamente 50°C y una concentración de sal de aproximadamente 2 X SSPE. Estas condiciones permitirán la identificación de secuencias que tienen un grado sustancial de homología (similitud, identidad) con la secuencia de sonda, sin necesidad de la homología perfecta para la identificación de un híbrido estable.

Las condiciones adecuadas incluyen, por ejemplo para la detección de secuencias que son aproximadamente 80-90% idénticas, la hibridación durante la noche a 42°C en 0,25M de Na₂HPO₄; pH 7,2; 6,5% de SDS; 10% de sulfato de dextrano y un lavado final a 55°C en 0,1X de SSC; 0,1% de SDS. Para la detección de secuencias que son aproximadamente más del 90% idénticas, las condiciones adecuadas incluyen la hibridación durante la noche a 65°C en 0,25M de Na₂HPO₄; pH 7,2; 6,5% de SDS; 10% de sulfato de dextrano y un lavado final a 60°C en 0,1X de SSC; 0,1% de SDS.

ES 2 307 491 T3

Una alternativa es una solución de 5x de SSPE (final 0,9 M de NaCl; 0,05M de fosfato sódico; 0,005M de ácido de tetraacetato de etilendiamina (EDTA); pH 7,7), 5X de solución de Denhardt; 0,5% de SDS (dodecilsulfato de sodio), a 65°C durante la noche, (para un alto rigor, secuencias muy similares) o 50°C (para un bajo rigor, secuencias menos similares). Los lavados deben realizarse con 0,2x de SSC/0,1% de SDS a 65°C para lograr un alto rigor.
5 Alternativamente, a 50-60°C en 1x de SSC/0,1% de SDS para bajo rigor.

La presente invención se extiende al ácido nucleico que se hibrida selectivamente en alto rigor con el ácido nucleico identificado en este documento.

10 Como una alternativa a los estudios con sondas (aunque todavía emplean la hibridación del ácido nucleico), los oligonucleótidos diseñados para amplificar las secuencias de ADN se pueden utilizar en reacciones PCR u otros métodos que incluyen la amplificación del ácido nucleico, utilizando procedimientos de rutina. Consulte por ejemplo "PCR protocols; A Guide to Methods and Applications", Eds. Innis y col, 1990, Academic Press, New York.

15 Las secuencias de aminoácidos preferentes adecuadas para su uso en el diseño de sondas o cebadores de PCR para algunos propósitos son secuencias conservadas (completamente, sustancialmente o parcialmente) entre la secuencia del VRN2 y, al menos, otra de las secuencias de la figura 8a u 8b.

Los cebadores preferentes para la amplificación de regiones conservadas del VRN2 para su uso como sondas para obtener clones de cADN pueden incluir los siguientes:

20 Cebadores VRN2-AI y VRN2-AJ que, en RT-PCR, amplifican un fragmento de 1583 bp que contiene el marco de lectura abierto del VRN2 completo y porciones de las secuencias no traducidas a 5' y 3'.

25 Cebadores VRN2-AP y VRN2-AJ que, en RT-PCR, amplifican un fragmento de 781 bp que incluye la región ácida conservada.

Cebadores VRN2-AO y VRN2-AS que, en RT-PCR, amplifican un fragmento de 493 bp que incluye el motivo de dedos de zinc y la segunda señal de localización nuclear (NLS).

30 Cebadores VRN2-AI y VRN2-AJ del ADN genómico, que amplifican un producto de 3605 bp que incluye la mayor parte del gen VRN2, a excepción del promotor y las regiones a 3' (es decir, que incluye las mismas regiones que el par VRN2-AI/AJ anteriormente, pero con intrones, lo que útil para la hibridación a un ADN genómico, pero no tanto para un ADNc).

35 Teniendo en cuenta la información sobre secuencias aminoacídicas, se pueden diseñar sondas o cebadores de oligonucleótidos, considerando la degeneración del código genético y, cuando sea apropiado, el uso de codones del organismo del que deriva el ácido nucleico candidato.

40 Preferentemente, un oligonucleótido según ciertas formas de realización de la invención (por ejemplo, para el uso en la amplificación de ácido nucleico) está formado por hasta 50 nucleótidos, aproximadamente 40 nucleótidos, aproximadamente 30 o menos nucleótidos de longitud (por ejemplo: 18, 21 ó 24).

45 La valoración de que si dicho producto de la PCR corresponde o no a un gen homólogo se puede realizar de diversas maneras. Una banda de la PCR puede contener una mezcla compleja de productos. Los productos individuales se pueden clonar y detectar cada uno de ellos individualmente. Se pueden analizar mediante transformación para valorar la función o introducción en una planta de interés.

50 Como se indicó, el ácido nucleico según la presente invención se obtiene utilizando oligonucleótidos, diseñados en base a la información de las secuencias proporcionada en este documento, como sondas o cebadores. El ácido nucleico aislado y/o purificado a partir de una o más células de una planta (consulte anteriormente) o una genoteca de ácidos nucleicos derivados de un ácido nucleico aislado y/o purificado a partir de la planta (por ejemplo, una genoteca de cADN derivada del ARNm aislado de la planta) puede ser sometido a sondas en condiciones para una hibridación selectiva y/o sujeto a una reacción de amplificación específica del ácido nucleico como la reacción en cadena por la polimerasa (PCR). El ácido nucleico sometido a sonda o utilizado como plantilla en la reacción por amplificación puede ser un ADN, ADNc o ARN genómicos. En caso de ser necesario, se pueden ligar uno o más fragmentos de genes para .generar una secuencia codificadora completa.

60 Los cebadores de la PCR derivados de las secuencias del VRN2 desvelados en la presente memoria descriptiva se pueden analizar fácilmente en busca de su especificidad para la amplificación del ácido nucleico según la presente invención, utilizando plantillas de ADN y RT-PCR genómicos. La clonación y posterior secuenciación de productos de la PCR se pueden utilizar para indicar la amplificación del fragmento del gen derivado esperado. Los clones de cADN completos se pueden obtener como lo describe la tecnología RACE a 5' y 3' si los productos de la RT-PCR se utilizan como plantillas.

65 Diversos aspectos de la presente invención incluyen el ácido nucleico que se puede obtener, los métodos para la detección de material (por ejemplo un lisado celular), preparaciones de ácidos nucleicos, para la presencia del ácido nucleico de interés, métodos para la obtención del ácido nucleico y los cebadores y las combinaciones de los cebadores adecuados.

ES 2 307 491 T3

La información sobre las secuencias proporcionadas en la presente memoria descriptiva también permite el diseño de pruebas de diagnóstico para la determinación de la presencia de un gen específico o alelo del mismo en cualquier planta, cultivo, variedad, población, raza, parte de una familia u otra selección en un programa de reproducción u otro tipo de genotipo. Una prueba de diagnóstico se puede basar en la determinación de la presencia o ausencia de un alelo particular por medio de la determinación de un ácido nucleico o polipéptido.

A nivel del ácido nucleico, esto puede incluir la hibridación de un oligo o polinucleótido adecuado como un fragmento del gen o un homólogo del mismo, incluyendo cualquier homólogo desvelado en este documento o cualquier alelo particular, como puede ser un alelo que proporciona un fenotipo deseado o el alelo desvelado en la presente memoria descriptiva. La hibridación puede incluir una PCR diseñada para amplificar un producto a partir de una versión alélica del gen, con una posterior detección de un producto amplificado mediante diversos métodos incluyendo, pero no limitándose a, electroforesis en gel, electroforesis capilar, hibridación directa de las sondas de las secuencias nucleotídicas, etc. Una prueba de diagnóstico se puede basar en la PCR diseñada para amplificar varios alelos o cualquier alelo a partir del locus correspondiente, con una prueba para distinguir los posibles alelos diferentes por medio de diversos métodos posibles, incluyendo el tamaño del fragmento del ADN, la modificación del centro de restricción (por ejemplo, CAPS - sitios polimórficos amplificados y escindidos), etc. Una prueba de diagnóstico también se puede basar en un gran número de posibles variantes de análisis de ácidos nucleicos que son evidentes para los expertos en la materia, como por ejemplo el uso de una secuencia sintética como sonda de hibridación.

En términos generales, los métodos se dividen en los que se utilizan para detectar la presencia de secuencias nucleotídicas y los que se utilizan para detectar la presencia o ausencia de un polipéptido. Los métodos utilizan muestras biológicas de una o más plantas o células que se cree que contienen las secuencias nucleotídicas o polipéptido.

Ejemplos de enfoques para la detección de ácido nucleico o polipéptidos incluyen el análisis de una muestra de la planta o célula de la planta mediante:

(a) La comparación de la secuencia del ácido nucleico en la muestra con toda o parte de una secuencia nucleotídica que se presenta en este documento para determinar si la muestra contiene una mutación.

(b) La determinación de la presencia en la muestra de un polipéptido que incluye una secuencia aminoacídica del VRN2 que se presenta en este documento o un fragmento del mismo y, en caso de estar presente, la determinación de si el polipéptido está completo y/o mutado y/o si está expresado a un nivel normal.

(c) La realización de una obtención de la huella genética del ADN para comparar la trama de restricción producida cuando una enzima de restricción corta el ácido nucleico de la muestra con la trama de restricción obtenida a partir de una secuencia nucleotídica presentada en este documento o a partir de un mutante, alelo o variante de la misma conocidos.

(d) El contacto con la muestra mediante un miembro de unión específico capaz de unirse al ácido nucleico que incluye la secuencia nucleotídica que se establece en este documento, un fragmento de la misma o un mutante, alelo o variante de la misma, el miembro de unión específico que incluye el ácido nucleico que se puede hibridar con una secuencia del VRN2 o un polipéptido que incluye un dominio de unión con la especificidad para el ácido nucleico que incluye una secuencia del VRN2 o polipéptido codificado por él o una forma mutada de la misma y la determinación de la unión del miembro de unión específico.

(e) La realización de una PCR con uno o más cebadores basándose en la secuencia nucleotídica que se presenta en este documento para detectar la muestra para el ácido nucleico que incluye la secuencia nucleotídica del identificador de secuencia N°: 1 o el identificador de secuencia N° 4 o un mutante, alelo o variante de la misma.

Cuando se intenta detectar un ácido nucleico del alelo del VRN2, el ácido nucleico de la muestra se amplificará inicialmente (por ejemplo mediante una PCR) para aumentar la cantidad del analito en comparación con las demás secuencias presentes en la muestra. Lo que permite la detección de las secuencias diana con un alto grado de sensibilidad si están presentes en la muestra. Este paso inicial se puede evitar utilizando técnicas de matrices altamente sensibles, que cada día son más importantes en la técnica.

Una forma variante del gen puede contener una o más inserciones, supresiones, sustituciones y/o adiciones de uno o más nucleótidos en comparación con la secuencia silvestre que puede o no interrumpir o alterar la función del gen. Las diferencias a nivel del ácido nucleico no se ven necesariamente reflejadas por una diferencia en la secuencia aminoacídica del polipéptido codificado. Sin embargo, una mutación u otra diferencia en un gen puede provocar una modificación en la pauta o codón finalizador, lo que podría afectar gravemente la naturaleza del polipéptido producido (en caso de existir) o una mutación puntual o cambio en la mutación voluminosa del polipéptido codificado, incluyendo la inserción, supresión, sustitución y/o adición de uno o más aminoácidos o regiones del polipéptido. Una mutación en una secuencia del promotor u otra región regulatoria puede prevenir o reducir la expresión a partir del gen o afectar el procesamiento o estabilidad de la transcripción del ARNm.

Las pruebas se pueden realizar en preparaciones con ADN, ADNc y/o ARNm genómicos. Las pruebas en el ADNc o ARNm tienen la ventaja de la reducción de la complejidad del ácido nucleico por la ausencia de secuencias de intrones, pero la posible desventaja del tiempo y esfuerzo extra que se necesitan para realizar las preparaciones. El ARN es más difícil de manipular que el ADN debido a su amplia aparición de ribonucleasas.

ES 2 307 491 T3

Se puede secuenciar el ácido nucleico en una muestra de prueba y la secuencia en comparación con una secuencia que se presenta en este documento para determinar si hay o no una diferencia. En caso de haberla, la diferencia se puede comparar con los alelos conocidos para determinar si el ácido nucleico de la prueba contiene una o más de las variaciones indicadas o la diferencia se puede investigar para la asociación con un fenotipo deseado.

El ácido nucleico amplificado se puede secuenciar luego como se indicó anteriormente y/o analizar de otra forma para determinar la presencia o ausencia de una característica particular. El ácido nucleico para las pruebas se puede preparar a partir de un ácido nucleico extraído de células o en una genoteca con diversas técnicas como por ejemplo la digestión de enzimas de restricción y electroforesis.

El ácido nucleico se puede detectar utilizando una sonda específica de la variante o alelo. Dicha sonda corresponde en secuencia a la región del gen (o su complemento) que contiene una alteración de la secuencia conocida por estar asociada con la alteración de la capacidad para afectar la respuesta a la vernalización, época de floración, forma de la hoja y/o respuesta de evasión de sombreado. En condiciones adecuadamente restrictivas, una hibridación específica de dicha sonda para el ácido nucleico de la prueba está indicando la presencia de la alteración de la secuencia en el ácido nucleico de la prueba. Para propósitos de detección eficaz, se pueden utilizar más de una sonda en la misma muestra de la prueba.

Los oligonucleótidos específicos del alelo o de la variante se pueden utilizar del mismo modo en la PCR para amplificar específicamente las secuencias particulares si estuvieran presentes en la muestra de la prueba. La valoración de si una banda de la PCR contiene una variante del gen se puede realizar de diversas maneras conocidas para los expertos en la materia. El producto de la PCR, por ejemplo, se puede tratar de forma tal que permita presentar la mutación o polimorfismo en un gel de secuenciación del ADN de poliácridamida desnaturalizante, con bandas específicas que están ligadas a las variantes del gen seleccionado.

Una alternativa o complemento para la búsqueda de la presencia de secuencias de variantes en una muestra de la prueba es buscar la presencia de la secuencia normal; por ejemplo, utilizando una sonda o cebador de oligonucleótidos específicos.

Se pueden emplear enfoques que se basan en la hibridación entre una sonda y un ácido nucleico de prueba y la posterior detección de un malapareamiento. En condiciones apropiadas (temperatura, pH, etc.), una sonda de oligonucleótidos se podrá hibridar con una secuencia que no es totalmente complementaria. El grado de apareamiento de bases entre las dos moléculas será suficiente para que se fijen a pesar de un malapareamiento. Los distintos enfoques son muy conocidos en la técnica para la detección de la presencia de un malapareamiento entre dos moléculas de ácido nucleico de fijación.

Por ejemplo, la ribonucleasa pancreática en el sitio de un malapareamiento. Se puede detectar una escisión mediante un ácido nucleico de prueba de electroforesis al que se ha fijado la sonda correspondiente y está en busca de moléculas más pequeñas (es decir, moléculas con movilidad electroforética mayor) que el híbrido de la sonda/prueba completas. Otros enfoques se basan en el uso de enzimas como por ejemplo resolvasas o endonucleasas.

De esta manera, una sonda de oligonucleótidos tiene la secuencia de una región del gen normal (ya sea una cadena homosenrido o anti-homosenrido) en la que las mutaciones asociadas con los fenotipos particulares que ocurren se fijan al ácido nucleico de prueba y la presencia o ausencia de un malapareamiento determinado. La detección de la presencia de un malapareamiento puede indicar la presencia de una mutación en el ácido nucleico de la prueba. Por otro lado, una sonda de oligonucleótidos que tiene la secuencia de una región del gen que incluye una mutación se puede fijar al ácido nucleico de la prueba y la presencia o ausencia de un malapareamiento determinado. La presencia de un malapareamiento puede indicar que el ácido nucleico en una muestra de prueba tiene la secuencia normal o un mutante o secuencia de alelos diferentes. En ambos casos, se puede utilizar diversas sondas para las diferentes regiones del gen.

La presencia de diferencias en la secuencia de las moléculas de ácido nucleico se puede detectar por medio de la digestión de una enzima de restricción, como en el método de obtención de la huella genética del ADN en el que la trama de restricción producida cuando una o más enzimas de restricción se utilizan para cortar una muestra del ácido nucleico se compara con la trama obtenida cuando una muestra que contiene el gen normal o una variante o alelo se digiere con la misma enzima o enzimas.

También se puede valorar la presencia o ausencia de una lesión en un promotor u otra secuencia regulatoria mediante la determinación del nivel de producción de ARNm mediante transcripción o el nivel de la producción de polipéptidos mediante la traducción del ARNm.

El ácido nucleico aislado y/o purificado a partir de una o más células de una planta o una genoteca de ácidos nucleicos derivados de un ácido nucleico aislado y/o purificado a partir de células (por ejemplo, una genoteca de cADN derivada del ARNm aislado de las células) puede ser sometido a sondas en condiciones para una hibridación selectiva y/o sujeto a una reacción de amplificación específica del ácido nucleico como la reacción en cadena por la polimerasa (PCR).

Un método puede incluir la hibridación de una o más (por ejemplo, dos) sondas o cebadores a un ácido nucleico diana. Cuando el ácido nucleico tiene DNA bicatenario, la hibridación estará generalmente precedida de una desnaturalización para producir un DNA monocatenario. La hibridación puede formar parte del procedimiento de la PCR o formar parte del procedimiento de estudios con sondas que no participan de la PCR. Un procedimiento de ejemplo es una combinación de la PCR y la hibridación de bajo rigor. Un procedimiento de detección, seleccionado de los tantos disponibles para los expertos en la materia, se utiliza para identificar los eventos de hibridaciones con éxito y para aislar el ácido nucleico sometido a hibridación.

La unión de una sonda al ácido nucleico diana (por ejemplo, ADN) se puede medir utilizando una de las diversas técnicas a disposición de los expertos en la materia. Por ejemplo, las sondas se pueden marcar de forma radiactiva, fluorescente o enzimática. Otros métodos que no emplean el marcado de una sonda incluyen el examen de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción, amplificación con la PCR, escisión de la ribonucleasa y estudios con sondas en oligonucleótidos específicos del alelo.

Los estudios con sondas pueden empezar la técnica estándar de hibridación tipo Southern. Por ejemplo, el ADN se puede extraer a partir de células y digerirse con diferentes enzimas de restricción. Los fragmentos de restricción se pueden separar luego mediante electroforesis en un gel de agarosa, antes de la desnaturalización y transferencia a un filtro de nitrocelulosa. La sonda marcada se puede hibridar a los fragmentos de ADN en el filtro y se puede determinar la unión. El ADN para los estudios con sondas se puede preparar a partir de preparaciones del ARN de células.

Se pueden realizar experimentos preliminares mediante la hibridación, en condiciones de bajo rigor, de diversas sondas en transferencias Southern del ADN digerido con las enzimas de restricción. Se pueden lograr condiciones adecuadas si se obtiene un gran número de fragmentos de hibridación mientras que la hibridación de fondo sea baja. En estas condiciones, se pueden buscar genotecas de ácidos nucleicos; por ejemplo, genotecas de cADN representantes de secuencias expresadas.

Como se indicó, los expertos en la materia pueden emplear condiciones adecuadas del rigor deseado para la hibridación selectiva, tomando en cuenta factores como la longitud de los oligonucleótidos y la composición de la base, la temperatura, etc.

En algunas formas de realización preferentes de ensayos de diagnóstico según la presente invención, los oligonucleótidos según la presente invención que son fragmentos de cualquiera de las secuencias presentadas en este documento o cualquier alelo asociado con un fenotipo deseado son, al menos, aproximadamente 10 nucleótidos de longitud, más preferentemente al menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud, más preferentemente al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, más preferentemente aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. Dichos fragmentos representan individualmente los aspectos de la presente invención. Los fragmentos y demás oligonucleótidos se pueden utilizar como cebadores o sondas según lo analizado, pero también se pueden generar (por ejemplo, mediante PCR) en métodos relacionados con la determinación de la presencia en una muestra de la prueba de una secuencia que indica un fenotipo deseado.

Hay diversos métodos para la determinación de la presencia o ausencia en una muestra de la prueba de un polipéptido particular, como un polipéptido que incluye la secuencia aminoacídica presentada en el identificador de secuencia N°: 2 o el identificador de secuencia N° 5 o una secuencia aminoacídica, mutante, variante o alelo de la misma.

Se puede analizar una muestra en busca de la presencia de un integrante de la unión para un miembro específico de la unión, como un anticuerpo (o mezcla de anticuerpos), específico para uno o más variantes particulares de un polipéptido presentado en la presente memoria descriptiva.

En dichos casos, la muestra se puede analizar en contacto con un miembro de unión específico como un anticuerpo en condiciones apropiadas para una unión específica, antes de la determinación de la unión, por ejemplo utilizando un sistema de informe, según lo analizado. Cuando se utiliza un panel de anticuerpos, se pueden emplear diferentes marcas de informe para cada anticuerpo para que la unión pueda determinarse.

Se puede utilizar un miembro específico de unión como un anticuerpo para aislar y/o purificar su polipéptido integrante de unión a partir de una muestra de la prueba, para permitir la secuencia y/o análisis bioquímico del polipéptido para determinar si tiene la secuencia y/o propiedades del polipéptido silvestre o un mutante, variante o alelo particular del mismo. La secuencia aminoacídica es un procedimiento rutinario en la técnica que utiliza máquinas de secuenciación automáticas.

El uso de pruebas de diagnóstico para los alelos permite que el investigador u obtentor de plantas establezcan, con total confianza e independientemente de las pruebas bioquímicas que tanto tiempo llevan, si un alelo deseado está presente o no en la planta de interés (o una célula de la misma), si la planta es un representante de un grupo de otras plantas genéticamente idénticas (por ejemplo, una variedad de la familia o cultivo) o un individuo en una muestra de plantas relacionadas (por ejemplo, selección de obtentores) o no relacionadas.

En un esquema de reproducción basado en la selección y autofecundación de individuos deseados, los diagnósticos de ácidos nucleicos o polipéptidos para el alelo o alelos deseados en un alto rendimiento, ensayos de bajo coste según lo proporcionado por esta invención, selección fiable para XXXX se puede realizar en las primeras generaciones y en

ES 2 307 491 T3

más material que, de otros modos, no sería posible. Esta ganancia en la fiabilidad de la selección más el tiempo que se ahorra pudiendo analizar el material en las primeras etapas y sin una detección del fenotipo costosa es de gran valor para la reproducción de plantas.

5 La determinación basándose en ácidos nucleicos de la presencia o ausencia de uno o más alelos deseados se puede combinar con la determinación del genotipo del ADN genómico ligado flanqueador y otro ADN genómico no ligado utilizando grupos de marcadores establecidos como RFLP, microsatélites o SSR, AFLP, RAPD, etc. Lo que permite que el investigador u obtentor de plantas seleccione para no sólo la presencia del alelo deseado sino para la planta individual o familias de plantas con las combinaciones más deseadas de fondo genético ligado o no. Dichas
10 recombinaciones de material deseado puede darse sólo en muy pocas ocasiones en una población de reproducción de segregación o progenie de retrocruzamiento. El ensayo directo del locus según la presente invención permite al investigador hacer un enfoque en diluciones sucesivas para fijar (haciendo homocigotos) la combinación deseada de marcadores y alelos flanqueadores, en primer lugar identificando los individuos fijados por un marcador flanqueador y, luego, identificando la progenie fijada en la otra parte del locus, sabiendo todo el tiempo con total confianza que el
15 alelo deseado está aún presente.

La presente divulgación proporciona suficiente información para una persona experta en la materia para que pueda obtener una secuencia de ADN genómico para un alelo nuevo o existente y crea un ensayo de diagnóstico basado en ácidos nucleicos y/o polipéptidos adecuados. En el diseño de un ensayo con ácidos nucleicos se tiene en cuenta la
20 modificación distintiva en la secuencia que caracteriza el alelo variante particular.

El ácido nucleico según la invención puede incluir una secuencia nucleotídica que codifica un producto que participa en la respuesta a la vernalización, época de floración, forma de la hoja y/o respuesta de evasión de sombreado. La reducción o el aumento del nivel de expresión se puede utilizar para manipular dicha característica en una planta. Lo
25 que puede incluir la regulación homosentido o anti-homosentido, analizada más adelante.

El ácido nucleico según la invención, como por ejemplo el gen VRN2 o un homólogo, se puede colocar bajo el control de un promotor del gen inducible externamente para colocar la expresión bajo el control del usuario. Una ventaja de la introducción de un gen heterólogo en una célula de una planta, particularmente cuando la célula está
30 formada en una planta, es la capacidad para colocar la expresión del gen bajo el control de un promotor de elección, a fin de ser capaz de influenciar la expresión del gen y, por lo tanto, la respuesta a la vernalización, época de floración, forma de la hoja, respuesta de evasión de sombreado y/o otra característica, según la preferencia. Además, se pueden utilizar mutantes y derivados del gen silvestre; por ejemplo, con una mayor o menor actividad que el silvestre en lugar del gen endógeno.

35 En la presente invención, la sobreexpresión se puede lograr mediante la introducción de la secuencia nucleotídica en una orientación homosentido. De este modo, la presente invención proporciona un método para influenciar una característica física de una planta, el método que causa o permite la expresión del producto (transcripción de polipéptidos o ácidos nucleicos) codificado por un ácido nucleico heterólogo según la invención a partir del ácido nucleico en las células de la planta.

El descenso del nivel de regulación de la expresión de un gen diana se puede lograr utilizando tecnología anti-homosentido o "regulación homosentido" ("cosupresión").

45 Al utilizar genes anti-homosentido o secuencias de genes parciales para descender el nivel de regulación de la expresión del gen, se coloca una secuencia nucleotídica bajo el control de un promotor en una "orientación contraria" como la de las producciones de transcripción del ARN que se complementario al ARNm normal transcrito a partir de una cadena "homosentido" del gen diana. Consulte, por ejemplo, Rothstein y col, 1987; Smith y col, (1988) Nature 334, 724-726; Zhang y col, (1992) The Plant Cell 4, 1575-1588, English y col., (1996) The Plant Cell 8, 179-188.
50 La tecnología anti-homosentido también se analiza en Bourque, (1995), Plant Science 105, 125-149 y Flavell, (1994) PNAS E.UU. 91, 3490-3496.

Una alternativa es utilizar una copia de todo o parte del gen diana introducido en homosentido, que es la misma orientación que la del gen diana, para alcanzar la reducción de la expresión del gen diana mediante cosupresión. Consulte, por ejemplo, van der Krol y col., (1990) The Plant Cell 2, 291-299; Napoli y col., (1990) The Plant Cell 2, 279-289; Zhang y col., (1992) The Plant Cell 4, 1575-1588 y EE.UU.-5,231,020.

La secuencia completa correspondiente a la secuencia codificadora (en orientación contraria para el anti-homosentido) no se necesita utilizar. Por ejemplo, se pueden utilizar fragmentos de suficiente longitud. Es una cuestión rutinaria para la persona experta en la materia la detección de fragmentos de diversos tamaños y de diversas plantas de la secuencia codificadora para optimizar el nivel de la inhibición anti-homosentido. Puede ser ventajoso incluir el codón ATG de metionina iniciador y, tal vez, uno o más nucleótidos en dirección 5' del codón iniciador. Otra posibilidad es dirigirse a una secuencia conservada de un gen; por ejemplo, una secuencia que es característica de uno o más genes, como una secuencia regulatoria.

65 La secuencia empleada puede ser de aproximadamente 500 nucleótidos o menos, posiblemente de aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos o aproximadamente 100 nucleótidos. Puede ser posible utilizar oligonucleótidos de longitudes mucho menores, 14 a 23 nucleótidos, aun-

que los fragmentos más largos y, generalmente, aún más largos que aproximadamente 500 nucleótidos son preferentes en donde sea posible, como los más largos que 600 nucleótidos, más que aproximadamente 700 nucleótidos, más que aproximadamente 800 nucleótidos, más que aproximadamente 1000 nucleótidos o más.

5 Puede ser preferente que haya una identidad de secuencia completa en la secuencia utilizada para el descenso del nivel de regulación de la expresión de una secuencia diana y la secuencia diana, aunque tenga una complementariedad o similitud totales a la secuencia, no es esencial. Uno o más nucleótidos pueden diferir en la secuencia utilizada a partir del gen diana. De este modo, una secuencia empleada en un descenso del nivel de regulación de la expresión del gen según la presente invención puede ser una secuencia silvestre (por ejemplo, un gen) seleccionada a partir de aquéllas
10 disponibles o un mutante, derivado, variante o alelo, mediante la inserción, adición, supresión o sustitución de uno o más nucleótidos de dicha secuencia. No es necesario incluir la secuencia en un marco de lectura abierto o especificar un ARN que se pueda traducir. Puede ser preferente si hay suficiente homología para hibridar las moléculas de ARN homosen­tido y anti-homosen­tido respectivas. Puede haber una regulación a la baja de la expresión del gen incluso si hay aproximadamente 5%, 10%, 15% o 20% o más malapareamiento entre la secuencia utilizada y el gen diana.

15 Generalmente, el ácido nucleico transcrito puede representar un fragmento de un gen o de su complemento o puede ser un mutante, derivado, variante o alelo del mismo, en términos de similitud según lo analizado anteriormente en relación a las modificaciones a la secuencia codificadora y a la homología de la secuencia alterada. La homología puede ser suficiente para que el ARN anti-homosen­tido transcrito se hibride con el ácido nucleico en las células de
20 la planta, aunque con independencia de si la hibridación tiene lugar, el efecto deseado es el el descenso del nivel de regulación de la expresión del gen.

De este modo, la presente invención también proporciona un método para modificar, afectar, alterar o modular una característica de una planta; por ejemplo, la respuesta a la vernalización, época de floración, forma de la hoja y/o
25 respuesta de evasión de sombreado, el método causa o permite la transcripción anti-homosen­tido del ácido nucleico heterólogo según la invención en las células de la planta.

La presente invención además proporciona el uso de la secuencia nucleotídica del VRN2 o un fragmento, mutante, derivado, alelo, variante u homólogo de la misma para el descenso del nivel de regulación de la expresión del gen, particularmente el descenso del nivel de regulación de la expresión de un gen VRN2 o su homólogo, preferentemente para influenciar una característica física de una planta, especialmente la respuesta a la vernalización, época de floración, forma de la hoja y/o respuesta de evasión de sombreado.
30

Cuando se introducen copias adicionales del gen diana en orientación homosen­tido, que es la misma que la del gen diana, se produce un grupo de fenotipos que incluyen los individuos en los que tiene lugar la sobreexpresión y algunos en los que tiene lugar la infraexpresión de la proteína a partir del gen diana. Cuando el gen introducido es sólo parte del gen endógeno, el número de individuos sometidos a la sobreexpresión en la población transgénica aumenta. El mecanismo mediante el cual tiene lugar la regulación homosen­tido, particularmente el descenso del nivel de regulación, no se entiende claramente. Sin embargo, hay muy buenos informes sobre esta técnica en publicaciones científicas y de patentes y son las que se utilizan habitualmente para el control de los genes. Consulte, por ejemplo, van der Krol y col., (1990) *The Plant Cell* 2, 291-229; Napoli y col., (1990) *The Plant Cell* 2, 279-289; Zhang y col., 1992 *The Plant Cell* 4, 1575-1588.
35

Una vez más, los fragmentos, mutantes, etc. pueden utilizarse en términos similares como se describe anteriormente para su uso en la regulación anti-homosen­tido.
45

De este modo, la presente invención también proporciona un método para influenciar una característica de una planta; por ejemplo, la respuesta a la vernalización, época de floración, forma de la hoja y/o respuesta de evasión de sombreado, el método causa o permite la expresión del ácido nucleico según la invención en las células de la planta. Lo que se puede utilizar para suprimir la actividad de un producto con capacidad para influenciar la respuesta a la vernalización, época de floración, forma de la hoja y/o respuesta de evasión de sombreado. En este caso, la actividad del producto se suprime preferentemente como resultado de la infraexpresión en las células de la planta.
50

Aspectos y realizaciones de la presente invención se representarán ahora, a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas.
55

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra el número total de hojas (roseta más caulina) de plantas LER (cuadrados), plantas *fca-1* (diamantes) y plantas *vrn2-1 fca-1* (círculos) después de varios periodos de vernalización (medidos en días).
60

La figura 2 ilustra el fenotipo de la planta con iluminación con luz roja y luz roja lejana:

La figura 2A muestra el área de la hoja más grande de LER, plantas *fca-1* y *vrn2-1 fca-1* cultivadas bajo luz blanca (W) (barras abiertas) o luz blanca con luz roja lejana complementaria (W + FR) (barras sombreadas).
65

La figura 2B muestra el número de hoja de la roseta en la floración de plantas tratadas como en el experimento cuyos resultados se muestran en la figura 2A.

ES 2 307 491 T3

La figura 3 ilustra los resultados del mapeo genético y físico del VRN2 en *Arabidopsis thaliana*.

La figura 4 ilustra los cósmidos y genes cercanos al VRN2 en el genoma de *Arabidopsis*.

5 La figura 5 ilustra la estructura del gen VRN2 de *Arabidopsis*, la eliminación de intrones del ADNc 5K y la posición y naturaleza de la mutación del *vrn2-1*. Los exones se muestran como cajas abiertas. Las regiones no traducidas se muestran como cajas sombreadas. Los intrones se muestran como líneas.

10 La figura 6 muestra la secuencia del ADNc del VRN2, incluyendo la secuencia codificadora y la secuencia aminoacídica prevista de la proteína codificada. Las NLS putativas se colocan en cajas, el dominio de activación ácido putativo se subraya. El motivo del dedo de zinc putativo tiene un doble subrayado. Las posiciones de los intrones se indican con flechas. La posición de la mutación del *vrn2-1* mutation se encuentra en un círculo.

15 La figura 7 ilustra el marcador dCAPS para la mutación del *vrn2-1*. Un marcador CAPS derivado de un diagnóstico (dCAPS) se designó para la mutación del *vrn2-1*. Esto utiliza un cebador (VRN2-AZ) que incluye la mitad del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción XmnI, la otra mitad se suministra, específicamente, mediante la secuencia de la mutación del *vrn2-1*. Esto resulta en una digestión de restricción con éxito sólo si se utiliza un ADN genómico amplificado de la reacción en cadena por la polimerasa a partir de mutantes del *vrn2-1* como molde.

20 La figura 8 muestra la alineación de la secuencia aminoacídica del VRN2 de *Arabidopsis* con similares proteínas.

La figura 8A alinea la proteína del VRN2 de longitud total con otras cuatro proteínas, usando el método Clustal con la tabla de pesos residual PAM250, realizada el 17 de enero de 1999 a las 19:19 GMT.

25 La figura 8B alinea la región de dedos de zinc, usando el método Clustal con la tabla de pesos residual PAM250, realizada el 17 de enero de 1999 a las 19:25 GMT.

Abreviaturas

30 En *Arabidopsis thaliana*, *Sc Saccharomyces cerevisiae*, *Sp Schizosaccharomyces pombe*, *Ce Caenorhabditis elegans*, *Dm Drosophila melanogaster*, *Hs Homo sapiens*, *Mm Mus musculus*, *Rn Rattus norvegicus*, *Xm Xiphophorus maculatus*.

Lista de secuencias

- 35 1 ADNc del VRN2 de Landsberg erecta
2 Aminoácido del VRN2 de Landsberg erecta
40 3 Genómico del VRN2 de Landsberg erecta
4 ADNc del VRN2 de Columbia
5 Aminoácido del VRN2 de Columbia
45 6 Genómico del VRN2 de Columbia
7 ADNc 5K (Columbia, eliminación de intrones aberrante)
50 8 Aminoácido 5K (Columbia, eliminación de intrones aberrante)
9 ADNc del C72616 EST (modificado)
10 Aminoácido del C72616 EST (modificado)
55 11 ADNc del AI163743 EST (modificado)
12 Aminoácido del AI163743 EST (modificado)
60 13 ADNc del At Hyp 2245035 (ATFCA7_4) (modificado)
14 Aminoácido del At Hyp 2245035 (ATFCA7_4) (modificado)
65 15 ADNc del KIAA0160
16 Aminoácido del KIAA0160

ES 2 307 491 T3

Secuencias adicionales incluidas en las figuras:

- 17 Aminoácido de dedos de zinc del VRN2 de Landsberg erecta
- 5 18 Aminoácido de dedos de zinc 1 del At Di19 S51478
- 19 Aminoácido de dedos de zinc 2 del At Di19 S54178
- 20 Aminoácido de dedos de zinc del At SUP U38946
- 10 21 Aminoácido de dedos de zinc del At Hyp 2191171
- 22 Aminoácido de dedos de zinc del At Hyp 3377806
- 15 23 Aminoácido de dedos de zinc del Sc Pep7 91500
- 24 Aminoácido de dedos de zinc del Sc TFIIIA 730931
- 25 Aminoácido de dedos de zinc del Sp Hyp 1351713
- 20 26 Aminoácido de dedos de zinc del Ce Hyp 255942
- 27 Aminoácido de dedos de zinc del Ce Hyp 2854197
- 25 28 Aminoácido de dedos de zinc del Ce Hyp 304459
- 29 Aminoácido de dedos de zinc del Dm BRCORE-NS-Z3
- 30 Aminoácido de dedos de zinc del Dm GAGA 729556
- 30 31 Aminoácido de dedos de zinc del Dm ken 3550814
- 32 Aminoácido de dedos de zinc del Hs ATBF-1 976347
- 35 33 Aminoácido de dedos de zinc del Hs KIAA0160
- 34 Aminoácido de dedos de zinc del Hs ZNF142 3123312
- 35 Aminoácido de dedos de zinc del Mm FOG 2252814
- 40 36 Aminoácido de dedos de zinc del Mm Spalt 1296845
- 37 Aminoácido de dedos de zinc del Rn Roaz 2149792
- 45 38 Aminoácido de dedos de zinc del Xm ZF1 532083

Ejemplo 1

Caracterización y clonación del VRN de Arabidopsis Thaliana y alelos mutantes del mismo

50 *Aislamiento de mutantes del vrn2*

55 Dos alelos mutantes del *vrn2* (*vrn2-1* y *vrn2-2*) se aislaron mediante la mutagénesis de siembras de *fca-1* con EMS como se describe en Chandler y col. (Plant J (1996) 10: 637-644). el documento WO96/38560 (PCT/GB96/01332) desvela la secuencia del *fca* y los alelos mutantes y su clonación y caracterización. La línea del *vrn2-1 fca-1* usada aquí se ha retrocruzado al *fca-1* cuatro veces. Para propósitos de mapeo, se utilizó el alelo del *vrn2-1* (en el segundo retrocruzamiento).

60 *Caracterización fenotípica*

Vernalización

65 Se investigó la respuesta a la vernalización de las plantas mutantes del *vrn2* examinando su época de floración en respuesta al aumento de las duraciones del tratamiento de vernalización.

Se utilizaron condiciones estándar de vernalización. Es decir, intensidad de luz baja de $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 8 h, 5 ± 1 grado C, para periodos de variación (entre 1 y 42 días). Se observaron efectos similares en luz continua o sin luz. La temperatura es más importante.

En ausencia de un tratamiento de vernalización, las plantas mutantes del *vrn2-1 fca-1* mostraron un retraso pequeño pero homogéneo en la floración en comparación con los controles parentales (silvestre) del *fca-1* (figura 1: *vrn2-1* tiene un número de hojas más alto que el *fca-1*, un número reducido de hojas para correlacionar con una transición desde un estado vegetativo a uno reproductivo (es decir, floración). Sin embargo, después de la vernalización, esta diferencia se amplió en gran parte (figura 1). La respuesta exhibida por medio de plantas del *vrn2-1 fca-1* fue una reducción típica del 35% en el número total de hojas después de 6 semanas de vernalización en comparación con la reducción del 67% o controles del *fca-1*. También se observó un retraso en la floración, con y sin un tratamiento de vernalización, medido mediante el aumento del número de hojas, si se utilizaron los días para la floración (es decir, el día en que se vio el primer capullo).

Percepción de la luz roja/roja lejana

La respuesta a la vernalización en *Arabidopsis* se ha correlacionado positivamente con la respuesta a los diferentes índices de luz roja (R) a roja intensa (FR). Los mutantes y los ecotipos que responden fuertemente tienden a responder fuertemente a las condiciones de luz baja R:FR (Bagnall, Ann Bot (1993) 71: 75-83; Martínez-Zapater y col., Plant Physiol (1990) 92: 770-776). Esta respuesta se manifiesta típicamente en dos formas distintas: una aceleración de la época de floración (que conlleva un efecto que simula el efecto del tratamiento de vernalización) y una reducción del área de hojas (o evasión de sombreado). Se cree que esta respuesta ha evolucionado hasta permitir a las plantas adaptarse a la disponibilidad de la luz que permite a los individuos buscar luz en competición con sus vecinos.

Examinamos la capacidad de los mutantes del *vrn2-1 fca-1* de responder a las condiciones que simulan dicho entorno.

En estas condiciones, las plantas del *vrn2-1 fca-1* mostraron una marcada reducción de la respuesta de evasión de sombreado, con el área media de la hoja más grande cayendo sólo un 26%, en comparación con el 74% para el control del *fca-1* (figura 2A). Sin embargo, la mutación del *vrn2-1* no parece afectar todos los aspectos de la respuesta a la luz FR puesto que las plantas del *vrn2-1 fca-1* mostraron una aceleración de la floración similar en respuesta a la luz FR complementaria a los controles del *fca-1* (figura 2B).

Estos datos indican que el VRN2 tiene una función en la regulación de la respuesta a la luz FR y que puede mediar en los cambios específicamente del tamaño de la hoja (puesto que la época de floración sólo se ve levemente afectada) en condiciones de índices de luz R:FR bajos.

Mapeo genético

Se trazó un mapa del gen VRN2 en una población F2 derivada del cruce del *vrn2-1 fca-1* cruzado con el *fca-10*, siguiendo el procedimiento utilizado para trazar el mapa del gen VRN1 (Chandler y col. citado con anterioridad). El gen VRN2 se colocó inicialmente utilizando una población de 70 individuos F2 entre los marcadores RFLP g13683 y mi1 12 (Schmidt y col., Plant J (1996) 9: 755-765) en el brazo largo del cromosoma IV (o D), usando técnicas convencionales. La posición del mapa del VRN2 se redefinió posteriormente mediante la selección de 429 plantas F2 adicionales con un SSLP derivado del marcador g19247 (Schmidt y col., (1996) Plant J 9: 755-765) y el marcador CAPS g4539 (Parker y col., Plant Cell (1998) 9: 1-17). Posteriormente, se analizó un total de 12 plantas F2 individuales que fueron recombinantes entre g19247 y g4539 con los marcadores RFLP g13683 y CC36F6 (Bancroft y col., Weeds World 4ii:(1997)) y el marcador CAPS C18 (Parket y col., citado con anterioridad) y con dos marcadores CAPS adicionales (VRN2RS, VRN2CD) generados usando la secuencia publicada de Columbia (Bevan y col., Nature (1998) 391: 485-488) (números de acceso Z97341 y Z97342) como molde. El gen VRN2 fue localizado en una región 245 kb definida en un terminal centromérico (norte) mediante un RFLP detectado con el cósmido CC36F6 y en el terminal telomérico (sur) mediante el marcador CAPS g4539. Este intervalo se define mediante 3 plantas F2 individuales recombinantes: 1 recombinante entre VRN2 y CC36F6 y 2 recombinantes entre g4539 y VRN2 (figura 3).

Mapeo físico

El intervalo genético definido mediante CC36F6 y g4539 está casi completamente cubierto por los 3 clones BAC T1C7, I5D3 y T5O15. Los cósmidos derivados de los subclones de YAC EW16B10 en el vector binario 04541 (Bancroft y col. citado con anterioridad.) (abreviado como IB) se colocaron mediante secuenciación de terminales y se ordenaron en relación a la secuencia publicada del ecotipo de Columbia en esta región (entradas número del Genbank Z97341 y Z97342). Seleccionamos clones de cósmidos que se extendieron desde el locus complejo RPP5 hacia CC36F6 y g4539, considerando que el VRN2 no estaba dentro del locus RPP5, que comprende múltiples repeticiones de los genes pseudo-RPP5 en los ecotipos de Columbia y Landsberg (Bevan y col. citado con anterioridad).

Los cósmidos Landsberg adicionales en el vector binario 04541 que cubren la región no cubierta por los cósmidos del subclon YAC de Columbia YAC se identificaron mediante hibridación en los prospectos de BAC T1C7 y T5O15 y se alinearon según la secuenciación de terminales y en comparación con la secuencia publicada de Columbia (Bevan y col. citado con anterioridad) y con la secuencia del ecotipo de Landsberg en esta región. Se generó casi un cósmido completo de secuencias contiguas en esta región.

Simultáneamente con el aislamiento de los cósmidos, los cósmidos ordenados, comenzando con aquéllos en el terminal centromérico de las secuencias contiguas se transformaron en plantas *vrn2-1 fca-1* mediante infiltración a vacío

mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Bechtold y col., C R Acad Sci Paris (1993) 316: 1194-1199). (figura 3). La presencia del cósmido en cada línea transgénica (plantas T1) se confirmó mediante una reacción en cadena por la polimerasa de diagnóstico específica para cósmidos, que comprende un cebador específico del prospecto (correspondiente a una porción del ADN genómico de Columbia) y un cebador presente en el vector del cósmido.

Complementación de cósmidos

Se analizaron los cósmidos introducidos en las plantas *vrn2-1 fca-1* para ver su capacidad para complementar el fenotipo *vrn2*. Se cultivaron siembras T2 en tierra a partir de plantas T1 individuales que segregan resistencia a la kanamicina a un relación de 3:1 y se realizó la vernalización durante dos (en algunos experimentos tres) semanas. Luego se transfirieron las plantas a condiciones de invernadero y, después de diez días, se transplantaron en compartimientos individuales de bandejas divididas. Se determinó el número total de hojas y se clasificaron los cósmidos como complementarios si la relación de segregación de plantas tempranas o tardías (en comparación con los controles *fca-1* and *vrn2-1 fca-1*) era de aproximadamente 3:1.

Dos cósmidos de Columbia (4A23, 2 de 2 T1; 6N1, 1 de 1 T1) complementaron claramente el fenotipo de los mutantes del *vrn2-1 fca-1*, con las plantas más tempranas floreciendo aproximadamente al mismo tiempo que las plantas *fca-1* sometidas a vernalización.

Análisis de secuencias y predicción del ORF

La secuencia en común a los cósmidos IB4A23 y IB6N1 se ha anotado anteriormente como que contiene 2 genes previstos completos (ATDL4445W y ATDL4450W) y porciones (probablemente no funcionales) de dos otros genes: el extremo 3' del ATDL4440W y el extremo 3' del gen pseudo-RPP5, CHPR (ATDL4460W) (Bevan y col., citado con anterioridad.) entrada número del Genbank Z97342. Además, un ADNc cognado (5K) no incluido en la anotación está presente en esta región y parece extenderse por los dos genes previstos (ATDL4445W y ATDL4450W) (Bevan y col., citado con anterioridad). Sin embargo, puesto que dos cósmidos en la región (1 línea T1 independiente de los cósmidos IB4N6 y IB6C5) no complementaron el fenotipo mutante (figura 4), se descartó el gen previsto ATDL4445W. Lo que deja el ADNc 5K no anotado y el gen previsto ATDL4450W como los candidatos para el VRN2. Sin embargo, la presencia del ADNc 5K cognado a partir del ecotipo de Columbia que se superponía a ATDL4445W y ATDL4450W necesitó de un nuevo examen de la predicción para el gen ATDL4450W.

Para definir la estructura de estos genes, utilizamos el programa de predicción NetGene2 (Hebsgaard y col., Nucl Acids Res (1998) 24: 3439-3452), usando "Arabidopsis" como la opción de organismo (el único parámetro que se puede ajustar manualmente). Los programas BLAST, PSI-BLAST, PSORT y PROSITE se utilizaron para identificar los posibles dominios de funciones y similitudes (Altschul y col., Nucleic Acids Res (1997) 25: 3389-3402; Bairoch y col., Nucl Acids Res (1997) 25: 217-221; Nakai y col., Genomics (1992) 14: 897-911). Se utilizaron parámetros predeterminados de TBLASTN, PSI-BLAST y BLASTP (Expectativa = 10, matriz BLOSUM62, penalización por espacio en blanco = 11, penalización por espacio en blanco 1, cociente de lambda 0,85). Se utilizó la base de datos de NCBI/GenBank. Se utilizó el algoritmo PSORT (Nakai), usando la opción "planta" como el organismo origen (el único parámetro que se puede cambiar manualmente). Se utilizó el programa de exploración de perfil PROSITE (Bairoch) para buscar motivos en VRN2, con parámetros predeterminados (no hay parámetros que un usuario pueda seleccionar, los resultados son "aciertos" o "no hay aciertos").

Este análisis produjo previsiones de dos genes: el 5K, una proteína nuclear putativa que se enlazan muy bien después de la transcripción (15 exones), representada por el ADNc cognado de Columbia y una previsión modificada para 4450, con 6 dominios de transmembrana putativos, representados en su extremo 3' mediante un EST de Arabidopsis (entrada número T22412).

Determinación de la mutación del *vrn2-1* e identificación del gen VRN2

En un intento por determinar qué gen (5K o 4450) es el VRN2, se designaron cebadores por reacción en cadena por la polimerasa para amplificar los productos que engloban el marco de lectura abierto previsto de ambos genes.

Se realizaron tres reacciones independientes de RT-PCR usando el ARN total preparado a partir de plántones de *fca-1*, *vrn2-1 fca-1* y *vrn2-2 fca-1* de 14 días de antigüedad cultivados en placas GM en luz continua para cada gen previsto con una mezcla de enzimas de alta fidelidad (Boehringer Mannheim, HiFi System). Estos productos de la reacción en cadena por la polimerasa se secuenciaron usando los cebadores utilizados para la PCR y una serie de cebadores internos, utilizando el kit BIGDYE (PE Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron en una máquina ABI377 y se compilaron utilizando el programa SeqMan (DNAStar, Lasergene).

Las secuencias de la PCR confirmaron nuestra previsión para ambos genes e indicaron que habíamos amplificado en toda el marco de lectura abierto de 5K y ATDL4450W, como se había anticipado.

Se detectaron numerosas diferencias polimórficas entre la secuencia publicada de Columbia y la secuencia de Landsberg erecta amplificada mediante PCR. Estas diferencias estuvieron relacionadas con la secuencia genómica de Landsberg erecta en esta región. Además, el ADNc de Columbia para 5K parece utilizar un centro donador de eliminación de intrones diferente al que se utilizó en el ecotipo de Landsberg y que hubiera producido una proteína

truncada, probablemente no funcional (figura 5). Sin embargo, también hemos secuenciado el producto 5K de Columbia derivado independientemente mediante RT-PCR y que parece usar el mismo centro de eliminación de intrones que Landsberg y debe codificar una proteína funcional. Una diferencia homogénea entre los mutantes del *vrn2* y el *fca-1* se detectó en el producto 5K de la PCR, un cambio de G a A en la posición 1201 del ADNc previsto en *vrn2-1 fca-1* (figura 5). Actualmente, estamos investigando la naturaleza de la mutación en el alelo del *vrn2-2*. Este tipo de mutación, un cambio único de pares de bases, se observa habitualmente después de la mutagénesis EMS. Esta mutación convierte el codón TGG (triptófano) en un codón finalizador (TGA) y provoca la producción de una proteína truncada de 322 aminoácidos en el mutante del *vrn2-1*, en comparación con los 443 aminoácidos del VRN2 silvestres (figura 6). La presencia de esta mutación indicó que el 5K era muy probable que fuera un VRN2. La presencia de la mutación del *vrn2-1* en el genoma de las plantas mutantes del *vrn2-1 fca-1* se confirmó mediante un CAPS derivado (dCAPS) (Michaels y col., Plant J (1998) 14: 381-385; Neff y col., Plant J (1998) 14: 387-392) marcador específico para la mutación del *vrn2-1* (figura 7). Esta prueba de diagnóstico es específica para la mutación del *vrn2-1*, puesto que detecta el VRN2 silvestre en mutantes del *fca-1* y del *vrn2-2 fca-1*.

15 *Análisis del gen VRN2*

Para llegar a comprender la posible función del gen VRN2 y cómo la mutación del *vrn2-1* puede afectar la función de la proteína del VRN2, comparamos la secuencia aminoacídica del VRN2 con numerosas bases de datos de proteínas y secuencias nucleotídicas traducidas usando los programas BLASTP y TBLASTN en NCBI, utilizando los parámetros predeterminados, como se indica anteriormente.

Se identificaron numerosas moléculas con un grado importante de similitud (tabla 1 y tabla 2).

Un gen, representado por un ADNc humano (KIAA0160) comparte homología con el VRN2 en una región breve cerca del terminal amino del VRN2 (aminoácidos 63 a 132) y una región más larga pero menos conservada de homología hacia el extremo carboxi terminal (aminoácidos 263-366) (figura 8a). Un examen más exhaustivo de la región conservada del terminal amino reveló que coincide con el consenso de un motivo de dedo de zinc. Dichos motivos pueden tener varias formas, pero todos coordinan los átomos de zinc a través de dos residuos de cisteína y dos residuos de cisteína e histidina. VRN2 entra en la última clase, con un motivo C2H2 que comprende dos cisteínas separadas por 2 aminoácidos y dos histidinas separadas por dos aminoácidos (Mackay y col., TIBS (1998) 23: 1-4).

Se sabe que los motivos de dedo de zinc tienen la capacidad de mediar las interacciones entre proteína-ADN y proteína-proteína. El motivo de dedos de zinc del VRN2 no se asemeja mucho a la gran familia EPF de dedos de zinc de C2H2 de *Arabidopsis* a partir de *Arabidopsis*, que tienen un motivo QALGG altamente conservado en el medio de los dedos de zinc (Kubo y col., Nucl Acids Res (1998) 26: 608-615) (figura 8b). Además, el VRN2 difiere de las proteínas EPF en que el VRN2 tiene un motivo único de dedos de zinc, mientras que la mayoría de los miembros de la familia EPF (a excepción de SUP y AtZFP1) tienen entre dos y cuatro dedos de zinc (Kubo y col. citado con anterioridad). Esta región amino terminal (aminoácidos 63-132) y, particularmente, el motivo de dedo de zinc (aminoácidos 90-111) puede además representar un dominio que media en las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN.

El extremo carboxi terminal del VRN2 (aminoácidos 263 a 366) es similar a otros muchos genes candidatos (tabla 1 y tabla 2). Como se mencionó anteriormente, existe una homología limitada para la proteína humana prevista KIAA0160. La molécula que muestra la mayor homología con el VRN2 es una secuencia EST del álamo (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx) (número de entrada AI163743) (Sterky y col., PNAS EE.UU. (1998) 95: 13330-13335) que tiene una identidad del 52,8% sobre 127 aminoácidos (tabla 1), según lo calculado con el algoritmo BLASTP utilizando parámetros predeterminados (como se indica anteriormente). El VRN2 también presenta una gran similitud con una proteína de la *Arabidopsis* prevista (ATFCA7_4, entrada número 2245035) (Bevan y col. citado con anterioridad), que está muy cercana al VRN2 en el cromosoma 4, sólo 30 kb de distancia del centrómero. Un examen exhaustivo de la secuencia cercana a este gen reveló que la previsión puede ser incorrecta, puesto que el uso de un centro de eliminación de intrones diferente, que provoca un extremo carboxi terminal diferente para la proteína, aumenta el grado de homología del VRN2. La similitud de estos dos genes de *Arabidopsis* plantea la posibilidad de que el VRN2 sea un miembro de una familia de genes en *Arabidopsis* y su cercana posición sugiere que estos genes pueden haber surgido después de la duplicación. Una postura contraria a esta idea es la observación de que estos dos genes, el VRN2 y el ATFCA7_4, se transcriben en direcciones opuestas. Un EST (C72616) de arroz también comparte una gran similitud con la región carboxi del VRN2, lo que sugiere que esta región puede formar un dominio conservado por evolución presente en monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Se prevé que región carboxi conservada esté altamente cargada, puesto que está formada por un gran número de residuos ácidos (D y E). Esta región altamente cargada es muy similar en los EST de álamo y arroz (tabla 2). Dichas regiones ácidas se encuentran en varios factores de transcripción eucariota y, con frecuencia, funcionan como dominios de activación (Hahn, Cell (1993) 72: 481-483). Es, por lo tanto, posible que el VRN2 pueda funcionar como un factor de transcripción, dado que tiene tanto un motivo de unión de ADN (o unión a proteínas) (aminoácidos 63-132) y un dominio de activación putativo (aminoácidos 263-328). Además, la porción amino del VRN2 contiene dos señales de localización nuclear previstas (NLS) (figura 6). La primera es una simple señal básica de 4 residuos y la segunda es una señal bipartita que encaja en el consenso (R/K)(R/K)N10(R/K)4 (Dingwall y col., TIBS (1991) 16: 478-481).

ES 2 307 491 T3

Ejemplo 2

Producción y caracterización de la Arabidopsis transgénica para VRN2

5 El ADNc del VRN2 en la orientación sentido se clona en los vectores de expresión de plantas SLJ4D4 y SLJ4K1 (Jones y col., (1992) Transg. Res. 1, pp 285-297) según las indicaciones de Sambrook J y col (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Los SLJ4D4 y SLJ4K1 colocan al ADNc del VRN2 bajo el control del promotor Ca MV 35S e incluyen las secuencias de terminación de los genes de la octopina sintetasa (ocs) y la nopalina sintetasa (nos), respectivamente.

10 Las construcciones antisentido se producen de la misma manera, a excepción de que el ADNc del VRN2 se introduce en los vectores de expresión en la orientación opuesta.

15 Los casetes de expresión del VRN2 se subclonan luego de forma separada en el vector binario SLJ1714 (Jones y col. citado con anterioridad) y se moviliza en cepas de *Agrobacterium* mediante apareamiento triparental según la las indicaciones de Hoekema y col., (1983) Nature 303, pp 179-180. Las *Arabidopsis* se transforman con las cepas de *Agrobacterium* que transportan las construcciones de la expresión del VRN2 (ya sea en sentido o antisentido) siguiendo las indicaciones de Bechtold y col., (1993) C R Acad. Sci. Paris 316, pág. 1194-1199.

20 Las plantas *Arabidopsis* se valoran en busca de cambios en su respuesta a los cambios en la relación de luz roja lejana, esencialmente según lo que describe Halliday y col., (1997) Plant J. 12, pp 1079-1090.

Resultados

25 Las diferencias en el requisito y respuesta a la vernalización se observan en plantas *Arabidopsis* transgénicas para el VRN2 (orientación sentido o antisentido) en relación a las plantas *Arabidopsis* transformadas con vectores vacíos y plantas *Arabidopsis* no transformadas.

Ejemplo 3

Producción y caracterización del tabaco transgénico para VRN2

30 El ADNc del VRN2 en la orientación sentido se clona en los vectores de expresión de plantas SLJ4D4 y SLJ4K1, como se describe en el ejemplo 2.

35 Las construcciones antisentido se producen de la misma manera, a excepción de que el ADNc del VRN2 se introduce en los vectores de expresión en la orientación opuesta.

40 Los casetes de expresión del VRN2 subclonados de forma separada en el vector binario SLJ1714 (Jones y col. citado con anterioridad) se mobilizan en cepas de *Agrobacterium* mediante apareamiento triparental como en el ejemplo 2 y las plantas de tabaco se transforman usando las cepas de *Agrobacterium* que transportan las construcciones de expresión del VRN2 (sentido o antisentido) siguiendo las indicaciones de Horsch y col., (1985) Science 227, pág. 1229-1231.

45 Las plantas de tabaco se valoran en busca de cambios en su respuesta a los cambios en la relación de luz roja lejana, esencialmente según lo que describe Halliday y col., (1997) Plant J. 12, pág. 1079-1090.

Resultados

50 Las diferencias en el requisito y respuesta a la vernalización se observan en plantas de tabaco transgénicas para el VRN2 (orientación sentido o antisentido) en relación a las plantas de tabaco transformadas con vectores vacíos y plantas de tabaco no transformadas.

Ejemplo 4

Producción y caracterización de Brassica (planta de colza, del tipo de invierno) transgénica para el VRN2

55 Las construcciones sentido y antisentido se utilizan para generar cepas de *Agrobacterium* que transportan las construcciones de expresión del VRN2 (sentido o antisentido) como se describe en el ejemplo 2 y el ejemplo 3 y se utilizan para transformar la planta de colza siguiendo las indicaciones de Moloney y col., (1989) Plant Cell Rep. 8, pág. 238-242.

Resultados

65 Las diferencias en el requisito y respuesta a la vernalización se observan en plantas de colza transgénicas para el VRN2 (orientación sentido o antisentido) en relación a las plantas de colza transformadas con vectores vacíos y plantas de colza no transformadas.

Ejemplo 5

Producción y caracterización del arroz transgénico para VRN2

5 El ADNc del VRN2 en la orientación sentido y antisentido se clona en construcciones y se utiliza para generar las cepas de *Agrobacterium* respectivas. Las cepas de *Agrobacterium* que transportan las construcciones de expresión del VRN2 (sentido o antisentido) se utilizan para transformar el arroz siguiendo las indicaciones de Kohll A y col (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95, pág 7203-7208.

10 *Resultados*

Las diferencias en el requisito y respuesta a la vernalización se observan en plantas de arroz transgénicas para el VRN2 (orientación en sentido o antisentido) en relación a las plantas arroz transformadas con vectores vacíos y plantas arroz no transformadas.

15 *Ejemplo 6**Producción y caracterización del trigo transgénico para VRN2*

20 Las cepas de *Agrobacterium* que transportan las construcciones de expresión del VRN2 (sentido o antisentido) se generan como en los ejemplos anteriores y se utilizan para transformar el trigo siguiendo las indicaciones de Becker D y col., (1994) Plant J. 5, pág 299-307.

Resultados

25 Las diferencias en el requisito y respuesta a la vernalización se observan en plantas de trigo transgénicas para el VRN2 (orientación sentido o antisentido) en relación a las plantas de trigo transformadas con vectores vacíos y plantas de trigo no transformadas.

30 *Métodos y materiales**Crecimiento de las plantas*

35 Para los tratamientos de vernalización, se cultivaron semillas en una capa húmeda de arena fina (M3 de Levington) en un suelo húmedo en tiestos individuales y se sometieron a vernalización para aumentar las duraciones a 4°C, 8 h de luz: 16 h de oscuridad, 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ de intensidad de luz. Se alternó la siembra de semillas, quitando todas las plantas de las condiciones de vernalización simultáneamente. Después de la vernalización, se colocaron las plantas en una cámara de ambiente controlado (Gallenkamp), 20°C, 16 h de luz: 8 h de oscuridad, 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ de intensidad de luz. Las plantas que no se trataron con vernalización se estratificaron durante 2 días en condiciones de vernalización y se cultivaron durante dos días antes de la transferencia a la cámara de crecimiento. Las plantas se cultivaron durante 10 días y luego se transplantaron en compartimientos individuales de bandejas P40. La época de floración (medida contando el número total de hojas; es decir, las hojas de la roseta y caulina) se determinó una vez que la inflorescencia primaria se había extendido lo suficiente.

45 Se examinó el fenotipo de las plantas del *vrn2-1 fca-1* plantas teniendo en cuenta diferentes índices de la luz roja a roja lejana (R:FR). Las plantas se estratificaron durante 2 días, luego se cultivaron durante 10 días bajo luz continua y, posteriormente, se transfirieron a cámaras de crecimiento separadas con luz blanca (W), índice R:FR de 5,8, con o sin luz FR complementaria (W+FR), índice R:FR 0,08. Se determinó el número de hojas de roseta para medir la época de floración y se utilizó el área de la hoja más grande como un indicador de la respuesta de evasión de sombreado.

50 *Mapeo*

El VRN2 se colocó en el brazo largo del cromosoma 4 (o D) a través de la unión con el marcador RFLP m506 (Chang y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. (1988) 85: 6856-6860), en la progenie de un cruzamiento entre *vrn2-1 fca-1* (fondo Ler) y *fca-10* (fondo Ws). Además, se utilizaron marcadores RFLP en esta región (Liu y col., Plant J (1996) 10:733-736) para refinar la posición del VRN2. Utilizamos técnicas RFLP estándar, con sondas de cósmidos 32P y un sistema de detección PhosphorImager. Se detectó un RFLP de Ler:Ws al utilizar el ADN genómico digerido con EcoRI y g13683 o CC36F6 como sondas. El marcador g19247 es un marcador SLP (que usa los cebadores g19247F y g19247R, consulte a continuación), con Ler produciendo una banda amplificada por PCR de aproximadamente 750 bp, mientras que Ws produce una banda de 862 bp. Se realizó un mapeo preciso del VRN2 utilizando varios marcadores derivados de la PCR, basándose en la secuencia genómica de Columbia en esta región (Bevan y col. citado con anterioridad). El marcador VRN2CD se amplificó con dos cebadores: VRN2-C y VRN2-D y se digirió con DdeI. Lo que produce un marcador CAPS, con Ler produciendo bandas de (aproximadamente) 480 bp, 290 bp y 190 bp, mientras que Ws produce bandas de (aproximadamente) 330 bp, 290 bp y 150 bp. El marcador VRN2RS es un marcador dominante para Ws (es decir, los heterocigotos de Ler:Ws no se pueden distinguir de los de Ws), producido mediante la amplificación del ADN genómico con VRN2-R y VRN2-S (consulte a continuación) y digiriendo el producto con *MboII*. Lo que produce una banda única predominante (y muchas otras bandas no resueltas más pequeñas) en Ler de aproximadamente 400 bp, mientras que Ws produce dos bandas: 400 bp y 300 bp.

Aislamiento de los cósmidos

Los cósmidos que cubren la región no cubierta por los subclones de EW16B10 YAC se identificaron a través de hibridación en los prospectos de BAC derivados de los BAC T5015 y T1C7. Se purificó el ADN del BAC y se aisló el prospecto después de la digestión con *NotI* y separación mediante electroforesis en gel con campo pulsátil (PFGE, por sus siglas en inglés) como se describe en (Bancroft y col., citado con anterioridad). Los prospectos de BAC purificados se etiquetaron al azar con a32P-dCTP y se sometieron a hibridación con un enrejado ordenado de una genoteca genómica de cósmidos Ler. Se identificaron los cósmidos de hibridación positiva y se controlaron nuevamente después de la digestión de enzimas de restricción, método de hibridación tipo Southern. Luego se sometieron a hibridación con la sonda del prospecto de BAC utilizado inicialmente. Se seleccionaron los cósmidos de la región de interés y se obtuvo una secuencia genómica a partir de los extremos del prospecto utilizando un kit de secuenciación de ciclo BIGDYE y cebadores T3 y T7, cuyas secuencias flanquean el sitio de inserción del ADN genómico. Esta secuencia se alineó con la de la secuencia genómica de Columbia para colocar los cósmidos en una posición precisa.

15 *Complementación*

Los cósmidos del vector binario 04541 se movilizaron en *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58C1 RifR mediante apareamiento triparental (Hoekema y col., Nature (1983) 303: 179-180). Las plantas del *vrn2-1 fca-1* se transformaron con estas cepas de *Agrobacterium* mediante infiltración a vacío (Bechtold y col, citado con anterioridad.). Se seleccionaron las plantas T1 transgénicas en GM con kanamicina (50 mg/mL) y se transplantaron cuando alcanzaron la etapa de 3-4 hojas. La presencia de cada cósmido en las líneas transgénicas se confirmó utilizando un polimorfismo específico de Ler/Col (marcador CAPS o SSLP) o, más comúnmente, a través del uso de una PCR de diagnóstico específica, utilizando un cebador presente en la secuencia de prospectos de cósmidos y un cebador presente en el cósmido que flanquea el sitio de inserción. Asimismo, se analizaron las plantas transgénicas en busca de mutación del *fca-1*, puesto que las plantas T0 deberían tener esta mutación. Estos dos métodos en su conjunto garantizaron un mayor análisis sólo de las plantas del *vrn2-1 fca-1* que tienen los cósmidos deseados. Nuestro objetivo era producir 5 a 6 transformantes T1 independientes para cada cósmido, pero sólo se produjo una línea única para algunos cósmidos. Sin embargo, puesto que se observó una complementación antes de haber generado los T1 para todos los cósmidos, continuamos produciendo plantas T1 transgénicas adicionales que tienen los cósmidos cerca del VRN2. Las plantas T1 se cultivaron en una cámara con ambiente controlado (condiciones descritas anteriormente) y se dejaron descansar. Se recogió la siembra T2, se analizó en busca de la segregación de la resistencia o sensibilidad a la kanamicina en placas GM con kanamicina (como se vio anteriormente) y se valoró 14 a 20 días después de la germinación. Se analizó la progenie de las plantas T1 que segregó una relación de 3:1 de plantas resistentes a sensibles para probar su capacidad de complementarse con el fenotipo mutante del *vrn2-1* mediante vernalización durante 3 semanas y con un registro del número total de hojas.

35 *Secuenciación de ORF*

Se secuenciaron dos posibles marcos de lectura abiertos después de la RT-PCR usando ARN aislado a partir de plantas de *fca-1* y *vrn2-1 fca-1*. Los ADNc se retrotranscribieron, se cebaron con un cebador dT12-18 y luego se utilizaron cebadores específicos para amplificar por PCR las regiones correspondientes a los ORF para ATDL4450W y 5K (VRN2). Se utilizó el sistema de PCR de alta fidelidad de Boehringer Mannheim para aumentar la fidelidad de la amplificación. Los cebadores VRN2-AL y VRN2-AM se utilizaron para cebar el ATDL4450W y VRN2-AI y VRN2-AJ para el 5K. Para el 5K, la reacción por PCR para el producto de longitud completa (VRN2AI-VRN2AJ) no se eficaz. Por lo tanto, se realizaron reacciones posteriores para amplificar el ADNc en dos fragmentos superpuestos, utilizando las combinaciones de cebadores VRN2-AI con VRN2-AS y VRN2-AO con VRN2-AJ. Los productos de la PCR se aislaron y purificaron. Y luego se secuenciaron directamente utilizando el kit de secuenciación BIGDYE (PE Applied Biosystems). Al menos dos productos de la PCR independientes se secuenciaron a partir de cada alelo. Secuenciamos los productos de la PCR ATDL4450W con los cebadores de amplificación VRN2-AL VRN2-AM y VRN2-AU a través del VRN2-AX. Se secuenció el ADNc del 5K con VRN2-AI, VRN2-AJ y VRN2-AO a través del VRN2-AT. Se alinearon las secuencias en secuencias contiguas utilizando el paquete de software DNASTar (LaserGene).

55 *Comparaciones de secuencias*

Las secuencias de EST y ADNc primero se tradujeron utilizando el programa MapDraw del DNASTar (LaserGene). Lo que reveló numerosas regiones en las que la secuencia parecía ser incorrecta, puesto que los pequeños cambios en las secuencias descritas mejoraron notablemente la similitud con el VRN2. Las secuencias aminoacídicas y las nucleicas modificadas se alinearon inicialmente utilizando programas del paquete MegAlign de DNASTar (LaserGene), del siguiente modo:

Las secuencias aminoacídicas se alinearon inicialmente utilizando el método Clustal V (Higgins and Sharp (1989) CABIOS vol. 5, no.2, 151-153). Se utilizaron parámetros predeterminados: penalización por espacio en blanco 10, penalización por longitud del espacio en blanco 10, ktuple 2 y la tabla de pesos residual PAM 250. La alineación se refinó con el sistema mano ojo, realizando pequeños ajustes a la posición de los espacios en blanco para mejorar la alineación.

ES 2 307 491 T3

Las secuencias de ácido nucleico (EST y cDNA) se alinearon inicialmente con el método Hein (Hein (1990) *Methods in Enzymology*, vol. 183, 626-645), utilizando parámetros predeterminados: penalización por espacio en blanco 11, penalización por longitud del espacio en blanco 3, ktuple 2 y la tabla de pesos residual ponderativa. Cuando la alineación de nucleótidos (cuando se traducen) no correspondía a la alineación de aminoácidos, las posiciones de los espacios en blanco se ajustaron para corresponderse con los espacios en blanco en las alineaciones de aminoácidos.

Marcador dCAPS para la mutación del vrn2-1

Se designó un marcador CAPS derivado (dCAPS) específico para la mutación del *vrn2-1*. Después de la amplificación por PCR a partir del ADN genómico con los cebadores VRN2-AY y VRN2-AZ, el producto 170 bp se digirió durante la noche con la enzima de restricción XmnI y los productos se resolvieron en un gel de agarosa al 4%. Las plantas silvestres (VRN2) producen una banda única de 170 bp después de la digestión, mientras que los mutantes del *vrn2-1* producen dos bandas: de 137 bp y 33 bp.

15 *Cebadores utilizados para identificar el VRN2*

Como se indica en la figura 3 y la figura 5. Todas las secuencias de cebadores se indican de 5' a 3'.

20 g19247F ACT GTT CGT CTC CTT CAT CAT G
g19247R TTG CTT GCC TGA AAA AAG TAT G
VRN2-C TGT CGA TAT GCG ACC AGT ACC
25 VRN2-D CAG GCT TAG ACC CAA TTG ACC
VRN2-R AGG TAG GAT CCG ACA TCG TCT TCT TAT TTA CCG
VRN2-S CTC TTG AAT TCA AAA CTA TTC CTA CTC TCA CAC
30 VRN2-AI GCC AAT CGG TGT TTT CGC AGC TTT C
VRN2-AJ AAG AAT AAG TTA CAA TCC GAT AAA TCG G
VRN2-AL CAG TGG TTG AAG CTT AAG GAG G
35 VRN2-AM GCA ATG AAT AAA TCA TAA TCT TGG
VRN2-AO TCT ACT GGG ATG GTA GTT TTC
40 VRN2-AP ATA TCC CGA GGC AAC AGA GCT TG
VRN2-AQ CAT CTT TGG AAC TCG TTT G
VRN2-AR CTC AGT TGT AAT AGT TGC CC
45 VRN2-AS AAG AGT GGG CTA TGG CTG G
VRN2-AT GCA ACT CTT TCT CGT AAA ATC TTG
VRN2-AU GCC TCC ATA ACT GTC ATC ACA TC
50 VRN2-AV TTT CAT TGG TCA TGG GAT GG
VRN2-AW GAC TTC AGA GAT GGG TTT ATG C
55 VRN2-AX TCC ATA TCT AGC TCC TTC GCC
VRN2-AY TGC GTT CAT TAA GTA GGC AAC AGA AAA TGG
VRN2-AZ GAG AAG TAG TTA CCT TTG TTT TCT TAC AGA AGA GT

60

65

ES 2 307 491 T3

Tabla 1 Comparación de Nucleótido VRN2 y Secuencia de Aminoácido en Secuencias de Bases de datos

Secuencia	Nucleótidos			Aminoácidos			
	Identidad (%)	Longitud	Rango ^a	Identidad (%)	Similitud (%) ^b	Longitud	Rango ^c
VRN2 Col	96,5	1722	1-1722	96,1	96,8	445	1-445
C72616 Región I	32,4	219	681- 899	15,1	42,5	73	151- 223
C72616 Región II	71,7	247	951- 1197	72,7	85,7	82	241- 322
C72616 Completo	47,7	517	681- 1197	40,1	58,1	172	151- 322
AI163743 Región I	41,0	61	839- 899	27,3	68,1	22	202- 223
AI163743 Región II	71,6	264	951- 1214	66,7	77,1	88	241- 328
AI163743 Completo	65,8	376	839- 1214	52,8	66,6	127	202- 328
At Hyp 2245035	66,3	570	924- 1493	63,7	79,5	190	232- 421
KIAA0160 Región I	36,6	396	231- 626	20,4	39,4	132	1-132
KIAA0160 Región II	35,5	904	819- 1722	17,7	43,4	249	197- 445
KIAA0160 Completo	41,1	1492	231- 1722	16,0	36,0	445	1-445

a Numerado respecto a secuencia cADN del VRN2

b Similitud definida como identidad más similitud sobre la base de aminoácidos agrupados en cuatro clases - (D, E), (R, K, H), (S, T, N, Q, Y), y (L, I, V, M, A, G, W, F, P, C)

c Numerado respecto a secuencia de aminoácido VRN2

ES 2 307 491 T3

Tabla 2 Dominios Putativos de la Proteína VRN2						
"Dominio"	"Sub-dominio"	Longitud	Posición ^a	Identidad (%)	Similitud (%) ^b	Molécula
Unión ADN/Proteína		70	63-132	30,0	51,4	KIAA0160
	Motivos de dedos de zinc	22	90-111	50,0	68,1	Mm Spalt 1296845
		22	90-111	45,4	68,1	Sc TFIIIA 730931
		22	90-111	40,1	72,7	Ce Hyp 2854197
		22	90-111	36,4	50,0	KIAA0160
	Región Conservada	41	76-116	43,9	61,0	KIAA0160
Activación		66	263-328	89,4	95,4	AI163743
		68	263-330	83,0	93,2	C72616
		104	263-366	58,6	76,0	At Hyp 2245035
		104	263-366	29,8	49,0	KIAA0160
	Región Acídica Conservada	36	281-316	94,4	97,2	AI 163743
		36	281-316	86,1	94,4	C72616
		36	281-316	58,3	72,2	At Hyp 2254035
		36	281-316	30,5	50,0	KIAA0160
a Posición en relación a la secuencia aminoacídica del VRN2						
b La similitud se calculó según la tabla I						

ES 2 307 491 T3

SEQ ID NO: 1

5 CAAGCTTCTTCAATTTTGCTTGCTCTCTCTTACACAGCCAATCGGTGTTTTTCGCAGCTTTCA
GGCCTCAATCCAAGACATTCTATATAAGCATATTGCAGAAGAGGCGGTCTAATTGTTGCAT
TGAGTTTATCGCTATGACGTAGGGAAATTCTAATTTAGGGGAGGCCTCAGAGTTTGCCTAA
10 CTTTATAATCGGCTCTTGACGTTGTTGAGTGTAATTGAACAAGAATGTGTAGGCAGAATTGT
CGCGCGAAATCCTCACC GGAGGAAGTGATTTCAACTGATGAGAATCTCTTGATATATTGTAA
ACCTGTTGACTATATAACATCTTTCACCTTCGCTCTCTAGGCAACCCATCGTTTCTTCCAA
GATGCTTGAAC TACAAAATTGGAGCAAAGCGCAAAGAAAGTCAAGATCTACTGGGATGGTA
15 GTTTTCAACTATAAGGATTGTAATAACACATTACAGAAAAGTGAAGTTAGGGAGGATTGTTT
TTGTCCATTTTGCTCTATGCTATGTGGTACCTTCAAGGGGCTGCAATTTCAATTTGAATTCAT
CTCATGATTTATTTGAATTTGAGTTCAAGCTTTTGAAGAATACCAGACAGTTAATGTTTCT
GTAAGCTTAAATTCCTTCATATTTGAGGAAGAAGGAAGTGATGACGATAAATTTGAGCCCTT
20 CTCTCTGCTCGAAACCTCGTAAGCGGAGACAAAGAGGTGGCAGAAATAACACCAGGAGAC
TTAAAGTATGCTTTTTTACCGTTGGATTCAACCAGTTTAACTAATGGCACAGAAAATGGAATC
ACCTACTTAATGATGGAAACCGTGGTTTAGGATATCCCGAGGCAACAGAGCTTGCTGGACA
25 ATTTGAGATGACCAGCAACATTCACCAGCCATAGCCCACTCTTCTCTGGACGCTGGTGCTA
AAGTTATATTGACAAGCGAAGCTGTGGTCCCTGCTACTAAGACAAGAAAGTTATCTGCTGAG
CGATCAGAGGCTAGAAGCCACCTACTTCTTACAGAAACGCCAATTCTATCATTCTCACAGAGT
30 CCAGCCAATGGCGCTTGAGCAAGTAATGTCTGACCGGGATAGCGAGGATGAAGTCGATGACG
ATGTTGCAGATTTTGAAGATCGCCAGATGCTTGATGACTTTGTGGATGTGAATAAAGATGAA
AAGCAATTCATGCATCTTTGGAACCTGTTTGTAAGAAAACAAAGGGTTATAGCAGATGGTCA
TATCTCTTGGGCATGTGAAGCATTTTCAAGATTTTACGAGAAAGAGTTGCACCGTTACTCAT
35 CACTCTTCTGGTGTGGAGATTGTTTTTGTATAAACTATGGAACCATGGACTTGTGACTCA
GCCACCATCAACAAC TGAATACCATCCTCGAGAATTGCCGTAATAGCTCAGACACCACCAC
CACCACAACAACAACAGTGTGGATCGTCCAGTGACTCAAACACCAACAACAATAACATTG
40 TGGATCATCCAATGACATAAACAAGAACAATGTTGACAACAAGGACAATAACAGCAGA
GACAAAGTAATTAATAGGAAAATCTCCGCCTTTATGATACCGATTTATCGGATTGTAAC
TATTCTTCTTTCTTAAAAAATGTTTAGGAGCAAACAAATTTTTTATATGTTAGTGTATTCA
45 ACTGATTACATTTTTAGTTAAAAAATAATGGATTCTGCTTATAACT

SEQ ID NO: 2

50 MCRQNCRAKSSPEEVI STDENLLIYCKPVRLYNI FHLRSLGNPSFLPRCLNYKIGAKRKRKS
RSTGMVVFNYKDCNNTLQKTEVREDCSFPFC SMLCGSFKGLQFHLNSSHDLFEFEFKLFEEY
55 QTVNVSVKLNSFIFEEGSDDDKFEPFSLCSKPKRRRQRGGRNNTTRRLKVCFLPLDSPSLTN
GTENGITLLNDGNRGLGYPEATELAGQFEMTSNIPPAIAHSSLDAGAKVILTSEAVVPATKT
60 RKLSEARSEARSHLLLQKRQFYHSHRVQPMAL EQVMSDRDSEDEVDDDVADFEDRQMLDDFV
DVNKDEKQFMHLWNSFVRKQRV IADGHI SWACEAFSRFYEKELHRYSSLFWCWRLFLIKLWN
HGLVDSATINN CNTILENCRNSSDTTTTNNNNSVDRPSDSNTNNNNI VDH PNDINNKNVNDN
65 KDNNSRDKVIK

ES 2 307 491 T3

SEQ ID NO: 3

5 AAAGAGAATGCTTTGACTCTCTCATTGGTCAAACCTGACTGTATTTATATGCGTTATTGTGT
GGTAAAGTTTTCGACCTTTGACTTTACAAGTTGGCGTTAAGAAGAGAGATGCGTAGATCAGCG
AGTGGTTCGAGAGTTTTGGATCATTTCCTCCCGACTTCACGGTCTCCACGTTCGATCTCAGAG
10 CATTACATCATTGGAAGATGATGTGGAGGTGCTTTTGCCTAGGTACGATCCGAATTCTCAAG
CGGGGAAGAGAGAGAAGTCAAGATTCAGATTTGCAGAAAACGTCATCCATTTGATTCCTCTC
ATTCTTCTTCTCTGTATCGCAATCCTCTGGCTCTCCTCTTATTCAGGTAAGCCGAGAAATTG
ATTCAATCTCTATGAATCCATAATTGATATGTGAAACTTAATTAGGGATTTTACAAAGGCTC
15 ATATGGATATGATATGAGGATCGAGATGTCTCTGTAAACATTAGAATCTTGTGTTGAATTATT
GTTTCAATTTGTTTCATATTATACTAAACCGGTGATGGATTTGGAATTTGTCAGCAGCGTTAA
GGAGTTGAGTTCAAGAAGCAACATGTTGTCTTGTCTCCATGGGAACTCATCATATTCAGTTT
TGGGAAAGGAAACAATTTTTTTTACCGCCGGTGATTATGTGCCGCAAACCATACGTAACTTT
20 TGTAATTTTCGGTCTGTAGACACATAAAAAGGATCTCTCGTTTTTCATGAAATGTATGTTTAA
TATTTCACTATACATCACACAACCTCAAGTAGAAAACACTGATGGTTATCCATTAATCATCAT
TCTATTGGTCGAAAACAAGGATTAGTTTCAACTTATTGCTACCTTAGTGATTAGATGTTCCCT
25 GTGAGTTTCAGCTAGCCAAGTCAACTAGAGTTAAACAATGGAATCAAATACATATTAGTA
ATTTATTTTAAACTCTGACTATTTATGTAAACAAAAATGAAAATTTAAATTTGAAGGTATGA
AGATTCTATTCTTAGTATGAAAAGTATAGATCAATGATAAAAAGTATATACCAGAACAGTGGT
GGATCTAGAAACATATTTAGTATATGGCACAATATATTTAACATATACAAATTTTAACTAA
30 AAGTTGTATTCAATTTATGAAAAGACWCTGAATGAAGCAAATTTATTTGATGTGTTAATCAT
CCATTTATGTGTTAATCAGCCATTGATGTTAGTATAGTACTCTATGCTAACATAATTTTTTT
ATACTATAAATTAATAAATAAGGTAAGAAAAGAAAATAGATTAATATAAAAAGCATTTTAT
35 TAGCTGAAATAAATAAATAAAGAAAGATAATAACTAATTGACTAAAAAATTAGTAGAGCAT
ATGGGGCACAATACTAAGTATTTTCATCTTACTATAAAATGTAACAAATTTCAAATTTAT
CAAACCTGTATATAGGGCACGTGCCTAGGTACCAATAGACGTACGTCCGCCCTGAAATAAGTT
40 GGTGAATATGGTTTTAATTCCTCTAATACTCACTGTACTGCCATGGTAGAGGTGAAAAAAC
AATTTTAGAAATATTATAATGGATTAAGCTGTCCAAGTTGGTCGTATTTTCTTTACATTTTA
TTAACTAATAAACATAAATAAGTTCAACTATTTATTGACTAGTAATAATACGTGTAAAATGT
CTATTGGTTTTAAATATGGGCCATAAGGCCAGACTTGAAAAAAAACCTTGAAACCCAAAGT
45 TATATTTTTACTTGTCTTCTTCTCAGTGAATATCTCCAATCAAGCTTCTTCGATTTTG
CTCTCTTTACACAGCCAATCGGTGTTTTTCGCAGCTTTCAGGTTTGTCTCAATCTCAAATTA

50

55

60

65

ES 2 307 491 T3

TCATCATAATTACCATTCCCTGTTGTTACAAATGTTCTTCCTATTATGGATAAGTGTATATAG
TACTGCCATATTAACCGAGAAAATTTCTTCCAGCCACCTACTTCTTCAGAAACGCCAATTCT
5 ATCATTCTCACAGAGTCCAGGTGATCCAAGTTCCTTACCTACTTCTTAGGCATTTTCTTTA
AATTGCTCATGATGATATCTTATCAAAGCATACTTGGTTTGTTCATCCAAATTTGTATTT
TGATCTGTATGTATCAACGCAAAAATAGTTATGTCCATGTTGTCTCCGTTTTATTGCCACTAA
10 CCAAAAAATGCATGTTTCTGTGACAAGCCAATGGCGCTTGAGCAAGTAATGTCTGACCGGGA
TAGCGAGGATGAAGTCGATGACGATGTTGCAGATTTTGAAGATCGCCAGGTATTCCATGATT
TCTTTCTGCGTTCATTAAATAGACAACAGAAAATGGTATATGATGTAACCTTGCTAATGGCTT
15 TTGAAACTTAAAAAAGCTGCAGATGCTTGATGACTTTGTGGATGTGAATAAAGATGAAAAGC
AATTCATGCATCTTTGGAACCTGTTTGTAAAGAAAACAAAGGTAACCTACTTCTCTTACACATG
AACAGACACAAAAAGACCTTATGTCTTACATTCCATACCTGTCTAAATGATTTTGCTTATGG
AACTTTGAGCTCAATTATGATTGTTGATGTTTTCAGGGTTATAGCAGATGGTCATATTTCTTG
20 GGCATGTGAAGCATTTTCAAGATTTTACGAGAAAGAGTTGCACCGTTACTCATCACTCTTCT
GGTAATATAAGTACACCAAACATATACAGACACATAACTACACTATCAATCTTGTTCGTTT
TCTGAAAAAAAATAAAAAATTTCCAGGTGTTGGAGATTGTTTTTATTAACTATGGAACCA
25 TGGACTTGTGACTCAGCCACCATCAACAACCTGCAATACCATCCTCGAGAATTGCCGTAATA
GCTCAGACACCACCACCACCAACAACAACAGTGTGGATCGTCCAGTGACTCAAACACC
AACAAACAATAACATTTGTGGRTCATCCCAATGACATAAAACAACAAGAACAATGTTGACAACAA
GGACAATAACAGCAGAGACAAAGTAATTAATAGGAAAATCTCCGGCTTTTATGATACCGAT
30 TTATCGGATTGTAACCTTATTCTTCTTTCTTAAAAAATTGTTTAGGAGCAAACAATTTTTTA
TATGTTAGTGATTTCAACTGATTACATTTTTAGTTAAAAAAAATAATGGATTCTGCTTATAA
CTAAAAACTGAAAAAAAAGAAAAGTTTCTTAATTTTTCTTTTGACTTGAGAAAAGCTCC
35 TCTAGTAAATATGAGTTATATATTAATCAAGTACATAACATAAAAAATAGTATATATTAAGTG
CAAATAGATTGAAAACAAATCAAGAAGAAATTAATTAAGACAGAGTGATTAAGCTTAAACC
CCATTTGGACTTGTCTTCTCAATGAATCCCTCACAAAGCAGCAAGCTTCTTCGATTTTGCT
TTGACACCACCAATCGGTGTTTTCGAATCTTTCAGGTTTGTCTCGATTTCAATCTAGATCGG
40 AGTCAAGTAATAAAATGATTAACCTAAGTATTTCCCGTTCTCTCGTAAGAGTTGGGATTTAG
CAGTAGATCGGAAATCGGAATTTACGTTTTGTTAAAAGATTGATGGTTTAGGTAATGGAAC
ATAGTTCTGGATTCATGCTTCTAGTTGATTTCTCGAATTGTTTATTTGATTTTCGCAATGCACATTT
TTGTTTCAAAGGATCACAGAATTTGATTTAAAATTTGACAAAATTCATCAATTTCTCATAT
45 TAGGGTTTATATTTCTTCTAGTAACTCGAACTGTTTGGAACTCTGTATACTCTGTGCTATGT
AGATAAAGTCTTAACATTTTGGTCAACTTTGTTTGTATCTTAACTAGTTTGGGCTCTCTGT
TTTAAAGTTTGTGCTTTCCTATTACACAGGTCTCATAAAGACTACAGTCTCAAGAAGCA
50 TAATATCGTCTGACTCTGTTTTGAGTTTCTCAACAGTGGTTGAAGCTTAAGGAGGTTCTTATG
TGCGTTTTGATATC

55

60

65

ES 2 307 491 T3

SEQ ID NO: 4

5 CAAGCTTCTTCAATTTTGCTTGCTCTCTCTCTTACACGGCCAATCGGTGTTTTTCGCAGCTTT
CAGGCCTCAATACAAGACATTCTATATAAGCATATTGCAGAAGAGGCGGTTCTAATTGTTGC
10 ATGGAGTTGAACAATATGACGTAGGGAAATTCTAATTTAGGGGAGGCCTCAGAGTTTGC
AACTTCATAATCAGCTCTGGACGTTGTTGATTGTATTTGAACAAGAATGTGTAGGCAGAATT
GTCCGCGGAAATCCTCACC GGAGGAAGTGATTTCAACTGATGAGAATCTCTTGATATATTGT
15 AAACCTGTTGACTATATAACATCTTTCACCTTCGCTCTCTAGGCAACCCATCGTTTCTGCC
AAGATGCTTGAAC TACAAAATGGGGCAAAGCGCAAAGAAAGTCAAGATCTACTGGGATGG
TAGTTTCAACTATAAGGATTGTAATAATACATTACAAAGAACTGAAGTTAGGGAGGATTGT
20 TCTTGCCATTTTGCTCTATGCTATGTGGTAGCTTCAAGGGGCTGCAATTTCAATTTGAATTC
ATCTCATGATTTATTGAAATTTGAGTTCAAGCTTTTGAAGAATACCAGACAGTTAATGTTT
CTGTAAAACTTAATTCCTTCATTTGAGGAAGAAGGAAGTGATGATGATAAAATTTGAGCCC
25 TTCTCTCTGCTCGAAACCTCGTAAGCGTAGACAAAGAGGTGGCAGAAATAACACCAGGAG
ACTTAAAGTATGCTTTTTACCGTTGGATTACCCAGTTTAGCTAATGGCACAGAAAATGGAA
TTGCCCTGCTGAATGATGGAAACCGTGGTTTAGGATATCCCGAGGCAACAGAGCTTGCTGGA
CAATTTGAGATGACTAGCAACATTCACCAGCCATAGCCCACTCTTCTCTGGACGCTGGTGC
30 TAAAGTTATATTAACAACCGAAGCTGTGGTCCCTGCTACTAAGACAAGAAAGTTATCTGCTG
AGCGATCAGAGGCTAGAAGCCACCTACTTCTTCAGAAACGCCAATTCTATCATTCTCACAGA
GTCCAGCCAATGGCGCTTGAGCAAGTAATGTCTGATCGGGATAGCGAGGATGAAGTCGATGA
CGATGTTGCAGATTTTGAAGATCGCCAGATGCTTGATGACTTTGTGGATGTGAATAAAGATG
35 AAAAGCAATTCATGCATCTTTGGAAC TCGTTTGTAAAGAAAACAAAGGGTTATAGCAGATGGT
CATATCTCTTGGGCATGTGAAGTATTTTCAAGATTTTACGAGAAAGAGTTGCACTGTTACTC
ATCACTCTTCTGGTGTGGAGATTGTTTTGATTAACTATGGAACCATGGACTTGTGCGACT
CAGCCACCATCAACAAC TGAATACCATCCTCGAGAATTGCCGTAATACCTCAGTCACTAAC
AACACAACAACAGTGTGGATCATCCAGTGA CTCAAACACCAACAACAATAACATTTGTGGA
40 TCATCCGAATGACATAAAAAACAAGAACAATGTTGACAACAAGGACAATAACAGCAGAGACA
AGTAATTAATAGGAAACACTCCGGTTTAGATGATACCGATCTATCGGATTGTAAC TTATTC
TTCTTTCTTAAAAAATGTTTAGGAGCAAACAAGATTTTATTTGTTAGTGATTTCAACTG
ATTACATTTTTAGTTAAAAAATGGATTCTCCTTAATAACT

45

SEQ ID NO: 5

50 MCRQNCRAKSSPEEVI STDENLLIYCKPVRLYNI FHLRSLGNPSFLPRCLNYKIGAKRKRKS
RSTGMVVFNYKDCNNTLQRTEVREDCSPFC SMLCGSFKGLQFHLNSSHDLFEFEFKLLEEY
55 QTVNVSVKLNSFI FEEEGSDDDKFEPFSLCSKPRKRRQRGGRNNTRRLLKVCFLPLDSPSLAN
GTENGIALLNDGNRGLGYPEATELAGQFEMTSNIPPAIAHSSLDAGAKVILTTEAVVPATKT
RKLSEAERSEARSHLLLQKRQFYHSHRVQPMAL EQVMSDRDSEDEVDDDVADFEDRQMLDDFV
60 DVNKDEKQFMHLWNSFVRKORVIADGHI SWACEVFSRFYEKELHCYSSLFWCWRLFLI KLWN
HGLVDSATIINNNTI LENCNRTSVTNNNNNSVDHPSDSNTNNNNI VDHPNDI KNKNVVDNKD
NNSRDK

65

ES 2 307 491 T3

SEQ ID NO: 6

5 AAAGAGAAGAGCTTTGACTCTCTCATTGGTCAAACCTGACTGTATTTATATGCGTTATTGTG
TGGTAAAGTTTCGACCTTTGACTTGACAAGTTGCCGTTAAGAAGAGAGATGCGTAGATCAGC
GAGTGGTTCTAGAGTTTTGGATCATTTCGGCGACTTCAAGGTCTCCGCCTCGATCTCAGA
10 GTGTTACAGCAATGGAAGATGATGTGGAGCTGCTTTGCTTAGGTACGATCCGAATTCTCAA
GCGGGGAAGAGAGAGAAATCAAGATTCCAGATTTTCAGAAAACGTCATCCATTTGATTCCTCT
CATTCTTCTTCTGTGTGCGCAATCCTCTGGCTCCTCTTACTCAGGTAAGCCGAGAAATT
15 GTTCAATCTCTATGAATCCATAATTGATCTGTGAACTTAATTAGGGATTTTACAAAGACT
CATATGGATATGAGGATCGAGATGTCTCTGCAACGTTAGAATCTTGTGTTGAATTATGGTTT
CAATTTGTTTCATATAACTAAATCGGTGATGGATTTGGAATTTGTCAGCAGCGTTAAGGAG
TTGAGTTCAAAAGCAACATGTTGTCTTGTCTCCATGGGAACTCATATTCAGTTTTGGGAAA
20 GGAAACAATTCCTTTACCGCCGGTGATTTTGTGCCGCAAACCATTTCGATTTGTAATTTTTG
GTTCTGTAGACACACAAAAGGATCTCTCGTTTTCATGAAATGTATGTTAATATTTAGTGA
TATACATCACAACTCAAGTAGAAAACACTGATGGTTATCCATTAATCATTCTATTGGTTCG
AAAAAAGATTAGTTTTCAACTTAATGCCACCTTAGGATTATATGTTCCCTGTGAGTTTCAGCT
25 AGCCAACTCAACTAGAGTTAAACAATGGAATCAAATACATATTCAGTAATTTATTTTAAAC
TCTGACTATTTATGTAACAACAATGGAATCAAATGGAAGGTATGAAGATTCTATTCT
TAGTGTGAAAAGTATAGATCAATGATTCTTAATTTCTTCATCCTCCACGCATAGATCAATGG
TGAATATGGTTTTAAATCCTTAATACTCACTGTACTGCCATGGTAGAGTTAAAAAACAAT
30 TTTAGAAATATTAGTGGATTAAGGCATTAAGCTGTCCAAGTTGCTTGTATTTCTTTTCATT
TTATTAATTAATAAAGTTCAACTATTTATTGACTAATAATAATACGTGTTAAATGGTTA
TCGGTTTAAATATGGGCCATAGGCCAGACTTGAAGAAAACTTGAACCCAAAGTTTTAT
35 TTTACTTGTTTTCTTTCTCAGTGAATATCTCCCAATCAAGCTTCTTCAATTTTGCTTGCTC
TCTCTTTACACGGCCAATCGGTGTTTTCGCAGCTTTCAGGTTTGTCTCAATCTCAAATTA
ATCGGAGTCAAGTAATAACAATTGATAACCCTAATTGTTTTCAATTATATTGTAAGATTTGAA
40 ATTTTGCAGTAGATCCGGAATCGTATTCTAGTTCTGGAATCGTTGATCTCGATGGAATTTTT
TTAAGATTTCTTCATACACATTTGGTTCAAAGATCACATAATTTATTTTAATTTGATAA
GTATGATGATTCTGCTAAGTGGCATTGGATAAAGTTTTCATTTTTGCAATACGTCTAAACTT
GTCTATGCTTGAATGAACTCTCTGAGTTGCTTAAAAAGTCTTGTGCTTTCTTTATTACACA
45 GGCCTCAATACAAGACATTCTATATAAGCATATTGCAGAAGAGGCGGTTCTAATTGTTGCAT
GGAGTTGAACAATATGACGTAGGAAATTTAATTTAGGGGAGGCCTCAGAGTTTGCACTAA

50

55

60

65

ES 2 307 491 T3

CTTCATAATCAGCTCTGGACGTTGTTGATTGTATTTGAACAAGAATGTGTAGGCAGAATTGT
CGCGCGAAATCCTCACCGGAGGAAGTGATTTCAACTGATGAGAATCTCTTGATATATTGTAA
5 ACCTGTTGACTATATAACATCTTTCACCTTCGCTCTCTAGGCAACGTATGATTTGGCCTTC
CTCTCTCATCATTTTAGCTTAGTAATCTTTCATCTCCTGTGTAGATCACCCACTAATAGTTT
GAGTTTGCTAAGCTGATTATGGTCTGACTCATGGCGAGTGTGTGCTTCTTTTGTCTCCTAAT
10 GTTATTTGAACTTGTGTTTGTGTTGTCAGCCATCGTTTCTGCCAAGATGCTTGAACTACAA
AATTGGGGCAAAGCGCAAAGAAAGTATGCGTTTCTTCTTGAATGTAGTTGCCACAGTGATA
TGTTATTTATCTTACTTCTAATATGGAAGCTGATGAACTATTTATCTTTGTTGAGTAGATAT
15 GGACATAATGAATGGTTTCTTCTTGTTCATGCTATACACTTATATTTTACAAAATTGTGTT
TTGCTTAGGTCAAGATCTACTGGGATGGTAGTTTTCAACTATAAGGATTGTAATAATACATT
ACAAAGAAGTGAAGGTTAGTCTTTTTCTGTTCTTCGACAAAATTGATGTCAATGTCTATGT
TTCTCTAGATGATTTGTATTTACTATTTTTTCTGTATTGTCACGCAGTTAGGGAGGATTG
20 TTCTTGTCCATTTTGCTCTATGCTATGTGGTAGCTTCAAGGTGGGCAACTATTACAAGTGA
GTTTCTTCCGGGGCTTTCATATCTAACACTGTGAAATGCTACTGCCGTTAATGCTATATA
CTTTCAGTGTTTGGTTACATATTTTTGTGTTTGTGTTTGTCTTCTTGCTCTTTTTAAACTG
CTGAGTGTGTGCTTATCTGAGAAAACATGTTCCAGTTCGAGCTTACAATCCATTGTCTTGTG
25 TCTATGCAGGGCTGCAATTTCAATTTGAATTCATCTCATGATTTATTTGAATTTGAGTTCAA
GGTATGTGGTTTTATGGAATTTCTGTTTTGCCTATGCCGTTAGTAATGAGGTTATAGTTAA
AAAAGGGTCTTTCCTATTGTAGCTTTTGGAGAATACCAGACAGTTAATGTTTCTGTAAAAC
TTAATTCCTTCATATTTGAGGTCAGTTACTTTAACTTGGTTAATTGGGAAATCCTATAGCT
30 GGTGAAAATTTGGTTTATATCCATCCTTATTTGTACTAGGAAGAAGGAAGTGATGATGATA
AATTTGAGCCCTTCTCTCTCTGGTAACTCTCAGAACCCTTGATTAATAACCTTAATAGCAG
TAACTCCTTGCTTTTCTTGTGCTAGTACTTCTCTATAAATCCAACCACAATGTTTGCAGCTCG
35 AAACCTCGTAAGCGTAGACAAAGAGGTGGCAGAAATAACACCAGGAGACTTAAAGTATGCTT
TTTACCGTTGGATTCACCCAGTTTAGCTAATGGCACAGAAAATGGAATTGCCCTGCTGAATG
ATGGTAAAATCACATCTTCTTCTGTGGTATTGCTTGTGGCTTAGAACTTCATTTTACAGAAG
40 AAGATACAATGTCCTGATTGTTTTAGTTTTTGTACTTCTCCTCGCATTCTTCTTGTGAGGGTA
ATGTTACCAGAACTGATGTACAAAATTAATGGCATGCTACAGGAAACCGTGGTTTAGGATAT
CCCAGGGCAACAGAGCTTGCTGGACAATTTGAGATGACTAGCAACATTCCACCAGCCATAGC
45 CCACTCTTCTCTGGACGCTGGTGTAAAGTTATATTAACAACCGAAGCTGTGGTCCCTGCTA
CTAAGACAAGAAAGTTATCTGCTGAGCGATCAGAGGCTAGAAGGTTTGTTCATCATGACACC
CCGTCATCATAATTACCATACCTGTTGTTACAAATGTTCTTCTTATTATGGATAAGTGTTTA
CTGTAAGCCATATTAACCGAGAAAATTTCTTCCAGCCACCTACTTCTTCCAGAAAACGCCAAT
50 TCTATCATTCTCACAGAGTCCAGGTGATCCAAGTTCCTTACCTACTTCTTAGGCATTTTCT
TTAAATTGCTCATGATGATATCTTATCAAAGCATACTTGGTTTGTCTCATCTAAATTTGTA
TTTTGATTCTGTATGTATCAACGCAAAAAAATTATGTCCATGTTGTCTCCGTTTTATTGCCA
55 CTAACCAAAAAGTGCATGTTTCTTGTGACAAGCCAATGGCGCTTGAGCAAGTAATGTCTGAT
CGGGATAGCGAGGATGAAGTCGATGACGATGTTGCAGATTTTGAAGATCGCCAGGTATTCCA

60

65

ES 2 307 491 T3

5
10
15
20
25
30
35
40

TGATTTCTTTCTGCGTTCATTAAGTAGGCAACAGAAAATGGTATACGATGTAACCTTGCTAAT
GGCTTTTGAAACTTAAAAAGCTGCAGATGCTTGATGACTTTGTGGATGTGAATAAAGATGA
AAAGCAATTCATGCATCTTTGGAACCTGTTTGTAGAAAAACAAAGGTAACACTTCTCTTAC
ACTTGAACACACACAAAAAGACCTTATGTCTTACATTCATACCTGTCTAAAATGATTCTGCT
TATGGAACTTTGAGCTCAAATTATGATTGATGTTTGCAGGGTTATAGCAGATGGTCATATCT
CTTGGGCATGTGAAGTATTTTCAAGATTTTACGAGAAAGAGTTGCACTGTTACTCATCACTC
TTCTGGTAATATAAGTACACCAACATATACAGACACATAACTACACTATCAATTTTGTTC
GTTTTCTGAAAGAAAAATAAAAAATCCAGGTGTTGGAGATTGTTTTGATTAAACTATGG
AACCATGGACTTGTGACTCAGCCACCATCAACAACTGCAATACCATCCTCGAGAATTGCCG
TAATACCTCAGTCACTAACAACAACAACAGTGTGGATCATCCCAGTGACTCAAACACCA
ACAACAATAACATGTGGATCATCCGAATGACATAAAAAACAAGAACAATGTTGACAACAAG
GACAATAACAGCAGAGACAAGTAATTAATAGGAAACACTCCGGTTTAGATGATACCGATCT
ATCGGATTGTAACTTATTCCTTCTTAAAAAATGTTTAGGAGCAAACAAAGATTTTAT
TTGTTAGTGATTCAACTGATTACATTTTGTAGTTAAAAAATGGATTCTCCTTAATAACTAA
AGACTGAAAAATAAGATAAGTTTCTTAATTTTCTTTTTGACTTGAGAAAAAGCTCCTCTA
GACCTCTAGTAAATAGGAGTTATATATTAATCAAGTACATAACATAAAAAATATATATATA
GTGCAATAGATTGAAAACAAATCAAGAAATTAATTAAGACACAGTGATTAAGCTTAAACC
CCATTTGACTTGTTCCTTCTCAATGAATCCCTCACAAGCAGCAAGCTTCTTCGATTTTGCT
TTGACACCACCAATCAGTGTTCGAACTTTTCAGGTTTGTCTCGATTTCAAACCTAGATCGG
AGTCAAGTGATAAAATGACTAACATAAATTATCCCGTTCTCTCGTAAGAGTTGGGATTTAG
CAGTAGATCGGAAATCGGAATTTACGTTTTTGTAAAAAGATTGATGGTTTAGGTAATAAAAC
ATAGTTCTGGATTCATTGCTTCTAGTTGATTCTCGAATGTTTGATTTGCAATGCACATTT
TTGGTTCAAAGGATCACATAATTTGCTTTAAAAATTTGACAAAAACATAACCATCAAATTTCTCA
TATTTCTTCAAGTAACTCGAACTTGTGGAAATCTATATACTCTGGGCTATGTAGATAAAGT
CTTAACATTTTGGTCAACATTTGTTGTTCTCTAAACTAGTTTGGGTTCTCTGTTTTAAAGTT
TGGTGCTTTCACTATTACACAGGTCTTATACAAGACTACAGTCTCTAGAAGCATAATATCGT
CGACTCTGTTTTGAGTTTCCCAACAGTGGTTGAAGCTTAAGGAGGTTCTTATGTGCCTTTTG
AAATC

45 SEQ ID NO: 7

50
55

CAAGCTTCTTCAATTTGCTTGCTCTCTCTTACACGGCCAATCGGTGTTTTCGCAGCTTT
CAGGCCTCAATACAAGACATTCATATAAGCATATTGCAGAAGAGGCGGTTCTAATTGTTGC
ATGGAGTTGAACAATATGACGTAGGAAATTTAATTTAGGGGAGGCCTCAGAGTTTGCCT
AACTTCATAATCAGCTCTGGACGTTGTTGATTGATTTGAACAAGAATGTGTAGGCAGAATT
GTGCGCGGAAATCCTCACCAGGAGGAGTGAATTTCACTGATGAGAATCTCTTGATATATTGT
AAACCTGTTGACTATATAACATCTTTCACCTTCGCTCTCTAGGCAACCCATCGTTTTCTGCC

60

65

ES 2 307 491 T3

5 AAGATGCTTGAAC TACAAAATTGGGGCAAAGCGCAAAAAGAAAGTCAAGATCTACTGGGATGG
TAGTTTTCAACTATAAGGATTGTAATAATACATTACAAAGAACTGAAGTTAGGGAGGATTGT
TCTTGTCCATTTTGTCTATGCTATGTGGTAGCTTCAAGGTGGGCAACTATTACAAC T GAGG
10 GGCTGCAATTTCAATTGAATTCATCTCATGATTTATTTGAATTTGAGTTCAAGCTTTTGGAA
GAATACCAGACAGTTAATGTTTCTGTAAAACCTTAATTCCTTCATA TTTGAGGAAGAAGGAAG
TGATGATGATAAAATTTGAGCCCTTCTCTCTGCTCGAAACCTCGTAAGCGTAGACAAAGAG
15 GTGGCAGAAATAACACCAGGAGACTTAAAGTATGCTTTTTACCGTTGGATT CACCCAGTTTA
GCTAATGGCACAGAAAATGGAATTGCCCTGCTGAATGATGGAAACCGTGGTTTAGGATATCC
CGAGGCAACAGAGCTTGTGGACAATTTGAGATGACTAGCAACATTCCACCAGCCATAGCCC
20 ACTCTTCTCTGGACGCTGGTGCTAAAGTTATATTAACAACCGAAGCTGTGGTCCCTGCTACT
AAGACAAGAAAGTTATCTGCTGAGCGATCAGAGGCTAGAAGCCACCTACTTCTTCAGAAACG
CCAATTCTATCATTCTCACAGAGTCCAGCCAATGGCGCTTGAGCAAGTAATGTCTGATCGGG
25 ATAGCGAGGATGAAGTCGATGACGATGTTGCAGATTTTGAAGATCGCCAGATGCTTGATGAC
TTTGTGGATGTGAATAAAGATGAAAAGCAATTCATGCATCTTTGGAAC TCGTTTGTAAGAAA
ACAAAGGGTTATAGCAGATGGTCATATCTCTTGGGCATGTGAAGTATTTCAAGATTTTACG
AGAAAGAGTTGCACTGTTACTCATCACTCTTCTGGTGTGGAGATTGTTTTTGATTAAACTA
30 TGGAACCATGGACTTGTGCGACTCAGCCACCATCAACAAC T GCAATACCATCCTCGAGAATTG
CCGTAATACCTCAGTCACTAACAACAACAACAGTGTGGATCATCCCAGT GACTCAAACA
CCAACAACAATAACATTGTGGATCATCCGAATGACATAAAAAACAAGAACAA T GTTGACAAC
35 AAGGACAATAACAGCAGAGACAAGTAATTAATAGGAAACACTCCGGTTTAGATGATACCGA
TCTATCGGATTGTAAC T TATTCTTTCTTAAAAAAAATTGTTTAGGAGCAAACAAGATTT
TATTTGTTAGTGTATTCAACTGATTACATTTTTAGTTAAAAAAATGGATTCTCCTTAATAAC
T

SEQ ID NO: 8

40 MCRQNCRAKSSPEEVISTDENLLIYCKPVRLYNIFHLRSLGNPSFLPRCLNYKIGAKRKRKS
RSTGMVVFNYKDCNNTLQRTEVREDCSPFCSMLCGSFKVGNYYN

SEQ ID NO: 9

50 ACATTTTCGTACCGCTCAAGATTTAAGAAGCGTAAAAGGGTGGAAATCTCAAGTGATAAAAT
TAGGCATGTACATCCACATATTGTGGATTCAGGATCACCTGAAGATGCCCAGGCAGGATCTG
AAGACGATTACGTGCAGAGGGAAAATGGTAGTTCTGTAGCACACGCTTCTGTTGATCCTGCT
55 AATTCATTACACGGTAGCAATCTTTCAGCACCAACAGTGTACAGTTTGGGAAGACAAGAAA
GCTGTCTGTTGAACGAGCTGATCCAGAAATCGGCAGCTCCTACAAAAACGCCAGTTCTTTC
ATTCTCACAGGGCTCAACCAATGGCATTGGGAGCAGTTTTCTCAGATCGTGATAGTGAAGAT
60 GAGGTTGATGATGACATTGCTGATTTTGAAGATAGACAGATGCTTGATGATTTTGTGATGT
TACCAAAGACGAACTTATTATGCATATGG

ES 2 307 491 T3

SEQ ID NO: 10

TFSYRSRFKKRKRVEISSDKIRHVPHIVDSGSPEDAQAGSEDDYVQRENGSSVAHASVDPA
NSLHGSNLSAPTVLQFGKTRKLSVERADPRNRQLLQKRQFFHSHRAQPMALGAVFSDRDSED
EVDDDIADFEDRQMLDDFVDVTKDELIMHM

5

10

SEQ ID NO: 11

ACATGCATATCCTGATGCTGAATGTGCTCAATTGGTACCTGGGAATAATCTTGACCTCCTG
CCATGCTACAATTTGCAAAGACAAGAAAATTATCAATTGAACGGTCTGACATGAGAAACCGT
ACACTCCTTCAAAAACGACAATTTTTTCACTCACATAGAGCTCAGCCAATGGCAGCTGAGCA
AGTTATGTCAGATCGGGATAGTGAGGATGAAGTTGACGATGATGTTGCAGATTTTGAAGACC
GAAGGATGCTTGATGATTTTGTAGACGTGACTAAAGATGAGAAGCAAATGATGCACCTTGTGG
AACTCATTGTGAGG

15

20

25

SEQ ID NO: 12

HAYPDAECAQLVPGNNLAPPAMLQFAKTRKLSIERSDMRNRTLLHKRQFFHSHRAQPMAAEQ
VMSDRDSEDEVDDDVADFEDRRMLDDFVDVTKDEKQMMHLWNSFVR

30

35

SEQ ID NO: 13

ATGGATCCGATTAAGCTGACAACAGAAGCTAAGGTCCCTGCTAAGCGATCAAAGGCTACAAG
CCACTACTTGCTCTTCATAAACGCCAGTTCTATCATTCCCGAACCGGTCAGCCATTGTCAC
TTGAGCAAGTTATGCTGACCGAGATAGCGAAAATGACGTCGACAAAATGATGATGCTGCA
CATCTCGAAGAAAGCCAGATGCTTAATGGTTCCATGGATGAGAATGAAATCGTAGCAGAGAG
ATTCATAAAACTTTGGAACCTCTTTGTTAAACAGCAAAGGATTGTTGCAGATGCTCATATTC
CTTGGGCATGTGAAGCATTCTCAAGATTACACCTGCAAGAGCTGCGCAGTAACTTATCACTC
GACTTGTGCTGGAGACAATTCATGATCAAACAATGGGATTATGGACTTCTTGACAGAGTCAC
CATGAACAAATGCAATACCATCATCTACCATAATATCTCAACTACCAACGATGACATAAACA
ATAACAACACAAGGACGACTGATAATATGGATGTTGTCGACGATGACATAAACAGAGACAAG

40

45

50

SEQ ID NO: 14

MDPIKLTTEAKVPAKRSKATSHYLPLHKRQFYHSRTGQPLSLEQVMSDRDSENDVDKNDDAA
HLEESQMLNGSMDENEIVAERFIKLWNSFVKQQRIVADAHIPWACEAFSRLHLQELRSNLSL
DLCWRQFMIKQWDYGLLDRVTMNCNTI IYHNISTTNDIINNNTTRTTDNDVDDDIINRDK

55

60

65

ES 2 307 491 T3

SEQ ID NO: 15

5 CTCTGAGGAGACACTTTTTTTTTCCTCCCTCCTTCCCTCCTCTCCTCCTCCCTTCCCTTCCC
CTCTCCTCCCCTCTCTCCTCCTTCCCCCTCGGTCCGCCGGAGCCTGCTGGGGCGAGCGGTT
GGTATTGCAGGCGCTTGCTCTCCGGGGCCGCCCGGGGTAGCTGGCGGGGGAGGAGGCAG
10 GAACCGCGATGGCGCCTCAGAAGCACGGCGGTGGGGGAGGGGGCGGCTCGGGGCCAGCGCG
GGGTCCGGGGGAGGCGGCTTCCGGGGTTCGGCGGCGGTGGCGGCGGCGACGGCTTCCGGGCGG
CAAATCCGGCGGCGGGAGCTGTGGAGGGGGTGGCAGTTACTCGGCCTCCTCCTCCTCCTCCG
15 CGGCGGCAGCGGCGGGGGCTGCGGTGTTACCGGTGAAGAAGCCGAAAATGGAGCACGTCCAG
GCTGACCACGAGCTTTTCCCTCCAGGCCTTTGAGAAGCCAACACAGATCTATAGATTTCTTCG
AACTCGGAATCTCATAGCACC AATATTTTTGCACAGA ACTCTTACTTACATGTCTCATCGAA
ACTCCAGAACAACATCAAAAGGAAAACATTTAAAGTTGATGATATGTTATCAAAAGTAGAG
20 AAAATGAAAGGAGAGCAAGAATCTCATAGCTTGTGAGCTCATTTGCAGCTTACGTTTACTGG
TTTCTTCCACAAAATGATAAGCCATCACCAA ACTCAGAAAATGAACAAAATTTCTGTTACCC
TGGAAGTCTGCTTGTGAAAGTTTGCCACAAAAAAGAAAGGATGTAAGTTGTCCAATAAGG
CAAGTTCCCACAGGTAAAAAGCAGGTGCCTTTGATTCCTGACCTCAATCAAACAAAACCCGG
25 AAATTTCCCGTCCCTTGCAGTTTCCAGTAATGAATTTGAACCTAGTAACAGCCATATGGTGA
AGTCTTACTCGTTGCTATTTAGAGTGA CTGTCAGGAAGAAGAGAGTTTAATGGAATGATT
AATGGAGAAACCAATGAAAATATTGATGTCAATGAAGAGCTTCCAGCCAGAAGAAAACGAAA
30 TCGTGAGGATGGGGAAAAGACATTTGTTGCACAAATGACAGTATTTGATAAAAACAGGCGCT
TACAGCTTTTAGATGGGGAAATATGAAGTAGCCATGCAGGAAATGGAAGAATGTCCAATAAGC
AAGAAAAGAGCAACATGGGAGACTATTCTTGATGGGAAGAGGCTGCCTCCATTGAAACATT
35 TTCTCAGGGACCTACGTTGCAGTTCACTCTTCGTTGGACAGGAGAGACCAATGATAAATCTA
CGGCTCCTATTGCCAAACCTCTTGCCACTAGAAATTCAGAGAGTCTCCATCAGGAAAACAAG
CCTGGTTCAGTTAAACCTACTCAAAC TATTGCTGTTAAAGAATCATTGACTACAGATCTACA
40 AACAAAGAAAAGAAAAGGATACTCCAATGAAAACCGACAAAATTAAGAATATTTTATCAGT
TTCTCTATAACAACAATACAAGGCAACAACTGAAGCAAGAGATGACCTGCATTGCCCTTGG
TGTA CTCTGAACTGCCGAACTTTATAGTTTACTCAAGCATCTTAAACTCTGCCATAGCAG
45 ATTTATCTTCAACTATGTTTATCATCCAAAAGGTGCTAGGATAGATGTTTCTATCAATGAGT
GTTATGATGGCTCCTATGCAGGAAATCCTCAGGATATTCATCGCCAACCTGGATTTGCTTTT

50

55

60

65

ES 2 307 491 T3

AGTCGCAACGGACCAGTTAAGAGAACACCTATCACACATATTCTTGTGTGCAGGCCAAAACG
AACAAAAGCAAGCATGTCTGAATTTCTTGAATCTGAAGATGGGGAAGTAGAACAGCAAAGAA
5 CATATAGTAGTGGCCACAATCGTCTGTATTTCCATAGTGATACCTGCTTACCTCTCCGTCCA
CAAGAAATGGAAGTAGATAGTGAAGATGAAAAGGATCCTGAATGGCTAAGAGAAAAACCAT
TACACAAATTGAAGAGTTTTCTGATGTTAATGAAGGAGAGAAAGAAGTGATGAAACTCTGGA
ATCTCCATGTCTGAAGCATGGGTTTATTGCTGACAATCAAATGAATCATGCCTGTATGCTG
10 TTTGTAGAAAATTATGGACAGAAAATAATTAAGAAGAATTTATGTGAAAACCTTCATGCTTCA
TCTAGTCAGCATGCATGACTTTAATCTTATTAGCATAATGTCAATAGATAAAGCTGTTACCA
AGCTCCGTGAAATGCAGCAAAAATTAGAAAAGGGGAATCTGCTTCCCCTGCAAACGAAGAA
15 ATAACGAAGAACAAAATGGGACAGCAAATGGATTTAGTGAATTAACCAAAAGAGAAAAGC
TTTGAAACAGATAGTGTCTCAGGGGTTTCAAAAACAGAGCAAAAAACAAAACCTCTGAAAAG
CTCTAACCCCATGTTATGGACAAACACTGAAATTACATTTTAGGGAATTCATCCTCTAAGAA
TTATGTTTTGTTTTAATCATATGTTCCAAACAGGCACCTGTTAGATGAAGTAAATGATTTT
20 AACAAAGGATATTTGTATCAGGGTCTACTTCACTTCATTATGCAGCATTACATGTATATCAC
TTTTATTGATGTCATTAAAACATTCTGTACTTTAAGCATGAAAAGCAATATTTCAAAGTATT
TTTAACTCAACAAATGTCATCAAATATGTTGAATTGATCTAGAAATTATTTCATATATAAA
25 TCAGAAATTTTTTGCAATTTATGAACGGCTGTTTTTCTACTTTGTAATTGTGAGACATTTTCT
TGGGGAGGGAAAATTGGAATGGTTCCTTTTTTAGAAATTGAAGTGGTCTTCATATGTCAAC
TACAGAAAAGGAAAAAATAGAAATTGAAGGATTTTTATGAAATTATATTGCATTACTATTT
GCAGTCAAACCTTTGATCCTTGTTTTTGAATCAITTTGTCAATTCGGAATGAAAAATTATAAT
30 GTAATTTTACATTACATAAGTTCCTTTTACAATTAAAAAATAGCACTTCTTCATCTTATGCC
TGTTTGAGAAGATATTAATTTTTACATTGTTGACAGTGAATGCTATGTTGGTTTATAAGA
TTACAGACCATTTGTTTTCATGTGGATAATTTAGTGCATTGCTCACCCGGTATGTTTTTTT
35 TTTTTAACTTGAACATTTTGCTTGTTTTGTTTTTCTTTTTTAATTAGATAATCACACGGAAA
ATTAAGCTGTTTCATATCTTTAAATTAGGATTGCAAACCAAGGAAAGAACGCATTTGAGATTT
TAAGATGTCACCTTATAAGGGGAGAAGTGTCTTAAAAAGTCAACCAGAAAACCTGTTATGCCT
40 TTTATTTGTTTGCAAGGATGTCTTTGTAATGTGTTTCATGAATAGAATATCCAATAGAGATA
AGCTGACTTGAATCATTTTGAGCAATTTGCCCCTGTGTTATATGTGTTTCACGCACATATTT
GCAGTTGGATTTTCTCCAACAGAAAGTGGATTCACTACTGGCACATTAACAAGCACCAATAG
GTTTTTATTCCAACCTCCGAGCACTGTGGTTGAGTAACATCACCTCAATTTTTTATTATCCTT
45 AAAGATATTGCATTTTCATATTTCTTTATTTATAAAGGATCAATGCTGCTGTAATACAGGTA
TTTTTAATTTTAAAATTTCAATCCACCACCATCAGATGCAGTTCCCTATTTTGTTTAATGAA
GGGATATATAAGCTTTCTAATGGTGTCTTCAGAAATTTATAAAAATGTAAATACTGATTTGAC
50 TGGTCTTTAAGATGTGTTTAACTGTGAGGCTATTTAACGAATAGTGTGGATGTGATTTGTCA
TCCAGTATTAAGTTCCTTAGTCATTGATTTTTGTGTTTAAAAAAAATAGGAAAGAGGGAAAC
TGCAGCTTTCATTACAGATTCCTTGATTGGTAAGCTCTCAAATGATGAGTTCTAGTAACT
CTGATTTTTGCCTCTGGATAGTAGATCTCGAGCGTTTATCTCGGGCTTTAATTTGCTAAAGC
55 TGTGCACATATGTAAAAAAGATATTTTAGGGGAGATGTAGGTGTAGAATT
ATTGCTTATGTCATTTCTTAAGCAGTTATGCTCTTAATGCTTAAAAGAAGGCTAGCATTGTT
TGCACAAAAGTTGGTGATTCCCACCCCAAATAGTAATAAAATTACTTCTGTTGAGTAACT
60 TTTTATGTCATCGTAAAAGCTGGAAAAATCCCTTTGTTTCTATTTATAAAAAAAGTGCTTTT
CTATATGTACCCTTGATAACAGATTTTGAAGAAATCCTGTAAGATGATAAAGCATTGGAATG
GTACAGTAGATGTAAAAAATTCAGTTTAAAAGAACATTTGTTTTTACATTAAATGTTTAT
65 TTGAAATCAAATGATTTTGTACATAAAGTTCAATAATAT

SEQ ID NO: 16

5 LRRHFFFPSPFPPLLLPSLPLSSPLSSFPPRSAGACWGERLVLQALALRGRPAGSWRGEEAG
 TAMAPQKHGGGGGGGSGPSAGSGGGGFGGSAAVAAATASGGKSGGGSCGGGSSYSASSSSSA
 AAAAGAAVLPVKKPKMEHVQADHELFLQAFEKPTQIYRFLRTRNLIAPIFLHRTLTYMSHRN
 10 SRTNIKRKTFFKVDMLSKVEKMKGEQESHLSAHLQLTFTGFFHKNDKPSNSENEQNSVTL
 EVLLVKVCHKKRKDVSCPIRQVPTGKKQVPLIPDLNQTKPGNFPSLAVSSNEFEPNSNSHMVK
 SYSLLFRVTRPGRREFNGMINGETNENIDVNEELPARRKRNREDGEKTFVAQMTVFDKNRRL
 QLLDGEYEVAMQEMEECPISKKRATWETILDGKRLPPFETFSQGPTLQFTLRWTGETNDKST
 15 APIAKPLATRNSSESLHQENKPGSVKPTQTIAVKESLTTDLQTRKEKDTPNENRQKLRIFYQF
 LYNNNTRQQTEARDDLHCPWCTLNCRKLYSLLKHLKLCHSRFIFNYVYHPKGARIDVSI
 YDGSYAGNPDQIHRQPGFAFSRNGPVKRTPIITHILVCRPKRTKASMSEFLESEDEGEVEQQRT
 20 YSSGHNRLYFHSDTCLPLRPQEMEVDSEDEKDPWELREKTIITQIEEFSDVNEGEKEVMKLWN
 LHVMMKHGFIADNQMNHACMLFVENYGQKI IKKNLCRNFMHLVSMHDFNLISIMSIDKAVTK
 LREMQQLEKGESASPANEEITTEQNGTANGFSEINSKEKALETDSVSGVSKQSKKQKL

25 **Referencias citadas en la descripción**

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

30 **Documentos de patente citados en la descripción**

- WO9638560A [0008] [0148]
- 35 • EP270355A [0053]
- EP0116718A [0053]
- US5100792A [0053]
- 40 • EP444882A [0053]
- EP434616A [0053]
- 45 • WO9209696A [0053]
- WO9400583A [0053]
- EP331083A [0053]
- 50 • EP175966A [0053]
- EP290395A [0053]
- 55 • WO8706614A [0053]
- DE4005152 [0053]
- WO9012096A [0053]
- 60 • US4684611A [0053]
- WO9214828A [0054]
- 65 • EP486234A [0056]
- EP486233A [0056]

ES 2 307 491 T3

- WO9201047A [0072]
- WO9614414A [0079]
- 5 • US5231020A [0133]
- GB9601332W [0148]

Literatura citada en la descripción que no son patentes

- 10 • **WILSON DEAN** Seminars in Cell and Developmental Biology, 1996, vol. 7, 435-440 [0004]
- **CHANDLER WILSON DEAN** The Plant *Journal*, 1996, vol. 10, 4637-644 [0005]
- 15 • **LEVY DEAN** *The Plant Cell*, 1998, vol. 10, 1973-1999 [0006]
- **ALTSCHUL et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-10 [0038]
- **SMITH WATERMAN** Advances in Applied Mathematics, 1981, vol. 2, 482-489 [0038]
- 20 • **ALTSCHUL et al.** *Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480 [0042]
- **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 1989, [0049]
- 25 • *Current Protocols in Molecular Biology*, 1992, [0049]
- **BEVAN** *Nucl. Acids Res.*, 1984, vol. 12, 8711-8721 [0049]
- Plant transformation and expression vectors **GUERINEAU MULLINEAUX** *Plant Molecular Biology Labfax-*
30 *BIOS Scientific Publishers* 1993 121-148 [0049]
- **NAR**, 1984, vol. 12, 228711-87215 [0053]
- **GREEN et al.** *Plant Tissue and Cell Culture Academic Press* 1987 [0053]
- 35 • **FREEMAN et al.** *Plant Cell Physiol.*, 1984, vol. 29, 1353- [0053]
- **KINDLEPNAS** U.S.A., 1990, vol. 87, 1228- [0053]
- 40 • **OARD** *Biotech. Adv.*, 1991, vol. 9, 1-11 [0053]
- **TORIYAMA et al.** *Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 1072-1074 [0054]
- **ZHANG et al.** *Plant Cell Rep.*, 1988, vol. 7, 379-384 [0054]
- 45 • **ZHANG et al.** *Theor Appl Genet*, 1988, vol. 76, 835-840 [0054]
- **SHIMAMOTO et al.** *Nature*, 1989, vol. 338, 274-276 [0054]
- 50 • **DATTA et al.** *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 736-740 [0054]
- **CHRISTOU et al.** *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 957-962 [0054]
- **PENG et al.** *International Rice Research Institute*, 1991, 563-574 [0054]
- 55 • **CAO et al.** *Plant Cell Rep.*, 1992, vol. 11, 585-591 [0054]
- **LI et al.** *Plant Cell Rep.*, 1993, vol. 12, 250-255 [0054]
- 60 • **RATHORE et al.** *Plant Molecular Biology*, 1993, vol. 21, 871-884 [0054]
- **FROMM et al.** *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 833-839 [0054]
- **GORDON-KAMM et al.** *Plant Cell*, 1990, vol. 2, 603-618 [0054]
- 65 • **D'HALLUIN et al.** *Plant Cell*, 1992, vol. 4, 1495-1505 [0054]
- **WALTERS et al.** *Plant Molecular Biology*, 1992, vol. 18, 189-200 [0054]

ES 2 307 491 T3

- **KOZIEL** *et al. Biotechnology*, 1993, vol. 11, 194-200 [0054]
- **VASIL**, I. K. *Plant Molecular Biology*, 1994, vol. 25, 925-937 [0054]
- 5 • **WEEKS** *et al. Plant Physiology*, 1993, vol. 102, 1077-1084 [0054]
- **SOMERS** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 1589-1594 [0054]
- **HIEI** *et al. The Plant Journal*, 1994, vol. 6, 271-282 [0054]
- 10 • **SHIMAMOTO**, K. *Current Opinion in Biotechnology*, 1994, vol. 5, 158-162 [0055]
- **VASIL** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 667-674 [0055]
- 15 • **VAIN** *et al. Biotechnology Advances*, 1995, vol. 13, 4653-671 [0055]
- **VASIL** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 702- [0055]
- Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants **VASIL** *et al. Laboratory Procedures and Their Applications*
20 *Academic Press* 1984 vol. I, II an, [0057]
- **WEISSBACH WEISSBACH** *Methods for Plant Molecular Biology Academic Press* 1989 [0057]
- **ARMITAGE** *et al. Nature*, 1992, vol. 357, 80-82 [0071]
- 25 • **PCR** protocols; *A Guide to Methods and Applications Academic Press* 1990 [0087]
- **SMITH** *et al. Nature*, 1988, vol. 334, 724-726 [0132]
- 30 • **ZHANG** *et al. The Plant Cell*, 1992, vol. 4, 1575-1588 [0132] [0133] [0140]
- **ENGLISH** *et al. The Plant Cell*, 1996, vol. 8, 179-188 [0132]
- **BOURQUE** *Plant Science*, 1995, vol. 105, 125-149 [0132]
- 35 • **FLAVELLPNAS** USA, 1994, vol. 91, 3490-3496 [0132]
- **VAN DER KROL** *et al. The Plant Cell*, 1990, vol. 2, 291-299 [0133]
- 40 • **NAPOLI** *et al. The Plant Cell*, 1990, vol. 2, 279-289 [0133] [0140]
- **VAN DER KROL** *et al. The Plant Cell*, 1990, vol. 2, 291-229 [0140]
- **CHANDLER** *et al. Plant J*, 1996, vol. 10, 637-644 [0148]
- 45 • **BAGNALL** *Ann Bot*, 1993, vol. 71, 75-83 [0152]
- **MARTINEZ-ZAPATER** *et al. Plant Physiol*, 1990, vol. 92, 770-776 [0152]
- 50 • **SCHMIDT** *et al. Plant J*, 1996, vol. 9, 755-765 [0156] [0156]
- **PARKER** *et al. Plant Cell*, 1998, vol. 9, 1-17 [0156]
- **BEVAN** *et al. Nature*, 1998, vol. 391, 485-488 [0156]
- 55 • **BECHTOLD** *et al. C R Acad Sci Paris*, 1993, vol. 316, 1194-1199 [0159]
- **HEBSGAARD** *et al. Nucl Acids Res*, 1998, vol. 24, 3439-3452 [0163]
- 60 • **ALTSCHUL** *et al. Nucleic Acids Res*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0163]
- **BAIROCH** *et al. Nucl Acids Res*, 1997, vol. 25, 217-221 [0163]
- **NAKAI** *et al. Genomics*, 1992, vol. 14, 897-911 [0163]
- 65 • **MICHAELS** *et al. Plant J*, 1998, vol. 14, 381-385 [0168]
- **NEFF** *et al. Plant J*, 1998, vol. 14, 387-392 [0168]

ES 2 307 491 T3

- **MACKAY** *et al. TIBS*, 1998, vol. 23, 1-4 [0171]
- **KUBO** *et al. Nucl Acids Res*, 1998, vol. 26, 608-615 [0172]
- 5 • **STERKY** *et al. PNAS USA*, 1998, vol. 95, 13330-13335 [0173]
- **HAHN** *Cell*, 1993, vol. 72, 481-483 [0174]
- **DINGWALL** *et al. TIBS*, 1991, vol. 16, 478-481 [0174]
- 10 • **JONES** *et al. Transg. Res.*, 1992, vol. 1, 285-297 [0175]
- **SAMBROOK J** *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1989
[0175]
- 15 • **HOEKEMA** *et al. Nature*, 1983, vol. 303, 179-180 [0177] [0195]
- **BECHTOLD** *et al. C R Acad. Sci. Paris*, 1993, vol. 316, 1194-1199 [0177]
- 20 • **HALLIDAY** *et al. Plant J.*, 1997, vol. 12, 1079-1090 [0178] [0183]
- **HORSCH** *et al. Science*, 1985, vol. 227, 1229-1231 [0182]
- **MOLONEY** *et al. Plant Cell Rep.*, 1989, vol. 8, 238-242 [0185]
- 25 • **KOHL A** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 7203-7208 [0187]
- **BECKER D** *et al. Plant J.*, 1994, vol. 5, 299-307 [0189]
- 30 • **CHANG** *et al. Proc Natl Acad Sci. USA*, 1988, vol. 85, 6856-6860 [0193]
- **LIU** *et al. Plant J*, 1996, vol. 10, 733-736 [0193]
- 35 • **HIGGINS SHARP CABIOS**, 1989, vol. 5, 2151-153 [0198]
- **HEIN** *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 183, 626-645 [0199]

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Secuencia nucleotídica aislada que tiene, al menos, 70% de identidad de secuencia con la secuencia nucleotídica de longitud completa del Identificador de secuencia N°: 1, Identificador de secuencia N°: 3, Identificador de secuencia N°: 4, Identificador de secuencia N°: 6 o el identificador de secuencia N° 7 y en el que la secuencia es capaz de afectar una o más características físicas de una planta en la que se introduce el ácido nucleico, las características físicas que se seleccionan desde la respuesta a la vernalización, época de floración, tamaño y/o forma de la hoja y respuesta de evasión de sombreado.
- 10 2. Ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que la secuencia tiene, al menos, 80% de identidad de secuencia con la secuencia nucleotídica de longitud completa del Identificador de secuencia N°: 1, Identificador de secuencia N°: 3, Identificador de secuencia N°: 4, Identificador de secuencia N°: 6 o el identificador de secuencia N° 7.
- 15 3. Ácido nucleico según la reivindicación 2, en la que la secuencia tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la secuencia nucleotídica de longitud completa del Identificador de secuencia N°: 1, Identificador de secuencia N°: 3, Identificador de secuencia N°: 4, Identificador de secuencia N°: 6 o el identificador de secuencia N° 7.
- 20 4. Ácido nucleico según la reivindicación 3, en la que la secuencia tiene, al menos, 95% de identidad de secuencia con la secuencia nucleotídica de longitud completa del Identificador de secuencia N°: 1, Identificador de secuencia N°: 3, Identificador de secuencia N°: 4, Identificador de secuencia N°: 6 o el identificador de secuencia N° 7.
- 25 5. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que es capaz de reducir el requisito de vernalización de la planta para la floración.
- 30 6. Ácido nucleico según la reivindicación 4 o la reivindicación 5 que comprende una secuencia nucleotídica del VRN2 que codifica un polipéptido del Identificador de secuencia N° 2.
- 35 7. Ácido nucleico según la reivindicación 6, en la que la secuencia nucleotídica del VRN2 está formada por la secuencia del Identificador de secuencia N° 1.
- 40 8. Ácido nucleico según la reivindicación 4 o reivindicación 5 que comprende una secuencia nucleotídica del VRN2 que codifica un polipéptido del Identificador de secuencia N° 5.
- 45 9. Ácido nucleico según la reivindicación 8, en la que la secuencia nucleotídica del VRN2 está formada por la secuencia del Identificador de secuencia N° 4.
- 50 10. Ácido nucleico según la reivindicación 4 o reivindicación 5 que comprende una secuencia nucleotídica del VRN2 que codifica un polipéptido del Identificador de secuencia N° 8.
- 55 11. Ácido nucleico según la reivindicación 10, en la que la secuencia nucleotídica del VRN2 está formada por la secuencia del Identificador de secuencia N° 7.
- 60 12. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en las que el ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica del Identificador de secuencia N° 3 o Identificador de secuencia N° 6.
- 65 13. Ácido nucleico según la reivindicación 12 que comprende una secuencia que tiene una función promotora y/o regulatoria.
14. Ácido nucleico aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende una secuencia de variante que es un variante homólogo del Identificador de secuencia N°: 1, Identificador de secuencia N°: 3, Identificador de secuencia N°: 4, Identificador de secuencia N°: 6 o el identificador de secuencia N° 7, en el que la secuencia de variante es una secuencia del VRN2 que se obtiene a partir de una especie de planta que no sea la *Arabidopsis thaliana*.
15. Ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que es el complemento de una secuencia de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
16. Par de cebadores que comprenden un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica una secuencia aminoacídica que se conserva parcialmente, sustancialmente o completamente entre una secuencia de VRN2 de Identificadores de secuencia N°: 2, 5 u 8 y, al menos, uno de las otras secuencias de la figura 8a u 8b, en las que el ácido nucleico tiene 15 a 40 nucleótidos de longitud.

ES 2 307 491 T3

17. Par de cebadores que comprenden un ácido nucleico aislado para uso como sonda o cebador que comprende una secuencia que se conserva parcialmente, sustancialmente o completamente entre dos o más de las secuencias nucleotídicas Identificadores de secuencia N°: 1, 3, 4, 6, o 7 o complementos de los mismos, en los que el ácido nucleico tiene 15 a 40 nucleótidos de longitud.

18. Par de cebadores según la reivindicación 16 o reivindicación 17, en las que los ácidos nucleicos aislados tienen 19 a 28 nucleótidos de longitud.

19. Par de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, que se seleccionan a partir de:

ATA TCC CGA GGC AAC AGA GCT TG y AAG AAT AAG TTA CAA TCC GAT AAA TCG G;

TCT ACT GGG ATG GTA GTT TTC y AAG AGT GGG CTA TGG CTG G y

GCC AAT CGG TGT TTT CGC AGC TTT C y AAG AAT AAG TTA CAA TCC GAT AAA TCG G.

20. Proceso para la producción de un ácido nucleico que es un derivado de una secuencia nucleotídica del Identificador de secuencia N°: 1, Identificador de secuencia N°: 3, Identificador de secuencia N°: 4, Identificador de secuencia N°: 6 o el identificador de secuencia N° 7 pasando por uno o más de adición, inserción, supresión o sustitución de una secuencia nucleotídica y en los que la secuencia derivada es capaz de afectar una o más características físicas de una planta en la que se introduce el ácido nucleico, las características físicas que se seleccionan desde la respuesta a la vernalización, época de floración, tamaño y/o forma de la hoja y respuesta de evasión de sombreado o tiene una función promotora y/o regulatoria en la que el proceso comprende el paso de modificación de una secuencia nucleotídica de cualquiera de los Identificadores de secuencia N°: 1, Identificador de secuencia N°: 3, Identificador de secuencia N°: 4, Identificador de secuencia N°: 6 o el identificador de secuencia N° 7.

21. Procedimiento para identificar o clonar un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, cuyo procedimiento comprende utilizando una secuencias nucleotídicas de una sonda o cebador en una búsqueda de base de datos, en las que la sonda o cebador es un cebador de ácido nucleico aislado que tiene 15 a 40 nucleótidos de longitud y que comprende una secuencia que

(i) codifica una secuencia aminoacídica que se conserva parcialmente, sustancialmente o completamente entre una secuencia de VRN2 de Identificadores de secuencia N°. 2, 5 u 8 y, al menos, una de las otras secuencias de la figura 8a u 8b.

(ii) se conserva parcialmente, sustancialmente o completamente entre dos o más de las secuencias nucleotídicas Identificadores de secuencia N°: 1, 3, 4, 6 o 7 o los complementos de los mismos.

22. Procedimiento para identificar o clonar un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, cuyo procedimiento utiliza una sonda o cebador, en las que la sonda o cebador es un cebador de ácido nucleico aislado que tiene 15 a 40 nucleótidos de longitud y que comprende una secuencia que

(i) codifica una secuencia aminoacídica que se conserva parcialmente, sustancialmente o completamente entre una secuencia de VRN2 de Identificadores de secuencia N°. 2, 5 u 8 y, al menos, una de las otras secuencias de la figura 8a u 8b; o

(ii) se conserva parcialmente, sustancialmente o completamente entre dos o más de las secuencias nucleotídicas Identificadores de secuencia N°: 1, 3, 4, 6 o 7 o los complementos de los mismos;

o un par de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19.

23. Procedimiento para determinar la presencia de un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 dentro de la composición genética de una planta, cuyo procedimiento utiliza una sonda o cebador, en las que la sonda o cebador es un cebador de ácido nucleico aislado que tiene 15 a 40 nucleótidos de longitud y que comprende una secuencia que

(i) codifica una secuencia aminoacídica que se conserva parcialmente, sustancialmente o completamente entre una secuencia de VRN2 de Identificadores de secuencia N°. 2, 5 u 8 y, al menos, una de las otras secuencias de la figura 8a u 8b; o

(ii) se conserva parcialmente, sustancialmente o completamente entre dos o más de las secuencias nucleotídicas Identificadores de secuencia N°: 1, 3, 4, 6 o 7 o los complementos de los mismos;

o un par de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19.

24. Procedimiento según la reivindicación 22 o la reivindicación 23, que comprende los pasos de:

(a) Proporcionar una preparación de un ácido nucleico a partir de una célula de una planta.

ES 2 307 491 T3

(b) Proporcionar una molécula de ácido nucleico que es una sonda, en la que la sonda es un cebador de ácido nucleico aislado que tiene 15 a 40 nucleótidos de longitud y que comprende una secuencia que

(i) codifica una secuencia aminoacídica que se conserva parcialmente, sustancialmente o completamente entre una secuencia de VRN2 de Identificadores de secuencia N°. 2, 5 u 8 y, al menos, una de las otras secuencias de la figura 8a u 8b. (ii) se conserva parcialmente, sustancialmente o completamente entre dos o más de las secuencias nucleotídicas Identificadores de secuencia N°.: 1, 3, 4, 6 o 7 o los complementos de los mismos;

(c) Contactar el ácido nucleico de dicha preparación con dicha sonda en condiciones para la hibridación;

(d) Identificar un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 si está presente mediante su hibridación con dicha sonda del ácido nucleico.

25. Procedimiento según la reivindicación 22 o la reivindicación 23 que comprende los pasos de:

(a) Proporcionar una preparación de un ácido nucleico a partir de una célula de una planta.

(b) Proporcionar un par de cebadores de la molécula de ácido nucleico adecuados para la reacción en cadena por la polimerasa, al menos uno de dichos cebadores debe ser un cebador de ácido nucleico aislado que tiene 15 a 40 nucleótidos de longitud y que comprende una secuencia que

(i) codifica una secuencia aminoacídica que se conserva parcialmente, sustancialmente o completamente entre una secuencia de VRN2 de Identificadores de secuencia N°. 2, 5 u 8 y, al menos, una de las otras secuencias de la figura 8a u 8b; o

(ii) se conserva parcialmente, sustancialmente o completamente entre dos o más de las secuencias nucleotídicas Identificadores de secuencia N°.: 1, 3, 4, 6 o 7 o los complementos de los mismos;

(c) Contactar el ácido nucleico de dicha preparación con dichos cebadores en condiciones para el rendimiento de la reacción en cadena por la polimerasa;

(d) Realizar la reacción en cadena por la polimerasa y determinar la presencia o ausencia de un producto amplificado de la reacción en cadena por la polimerasa.

26. Procedimiento según la reivindicación 25, en la que el par de cebadores de la molécula de ácido nucleico son según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19.

27. Procedimiento para la selección de una planta que tenga un alelo del gen VRN2, cuyo procedimiento utiliza una sonda o cebador en el que la sonda o cebador es un cebador de un ácido nucleico aislado que tiene 15 a 40 nucleótidos de longitud y que comprende una secuencia que

(i) codifica una secuencia aminoacídica que se conserva parcialmente, sustancialmente o completamente entre una secuencia de VRN2 de Identificadores de secuencia N°. 2, 5 u 8 y, al menos, una de las otras secuencias de la figura 8a u 8b; o

(ii) se conserva parcialmente, sustancialmente o completamente entre dos o más de las secuencias nucleotídicas Identificadores de secuencia N°.: 1, 3, 4, 6 o 7 o los complementos de los mismos;

o un par de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19.

28. Vector recombinante que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

29. Vector según la reivindicación 28, en la que el ácido nucleico comprendido en el vector es capaz de regular uno o más genes que participan en la transición del crecimiento vegetativo a reproductivo y/o es capaz de regular uno o más genes que participan en la determinación del tamaño y/o forma de la hoja.

30. Vector según la reivindicación 28 o la reivindicación 29, en las que el ácido nucleico es enlazado operativamente a un promotor para la transcripción en una célula huésped, en la que el promotor es opcionalmente un promotor inducible.

31. Vector según la reivindicación 30, en la que el promotor es un promotor constitutivo.

32. Vector según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31, que es un vector de una planta.

33. Procedimiento que comprende el paso de introducción de un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32 en una célula huésped como para transformar la célula huésped.

ES 2 307 491 T3

34. Célula huésped aislada que comprende un ácido nucleico heterólogo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en las que el ácido nucleico es heterólogo a la célula.

5 35. Célula huésped según la reivindicación 34 que es una célula de una planta., opcionalmente presente en una planta.

36. Procedimiento para la producción de una planta transgénica, cuyo procedimiento comprende los pasos de:

10 (a) Realización de un procedimiento según la reivindicación 33;

(b) Regeneración de una planta a partir de la célula huésped transformada.

15 37. Planta transgénica que se obtiene mediante el método de la reivindicación 36 o que es un clon o un progenie propio o híbrido u otro descendiente de dicha planta transgénica, en donde cada caso incluye la célula de la planta de la reivindicación 35.

38. Planta según la reivindicación 37 que es una planta agrícola u hortícola.

20 39. Planta según la reivindicación 37 o la reivindicación 38 seleccionada de la lista formada por: arroz, maíz, trigo, cebada, avena, centeno, planta de colza, caña de azúcar, girasol, soja, sorgo, lechuga, endibia, repollo, brócoli, coliflor, clavel, geranio, tabaco, algodón, canola, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, banana, melón, zanahoria, cebolla, guisante, apio.

25 40. Planta según la reivindicación 39 que se selecciona del tabaco, planta de colza, arroz y trigo.

41. Parte o propágulo de una planta según una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 40 que incluye la célula de la planta de la reivindicación 35.

30 42. Polipéptido aislado que comparte al menos el 70% de la identidad de la secuencia aminoacídica con el Identificador de secuencia N°: 2, Identificador de secuencia N°: 5 o el identificador de secuencia N° 8, en el que el polipéptido es capaz de afectar una o más características físicas de una planta, las características físicas que se seleccionan desde la respuesta a la vernalización, época de floración, tamaño y/o forma de la hoja y respuesta de evasión de sombreado.

35 43. Polipéptido según la reivindicación 42, que comprende una secuencia aminoacídica formada por la secuencia del Identificador de secuencia N°: 2, Identificador de secuencia N°: 5 o el identificador de secuencia N° 8.

44. Polipéptido aislado formado por la secuencia de los Identificadores de secuencia N° 2, 5 u 8.

40 45. Procedimiento para la realización del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44, qué método comprende el paso de causar o permitir la expresión de un ácido nucleico o de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en una célula huésped adecuada.

45 46. Anticuerpo que tiene una afinidad de capacidad de unión específica para un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44.

47. Procedimiento para afectar una característica física de una planta que comprende la célula de la planta de la reivindicación 35, en la que la característica se selecciona a partir de la respuesta a la vernalización, época de floración, tamaño y/o forma de la hoja y respuesta de evasión de sombreado, qué método comprende el paso de:

50 (i) Causar o permitir la transcripción de un ácido nucleico según la reivindicación 15 en la planta;

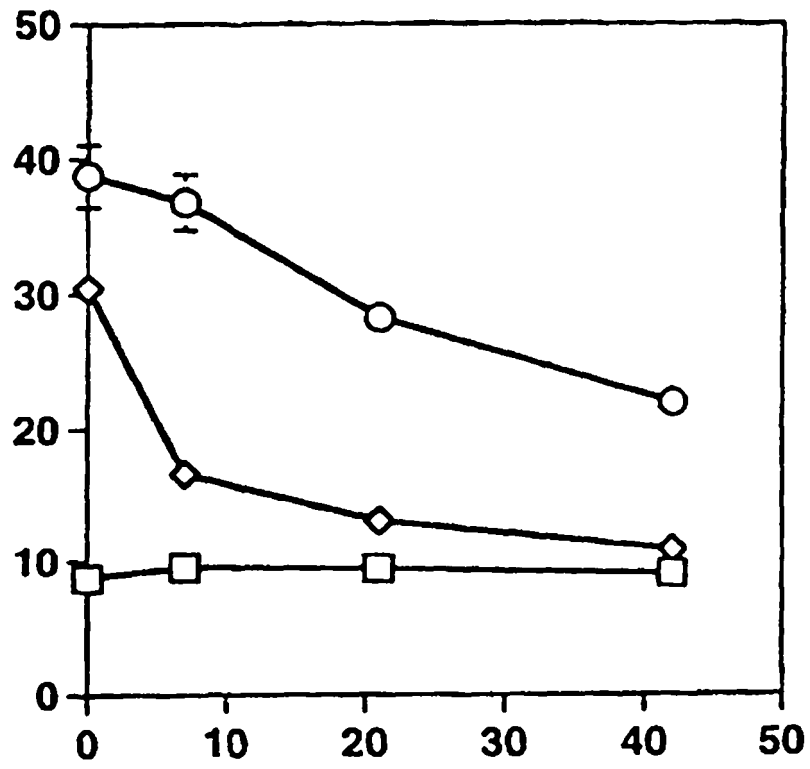
(ii) causar o permitir la transcripción de un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

55 48. Procedimiento según la reivindicación 47, cuyo procedimiento comprende la causa o permiso de transcripción de un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, por lo tanto, para reducir la expresión del VRN2 mediante cosupresión.

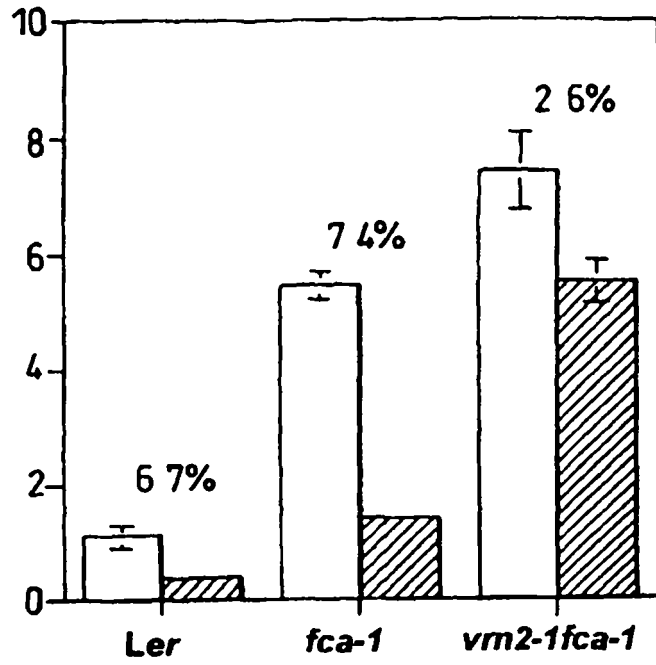
60

65

Figura 1



A



B

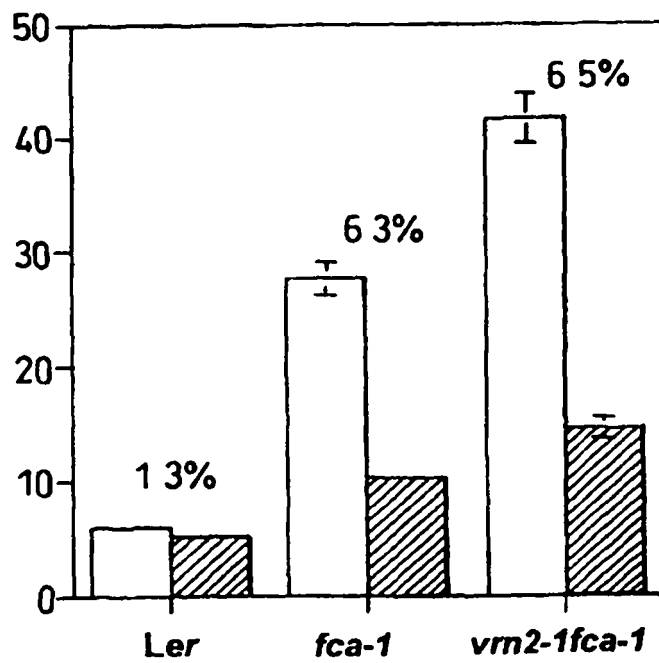
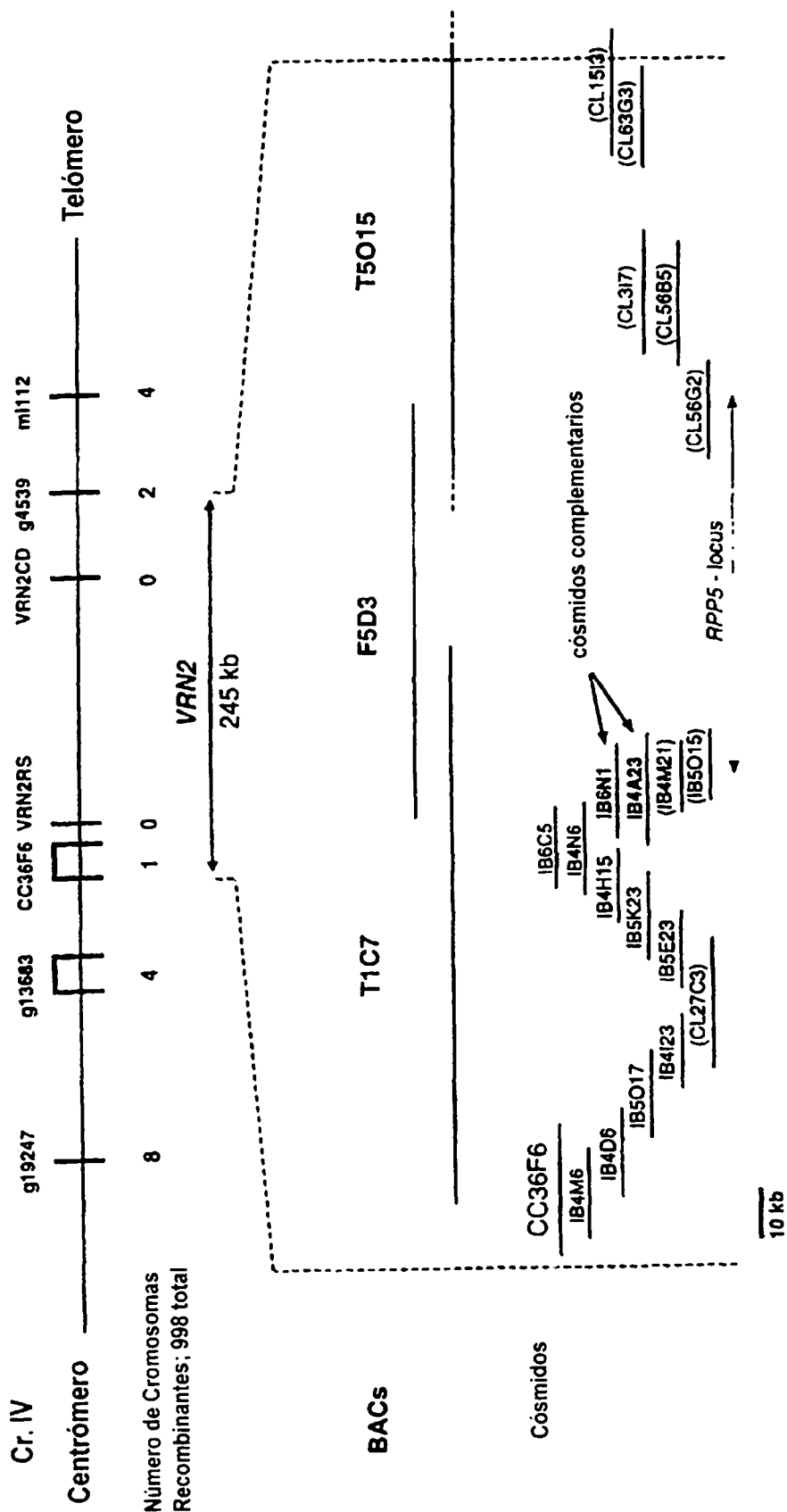


Fig. 2

Figura 3



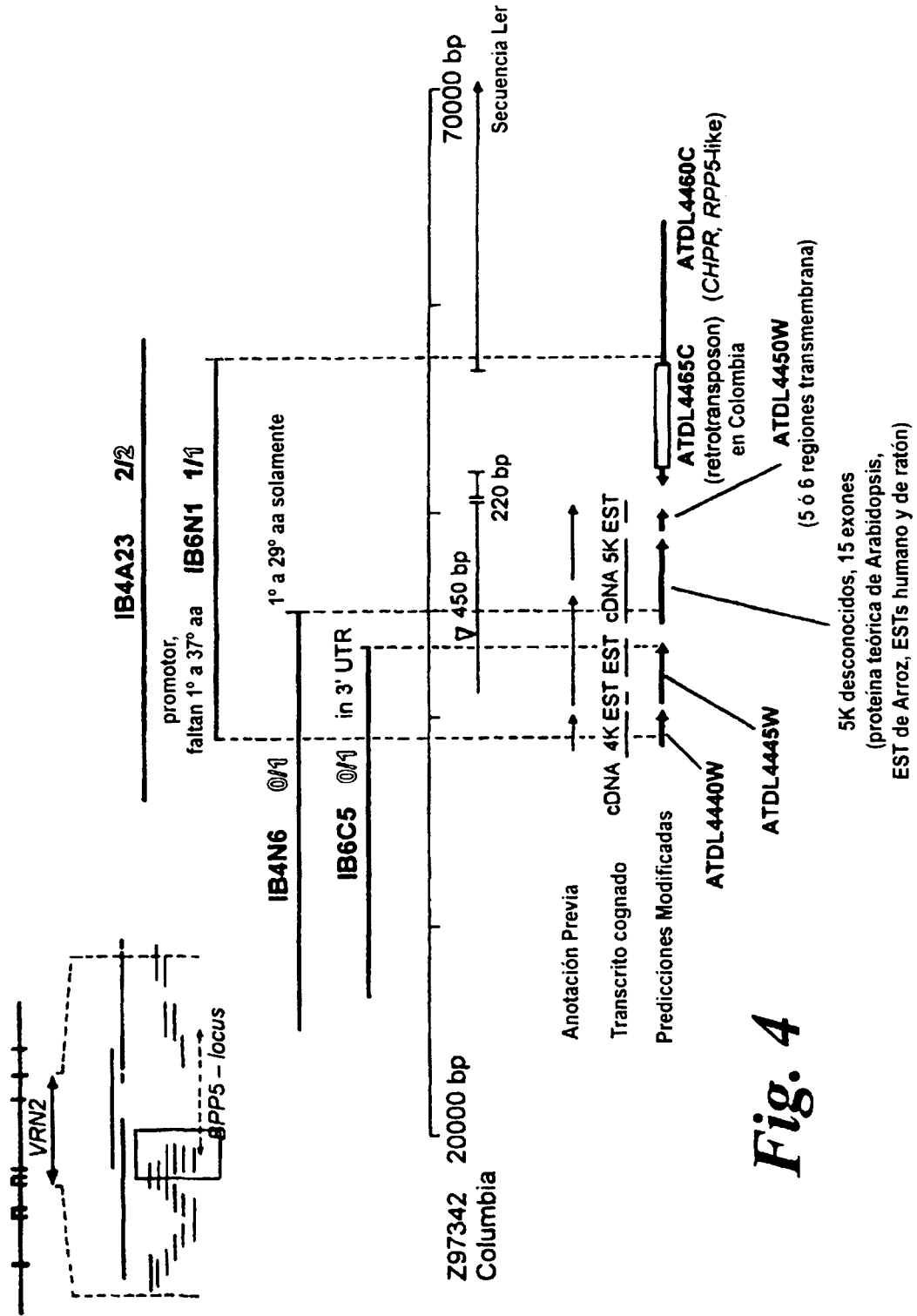
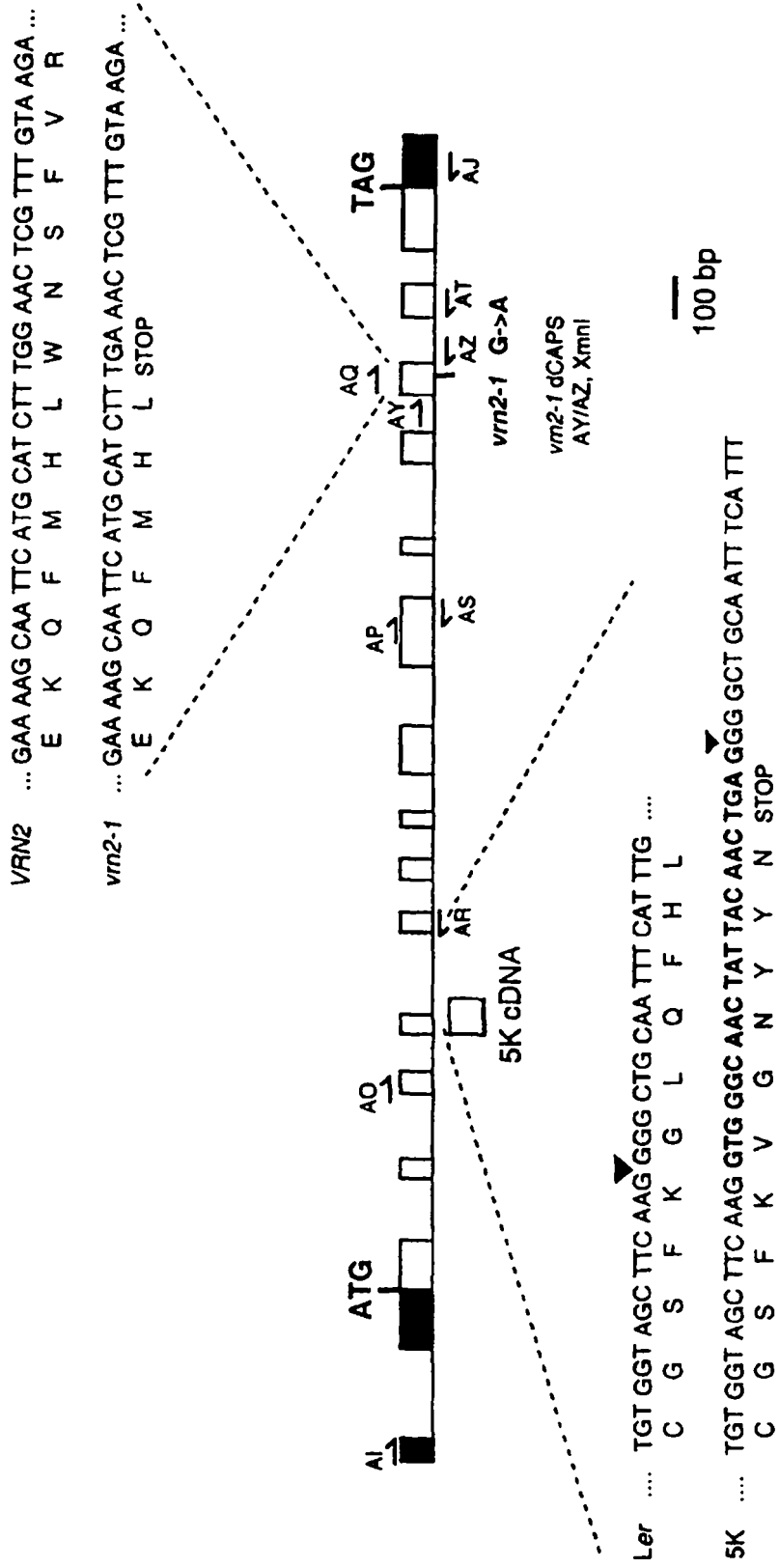


Fig. 4

Figura 5



ES 2 307 491 T3

TTCTTCAATTTTGCCTGCTCTCTTACACAGCCAAFCGGTGTTCGCAGCTTTCAGGCCCAATCCAAGACAT	5
TCTATATAAGCATATTGCAGAAAGGCGGTCTAATGTTCGATTGAGTTTATCGCTATGACGTAGGGAAATCT	80
AATTTAGGGAGCCCTCAGAGTTGCACAACTTCAATAATCGGCTCTTGACGTTGTTGAGTGTAAATGAACAAGA	155
	230
ATGTTAGGCAGAAATGTCGCCGGAATCTCAACCGAGGAAGTGAATTTCAACTGATGAGAAATCTCTTGATATAT	305
M C R Q N C R A K S S P E E V I S T D E N L L I Y	25
TGTAAACCTGTTCGACTATATAACATCTTTCACCTTCGCTCTAGGCAACCCATCGTTTCTTCCAAGATGCTTG	380
C K P V R L Y N I F H L R S L G N P S F L P R C L	50
AACTACAAAATTTGGAGCAAAGCCGAAAAGAAAGTCAAGATCTACTCGGATGTTAGTATTTCAACTATAAGGATGTT	455
N Y K I G A K R K R K S R S T G M V V F N Y K D C	75
AATAACACATTACAGAAAACCTGAAGTTAGGGAGGATTGTCTTGTCCATTTTGTCTATGCTATGTGGTAGCTTC	530
N N T L Q K T E V R E D C S C <u>P F C S M L C G S F</u>	100
AAGGGCTGCAATTTTCATTTGAATTCATCTCATGATTTATTTGAATTTGAGTTCAAGCTTTTCGAAGAATACCAG	605
<u>K G L Q F H L N S S H D L F E F E F K L F E E Y Q</u>	125
ACAGTTAATGTTCTGTAAACCTTAATTCCTTCATATTGAGGAAGAAGGATGATGACGATAAATTTGAGCCC	680
T V N V S V K L N S F I F E E E G S D D D K F E P	150
TTCTCTCTCTGCGAAACCTCGTAAGCGGAGACAAAGAGGTGGCAGAAATAACACCAGGAGACTTAAAGTATGC	755
F S L C S K P R K R R Q R G G R N N T R R L K V C	175
TTTTTACGGTTGGATTACCCAGTTTAACTAATGGCACAGAAATGGAATCACCCCTACTTAATGATGGAAACCGT	830
F L P L D S P S L T N G T E N G I T L L N D G N R	200
GGTTTAGGATATCCCGAGGCAACAGAGCTTCTGTCGACAAATTTGAGATGACCAGCAACATCCACCAGCCATAGCC	905
G L G Y P E A T E L A C Q F E M T S N I P P A I A	225
CACCTTCTCTGCGACCTGCTGCTAAAGTTATATTGACAAGCGAAGCTGTGTCCTGCTACTAAGACAAGAAG	980
N S S L D A G A K V I L T S E A V V P A T K T R K	250
TTATCTGCTGAGCGATCAGAGGCTAGAAGCCACCTACTTCTTCAGAAAACGCCAATTCATATCTTCACAGAGTC	1055
L S A E R S E A R S H L L L Q K R Q F Y H S H R V	275
CAGCCAATGGCGCTTGACCAAGTAATGTCTGACCGGATAGCGAGGATGAAGTCGATGACGATGTTGCAGATTTT	1130
Q P M A L <u>E Q V M S D R D S E D E V D D V A D F</u>	300
GAAGATCCCGAGATGCTTGTGACTTTGTGGATGTGAATAAAGATGAAAAGCAATTCATGATCTTTGGAACTCG	1205
<u>E D R Q M L D D F V D V N K D E K Q F M H L</u> W N S	325
TTTGTAAAGAAAACAAAGGGTTATAGCAGATGCTCATATCTCTTGGGCAATGTAAGCATTTTCAAGATTTTACGAG	1280
F V R K Q R V I A D G H I S W A C E A F S R F Y E	350
AAAGAGTTGCACCGTACTCATCTCTCTGGTGTGGAGATGTTTGTGATTAAGTATGGAACCATGGACTT	1355
K E L H R Y S S L F W C W R L F L I K L W N H G L	375
GTCGACTCAGCCACCATCAACAACCTGCAATACCATCCCTCGAGAATGCCGTAATAGCTCAGACACCACCACCACC	1430
V D S A T I N N C N T I L E N C R N S S D T T T T	400
AACAACAACAACAGTGTGGATCGTCCAGTACTCAAACACCAACAACAATAACATTTGTTGATCATCCCAATGAC	1505
N N N N S V D R P S D S N T N N N N I V D H P N D	425
ATAACAACAAGAACATGTTGACAAACAGGACAATAACAGCAGAGACAAAGTAATTAATAGGAAAATCTCCGG	1580
I N N K N N V D N K D N N S R D K V I K	445
CTTTTATGATACCGATTTATCGGATTTGAACTTATCTCTTTCTTAAAAAATGTTTAGGAGCAACAATTTT	1655
TTATATGTTAGTGTATTCAACTGATTACATTTTGTAGTAAAAAATAATGATTTCTGCTTATAACT	1722

Figura 6

Figura 7

fca-1
vrn2-1

W323
 GAAAAGCAATTTCATGCATCTTGGAAACTCGTTTGTAAGAA
 TGA
 STOP

GAAAAGCAATTTCATGCATCTTGGAAACTCGTTTGTAAGAA
 CTNNNNNAAG
 sitio Xmn I

Cebador de Diagnóstico: Antisentido VRN2-AZ
 (contiene emparejamientos erróneos A y G en posiciones 5, 7)

3' TGAGAAGACATCTTTTGTTCCTTCCATTGATGAAGAG 5'
 (CTNNNNNAAG
 medio-sitio Xmn I

Cebador anterior: VRN2-AY 5' TGGGTTTCATTAAGTAGGCAACAGAAAATGG 3'

Producto: 170 bp PCR producto PCR para *fca-1* y *vrn2-1*

Productos PCR:

fca-1 GAAAAGCAATTTCATGCATCTTGGAACTCTTCTGTAAAGAA
vrn2-1 GAAAAGCAATTTCATGCATCTTGGAACTCTTCTGTAAAGAA

digestión con Xmn I => *fca-1* sin sitio Xmn I 170 bp
vrn2-1 único sitio Xmn I 137 bp, 33 bp fragmentos

Figura 8a

VRN2 Ler	M	C	R	Q	N	C	R	A	K	S	S	P	E	E	V	I	S	T	D	E	20		
A1163743 Prot	1	
Rice C72616	1	
At Hyp 2245035	1	
KIA00160	A	K	P	L	A	T	R	N	S	E	S	L	H	Q	E	452
VRN2 Ler	N	L	L	I	Y	C	K	P	V	R	L	Y	N	I	F	H	L	R	S	L	40		
A1163743 Prot	1	
Rice C72616	1	
At Hyp 2245035	1	
KIA00160	N	K	P	G	S	V	K	P	T	Q	T	I	464		
VRN2 Ler	G	N	P	S	F	L	P	R	C	L	N	Y	K	I	G	A	K	R	K	R	60		
A1163743 Prot	1	
Rice C72616	1	
At Hyp 2245035	1	
KIA00160	A	V	K	E	S	L	T	T	D	L	Q	T	R	K	E	K	D	T	P	N	484		
VRN2 Ler	K	S	R	S	T	G	M	V	V	F	N	Y	K	D	C	N	N	T	L	Q	80		
A1163743 Prot	1		
Rice C72616	1		
At Hyp 2245035	1		
KIA00160	E	N	R	Q	K	L	R	I	F	Y	Q	F	L	Y	N	N	N	T	R	Q	504		
VRN2 Ler	K	T	E	V	R	E	D	C	S	C	P	F	C	S	M	L	C	G	S	F	100		
A1163743 Prot	1		
Rice C72616	1		
At Hyp 2245035	1		
KIA00160	Q	T	E	A	R	D	D	L	H	C	P	W	C	T	L	N	C	R	K	L	524		
VRN2 Ler	K	G	L	Q	F	H	L	N	S	S	H	D	L	F	E	F	E	F	K	L	120		
A1163743 Prot	1		
Rice C72616	1		
At Hyp 2245035	1		
KIA00160	Y	S	L	L	K	H	L	K	L	C	H	S	R	F	I	F	N	Y	V	Y	544		

Figura 8a continuación

VRN2 Ler	F	E	E	Y	Q	T	V	N	V	S	V	K	L	N	S	F	I	F	E	E	140		
AI163743 Prot	1		
Rice C72616	1		
At Hyp 2245035	1		
KIA00160	H	P	K	G	A	R	I	D	V	S	I	N	557		
VRN2 Ler	E	G	S	D	D	D	K	F	E	P	F	S	L	C	S	K	P	R	K	R	160		
AI163743 Prot	1		
Rice C72616	T	F	S	Y	R	S	R	F	K	K	10			
At Hyp 2245035	1		
KIA00160	557		
VRN2 Ler	R	Q	R	G	G	R	N	N	T	R	R	L	K	V	C	F	L	P	L	D	180		
AI163743 Prot	1		
Rice C72616	R	K	R	V	E	I	S	S	D	K	I	R	H	V	H	P	H	I	V	D	30		
At Hyp 2245035	1		
KIA00160	557		
VRN2 Ler	S	P	S	L	T	N	G	T	E	N	G	I	T	L	L	N	D	G	N	R	200		
AI163743 Prot	1		
Rice C72616	S	G	S	P	E	D	A	Q	A	G	S	E	D	Y	V	Q	R	E	N	.	50		
At Hyp 2245035	1		
KIA00160	E	C	Y	D	.	560		
VRN2 Ler	G	L	G	Y	P	E	A	T	E	L	A	G	Q	F	Q	F	E	M	T	S	N	I	220
AI163743 Prot	17
Rice C72616	G	H	A	Y	P	D	A	A	S	V	D	C	A	Q	L	V	P	G	N	N	L	L	70
At Hyp 2245035	1
KIA00160	G	S	S	Y	A	G	N	P	Q	D	I	H	R	Q	P	G	F	A	F	S	R	.	580
VRN2 Ler	P	P	A	I	A	H	S	S	L	D	A	G	A	K	V	I	L	T	S	E	.	.	240
AI163743 Prot	21
Rice C72616	S	A	P	74
At Hyp 2245035	9
KIA00160	N	G	P	V	K	R	T	P	I	T	H	I	L	V	C	R	P	K	R	T	.	.	600

Figura 8a continuación

VRN2 Ler	A V V P A T K T R R K L S S A I E E R R S E A R R S	260
AI163743 Prot	A M L Q F A K K T R R K L S S A I E E R R S E A R R S	40
Rice C72616	I V L Q F A K K T R R K L S S A I E E R R S E A R R S	93
AI Hyp 2245035	A K V P A . F L E S E D G	21
KIA00160	K A S M S E	620
VRN2 Ler	H L : L L Q K R R Q F F Y H S H R R V A Q P P M A	279
AI163743 Prot	R Q : L L H O K R R Q F F Y H S H R R V A Q P P M A	59
Rice C72616	H Y L : P L L H H K R R Q F F Y H S H R R V A Q P P M A	112
AI Hyp 2245035	H Y S : S G H H K R R Q F F Y H S H R R V A Q P P M A	41
KIA00160	L E Q V M S D R R D S S E E D E E V D . . . D D V	639
VRN2 Ler	L A G A V M S D R R D S S E E D E E V D . . . D D V	297
AI163743 Prot	L E Q V M S D R R D S S E E D E E V D . . . D D V	77
Rice C72616	L E Q V M S D R R D S S E E D E E V D . . . D D V	130
AI Hyp 2245035	P Q E M . . . E V D S S E E D E E V D . . . D D V	61
KIA00160	A D F E E D R R Q M L D D D F V D V N K D . . E E	655
VRN2 Ler	A D F E E D R R Q M L D D D F V D V N K D . . E E	316
AI163743 Prot	A D F E E D R R Q M L D D D F V D V N K D . . E E	96
Rice C72616	A H L E E S Q M L L N G S M D E N E I V A	149
AI Hyp 2245035	L R E K T I T Q I E E F S D V N E G . . E	81
KIA00160	K Q F M H L W N S F V R K Q R V I A D G	674
VRN2 Ler	K Q F M H L W N S F V R K Q R V I A D G	336
AI163743 Prot	. L I M H M	108
Rice C72616	E R F L K L W N S F V K Q Q R I V A D A	154
AI Hyp 2245035	K E V M K L W N L H V M K H G F I A D N	101
KIA00160	H I S W A C E A F S R F Y E K E L H R Y	694
VRN2 Ler	H I P W A C E A F S R L H L Q E L R S N	356
AI163743 Prot	Q M N H A C M L F V E N Y G Q K I I K	108
Rice C72616		154
AI Hyp 2245035		121
KIA00160		714

Figura 8a continuación

VRN2 Ler	S	S	L	F	W	C	W	R	L	F	L	I	K	L	W	N	H	G	L	V	376
AI163743 Prot																				108	
Rice C72616																				154	
AI Hyp 2245035	L	S	L	D	L	C	W	R	Q	F	M	I	K	Q	W	D	Y	G	L	L	141
KIA00160		N	L	C	R	N	F	M	L	H	L	V	S	M	H	D	F	N	L	I	733
VRN2 Ler	D	S	A	T	I	N	C	N	T	I	L	E	N	C	R	N	S	S	D		396
AI163743 Prot																				108	
Rice C72616																				154	
AI Hyp 2245035	D	R	V	T	M	N	K	C	N	T	I	I	Y	H	N	I	S	T	T	N	161
KIA00160		S	I	M	S	I	D	K	A	V	T	K	L	R	E	M	Q	K	L	E	753
VRN2 Ler	T	T	T	T	N	N	N	S	V	D	R	P	S	D	S	N	T	N	N		416
AI163743 Prot																				108	
Rice C72616																				154	
AI Hyp 2245035	D	D	I	N	N	N	T	R	T	T	D	N	M	D	V	V	D	D	D		181
KIA00160		K	G	E	S	A	S	P	A	N	E	E	I	T	E	Q	N	G	T	A	773
VRN2 Ler	N	N	I	V	D	H	P	N	D	I	N	N	K	N	V	D	N	K	D		436
AI163743 Prot																				108	
Rice C72616																				154	
AI Hyp 2245035	I	N	R	D	K															186	
KIA00160		N	G	F	S	E	I	N	S	K	E	K	A	L	E	T	D	S	V	S	793
VRN2 Ler	N	N	S	R	D	K	V	I	K												445
AI163743 Prot																				108	
Rice C72616																				154	
AI Hyp 2245035	V	S	K	Q	S	K	K	Q	K	L											186
KIA00160																				803	

