

437



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

Division de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE No

05-111700

54 TÍTULO

Métodos y medios para incrementar la tolerancia de las plantas a condiciones de estrés

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C12N 15/8

71 SOLICITANTE

Bayer Bioscience NV

DOMICILIO

Gent, Bélgica

74 APODERADO

Luis Patino Leyva

22 BOGOTÁ, D C,

2 de Noviembre de 2005

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE



Patente de Invencion



Patente de Modelo de Utilidad



Capitulo I



Capitulo II

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre **BAYER BIOSCIENCE N V**

Direccion **Technologiepark 38**
B 9052 Gent Bélgica

Nacionalidad o Domicilio **Gent Bélgica**
Lugar de Constitución **Bélgica**

Teléfono

Fax

E mail

IDENTIFICACION

CC ☐

NIT ☐

CE ☐

Otro ☐

Cual _____

Numero _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre **LUIS PATIÑO LEYVA**

Dirección **Cra 11ª No 94-76 - Of 308**

Teléfono **6161948**

Fax **6163976**

E mail

IDENTIFICACION

CC ☒

NIT ☐

CE ☐

Otro ☒

Cual _____

Numero **2 930 616 TP 2698**

④

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre **DE BLOCK Marc**

Dirección **Abrikozenstraat 26**

Nacionalidad o Domicilio **B 9820 Merelbeke Bélgica**

⑤ **PCT (86)**

Solicitud Internacional No **PCT/EP2004/003995**

Fecha **Abril 9 de 2004**

Publicación Internacional No **WO 2004/090140 A2**

Fecha **Octubre 21 de 2004**

⑥ **Título (54) MÉTODOS Y MEDIOS PARA INCREMENTAR LA TOLERANCIA DE LAS PLANTAS A CONDICIONES DE ESTRÉS**

⑦

Clasificación Internacional (51) C12N 15/82

⑧

PRIORIDAD

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

Europa
Estados Unidos

(32) Fecha

Abril 9 2003
Agosto 21 2003

(31) Número de Solicitud

03076044 1
60/496 688

⑨

Comprobante de pago No 05 - 83 689

Fecha Noviembre 1 de 2005

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario ver reverso de esta página

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso Sustitución del poder
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen descripción reivindicaciones dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen descripción reivindicaciones dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros Reporte de Búsqueda Internacional

(11) FIGURA CARACTERISTICA

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE LUIS PATIÑO LEYVA

FIRMA

C C 2.930.616 Bogotá T P 2698

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario ver reverso de esta página

Otros anexos que se acompañan a la solicitud

Documento correspondiente a la presentación de la solicitud internacional

Formato PCT/IB/306 notificación de registro de un cambio

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT 800176089 2

RECIBO OFICIAL DE CAJA 05 83 689
FECHA NOVIEMBRE 1 DE 2005

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion 05111700 00000000 Folios 182
Fecha (AMD) 2005-11-02 15 22 48
Tramite 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENIAL
Dependencia 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PAGO	Vr PAGO
GUSTAVO HOLLMAN	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050 00110 6	43140705	01/11/2005	1,329,000 00

***** CONCEPTO *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005 01 01	SOLICITUDES	
		7 TRAMITES DE SOL DE DISENOS INDUS	443,000 00
		TOTAL	\$ 443,000 00

SON CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

Ref 57481

RESPONSABLE _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 October 2004 (21 10.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/090140 A2

(51) International Patent Classification⁷ C12N 15/82

(21) International Application Number
PCT/EP2004/003995

(22) International Filing Date 9 April 2004 (09 04 2004)

(25) Filing Language English

(26) Publication Language English

(30) Priority Data
03076044.1 9 April 2003 (09 04 2003) EP
60/496 688 21 August 2003 (21 08 2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US) BAYER
BIOSCIENCE N V [BE/BE] Technologiepark 38
B 9052 Gent (BE)

(72) Inventor and

(75) Inventor/Applicant (for US only) DE BLOCK, Marc
[BE/BE] Abrikozenstraat 26 B 9820 Merelbeke (BE)

(74) Common Representative BAYER BIOSCIENCE N V
Technologiepark 38 B 9052 Gent (BE)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available) AE AG AL AM

AT AU AZ, BA BB BG BR BW BY BZ CA CH CN
CO CR CU CZ, DE DK, DM DZ, EC EE, EG ES FI
GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE
KG KP KR KZ, LC LK LR LS LT LU LV MA MD
MG MK MN MW MX MZ, NA NI NO NZ OM PG
PH PL PT RO RU SC SD SE, SG SK SL, SY TJ TM
TN TR TT TZ, UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM
ZW

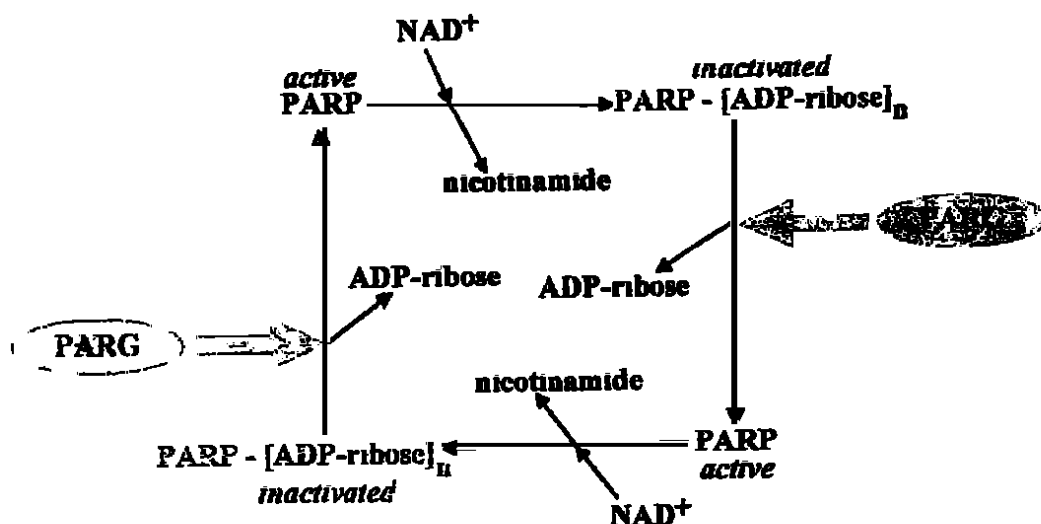
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available) ARIPO (BW GH
GM KE LS MW MZ, SD SL SZ, TZ UG ZM ZW).
Eurasian (AM AZ, BY KG KZ, MD RU TJ TM). Euro-
pean (AT BE, BG CH CY CZ, DE, DK EE, ES FI FR
GB GR HU IE IT LU MC NL PL, PT RO SE, SI SK
TR). OAPI (BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW
ML MR NE SN TD TG)

Declarations under Rule 4.17

— as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i)) for the fol-
lowing designations AE AG AL AM AT AU AZ, BA BB
BG BR BW BY BZ, CA CH CN CO CR CU CZ, DE
DK DM DZ, EC EE, EG ES FI GB GD GE, GH GM
HR HU ID IL, IN IS JP KE, KG KP KR KZ, LC LK
LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ,
NA NI NO NZ, OM PG PH PL, PT RO RU SC SD
SE, SG SK SL, SY TJ TM TN TR TT TZ, UA UG UZ

[Continued on next page]

(54) Title METHODS AND MEANS FOR INCREASING THE TOLERANCE OF PLANTS TO STRESS CONDITIONS



(57) Abstract. Methods and means are provided to increase the tolerance of plants to abiotic stress or adverse growing conditions including drought, high light intensities, high temperatures, nutrient limitations and the like by reducing the activity of endogenous PARG proteins in plants.

WO 2004/090140 A2

5

Methods and means for increasing the tolerance of plants to stress conditions

Field of the Invention

[1] The present invention relates to the use of poly (ADP-ribose) glycohydrolases in plants to increase the tolerance of plants to adverse growing conditions including drought, high light intensities, high temperatures, nutrient limitations and the like. Methods and means are provided to produce plants that are tolerant to abiotic stress conditions.

Background to the Invention

[2] Frequently, abiotic stress will lead either directly or indirectly to damage of the DNA of the cells of the plants exposed to the adverse conditions. Genomic damage, if left unrepaired, can lead to cell death. Tolerance to stress conditions exhibited by plants is the result of the ability of the plant cells exposed to the adverse conditions to reduce and/or repair the damage and to survive.

[3] Plant cells, like other eukaryotic cells, have evolved an elaborate DNA repair system. The activation of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) by DNA strand breaks is often one of the first cellular responses to DNA damage. PARP catalyzes the post-translational modification of proteins by adding successively molecules of ADP-ribose obtained from the conversion of nicotinamide dinucleotide (NAD) to form multibranched polymers containing up to 200 ADP-ribose residues (about 40 residues in plants). The dependence of poly(ADP-ribose) synthesis on DNA strand breaks and the presence of PARP in multiprotein complexes further containing key effectors of DNA repair, replication and transcription reactions strongly suggests that this posttranslational modification is involved in metabolism of nucleic acids and DNA repair. There are also indications that poly (ADP -ribose) synthesis is involved in regulation of cell cycle and cell death.

[4] Poly (ADP-ribosylation) of proteins is transient in living cells. The poly (ADP-ribose) polymers are rapidly turned over, being converted to free ADP-ribose by the exoglycosidase and endoglycosidase activity of poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG, E.C. 3.2.1.143). The most proximal unit of ADP-ribose on the protein acceptor is hydrolyzed by the action of another enzyme (ADP-ribosyl protein lyase).

[5] In addition to this positive (DNA-repair associated) effect of PARP on cell survival, there is also a negative effect of PARP. The process of activating PARP upon DNA damage is associated with a rapid lowering of NAD⁺ levels, since each ADP-ribose unit transferred by PARP consumes one molecule of NAD⁺. NAD⁺ depletion in turn results in ATP depletion, because NAD⁺ resynthesis requires at least (depending on the biosynthesis pathway) three molecules of ATP per molecule of NAD⁺. Furthermore, NAD⁺ depletion blocks glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity, which is required to resynthesize ATP during glycolysis. Finally, NAD⁺ is a key carrier of electrons needed to generate ATP via electron transport and oxidative phosphorylation.

[6] The physiological consequence of NAD⁺ and ATP depletion has been established in the context of DNA-damage induced cell death. It has been shown that the completion of apoptosis is absolutely dependent on the presence of ATP and that, in the absence of this nucleotide, the type of cellular demise switches from apoptosis to necrosis. Since the cellular lysis associated with necrosis generates further damage to neighboring cells, it is preferable for multicellular organisms to favor apoptotic cell death rather than necrosis.

[7] It is thus very important to consider the delicate balance of positive and negative effects of the poly (ADP-ribosylation) on the potential of a cell to survive DNA damage.

[8] WO 00/04173 describes methods to modulate programmed cell death (PCD) in eukaryotic cells and organisms, particularly plant cells and plants, by

introducing of "PCD modulating chimeric genes" influencing the expression and/or apparent activity of endogenous poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) genes. Programmed cell death may be inhibited or provoked. The invention particularly relates to the use of nucleotide sequences encoding proteins with PARP activity for modulating PCD for enhancing growth rate or for producing stress tolerant cells and organisms.

[9] PARP encoding genes have been identified in a number of animals such as *Rattus norvegicus* (Accession numbers NM_031339 NW_043030 AB019366) *Mus musculus* (Accession numbers NT_039598 NM_003631 AF079557) *Homo sapiens* (Accession numbers NT_017696 NM_003631 AF005043) *Bos taurus* (Accession numbers NM_174138 U78975) *Drosophila melanogaster* (Accession number AF079556)

[10] In plants a poly(ADP-ribose) glycohydrolase has been identified by map-based cloning of the wild-type gene inactivated in a mutant affected in clock-controlled transcription of genes in *Arabidopsis* and in photoperiod dependent transition from vegetative growth to flowering (*tef*). The nucleotide sequence of the gene can be obtained from nucleotide databases under the accession number AF394690 (Panda et al 2002 Dev Cell 3 51-61)

Summary of the invention

[11] The invention provides a method to produce a plant tolerant to stress conditions comprising the steps of providing plant cells with a chimeric gene to create transgenic plant cells wherein the chimeric gene comprises the following operably linked DNA fragments: a plant expressible promoter; a DNA region which when transcribed yields a PARP inhibitory RNA molecule; and a 3' end region involved in transcription termination and polyadenylation. A population of transgenic plant lines is regenerated from the transgenic plant cell and a stress tolerant plant line is identified within the population of transgenic plant lines. The PARP inhibitory RNA molecule may comprise a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the nucleotide sequence of the PARP gene present in the plant cell (the endogenous PARP

gene) The ParG inhibitory RNA molecule may also comprise a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the complement of the nucleotide sequence of the ParG gene present in the plant cell (the endogenous ParG gene) In yet another embodiment, the parG inhibitory RNA may comprise a sense region comprising a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the nucleotide sequence of the ParG gene present in the plant cell and an antisense region comprising a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the complement of the nucleotide sequence of the ParG gene present in the plant cell wherein the sense and antisense region are capable of forming a double stranded RNA region comprising said at least 20 consecutive nucleotides The chimeric gene may further comprise a DNA region encoding a self-splicing ribozyme between said DNA region coding for parG inhibitory RNA molecule and the 3' end region Stress conditions may be selected from heat drought nutrient depletion oxidative stress or high light conditions

[12] In another embodiment of the invention a method is provided to produce a plant tolerant to stress conditions comprising the steps of isolating a DNA fragment of at least 100 bp comprising a part of the parG encoding gene of the plant of interest producing a chimeric gene by operably linking a plant expressible promoter region to the isolated DNA fragment comprising part of the parG encoding gene of the plant in direct orientation compared to the promoter region and to the isolated DNA fragment comprising part of the parG encoding gene of said plant in inverted orientation compared to the promoter region and a 3' end region involved in transcription termination and polyadenylation These chimeric genes are then provided to plant cells to create transgenic plant cells A population of transgenic plant lines is regenerated from the transgenic plant cells and a stress tolerant plant line is identified within the population of transgenic plant lines The invention also relates to stress tolerant plant cells and plants obtained by this process

[13] In yet another embodiment of the invention a method is provided to produce a plant tolerant to stress conditions comprising the steps of providing plant cells with a chimeric gene to create transgenic plant cells comprising a

DNA region which when transcribed yields an ParG inhibitory RNA molecule whereby the DNA region comprises a nucleotide sequence of at least 21 to 100 nucleotides of a nucleotide sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID No 1 2 or 16 or at least 21 to 100 nucleotides of a nucleotide sequence of SEQ ID 3 4 15 or 23 operably linked to a plant-expressible promoter and a 3' end region involved in transcription termination and polyadenylation regenerating a population of transgenic plant lines from said transgenic plant cell and identifying a stress tolerant plant line within the population of transgenic plant lines

[14] The invention also provides DNA molecules comprising a plant-expressible promoter operably linked to a DNA region which when transcribed yields an ParG inhibitory RNA molecule and to a 3' end region involved in transcription termination and polyadenylation. The ParG inhibitory RNA molecule may comprise a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the nucleotide sequence of the ParG gene present in the plant cell (the endogenous ParG gene). The ParG inhibitory RNA molecule may also comprise a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the complement of the nucleotide sequence of the ParG gene present in the plant cell (the endogenous ParG gene). In yet another embodiment the parG inhibitory RNA may comprise a sense region comprising a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the nucleotide sequence of the ParG gene present in the plant cell and an antisense region comprising a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the complement of the nucleotide sequence of the ParG gene present in the plant cell wherein the sense and antisense region are capable of forming a double stranded RNA region comprising said at least 20 consecutive nucleotides. The chimeric gene may further comprise a DNA region encoding a self-splicing ribozyme between said DNA region coding for parG inhibitory RNA molecule and the 3' end region. The chimeric gene may also comprise a nucleotide sequence of at least 21 to 100 nucleotides of a nucleotide sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID No 1 2 or 16 or at least 21 to 100 nucleotides of a nucleotide sequence of SEQ ID 3 4 15 or 23

[15] In yet another embodiment, the invention relates to plant cell comprising the DNA molecule of the invention and plants consisting essentially of such plant cells as well as to processes for producing stress tolerant plants comprising the step of further crossing such plants with another plant. Seeds and propagating material of such plants comprising the chimercic genes of the invention are also provided.

[16] The invention also relates to a method for obtaining stress tolerant plants comprising the steps of subjecting a plant cell line or a plant or plant line to mutagenesis identifying those plant cells or plants that have a mutation in an endogenous ParG gene subjecting the identified plant cells or plants to stress conditions and identifying plant cells or plants that tolerate said stress conditions better than control plants. Alternatively plant cells or plants may be selected for resistance to ParG inhibitors and further treated as described in this paragraph.

[17] The invention further relates to a stress tolerant plant cell or plant having a mutation in the endogenous ParG gene.

Brief description of the figures

[18] Figure 1 Schematic representation of the poly-ADP ribose polymerization / depolymerization cycle by the action of PARP/PARG in a eukaryotic cell.

[19] Figure 2 Diagram of the NAD⁺ and ATP content of *Arabidopsis* lines under high light stress. Dark boxes represent NAD content under high light conditions expressed as percentage of the value for NAD content determined under low light conditions. Light boxes represent ATP content under high light conditions expressed as percentage of the value for ATP content determined under low light conditions.

[20] Figure 3 Diagram of the NAD⁺ and ATP content of corn lines under nitrogen depletion stress. Dark boxes represent NAD content while light boxes represent ATP content.

Detailed description of preferred embodiments

[21] The invention is based on the one hand on the demonstration that cells from stress resistant plant lines comprising a chimeric gene reducing the PARP gene expression exhibited a higher NAD/ATP content under adverse conditions than cells from untransformed plant lines. On the other hand it has been observed that silencing of the expression of PARG encoding gene in tobacco using a transient silencing RNA vector based on satellite viruses resulted in a similar phenotype as that observed for silencing of PARP encoding gene using the same silencing system. Furthermore silencing the expression of PARG encoding gene in plants such as Arabidopsis and tobacco resulted in plants that were more resistant to stress conditions such as e.g. those imposed by high light conditions.

[22] Although not intending to limit the invention to a specific mode of action it is expected that silencing of PARG gene expression results in a similar phenotype as silencing of PARP gene expression for the following reasons. As can be seen from Figure 1 polymerization of ADP-ribose catalyzed by PARP consuming NAD is followed by depolymerization of poly ADP-ribose catalyzed by PARG. Poly ADP-ribosylation of the PARP protein itself results in inactivation of the PARP protein. The speed at which the ADP-ribose polymerization / depolymerization cycle occurs in plant cells leading to NAD depletion and consequently ATP depletion can be slowed down or stopped by reduction of the PARP gene expression or of the enzymatic activity of PARP. As a result plant cells and plants comprising such cells are more resistant to adverse conditions. The data provided here indicate that a similar effect can be obtained through slowing down or stopping the cycle by reduction of the PARG gene expression or PARG activity.

[23] The invention relates to reduction of plant cell death in response to adverse environmental conditions, and consequently to enhanced stress resistance by altering the level of expression of ParG genes, or by altering the activity or the apparent activity of PARG proteins in that plant cell. Conveniently the level of expression of ParG genes may be controlled genetically by introduction of chimeric genes altering the expression of ParG genes or by altering the endogenous PARG encoding genes, including the expression signals.

[24] In one embodiment of the invention a method for producing plants tolerant to stress conditions or adverse growing conditions is provided comprising the steps of:

- providing plant cells with a chimeric gene to create transgenic plant cells wherein the chimeric gene comprises the following operably linked DNA fragments

- a plant-expressible promoter
- a DNA region, which when transcribed yields a ParG inhibitory RNA molecule
 - a 3' end region involved in transcription termination and polyadenylation
- regenerating a population of transgenic plant lines from said transgenic plant cell and
 - identifying a stress tolerant plant line within said population of transgenic plant lines

[25] As used herein "a stress tolerant plant" or "a plant tolerant to stress conditions or adverse growing conditions" is a plant (particularly a plant obtained according to the methods of the invention) which when subjected to adverse growing conditions for a period of time such as but not limited to drought, high temperatures, limited supply of nutrients (particularly nitrogen), high light intensities, grows better than a control plant not treated according to the methods of the invention. This will usually be apparent from the general appearance of the plants and may be measured e.g. by increased biomass production, continued vegetative growth under adverse conditions or higher

9

seed yield. Stress tolerant plants have a broader growth spectrum i.e. they are able to withstand a broader range of climatological and other abiotic changes without yield penalty. Biochemically, stress tolerance may be apparent as the higher NAD⁺-NADH /ATP content and lower production of reactive oxygen species of stress tolerant plants compared to control plants under stress condition. Stress tolerance may also be apparent as the higher chlorophyll content, higher photosynthesis and lower chlorophyll fluorescence under stress conditions in stress tolerant plants compared to control plants under the same conditions.

[26] It will be clear that it is also not required that the plant be grown continuously under the adverse conditions for the stress tolerance to become apparent. Usually, the difference in stress tolerance between a plant or plant cell according to the invention and a control plant or plant cell will become apparent even when only a relatively short period of adverse conditions is encountered during growth.

[27] As used herein, a ParG inhibitory RNA molecule is an RNA molecule that is capable of decreasing the expression of the endogenous PARG encoding genes of a plant cell preferably through post-transcriptional silencing. It will be clear that even when a ParG inhibitory RNA molecule decreases the expression of a PARG encoding gene through post-transcriptional silencing, such an RNA molecule may also exert other functions within a cell such as e.g. guiding DNA methylation of the endogenous ParG gene, again ultimately leading to decreased expression of the PARG encoding gene. Also, expression of the endogenous PARG encoding genes of a plant cell may be reduced by transcriptional silencing e.g. by using RNAi or dsRNA targeted against the promoter region of the endogenous ParG gene.

[28] As used herein, a PARG encoding gene or a ParG gene is a gene capable of encoding a PARG (poly ADP ribose glycohydrolase) protein wherein the PARG protein catalyzes the depolymerization of poly ADP ribose.

by releasing free ADP ribose units either by endoglycolytic or exoglycolytic action

[29] PARG encoding genes may comprise a nucleotide sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID No 1 (*Arabidopsis thaliana*) or of SEQ ID No 2 (*Solanum tuberosum*) or of SEQ ID No 16 (*Oryza sativa*) or parts thereof such as a DNA fragment comprising the nucleotide sequence of SEQ ID No 3 or SEQ ID 4 or SEQ ID No 15 or SEQ ID 23 (*Zea mays*)

[30] However it will be clear that the skilled person can isolate variant DNA sequences from other plant species' by hybridization with a probe derived from the above mentioned PARG encoding genes from plant species or even with a probe derived from the above mentioned PARG encoding genes from animal species To this end the probes should preferably have a nucleotide sequence comprising at least 40 consecutive nucleotides from the coding region of those mentioned PARG encoding genes sequences preferably from the coding region of SEQ ID No 3 or SEQ ID No 4 The probes may however comprise longer regions of nucleotide sequences derived from the ParG genes such as about 50 60 75 100 200 or 500 consecutive nucleotides from any of the mentioned ParG genes Preferably the probe should comprise a nucleotide sequence coding for one of the highly conserved regions of the catalytic domain which have been identified by aligning the different PARG proteins from animals These regions are also present in the identified PARG protein from *Arabidopsis thaliana* and comprise the amino acid sequence LXVDFANXXXGGG (corresponding to SEQ ID No 1 from the amino acid at position 252 to the amino acid at position 264 X may be any amino acid) LXVDFANXXXGGGXXXXGXVQEEIRF (corresponding to SEQ ID No 1 from the amino acid at position 252 to the amino acid at position 277) or LXVDFANXXXGGGXXXXGXVQEEIRFXXXPE (corresponding to SEQ ID No 1 from the amino acid at position 252 to the amino acid at position 282) TGXWGCGXFXGD (corresponding to SEQ ID No 1 from the amino acid at position 449 to the amino acid at position 460) or TGXWGCGAFXGDXXLKXXXQ (corresponding to SEQ ID No 1 from the

amino acid at position 449 to the amino acid at position 468) Other conserved regions have the amino acid sequence DXXXRXXXXAIDA (corresponding to SEQ ID No 1 from the amino acid at position 335 to the amino acid at position 344) or REXXKAXXGF (corresponding to SEQ ID No 1 from the amino acid at position 360 to the amino acid at position 369) or GXXXXSXYTGY (corresponding to SEQ ID No 1 from the amino acid at position 303 to the amino acid at position 313) Hybridization should preferably be under stringent conditions

[31] "Stringent hybridization conditions as used herein mean that hybridization will generally occur if there is at least 95% and preferably at least 97% sequence identity between the probe and the target sequence Examples of stringent hybridization conditions are overnight incubation in a solution comprising 50% formamide 5 x SSC (150 mM NaCl 15 mM trisodium citrate) 50 mM sodium phosphate (pH 7.6) 5x Denhardt's solution 10% dextran sulfate and 20 µg/ml denatured sheared carrier DNA such as salmon sperm DNA followed by washing the hybridization support in 0.1 x SSC at approximately 65 °C e.g. for about 10 min (twice) Other hybridization and wash conditions are well known and are exemplified in Sambrook et al Molecular Cloning A Laboratory Manual Second Edition Cold Spring Harbor NY (1989) particularly chapter 11

[32] Alternatively ParG encoding genes or parts thereof may also be isolated by PCR based techniques using as primers oligonucleotides comprising at least 20 consecutive nucleotides from a nucleotide sequence of the mentioned PARG encoding genes or the complement thereof Such primers may comprise a nucleotide sequence encoding a conserved region as mentioned above or be complementary to such a nucleotide sequence Oligonucleotides which may be used for that purpose may comprise the nucleotide sequence of either or SEQ ID No 5 SEQ ID No 6 SEQ ID No 7 or SEQ ID No 8 Oligonucleotides which may be used may also be degenerate such as the oligonucleotide primers of SEQ ID No 17 SEQ ID No 18 SEQ ID No 19 SEQ ID No 20 SEQ ID No 21 or SEQ ID No 22

[33] Specific PCR fragments from ParG genes may e g be obtained by using combinations of the oligonucleotides having the nucleotide sequence of SEQ ID No 5 and SEQ ID No 6 using e g *Arabidopsis* genomic DNA or cDNA as a template DNA, or by using combinations of the oligonucleotides having the nucleotide sequence of SEQ ID No 7 and SEQ ID No 8 using e g , potato genomic DNA or cDNA as a template DNA under stringent annealing conditions

[34] The isolated sequences may encode a functional PARG protein or a part thereof Preferably the isolated sequences should comprise a nucleotide sequence coding for one or more of the highly conserved regions from the catalytic domain of PARG proteins as mentioned elsewhere

[35] However for the purpose of the invention is not required that the isolated sequences encode a functional ParG protein nor that a complete coding region is isolated Indeed all that is required for the invention is that a chimerc gene can be designed or produced based on the identified or isolated sequence of the endogenous ParG gene from a plant which is capable of producing a ParG inhibitory RNA Several alternative methods are available to produce such a ParG inhibitory RNA molecule

[36] In one embodiment the ParG inhibitory RNA molecule encoding chimeric gene is based on the so-called antisense technology In other words the coding region of the chimerc gene comprises a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the complement of the nucleotide sequence of the endogenous ParG gene of the plant cell or plant the expression of which is targeted to be reduced Such a chimerc gene may be conveniently constructed by operably linking a DNA fragment comprising at least 20 nucleotides from the isolated or identified ParG gene or part of such a gene in inverse orientation to a plant expressible promoter and 3 end formation region involved in transcription termination and polyadenylation It will be immediately clear that there is no need to know the exact nucleotide sequence or complete nucleotide sequence of such a DNA fragment from an isolated ParG gene

[37] In another embodiment the ParG inhibitory RNA molecule encoding chimeric gene is based on the so-called co-suppression technology. In other words, the coding region of the chimeric gene comprises a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the nucleotide sequence of the endogenous ParG gene of the plant cell or plant, the expression of which is targeted to be reduced. Such a chimeric gene may be conveniently constructed by operably linking a DNA fragment comprising at least 20 nucleotides from the isolated or identified ParG gene or part of such a gene in direct orientation to a plant expressible promoter and 3' end formation region involved in transcription/termination and polyadenylation. Again it is not required to know the exact nucleotide sequence of the used DNA fragment from the isolated ParG gene.

[38] The efficiency of the above mentioned chimeric genes in reducing the expression of the endogenous ParG gene may be further enhanced by inclusion of DNA elements which result in the expression of aberrant unpolyadenylated ParG inhibitory RNA molecules. One such DNA element suitable for that purpose is a DNA region encoding a self-splicing ribozyme as described in WO 00/01133.

[39] The efficiency of the above mentioned chimeric genes in reducing the expression of the endogenous ParG gene of a plant cell may also be further enhanced by including into one plant cell simultaneously a chimeric gene as herein described encoding an antisense ParG inhibitory RNA molecule and a chimeric gene as herein described encoding a sense ParG inhibitory RNA molecule, wherein said antisense and sense ParG inhibitory RNA molecules are capable of forming a double stranded RNA region by base pairing between the mentioned at least 20 consecutive nucleotides as described in WO 99/53050.

[40] As further described in WO 99/53050, the sense and antisense ParG inhibitory RNA regions capable of forming a double stranded RNA region may be present in one RNA molecule, preferably separated by a spacer region.

The spacer region may comprise an intron sequence. Such a chimeric gene may be conveniently constructed by operably linking a DNA fragment comprising at least 20 nucleotides from the isolated or identified endogenous ParG gene the expression of which is targeted to be reduced in an inverted repeat to a plant expressible promoter and 3' end formation region involved in transcription termination and polyadenylation. To achieve the construction of such a chimeric gene use can be made of the vectors described in WO 02/059294.

[41] An embodiment of the invention thus concerns a method for obtaining a stress tolerant plant line comprising the steps of

- providing plant cells with a chimeric gene to create transgenic plant cells wherein the chimeric gene comprises the following operably linked DNA fragments

a plant-expressible promoter

a DNA region which when transcribed yields a ParG inhibitory RNA molecule comprising a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the nucleotide sequence of the ParG gene present in said plant cell or

a DNA region which when transcribed yields a ParG inhibitory RNA molecule comprising a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the complement of the nucleotide sequence of the ParG gene present in said plant cell or

a DNA region which when transcribed yields a ParG inhibitory RNA molecule comprising a sense region comprising a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the nucleotide sequence of the ParG gene present in said plant cell and an antisense region comprising a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the complement of the nucleotide sequence of the ParG gene present in said plant cell wherein said sense and antisense region are capable of forming a double stranded RNA region comprising said at least 20 consecutive nucleotides

a 3 end region involved in transcription termination and polyadenylation

regenerating a population of transgenic plant lines from said transgenic plant cell and

identifying a stress tolerant plant line within said population of transgenic plant lines

[42] As used herein "comprising" is to be interpreted as specifying the presence of the stated features, integers, steps or components as referred to but does not preclude the presence or addition of one or more features, integers, steps or components or groups thereof. Thus e.g. a nucleic acid or protein comprising a sequence of nucleotides or amino acids may comprise more nucleotides or amino acids than the actually cited ones i.e. be embedded in a larger nucleic acid or protein. A chimeric gene comprising a DNA region which is functionally or structurally defined may comprise additional DNA regions etc.

[43] It will thus be clear that the minimum nucleotide sequence of the antisense or sense RNA region of about 20 nt of the ParG coding region may be comprised within a larger RNA molecule varying in size from 20 nt to a length equal to the size of the target gene.

[44] The mentioned antisense or sense nucleotide regions may thus be about from about 21 nt to about 5000 nt long such as 21nt, 40 nt, 50 nt, 100nt, 200 nt, 300nt, 500nt, 1000 nt, 2000 nt or even about 5000 nt or larger in length.

[45] Moreover it is not required for the purpose of the invention that the nucleotide sequence of the used inhibitory ParG RNA molecule or the encoding region of the chimeric gene is completely identical or complementary to the endogenous ParG gene the expression of which is targeted to be reduced in the plant cell. The longer the sequence the less stringent the requirement for the overall sequence identity is. Thus the sense or antisense regions may have an overall sequence identity of about 40 % or

50% or 60 % or 70% or 80% or 90 % or 100% to the nucleotide sequence of the endogenous ParG gene or the complement thereof. However, as mentioned, antisense or sense regions should comprise a nucleotide sequence of 20 consecutive nucleotides having about 100% sequence identity to the nucleotide sequence of the endogenous ParG gene. Preferably, the stretch of about 100 % sequence identity should be about 50, 75 or 100 nt.

[46] For the purpose of this invention, the "sequence identity" of two related nucleotide sequences expressed as a percentage refers to the number of positions in the two optimally aligned sequences which have identical residues (x100) divided by the number of positions compared. A gap, i.e., a position in an alignment where a residue is present in one sequence but not in the other, is regarded as a position with non-identical residues. The alignment of the two sequences is performed by the Needleman and Wunsch algorithm (Needleman and Wunsch 1970). Computer-assisted sequence alignment can be conveniently performed using standard software programs such as GAP, which is part of the Wisconsin Package Version 10.1 (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA), using the default scoring matrix with a gap creation penalty of 50 and a gap extension penalty of 3.

[47] It will be clear that whenever nucleotide sequences of RNA molecules are defined by reference to nucleotide sequence of corresponding DNA molecules, the thymine (T) in the nucleotide sequence should be replaced by uracil (U). Whether reference is made to RNA or DNA molecules will be clear from the context of the application.

[48] It will also be clear that chimeric genes capable of producing inhibitory ParG genes for a particular ParG gene in a particular plant variety or plant species may also be used to inhibit ParG gene expression in other plant varieties or plant species. Indeed, when sufficient homology exists between the ParG inhibitory RNA region and the ParG gene, or when the ParG genes share the same stretch of 19 nucleotides, expression of those other genes will also be down-regulated.

[49] In view of the potential role of ParG in nucleic acid metabolism it may be advantageous that the expression of the endogenous ParG gene by the ParG inhibitory RNA is not completely inhibited. Downregulating the expression of a particular gene by gene silencing through the introduction of a chimeric gene encoding ParG inhibitory RNA will result in a population of different transgenic lines exhibiting a distribution of different degrees of silencing of the ParG gene. The population will thus contain individual transgenic plant lines wherein the endogenous ParG gene is silenced to the required degree of silencing. A person skilled in the art can easily identify such plant lines e.g. by subjecting the plant lines to a particular adverse condition such as high light intensity, oxidative stress, drought, heat etc. and selecting those plants which perform satisfactorily and survive best the treatment.

[50] As used herein the term "promoter" denotes any DNA which is recognized and bound (directly or indirectly) by a DNA-dependent RNA-polymerase during initiation of transcription. A promoter includes the transcription initiation site and binding sites for transcription initiation factors and RNA polymerase and can comprise various other sites (e.g. enhancers) at which gene expression regulatory proteins may bind.

[51] The term "regulatory region" as used herein means any DNA that is involved in driving transcription and controlling (i.e. regulating) the timing and level of transcription of a given DNA sequence such as a DNA coding for a protein or polypeptide. For example, a 5' regulatory region (or "promoter region") is a DNA sequence located upstream (i.e. 5') of a coding sequence and which comprises the promoter and the 5' untranslated leader sequence. A 3' regulatory region is a DNA sequence located downstream (i.e. 3') of the coding sequence and which comprises suitable transcription termination (and/or regulation) signals including one or more polyadenylation signals.

[52] In one embodiment of the invention the promoter is a constitutive promoter. In another embodiment of the invention the promoter activity is enhanced by external or internal stimuli (inducible promoter) such as but not

limited to hormones, chemical compounds, mechanical impulses, abiotic or biotic stress conditions. The activity of the promoter may also be regulated in a temporal or spatial manner (tissue-specific promoters developmentally regulated promoters)

[53] For the purpose of the invention the promoter is a plant-expressible promoter. As used herein the term "plant-expressible promoter" means a DNA sequence which is capable of controlling (initiating) transcription in a plant cell. This includes any promoter of plant origin but also any promoter of non-plant origin which is capable of directing transcription in a plant cell. e.g. certain promoters of viral or bacterial origin such as the CaMV35S (Hapster et al., 1988), the subterranean clover virus promoter No. 4 or No. 7 (WO9606932), or T-DNA gene promoters but also tissue-specific or organ-specific promoters including but not limited to seed-specific promoters (e.g. WO89/03887) organ-primordia specific promoters (An et al. 1996), stem-specific promoters (Keller et al., 1988) leaf specific promoters (Hudspeth et al. 1989) mesophyll-specific promoters (such as the light-inducible Rubisco promoters) root-specific promoters (Keller et al. 1989) tuber-specific promoters (Keil et al. 1989), vascular tissue specific promoters (Peleman et al. 1989) stamen-selective promoters (WO 89/10396 WO 92/13956) dehiscence zone specific promoters (WO 97/13865) and the like

[54] Methods for the introduction of chimeric genes into plants are well known in the art and include *Agrobacterium*-mediated transformation particle gun delivery microinjection electroporation of intact cells polyethyleneglycol-mediated protoplast transformation electroporation of protoplasts liposome-mediated transformation silicon-whiskers mediated transformation etc. The transformed cells obtained in this way may then be regenerated into mature fertile plants

[55] The transgenic plant cells and plant lines according to the invention may further comprise chimeric genes which will reduce the expression of PARP genes as described in WO 00/04173. These further chimeric genes may be introduced e.g. by crossing the transgenic plant lines of the current

invention with transgenic plants containing PARP gene expression reducing chimeric genes. Transgenic plant cells or plant lines may also be obtained by introducing or transforming the chimeric genes of the invention into transgenic plant cells comprising the PARP gene expression reducing chimeric genes or vice versa. Alternatively, the PARP and PARG inhibitory RNA regions may be encoded by one chimeric gene and transcribed as one RNA molecule.

[56] The chimeric genes of the invention (or the inhibitory RNA molecules corresponding thereto) may also be introduced into plant cells in a transient manner, e.g. using the viral vectors such as viral RNA vectors as described in WO 00/63397 or WO 02/13964.

[57] Having read this specification, it will be immediately clear to the skilled artisan that mutant plant cells and plant lines wherein the PARG activity is reduced may be used to the same effect as the transgenic plant cells and plant lines described herein. Mutants in ParG gene of a plant cell or plant may be easily identified using screening methods known in the art, whereby chemical mutagenesis such as e.g. EMS mutagenesis is combined with sensitive detection methods (such as e.g. denaturing HPLC). An example of such a technique is the so-called "Targeted Induced Local Lesions in Genomes" method as described in McCallum et al. *Plant Physiology* 123: 439-442 or WO 01/75167. However, other methods to detect mutations in particular genome regions or even alleles are also available and include screening of libraries of existing or newly generated insertion mutant plant lines whereby pools of genomic DNA of these mutant plant lines are subjected to PCR amplification using primers specific for the inserted DNA fragment and primers specific for the genomic region or allele wherein the insertion is expected (see e.g. Maes et al. 1999 *Trends in Plant Science* 4: pp 90-96).

[58] Plant cell lines and plant lines may also be subjected to mutagenesis by selection for resistance to ParG inhibitors such as gallotannines (Ying et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(21): 12227-12232; Ying W. Swanson R.A. (2000) *NeuroReport* 11(7): 1385-1388).

[59] Thus methods are available in the art to identify plant cells and plant lines comprising a mutation in the ParG gene. This population of mutant cells or plant lines can then be subjected to different abiotic stresses and their phenotype or survival can be easily determined. Additionally the NAD and/or the ATP content of the stressed cells can be determined and compared to results of such determinations of unstressed cells. In stress tolerant cells the reduction of NAD content under stress conditions should when compared with unstressed cells should be lower than for corresponding control cells.

[60] It is also an object of the invention to provide plant cells and plants containing the chimeric genes or the RNA molecules according to the invention. Gametes, seeds, embryos, either zygotic or somatic progeny or hybrids of plants comprising the chimeric genes of the present invention which are produced by traditional breeding methods are also included within the scope of the present invention.

[61] The plants obtained by the methods described herein may be further crossed by traditional breeding techniques with other plants to obtain stress tolerant progeny plants comprising the chimeric genes of the present invention.

[62] The methods and means described herein are believed to be suitable for all plant cells and plants, both dicotyledonous and monocotyledonous plant cells and plants, including but not limited to cotton, Brassica vegetables, oilseed rape, wheat, corn or maize, barley, alfalfa, peanuts, sunflowers, rice, oats, sugarcane, soybean, turf grasses, barley, rye, sorghum, sugar cane, vegetables (including chicory, lettuce, tomato, zucchini, bell pepper, eggplant, cucumber, melon, onion, leek), tobacco, potato, sugarbeet, papaya, pineapple, mango, *Arabidopsis thaliana*, but also plants used in horticulture, floriculture or forestry (poplar, fir, eucalyptus, etc.).

[63] The following non-limiting Examples describe method and means for increasing stress tolerance in plants according to the invention.

[64] Unless stated otherwise in the Examples all recombinant DNA techniques are carried out according to standard protocols as described in Sambrook et al (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press NY and in Volumes 1 and 2 of Ausubel et al (1994) *Current Protocols in Molecular Biology* Current Protocols USA. Standard materials and methods for plant molecular work are described in *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) by R D D Croy jointly published by BIOS Scientific Publications Ltd (UK) and Blackwell Scientific Publications UK. Other references for standard molecular biology techniques include Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* Third Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press NY Volumes I and II of Brown (1998) *Molecular Biology LabFax* Second Edition Academic Press (UK). Standard materials and methods for polymerase chain reactions can be found in Dieffenbach and Dveksler (1995) *PCR Primer A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press and in McPherson et al (2000) *PCR - Basics From Background to Bench* First Edition Springer Verlag Germany.

[65] Throughout the description and Examples reference is made to the following sequences

- [66] SEQ ID N°1 amino acid sequence of the ParG protein from *Arabidopsis thaliana*
- [67] SEQ ID N 2 amino acid sequence of part of the ParG protein from *Solanum tuberosum*
- [68] SEQ ID N°3 nucleotide sequence encoding the ParG protein from *Arabidopsis thaliana*
- [69] SEQ ID N°4 nucleotide sequence encoding the part of the ParG protein from *Solanum tuberosum*
- [70] SEQ ID N°5 nucleotide sequence of an oligonucleotide primer suitable for PCR amplification of part of a ParG protein encoding DNA fragment
- [71] SEQ ID N 6 nucleotide sequence of an oligonucleotide primer suitable for PCR amplification of part of a ParG protein encoding DNA fragment

- [72] SEQ ID N°7 nucleotide sequence of an oligonucleotide primer suitable for PCR amplification of part of a ParG protein encoding DNA fragment
- [73] SEQ ID N°8 nucleotide sequence of an oligonucleotide primer suitable for PCR amplification of part of a ParG protein encoding DNA fragment
- [74] SEQ ID N°9 nucleotide sequence of the T-DNA vector containing the ParG expression reducing chimeric gene based on the *Arabidopsis* ParG gene sequence
- [75] SEQ ID N°10 amino acid sequence of conserved sequence 1 of PARG proteins
- [76] SEQ ID N°11 amino acid sequence of conserved sequence 2 of PARG proteins
- [77] SEQ ID N°12 amino acid sequence of conserved sequence 3 of PARG proteins
- [78] SEQ ID N°13 amino acid sequence of conserved sequence 4 of PARG proteins
- [79] SEQ ID N°14 amino acid sequence of conserved sequence 5 of PARG proteins
- [80] SEQ ID N°15 nucleotide sequence of the ParG protein from *Oryza sativa*
- [81] SEQ ID N°16 amino acid sequence of the ParG protein from *Oryza sativa*
- [82] SEQ ID N° 17 nucleotide sequence of an oligonucleotide primer PG1 suitable for PCR amplification of part of a ParG protein encoding DNA fragment
- [83] SEQ ID N° 18 nucleotide sequence of an oligonucleotide primer PG2 suitable for PCR amplification of part of a ParG protein encoding DNA fragment
- [84] SEQ ID N° 19 nucleotide sequence of an oligonucleotide primer PG3 suitable for PCR amplification of part of a ParG protein encoding DNA fragment
- [85] SEQ ID N° 20 nucleotide sequence of an oligonucleotide primer PG4 suitable for PCR amplification of part of a ParG protein encoding DNA fragment

- [86]** SEQ ID N° 21 nucleotide sequence of an oligonucleotide primer PG5 suitable for PCR amplification of part of a ParG protein encoding DNA fragment
- [87]** SEQ ID N° 22 nucleotide sequence of an oligonucleotide primer PG6 suitable for PCR amplification of part of a ParG protein encoding DNA fragment
- [88]** SEQ ID N° 23 nucleotide sequence encoding a ParG protein from *Zea mays*
- [89]** SEQ ID N° 24 nucleotide sequence of a T-DNA vector comprising a chimenc gene capable of reducing PARG expression
- [90]** SEQ ID N° 25 nucleotide sequence of a T-DNA vector comprising a chimenc gene capable of reducing PARG expression

[91] Examples**Example 1 Analysis of the influence of stress on energy production efficiency of transgenic stress tolerant plant lines containing PARP gene expression reducing chimeric genes**

- [92]** Hypocotyls of transgenic *Brassica napus* plants comprising PARP gene expression reducing chimeric genes as described in WO 00/04173 were cultivated for 5 days on a growth medium. Explants were then transferred to liquid medium comprising 30 mg/L aspirin or acetylsalicylic acid (resulting in oxidative stress conditions) for one day. In control experiments, hypocotyls of non-transgenic *Brassica napus* plants N90-740 were cultivated on the same growth medium and then incubated for one day in liquid medium comprising 30 mg/L aspirin. In addition, hypocotyls of both the transgenic lines and the control line were cultivated on the same growth medium without aspirin.
- [93]** After the cultivation period, the ATP content of 125 explants was determined for each experiment. Additionally, the oxygen consumed in 3 hours by 125 explants was determined. The results are summarized in Table 1. The standard error of the mean was less than 6%. Whereas the ratio of moles ATP per mg consumed oxygen in the control plants decreased in the control plants when oxidative stress was applied, the same ratio in the stress tolerant transgenic plant lines actually increased under stress conditions and was considerably higher (about 24%) than in the control plants. The stress resistant transgenic lines thus maintained a constant energy production efficiency, whereas the control lines exhibited a decreased energy production efficiency. In addition, superoxide production expressed as a percentage of superoxide production in control plants not subjected to the oxidative stress did not increase in stress tolerant plants subjected to stress conditions.

[94] Table 1 Influence of stress on energy production efficiency of 5 days cultured *Brassica napus* hypocotyl explants

Plant line	Stress	moles ATP per 125 explants	O ₂ mg/L consumed in 3 hrs by 125 explants	moles ATP	Superoxide production
				mg consumed O ₂	
N90-740 (control)	None	12.4×10^{-7}	2.96	4.19×10^{-7}	100%
	30mg/L aspirin	13.2×10^{-7}	4.06	3.25×10^{-7}	167%
Transgenic line	None	9.3×10^{-7}	2.33	3.99×10^{-7}	108%
	30mg/L aspirin	11.4×10^{-7}	2.82	4.04×10^{-7}	100%

[95] In another experiment the NAD⁺ and ATP content of 4 different transgenic *Arabidopsis* lines comprising PARP gene expression reducing chimeric genes as described in WO 00/04173 were determined under high and low light conditions and compared to the values obtained for a non transformed control line under the same conditions. The 4 different lines exhibited different degrees of stress resistance as exhibited e.g. by their ability to withstand heat and/or drought conditions. The values obtained for the NAD and ATP contents under high light stress are expressed as a percentage of the values for the NAD and ATP contents under low light conditions and are plotted in Figure 2

[96] The results show that high light stress leads to a significant NAD reduction in control plant cells and in the transgenic plant line which is the least stress resistant. The more stress resistant the transgenic plant lines are the less significant the NAD reduction is under high light stress conditions

[97] In another experiment the NAD⁺ and ATP content of a segregating population resulting from a cross between transgenic corn lines comprising PARP gene expression reducing chimeric genes as described in WO 00/04173 and an untransformed corn line were determined under conditions of nutrient (nitrogen) depletion and compared to the values obtained for a non transformed control line under the same conditions. Figure 3 is a graphic representation of the of the obtained results. Hemizygous and azygous lines were discriminated by verification for the presence of the selectable marker gene. The NAD and ATP content was significantly higher in the hemizygous stress tolerant plants than in the untransformed control plants or the azygous plants.

Example 2 Construction of ParG gene expression reducing chimeric genes

[98] To reduce the expression of the PARG gene e.g. in *Arabidopsis* and related plants, a chimeric gene was constructed which is capable of expressing a dsRNA comprising both a sense and antisense region which can form a double stranded RNA. Such dsRNA is very effective in reducing the expression of the genes with which it shares sequence homology by post-transcriptional silencing. The chimeric gene comprises the following DNA fragments:

- A promoter region from Cauliflower mosaic Virus (CaMV 35S)
- A DNA fragment comprising 163 bp from the ParG gene from *Arabidopsis thaliana* in direct orientation (Genbank Accession number AF394690 from nucleotide position 973 to 1135)
- A DNA fragment encoding intron 2 from the pdk gene from *Flaveria*
- The DNA fragment comprising 163 bp from the ParG gene from *Arabidopsis thaliana* in inverted orientation (Genbank Accession number AF394690 from nucleotide position 973 to 1135)
- A fragment of the 3' untranslated end from the octopine synthetase gene from *Agrobacterium tumefaciens*

[99] This chimeric gene was introduced in a T-DNA vector between the left and right border sequences from the T-DNA together with a selectable marker gene providing resistance to the herbicide phosphinotncin

[100] To reduce the expression of the PARG gene e.g. in potatoes and related plants a chimeric gene is constructed which is capable of expressing a dsRNA comprising both a sense and antisense region of a cDNA sequence from potato that is capable of encoding a protein having high sequence identity with the N-terminal part of the *Arabidopsis* PARG protein. The chimeric gene comprises the following DNA fragments:

- A promoter region from Cauliflower mosaic Virus (CaMV 35S)
- A DNA fragment comprising a sequence of at least 100 bp from ParG homologue from *Solanum tuberosum* in direct orientation (Genbank Accession number BE340510)
- A DNA fragment encoding intron 2 from the pdk gene from Flavena
- The DNA fragment comprising the sequence of at least 100 bp from ParG homologue from *Solanum tuberosum* in inverted orientation (Genbank Accession number BE340510)
- A fragment of the 3' untranslated end from the octopine synthetase gene from *Agrobacterium tumefaciens*

[101] This chimeric gene is introduced in a T-DNA vector between the left and right border sequences from the T-DNA together with a selectable marker gene providing resistance to the herbicide phosphinotncin

Example 3 Analysis of transgenic plant lines comprising ParG gene expression reducing chimeric genes

[102] The chimeric genes of Example 2 are introduced into *Arabidopsis* or potato respectively by *Agrobacterium* mediated transformation

[103] The population of obtained transgenic lines is subjected to the following stress conditions, together with control plants

- Increased heat for a period of days (greenhouse) or hours (in vitro)
- Drought for a period of days
- High light conditions for a period of days
- Nutrient depletion

[104] Individual plant lines surviving well the above mentioned stress conditions are selected

[105] The NAD content and ATP content for the above mentioned plants is determined under control and stress conditions

Example 4. Quantitative determination of NAD, ATP and superoxide radicals in plant cells

[106] Quantification of ATP in plant tissues was done basically as described by Rawlyer et al. (1999). Plant Physiol 120 293-300 The assay was used for the determination of the ATP content of hypocotyl explants that were cultured for 4-5 days on A2S3 medium or 2 weeks old *in vitro* cultured *Arabidopsis* plants. All manipulations are performed on crushed ice unless otherwise indicated

[107] ATP extraction

- Freeze plant material with liquid nitrogen
 - 100 hypocotyl explants
 - $\pm$ 700mg *Arabidopsis* plants (roots + shoots) (about 32-37 18 days old C24 plants)
- Put frozen hypocotyls in mortar and add 6ml of 6% perchloric acid
- Extraction can be done at room temperature using a pestle After extraction put samples as soon as possible on ice
- Centrifuge at 24 000g (Sorvall SS34 rotor at 14 000rpm) for 10min at

4°C

- The supernatant is neutralized with 5M K₂CO₃ (add 350µl of 5M K₂CO₃ to 3ml of supernatant)
- KClO₄ is removed by spinning as described above

[108] Quantitative bioluminescent determination of ATP

- The ATP bioluminescent assay kit from Sigma is used (FL-AA)
- Dilute extract 6000 x (about 6 mL extract from which 100µl is taken that is diluted 1000 times) The dilutions are made with the ATP assay mix dilution buffer (FL-AAB) of the ATP bioluminescent assay kit
- The amount of light that is produced is measured with the TD 20/20 luminometer of Turner Designs (Sunnyvale USA)
- Standard curve dissolve ATP standard of kit (FL-AAS) in 10ml of water (2x10⁻⁸ moles)

[109] Quantification of NAD⁺ and NADH in plant tissues was performed essentially as described by Karp et al (1983) or Filipovic et al (1999) on the following plant material

Brassica napus 150 5-days cultured hypocotyl explants/sample

Arabidopsis 1000mg 18-days old in vitro grown plants (shoots + roots)/sample (corresponds to ±60 C24 plants)

[110] Assay solution

- (A) For measuring NADH 25mM potassium phosphate buffer pH7
 0.1mM DTT
 3µM FMN (Fluka 83810)
 30µM n-decanal (Sigma D 7384)

(B) For measuring NAD⁺ + NADH

idem as for measuring NADH alone
 + 2µg/mL alcohol dehydrogenase (Roche 102 717)

[111] Extraction

- Freeze with liquid nitrogen
- Put frozen plant material in cooled mortar (cooled at -20°C) and add 5mL extraction buffer
- Grind material using a pestle
- Centrifuge at 24 000g (Sorvall SS34 rotor at 14 000rpm) for 15 minutes at 4°C
- Take 1 mL of supernatant for analysis

[112] Assay

NADH

- 390 μL of assay solution A
- + 10 μL extract
- + 2 μL NAD(P)H FMN oxidoreductase
- + 100 μL luciferase solution

NAD⁺ + NADH

- 390 μL of assay solution B
- + 10 μL extract
- 2 minutes at room temperature
- + 2 μL NAD(P)H FMN oxidoreductase
- + 100 μL luciferase solution

The amount of light that is produced is measured with the TD-20/20 luminometer of Turner Designs (Sunnyvale USA)

NADH-standard

NADH stock solution 1mM (7.1mg/10mL H_2O)

NADH disodium salt Roche 107 735

Dilution series in 10mM potassium phosphate buffer pH7 (10^{-2}) 5×10^{-3}
 2×10^{-3} 10^{-3} 5×10^{-4}

Add 10 μL of dilutions in 390 μL of assay solution A and perform reaction

Make standard curve

- [113] Superoxide radicals production was measured by quantifying the reduction of XTT as described in De Block and De Brouwer (2002)
 Plant Physiol Biochem 40 845-852

[114] BRASSICA NAPUS

[115] Media and reaction buffers

Sowing medium (medium 201)

Half concentrated Murashige and Skoog salts

2% sucrose

pH 5.8

0.6% agar (Difco Bacto Agar)

250mg/l tetracycline

Callus inducing medium A2S3

MS medium 0.5g/l Mes (pH 5.8) 3% sucrose 40mg/l adenine- SO_4

0.5% agarose 1mg/l 2,4-D 0.25mg/l NAA 1mg/l BAP 250mg/l

tetracycline

Incubation medium

25mM K-phosphate buffer pH 5.8

2% sucrose

1 drop Tween20 for 25ml medium

Reaction buffer

50mM K-phosphate buffer pH 7.4

1mM sodium 3-[1-[phenylamino-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) = XTT (bts Germany cat n 2525)

1 drop Tween20 for 25ml buffer

[116] Sterilization of seeds - pregermination of seeds - growing of the seedlings Seeds are soaked in 70% ethanol for 2 min then surface-sterilized for 15 min in a sodium hypochlorite solution (with about 6% active chlorine) containing 0.1% Tween20. Finally the seeds are rinsed with 1l of sterile tap water. Incubate seeds for at least one hour in sterile tap water (to allow diffusion from seeds of components that may inhibit germination). Seeds are put in 250ml erlenmeyer flasks containing 50ml of sterile tap water (+ 250mg/l tetracycline). Shake for

about 20 hours Seeds from which the radicle is protruded are put in — Vitro Vent containers from Duchefa containing about 125ml of sowing medium (10 seeds/vessel not too many to reduce loss of seed by contamination) The seeds are germinated at $\pm 24^{\circ}\text{C}$ and 10-30 Einstein/s m^{-2} with a daylength of 16h

[117] Preculture of the hypocotyl explants and induction of stress

- 12-14 days after sowing the hypocotyls are cut in about 7-10mm segments
- The hypocotyl explants (25 hypocotyls/Optilux Petridish Falcon S1005 Denmark) are cultured for 5 days on medium A2S3 at 25°C (at 10-30 Einstein/s m^{-2})

[118] XTT-assay

- Transfer 150 hypocotyl explants to a 50ml Falcon tube
- Wash with reaction buffer (without XTT)
- Add 20mL reaction buffer + XTT
(explants have to be submerged but do not vacuum infiltrate)
- Incubate in the dark at 26°C for about 3hours
- Measure the absorption of the reaction medium at 470nm

[119] ARABIDOPSIS THALIANA

[120] Media and reaction buffers

Plant medium

Half concentrated Murashige and Skoog salts

B5 vitamins

1 5% sucrose

pH 5.8

0.7% Difco agar

Incubation medium

10mM K phosphate buffer pH 5.8

2% sucrose

1 drop Tween20 for 25ml medium

Reaction buffer

50mM K-phosphate buffer pH7.4

1mM sodium 3-[1-[phenylamino-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy 6-nitro) = XTT (bts Germany cat n° 2525)

1 drop Tween20 for 25ml buffer

[121] *Arabidopsis* plants

- *Arabidopsis* lines control

lines to test

- Sterilization of *Arabidopsis* seeds

2min 70% ethanol

10 min bleach (6% active chlorine) + 1 drop Tween 20 for 20ml solution

wash 5 times with sterile tap water

Pregermination of seeds

In 9cm Optilux Petridishes (Falcon) containing 12ml sterile tap water

Low light overnight to 24 hours

- Growing of *Arabidopsis* plants

Seeds are sown in Intergrid Tissue Culture disks of Falcon (nr 3025)

containing ± 125 ml of plant medium 1 seed/grid

Plants are grown at 24 °C

$30 \mu\text{Einstein s}^{-1}\text{m}^{-2}$

16hours light 8hours dark

for about 3 weeks (before bolting)

[122] XTT assay

Control condition (no stress)

- Harvest shoots (roots included) from agar plates and put them directly in a 50ml Falcon tube containing reaction buffer (without XTT)

Stressed shoots

- Transfer shoots to 50ml Falcon tubes containing reaction buffer (without XTT)

- Replace reaction buffer with buffer containing XTT (40mL/tube)

- Shoots have to be submerged but do not vacuum infiltrate
- Incubate in the dark at 26°C for about 3 hours
- Measure the absorption of the reaction medium at 470nm

[123] Quantification of respiration by measuring oxygen consumption using a Clark polarographic electrode was done in the following way

[124] Plant material

Brassica napus

150-200* hypocotyl explants

Cultured for 5 days at 25°C

(cfr protocol vigour assay)

* 150 explants error <10% 200 explants error <6%

Arabidopsis

For C24 ± 1000mg* *in vitro* plants (shoots + roots) (corresponds with ~50 18-days old plants)

Pregerminate seeds before sowing

Grow for 18 days at 24°C

(cfr protocol *in vitro* growth *Arabidopsis*)

* for error <8%

[125] Incubation media

Brassica napus

25mM K-phosphate buffer pH5.8

2% sucrose

Tween20 (1 drop/25ml)

Arabidopsis

10mM K phosphate buffer pH5.8

2% sucrose

22

Tween20 (1 drop/25ml)

Before use aerate (saturate with oxygen) medium well by stirring for at least a few hours

[126] Assay

- Put explants in 100ml glass bottle (Schott Germany) filled with incubation medium Put the same weight of shoots in each bottle ($\pm$ 700mg)
- Fill bottle to overflowing and close tightly (avoid large air bubbles)
- Fill also a bottle with incubation medium that does not contain explants (blanco)
- Incubate at 24°C at low light for 3-4 hours (*Brassica napus*)
3 hours (*Arabidopsis*)
- Shake gently during incubation (to avoid oxygen depletion of medium around explants)
- Measure oxygen concentration (mg/l) of incubation media using an hand-held dissolved oxygen meter (Cyberscan DO 310 Eutech Instruments Singapore)
- $\text{mg/l consumed oxygen} = [\text{oxygen}] \text{ blanco} - [\text{oxygen}] \text{ sample}$

Example 5 Analysis of transgenic plant lines comprising ParG gene expression reducing chimeric genes

[127] The chimenc genes of Example 2 were introduced into *Arabidopsis* an *Nicotiana tabacum* c v Petit Havana SR1 by *Agrobacterium* mediated transformation

[128] Transgenic seeds were germinated on a medium containing MS salts/2 B5 vitamins 1.5% sucrose pH5.8 and 0.7% Difco agar. Germinated seeds were subject to low light (photosynthetic photon flux of about $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 14 to 18 days after which the light intensity was increased about 6-fold (photosynthetic photon flux of about 190

$\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$) After 1 day the NAD and NADH contents were determined using the enzymatic cycling method (Karp et al (1983) Anal Biochem 128 pp 175-180) A portion of the seedlings were cultivated further under high light conditions for about 3 to about days after which the damage was scored Damage was visible as darkening of the young leaves and shoot tip bleaching of older leaves and growth retardation The results are summarized in Table 1 for Arabidopsis and in Table 2 for tobacco

[129] Table 1 Analysis of Arabidopsis (Columbia) $\pm R$ indicates that some dark pigmentation was observed ND not determined

	High light tolerance	NAD+NADH content in 1 gram of tissue ($10^{-3}\mu\text{M}$)	% TTC-reducing capacity vs control
Non-transgenic control	S	17.3	100
Transgenic line 9	R	28.2	ND
Transgenic line 10	R	31.7	ND
Transgenic line 11	$\pm R$	26.5	ND
Transgenic line 12	S	19.4	ND
Transgenic line 26	R	33.2	55
Transgenic line 27	S	21.3	100
Transgenic line 28	$\pm R$	26.5	75
Transgenic line 29	S	17.7	102
Transgenic line 30	R	28.3	66

[130] Table 2 Analysis of *Nicotiana tabacum* c.v. Petit Havana SR1 $\pm R$ indicates that some dark pigmentation was observed R/S indicates that the resistance phenotype was not very clear

	High light tolerance	% TTC-reducing capacity vs control
Non transgenic control	S	100
Transgenic line 1	R/S	88
Transgenic line 2	$\pm R$	79
Transgenic line 3	R	53

[131] There is a positive correlation between the resistance to high light stress in the transgenic plants and the NAD⁺/NADH content of the cells. An inverse correlation can be seen between TTC reducing capacity and high light tolerance.

Example 6 Construction of ParG gene expression reducing chimeric genes suited for use in cereal plants

[132] To reduce the expression of the PARG gene e.g. in cereals such as rice or corn (maize) and related plants a chimeric gene is constructed which is capable of expressing a dsRNA comprising both a sense and antisense region of nucleotide sequence from rice that is capable of encoding a protein having high sequence identity with PARG protein encoding nucleotide sequences. The chimeric gene comprises the following DNA fragments:

- A promoter region from Cauliflower mosaic Virus (CaMV 35S)
- A DNA fragment comprising a sequence of at least 100 bp from ParG homologue from *Oryza sativa* (SEQ ID No 15) in direct orientation
- A DNA fragment encoding intron 2 from the pdk gene from *Flavina*

- A DNA fragment comprising a sequence of at least 100 bp from ParG homologue from *Oryza sativa* (SEQ ID No 15) in inverted orientation
- A fragment of the 3' untranslated end from the octopine synthetase gene from *Agrobacterium tumefaciens*

[133] This chimeric gene is introduced in a T-DNA vector, between the left and right border sequences from the T-DNA, together with a selectable marker gene providing resistance to e.g. the herbicide phosphinotricin

[134] To reduce the expression of the PARG gene e.g. in cereals such as rice or corn (maize) and related plants, a chimeric gene is constructed which is capable of expressing a dsRNA comprising both a sense and antisense region of nucleotide sequence from rice, that is capable of encoding a protein having high sequence identity with PARG protein encoding nucleotide sequences. The chimeric gene comprises the following DNA fragments:

- A promoter region from Cauliflower mosaic Virus (CaMV 35S)
- A DNA fragment comprising a sequence of at least 100 bp from ParG homologue from *Zea mays* (SEQ ID No 23) in direct orientation
- A DNA fragment encoding intron 2 from the *pdh* gene from *Flavaria*
- A DNA fragment comprising a sequence of at least 100 bp from ParG homologue from *Zea mays* (SEQ ID No 23) in inverted orientation
- A fragment of the 3' untranslated end from the octopine synthetase gene from *Agrobacterium tumefaciens*

[135] This chimeric gene is introduced in a T-DNA vector between the left and right border sequences from the T-DNA together with a selectable marker gene providing resistance to e.g. the herbicide phosphinotricin. The nucleotide sequence of two examples of such T-DNA vectors

comprising two different chimeric genes as described in the previous paragraph is represented in SEQ ID Nos 24 and 25

Example 7 Analysis of transgenic plant lines comprising ParG gene expression reducing chimeric genes

[136] The chimeric genes of Example 6 are introduced into rice or corn respectively by Agrobacterium mediated transformation

[137] The population of obtained transgenic lines is subjected to the following stress conditions together with control plants

- Increased heat for a period of days (greenhouse) or hours (in vitro)
- Drought for a period of days
- High light conditions for a period of days
- Nutrient depletion

[138] Individual plant lines surviving well the above mentioned stress conditions or at least one thereof are selected

[139] The NAD content and ATP content for the above mentioned plants is determined under control and stress conditions

Claims

- 1 A method to produce a plant tolerant to stress conditions comprising the steps of
 - (a) providing plant cells with a chimeric gene to create transgenic plant cells said chimeric gene comprising the following operably linked DNA fragments
 - (i) a plant-expressible promoter
 - (ii) a DNA region which when transcribed yields an ParG inhibitory RNA molecule
 - (iii) a 3' end region involved in transcription termination and polyadenylation
 - (b) regenerating a population of transgenic plant lines from said transgenic plant cell and
 - (c) identifying a stress tolerant plant line within said population of transgenic plant lines
- 2 The method according to claim 1 wherein said parG inhibitory RNA molecule comprises comprising a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the nucleotide sequence of the ParG gene present in said plant cell
- 3 The method according to claim 1 wherein said parG inhibitory RNA molecule is comprises comprising a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the complement of the nucleotide sequence of the ParG gene present in said plant cell
- 4 The method according to claim 2 or 3 wherein said chimeric gene further comprises a DNA region encoding a self-splicing ribozyme between said DNA region coding for said parG inhibitory RNA molecule and said 3' end region
- 5 The method according to claim 1 wherein said parG inhibitory RNA comprises a sense region comprising a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the nucleotide sequence of the ParG gene present

in said plant cell and an antisense region comprising a nucleotide sequence of at least 20 consecutive nucleotides of the complement of the nucleotide sequence of the ParG gene present in said plant cell wherein said sense and antisense region are capable of forming a double stranded RNA region comprising said at least 20 consecutive nucleotides

6 The method according to any one of claims 1 to 5 wherein said stress conditions is selected from heat drought nutrient depletion oxidative stress or high light conditions

7 The method according to any one of claims 1 to 6 comprising further crossing said transgenic plant line with another plant line to obtain stress tolerant progeny plants

8 A method to produce a plant tolerant to stress conditions comprising the steps of

(a) isolating a DNA fragment of at least 100 bp comprising a part of the parG encoding gene of said plant

(b) producing a chimeric gene by operably linking the following DNA fragments

(i) a plant expressible promoter region

(ii) said isolated DNA fragment comprising part of the parG encoding gene of said plant in direct orientation compared to the promoter region

(iii) said isolated DNA fragment comprising part of the parG encoding gene of said plant in inverted orientation compared to the promoter region

(iv) a 3' end region involved in transcription termination and polyadenylation

(c) providing plant cells with said chimeric gene to create transgenic plant cells

(d) regenerating a population of transgenic plant lines from said transgenic plant cell and

(e) identifying a stress tolerant plant line within said population of transgenic plant lines

9 A DNA molecule comprising

- (i) a plant-expressible promoter
- (ii) a DNA region which when transcribed yields a ParG inhibitory RNA molecule
- (iii) a 3' end region involved in transcription termination and polyadenylation

10 The DNA molecule according to claim 9 wherein said DNA region comprises a nucleotide sequence of at least 21 to 100 nucleotides of a nucleotide sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID No 1, 2 or 16 or at least 21 to 100 nucleotides of a nucleotide sequence of SEQ ID 3, 4, 15 or 23

11 A plant cell comprising the DNA molecule of claim 9 or 10

12 A plant consisting essentially of the plant cells of claim 11

13 A process for producing stress tolerant plants comprising the step of further crossing a plant of claim 12 with another plant

14 Seeds and propagating material of a plant according to claim 12 comprising the chimeric gene of claim 9 or 10

15 Plants obtainable or obtained by the process of claim 8

16 A method to produce a plant tolerant to stress conditions comprising the steps of

(a) providing plant cells with a chimeric gene to create transgenic plant cells said chimeric gene comprising the following operably linked DNA fragments

- (i) a plant-expressible promoter

(ii) a DNA region which when transcribed yields an ParG inhibitory RNA molecule said DNA region comprising a nucleotide sequence of at least 21 to 100 nucleotides of a nucleotide sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID No 1 2 or 16 or at least 21 to 100 nucleotides of a nucleotide sequence of SEQ ID 3 4 15 or 23

(iii) a 3' end region involved in transcription termination and polyadenylation

(b) regenerating a population of transgenic plant lines from said transgenic plant cell and

(c) identifying a stress tolerant plant line within said population of transgenic plant lines

17 A method to produce a plant tolerant to stress conditions comprising the steps of

(a) subjecting a plant cell line or a plant or plant line to mutagenesis

(b) identifying those plant cells or plants that have a mutation in an endogenous ParG gene

(c) subjecting the identified plant cells or plants to stress conditions

(d) identifying plant cells or plants that tolerate said stress conditions better than control plants

18 A method to produce a plant tolerant to stress conditions comprising the steps of

(a) selecting a plant cell line or a plant or plant line which is resistant to a ParG inhibitor

(b) identifying those plant cells or plants that have a mutation in an endogenous ParG gene

(c) subjecting the identified plant cells or plants to stress conditions

(d) identifying plant cells or plants that tolerate said stress conditions better than control plants

19 A stress tolerant plant cell or plant comprising a mutation in an endogenous ParG gene

ABSTRACT Methods and means are provided to increase the tolerance of plants to abiotic stress or adverse environmental conditions including drought, high light intensities, high temperatures, nutrient limitations and the like by reducing the activity of endogenous PARG proteins in plants

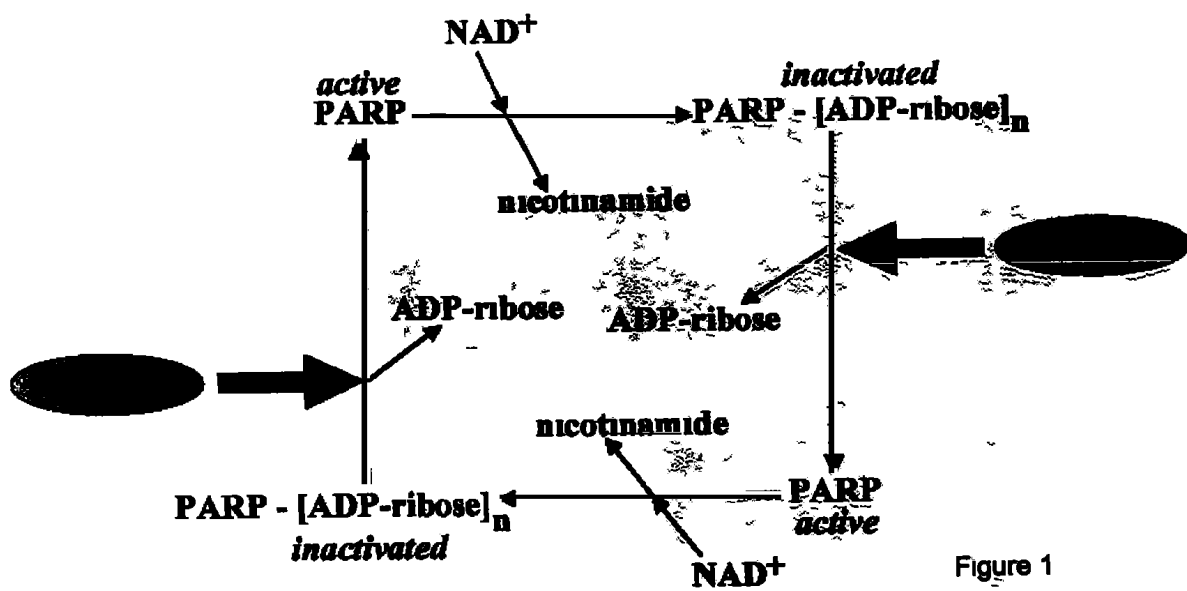


Figure 1

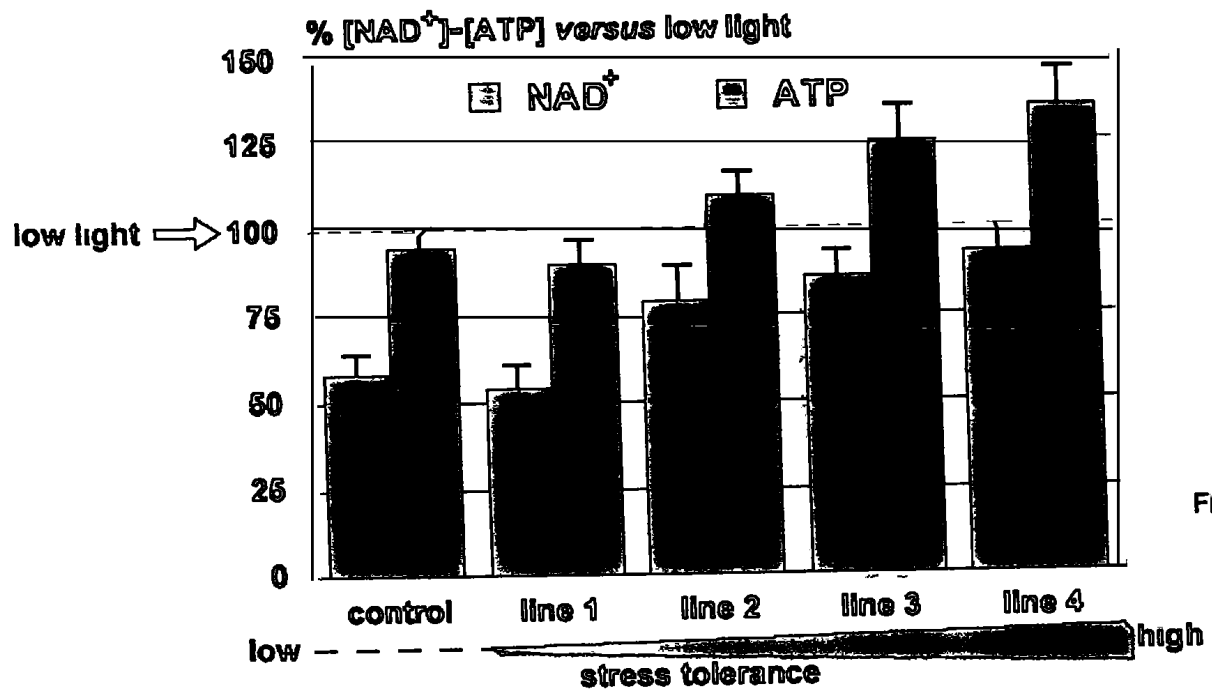


Figure 2

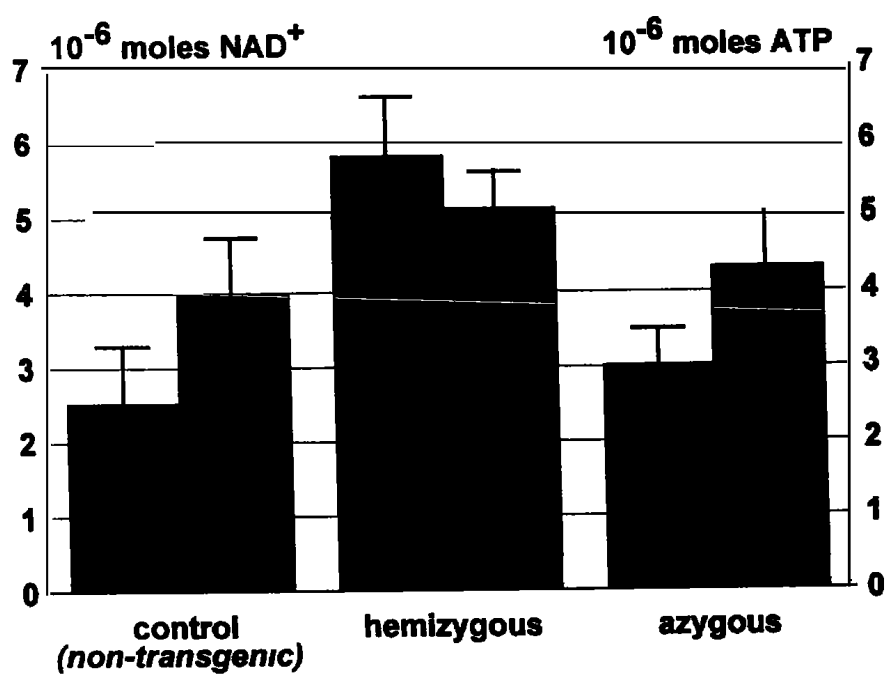


Figure 3

sp

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer BioScience N V
De Block Marc

<120> Methods and means for increasing the tolerance of plants to stress conditions

<130> BCS 03 2002 WO1

<150> EP03076044 1

<151> 2003-04-09

<150> US 60/496 688

<151> 2003-08 21

<160> 25

<170> PatentIn version 3 1

<210> 1

<211> 548

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

```

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

```

275 280 285
Phe Leu Pro Arg Met Asp Asp Asn Glu Ala Ile Glu Ile Val Gly Ala
290 295 300
Glu Arg Phe Ser Cys Tyr Thr Gly Tyr Ala Ser Ser Phe Arg Phe Ala
305 310 315 320
Gly Glu Tyr Ile Asp Lys Lys Ala Met Asp Pro Phe Lys Arg Arg Arg
325 330 335
Thr Arg Ile Val Ala Ile Asp Ala Leu Cys Thr Pro Lys Met Arg His
340 345 350
Phe Lys Asp Ile Cys Leu Leu Arg Glu Ile Asn Lys Ala Leu Cys Gly
355 360 365
Phe Leu Asn Cys Ser Lys Ala Trp Glu His Gln Asn Ile Phe Met Asp
370 375 380
Glu Gly Asp Asn Glu Ile Gln Leu Val Arg Asn Gly Arg Asp Ser Gly
385 390 395 400
Leu Leu Arg Thr Glu Thr Thr Ala Ser His Arg Thr Pro Leu Asn Asp
405 410 415
Val Glu Met Asn Arg Glu Lys Pro Ala Asn Asn Leu Ile Arg Asp Phe
420 425 430
Tyr Val Glu Gly Val Asp Asn Glu Asp His Glu Asp Asp Gly Val Ala
435 440 445
Thr Gly Asn Trp Gly Cys Gly Val Phe Gly Gly Asp Pro Glu Leu Lys
450 455 460
Ala Thr Ile Gln Trp Leu Ala Ala Ser Gln Thr Arg Arg Pro Phe Ile
465 470 475 480
Ser Tyr Tyr Thr Phe Gly Val Glu Ala Leu Arg Asn Leu Asp Gln Val
485 490 495
Thr Lys Trp Ile Leu Ser His Lys Trp Thr Val Gly Asp Leu Trp Asn
500 505 510
Met Met Leu Glu Tyr Ser Ala Gln Arg Leu Tyr Lys Gln Thr Ser Val
515 520 525
Gly Phe Ser Ser Trp Leu Leu Pro Ser Leu Ala Thr Thr Asn Lys Ala
530 535 540
Ile Gln Pro Pro
545

<210> 2
<211> 169
<212> PRT
<213> Solanum tuberosum

<400> 2
Met Glu Asn Arg Glu Asp Val Lys Ser Ile Leu Pro Phe Leu Pro Val
1 5 10 15
Cys Leu Arg Ser Ser Ser Leu Phe Trp Pro Pro Leu Val Val Glu Ala
20 25 30
Leu Lys Ala Leu Ser Glu Gly Pro His Tyr Ser Asn Val Asn Ser Gly
35 40 45
Gln Val Leu Phe Leu Ala Ile Ser Asp Ile Arg Asn Ser Leu Ser Leu
50 55 60
Pro Asp Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ala Ser Asp Gly Phe Ser Leu Leu
65 70 75 80
Phe Asp Asp Leu Ile Pro Arg Asp Glu Ala Val Lys Trp Phe Lys Glu
85 90 95
Val Val Pro Lys Met Ala Asp Leu Leu Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu
100 105 110
Glu Ala His Tyr Glu Lys Ala Asp Gly Gly Ile Val Lys Gly Val Asn
115 120 125

Thr Gly Leu Arg Leu Leu Glu Ser Gln Gln Pro Gly Ile Val Phe Leu
130 135 140

Ser Gln Glu Leu Val Gly Ala Leu Leu Ala Cys Ser Phe Phe Cys Tyr
145 150 155 160

Ser Leu Pro Met Ile Glu Val Ser Val
165

<210> 3
<211> 1647
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3
atggagaatc gcgaagatct taactcaatt cttccgtacc ttccacttgt aattcgttcg 60
tcgtcgctgt attggccgcc gcgtgtggtg gaggcgttaa aggcaatgtc tgaaggacca 120
tctcacagcc aagttgactc aggagagggt ctacggcaag ctattttcga tatgagacga 180
tccttatctt tctctactct cgagccatct gcttctaatt gctacgcatt tctctttgac 240
gaattgattg atgagaaaaga atcaaaagaga tggtttgatg agattatccc agcattggcg 300
agcttacttc tacagtttcc atctctgtta gaagtgcatt tccaaaatgc tgataatatt 360
gttagtggaa tcaaaaccgg tcttcgtttg ttaaattccc aacaagctgg cattgttttc 420
ctcagccagg agttgattgg agctcttctt gcatgctctt tcttttgttt gtttcgggat 480
gataatagag gtgcaaaaca ccttccagtc atcaactttg atcatttgtt tgcaagcctt 540
tatataagtt atagtcaaag tcaagaaagc aagataagat gtattatgca ttactttgaa 600
aggttttgct cctgcgtgcc tatttggtatt gtttcatttg aacgcaagat taccgctgct 660
cctgatgctg atttctggag caagtctgac gtttctcttt gtgcatttaa ggttcactct 720
tttgggttaa ttgaagatca acctgacaat gctctcgaag tggactttgc aaacaagtat 780
ctcggagggtg gttccctaag tagagggtgc gtgcaggaag agatacgctt catgattaac 840
cctgaattaa tcgctggcat gcttttcttg cctcggatgg atgacaatga agctatagaa 900
atagttggtg cggaagatt ttcatgttac acaggggatg catcttcggt tcggtttgct 960
ggtgagtaca ttgacaaaaa ggcaatggat cctttcaaaa ggcgaagaac cagaattgtt 1020
gcaattgatg cattatgtac accgaagatg agacacttta aagatatatg tcttttaagg 1080
gaaattaata aggcactatg tggcttttta aattgtagca aggcctggga gcaccagaat 1140
atattcatgg atgaaggaga taatgaaatt cagcttgctc gaaacggcag agattctggt 1200
cttctgcgta cagaaactac tgcgtcacac cgaactccac taaatgatgt tgagatgaat 1260
agagaaaagc ctgctaacaa tcttatcaga gatttttatg tggaggagt tgataacgag 1320
gatcatgaag atgatggtgt cgcgacaggg aattggggat gtggtgtttt tggaggagac 1380
ccagagctaa aggctacgat acaatggctt gctgcttccc agactcgaag accatttata 1440
tcatattaca cctttggagt agaggcactc cgaaacctag atcaggtgac gaagtggatt 1500
ctttcccata aatggactgt tggagatctg tggacatga tgttagaata ttctgctcaa 1560
aggctctaca agcaaaccag tgttggcttc ttttcttggc tacttccatc tctagctacc 1620
accaacaaag ctatccagcc gccttga 1647

<210> 4
<211> 598
<212> DNA
<213> Solanum tuberosum

<400> 4
gcaatggaga atagagaaga cgtgaagtca atccttccct ttttgccggt gtgtctccga 60
tcatcttctc ttttctggcc gccgctagtt gttgaagcac tgaaagccct ctctgaaggc 120
cctcattaca gcaatgttaa ctccggccaa gtccctcttc tcgcaatctc cgacattcgg 180
aattcccttt cactacctga ttcttcaatt tctcttctg cttcagacgg attttctctc 240
ttatttgatg atttaattcc tagggatgaa gctgttaaat ggttcaaaga agtgggtgccg 300
aaaatggcgg atttgctatt gcggtgcct tcttatttg aggtcacta tgagaaggct 360
gatgggtggaa ttgttaaagg agtcaacact ggtcttcgct tattggaatc acaacagcct 420
ggcattgttt tcctcagtca ggaattagtc ggtgctcttc ttgcatgttc cttcttttgc 480
tattccctac caatgataga ggtatctgta tgatcagtat gacgagaaat ttgaaaataa 540
attgaagtgc attcttcact attttgagag gattggctca ttgatacctg cgggctac 598

<210> 5
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ParGAt1
 <400> 5 37
 ggatcccctg caggacaaaa aggcaatgga tcctttc

 <210> 6
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ParGAt2
 <400> 6 39
 gcacgaattc gcggccgcgg tgctcccaag ccttgctac

 <210> 7
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ParGSt1
 <400> 7 39
 ggatcccctg caggctcact atgagaaggc tgatggtgg

 <210> 8
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ParGSt2
 <400> 8 43
 gcacgaattc gcggccgcgt catactgatr atacagatac ctc

 <210> 9
 <211> 13466
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> nucleotide sequence of pTVE428
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (198) (222)
 <223> Right T DNA border

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (983) (273)
 <223> 3 ocs (3 untranslated end of octopine synthase gene)

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (995) (1155)
 <223> part of poly (ADP ribose) glycohydrolase

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1929) (1188)
 <223> intron 2 from the Pdk gene of Flaveria

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2122) (1962)
 <223> part of poly (ADP-ribose) glycohydrolase

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3476) (2131)
 <223> 35S promoter region from Cauliflower Mosaic Virus

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3948) (3737)
 <223> 3 untranslated end of gene 7 from Agrobacterium tumefaciens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4521) (3970)
 <223> bar coding region

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6247) (4522)
 <223> PSSuAra promoter region

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6415) (6439)
 <223> left border region of T DNA of Agrobacterium tumefaciens

<400> 9
 agattcgaag ctcggtcccc tgggtgttct gtcgtctcgt tgtacaacga aatccattcc 60
 cattccgcgc tcaagatggc ttccccctcg cagttcatca gggctaaatc aatctagccg 120
 acttgtccgg tgaatgggc tgcaactccaa cagaaacaat caaacaacaa tacacagcga 180
 cttattcaca cgcgacaaat tacaacggta tatatcctgc cagtactcgg ccgtcgaccg 240
 cggtagcccg gaattaagct tgcatgcctg caggtcctgc tgagcctcga catgttgctg 300
 caaaattcgc cctggaccgg cccaacgatt tgcgtcact gtcaagggtt gacctgcact 360
 tcatttgggg ccacataca ccaaaaaaat gctgcataat tctcggggca gcaagtcggt 420
 tacccggccg ccgtgctgga ccgggttgaa tggtgccccg aactttcggg agagcggacg 480
 gccaatctc aacttcaagg aatctcacc atgcgcgccg gcggggaacc ggagttccct 540
 tcagtgaacg ttattagttc gccgctcgg gtgtcgtaga tactagcccc tggggccttt 600
 tgaaatttga ataagattta tgtaatcagt cttttaggtt tgaccggttc tgccgctttt 660
 tttaaaattg gatttgtaat aataaaacgc aattgtttgt tattgtggcg ctctatcata 720
 gatgtcgcta taaacctatt cagcacataa tattgttttc attttaatat tgtacatata 780
 agtagtaggg tacaatcagt aaattgaacg gagaatatta ttcataaaaa tacgatagta 840
 acgggtgata tattcattag aatgaaccga aaccggcggg aaggatctga gctacacatg 900
 ctcagggttt ttacaacgtg cacaacagaa ttgaaagcaa atatcatgcg atcataggcg 960
 tctcgcatat ctcattaaag caggactcta gagacaaaaa ggcaatggat cctttcaaaa 1020
 ggcgaagaac cagaattgtt gcaattgatg cattatgtac accgaagatg agacacttta 1080
 aagatatatg tcttttaagg gaaattaata aggcactatg tggcttttta aattgtagca 1140
 aggcttggga gcaccatcga tttcgaaccc agcttcccaa ctgtaatcaa tccaaatgta 1200
 agatcaatga taacacaatg acatgatcta tcatgttacc ttgtttattc atgttcgact 1260
 aattcattta attaatagtc aatccattta gaagttaata aaactacaag tattatttag 1320
 aaattaataa gaatgttgat tgaaaataat actatataaa atgatagatc ttgcgctttg 1380
 ttatattagc attagattat gttttgttac attagattac tgtttctatt agtttgatat 1440

tatttgttac	tttagcttgt	tatttaatat	tttgtttatt	gataaattac	aagcagattg	1500
gaatttctaa	caaaatāttt	attaactttt	aaactaaaat	atttagtaat	ggtatagata	1560
tttaattata	taataaacta	ttaatcataa	aaaaatatta	ttttaattta	tttattctta	1620
tttttactat	agtattttat	cattgatatt	taattcatca	aaccagctag	aattactatt	1680
atgattaaaa	caaataattaa	tgctagtata	tcattcttaca	tgttcgcata	aattcattaa	1740
aaataatata	cttactctca	actttttatct	tcttcgtctt	acacatcact	tgtcatattt	1800
ttttacatta	ctatgttgtt	tatgtaaaca	atatattttat	aaattatttt	ttcacaatta	1860
taacaactat	attattataa	tcataactaat	taacatcact	taactatttt	atactaaaag	1920
gaaaaaagaa	aataattatt	tccttaccac	gctggggtac	cgggtgctccc	aagccttgct	1980
acaattttaa	aagccacata	gtgccttatt	aatttccctt	aaaagacata	tatcttttaa	2040
gtgtctcatc	ttcgggtgtac	ataatgcac	aattgcaaca	attctgggtc	ttcgcctttt	2100
gaaaggatcc	attgcctttt	tgctctcgag	cgtgtcctct	ccaaatgaaa	tgaacttcct	2160
tatatagagg	aagggtcttg	cgaaggatag	tgggattgtg	cgatcatcct	tacgtcagtg	2220
gagatgtcac	atcaatccac	ttgctttgaa	gacgtgggtg	gaacgtcttc	ttttccacg	2280
atgctcctcg	tgggtggggg	tccatctttg	ggaccactgt	cggcagagag	atcttgaatg	2340
atagcctttc	ctttatcgca	atgatggcat	ttgtaggagc	caccttcctt	ttctactgtc	2400
ctttcgatga	agtgcagat	agctgggcaa	tggaaatccga	ggagggtttcc	cgaatattatc	2460
ctttgttgaa	aagtctcaat	agcccttttg	tcttctgaga	ctgtatcttt	gacatttttg	2520
gagtagacca	gagtgtcgtg	ctccaccatg	ttgacgaaga	ttttcttctt	gtcattgagt	2580
cgtaaaagac	tctgtatgaa	ctgttcgcca	gtcttcacgg	cgagttctgt	tagatcctcg	2640
atltgaaatct	tagactccat	gcatggcctt	agattcagta	ggaactacct	ttttagagac	2700
tccaatctct	attacttgcc	ttgggtttatg	aagcaagcct	tgaatcgctc	atactggaat	2760
agtacttctg	atcttgagaa	atatgtcttt	ctctgtgttc	ttgatgcaat	tagtctcgaa	2820
tcttttgact	gcacttttaa	ccttcttggg	aagggtatttg	atctcctgga	gattgttact	2880
cgggtagatc	gtcttgatga	gacctgctgc	gtaggcctct	ctaaccatct	gtgggtcagc	2940
attctttctg	aaattgaaga	ggctaacctt	ctcattatca	gtgggtgaaca	tagtgtcgtc	3000
accttcacct	togaacttcc	ttcctagatc	gtaaagatag	aggaaatcgt	ccattgtaat	3060
ctccggggca	aaggagatct	cttttggggc	tggatcactg	ctggggccttt	tgggtccctag	3120
cgtgagccag	tgggcttttt	gctttgggtg	gcttggttagg	gccttagcaa	agctcttggg	3180
cttgagttga	gcttctcctt	tggggatgaa	gttcaacctg	tctgtttgct	gacttgttgt	3240
gtacgcgtca	gctgctgctc	ttgcctctgt	aatagtggca	aatttcttgt	gtgcaactcc	3300
gggaacgccg	tttgttgccg	cctttgtaca	acccagtcac	tcgtatatac	cggcatgtgg	3360
accgttatac	acaacgtagt	agttgatatg	agggtgttga	atacccgatt	ctgctctgag	3420
aggagcaact	gtgctgttaa	gctcagattt	ttgtgggatt	ggaattaatt	cgtcgagcgg	3480
ccgctcgacg	agcgcgccga	tatcgcgac	gcccgggccg	gccatttaaa	tgaattcgag	3540
ctcggtagcc	aaacgcggcc	gcaagctata	acttcgtata	gcatacatta	tacgaagtta	3600
ttcgactcta	gaggatccca	attcccattg	atggagtcaa	agattcaaat	agaggacact	3660
tctcgaactc	ggccgtcgaa	ctcggccgtc	gagtacatgg	tcgataagaa	aaggcaattt	3720
gtagatgtta	attcccattc	tgaagaaat	atagtttaaa	tattttattga	taaaataaca	3780
agtcagggtat	tatagtccaa	gcaaaaacat	aaattttattg	atgcaagttt	aaattcagaa	3840
atattttcaat	aactgattat	atcagctggg	acattgcccgt	agatgaaaga	ctgagtgcga	3900
tattatgtgt	aatacataaa	ttgatgatat	agctagctta	gctcatcggg	ggatcctaga	3960
cgcgtgagat	cagatctcgg	tgacgggcag	gaccggacgg	ggcggtagccg	gcaggctgaa	4020
gtccagctgc	cagaaaccca	cgtcatgcga	gttcccgtgc	ttgaagccgg	ccgcccgcag	4080
catgccgcgg	ggggcatatc	cgagcgcctc	gtgcatgcgc	acgctcgggt	cgttggggcag	4140
cccgatgaca	gcgaccacgc	tcttgaagcc	ctgtgcctcc	agggacttca	gcagggtgggt	4200
gtagagcgtg	gagcccagtc	ccgtccgctg	gtggcggggg	gagacgtaca	cggctgactc	4260
ggccgtccag	tcgtaggcgt	tgctgcctt	ccagggggcc	gcgtaggcga	tgcgggcgac	4320
ctcgccttcc	acctcggcga	cgagccaggg	atagcgctcc	cgcagacgga	cgaggctcgtc	4380
cgtccactcc	tgcggttcct	gcggctcggg	acggaagtgt	accgtgcttg	tctcgatgta	4440
gtgggtgacg	atgggtgcaga	ccgccggcat	gtccgcctcg	gtggcacggc	ggatgtcggc	4500
cgggcgtcgt	tctgggtcca	ttgttcttct	ttactctttg	tgtgactgag	gtttgggtcta	4560
gtgctttggg	catctatata	taatgataac	aacaatgaga	acaagctttg	gagtgatcgg	4620
aggggtctagg	atacatgaga	ttcaagtggg	ctaggatcta	caccgttggg	ttttgagtgt	4680
ggatatgtgt	gagggttaatt	ttacttgggt	acggccacaa	aggcctaagg	agagggtgtg	4740
agacccttat	cggcttgaac	cgctggaata	atgccacgtg	gaagataatt	ccatgaatct	4800
tatcgttatc	tatgagtga	attgtgtjat	gggtggagtgg	tgcttgctca	ttttacttgc	4860
ctgggtggact	tggccctttc	cttatgggga	atlttatattt	tacttactat	agagctttca	4920
tacctttttt	ttaccttgga	tttagttaat	atataatggg	atgattcatg	aataaaaatg	4980
ggaaattttt	gaatttgtac	tgctaaatgc	ataagattag	gtgaaactgt	ggaatatata	5040
tttttttcat	ttaaaagcaa	aatttgcctt	ttactagaat	tataaatata	gaaaaatata	5100

taacattcaa	ataaaaaatga	aaataagaac	tttcaaaaaa	cagaactatg	tttaatgtgt	5160
aaagattagt	cgcacatcaa	gtcatctgtt	acaatatgtt	acaacaagtc	ataagcccaa	5220
caaagtttagc	acgtctaaat	aaactaaaga	gtccacgaaa	atattacaaa	tcataagccc	5280
aacaaagtta	ttgatcaaaa	aaaaaaaacg	cccaacaaag	ctaaacaaag	tccaaaaaaa	5340
acttctcaag	tctccatctt	cctttatgaa	cattgaaaac	tatacacaaa	acaagtcaga	5400
taaatctctt	tctgggcctg	tcttcccaac	ctcctacatc	acttccctat	cggattgaat	5460
gttttacttg	taccttttcc	gttgcaatga	tattgatagt	atgtttgtga	aaactaatag	5520
ggttaacaat	cgaagtcatg	gaatatggat	ttgggtccaag	attttccgag	agctttctag	5580
tagaaaagccc	atcaccagaa	atttactagt	aaaataaatc	accaattagg	tttcttatta	5640
tgtgccaaat	tcaatataat	tatagaggat	atttcaaatg	aaaacgtatg	aatgttatta	5700
gtaaatggtc	aggtaagaca	ttaaaaaat	cctacgtcag	atattcaact	ttaaaaattc	5760
gatcagtggt	gaattgtaca	aaaatttggg	atctactata	tatatataat	gctttacaac	5820
acttggattt	ttttttggag	gctggaattt	ttaatctaca	tatttgtttt	ggccatgcac	5880
caactcattg	tttagtgtaa	tactttgatt	ttgtcaaata	tatgtgttcg	tgtatatttg	5940
tataagaatt	tctttgacca	tatacacaca	cacatatata	tatatatata	tatattatat	6000
atcatgcact	tttaattgaa	aaaataatat	atatatatat	agtgcatttt	ttctaacaac	6060
catatatgtt	gcgattgatc	tgcaaaaaata	ctgctagagt	aatgaaaaat	ataatctatt	6120
gctgaaatta	tctcagatgt	taagattttt	ttaaagtaaa	ttctttcaaa	ttttagctaa	6180
aagtcttgta	ataactaaag	aataatacac	aatctcgacc	acggaaaaaa	aacacataat	6240
aaatttgaat	ttcgaccgcg	gtacccggaa	ttgggttata	attacctcag	gtcgaggaat	6300
taattcggta	cgtacctaat	aacttcgtat	agcatacatt	atacgaagtt	atatggatct	6360
cgaggcatta	cggcattacg	gcactcgcga	gggtcccaat	tcgagcatgg	agccatttac	6420
aattgaatat	atcctgccgc	cgctgccgct	ttgcaccggg	tggagcttgc	atgttggttt	6480
ctacgcagaa	ctgagccggg	taggcagata	atttccattg	agaactgagc	catgtgcacc	6540
ttccccccaa	cacgggtgagc	gacgggggcaa	cggagtgatc	cacatgggac	ttttaaacat	6600
catccgtcgg	atggcggttc	gagagaagca	gtcgatccgt	gagatcagcc	gacgcaccgg	6660
gcaggcgcg	aacacgatcg	caaagtattt	gaacgcaggt	acaatcgagc	cgacgttcac	6720
ggtaccggaa	cgaccaagca	agctagctta	gtaaaagccct	cgctagattt	taatgcggat	6780
gttgcgatta	cttcgccaac	tattgcgata	acaagaaaaa	gccagccttt	catgatatat	6840
ctcccaattt	gtgtagggct	tattatgcac	gcttaaaaaat	aataaaaagca	gacttgacct	6900
gatagtttgg	ctgtgagcaa	ttatgtgctt	agtgcattct	acgcttgagt	taagccgcgc	6960
cgcgaagcgg	cgctgggctt	aacgaattgt	tagacattat	ttgccgacta	ccttggtgat	7020
ctcgcccttc	acgtagtggg	caaattcttc	caactgatct	gcgcgcgagg	ccaagcgatc	7080
ttcttcttgc	ccaagataag	cctgtctagc	ttcaagtatg	acgggctgat	actgggcccgg	7140
caggcgctcc	attgcccagt	cggcagcgac	atccttcggc	gcgattttgc	cggttactgc	7200
gctgtaccaaa	atgcgggaca	acgtaagcac	tacatttcgc	tcatcgccag	cccagtcggg	7260
cggcgagttc	catagcggtt	aggtttcatt	tagcgcctca	aatagatcct	gttcaggaac	7320
cggatcaaaag	agttcctccg	ccgctggacc	taccaaggca	acgctatgtt	ctcttgcttt	7380
tgtcagcaag	atagccagat	caatgtcgat	cgtggctggc	tcgaagatac	ctgcaagaaat	7440
gtcattgcgc	tgccattctc	caaattgcag	ttcgcgctta	gctggataac	gccacggaat	7500
gatgtcgtcg	tgcacaacaa	tggtgacttc	tacagcgcg	agaatctcgc	tctctccagg	7560
ggaagccgaa	gtttccaaaa	ggtcgttgat	caaagctcgc	cgcgttggtt	catcaagcct	7620
taöggtcacc	gtaaccagca	aatcaatatc	actgtgtggc	ttcaggcccg	catccactgc	7680
ggagccgtac	aaatgtacgg	ccagcaacgt	cggttccgaga	tggcgctcga	tgacgccaac	7740
tacctctgat	agttgagtcg	atacttcggc	gatcaccgct	tccctcatga	tgtttaactt	7800
tgttttaggg	cgactgccct	gctgcgtaac	atcgttgctg	ctccataaca	tcaaacatcg	7860
accacgggcg	taacgcgctt	gctgcttgga	tgcccgaggg	atagactgta	ccccaaaaaa	7920
acagtcataa	caagccatga	aaaccgccac	tgcgcccgtt	ccaccgctgc	gttcgggtcaa	7980
ggttctggac	cagttgcgtg	agcgcatacg	ctacttgcac	tacagcttac	gaaccgaaca	8040
ggcttatgtc	cactgggttc	gtgccttcac	ccgtttccac	ggtgtgcgtc	acccggcaac	8100
cttgggcagc	agcgaagtcg	aggcatttct	gtcctggctg	gcgaacgagc	gcaagggttc	8160
ggtctccacg	catcgtcagg	cattggcggc	cttgcgtgtc	ttctacggca	agtgtgtgtc	8220
acggatctgc	cctggcttca	ggagatcgga	agacctcggc	cgtccggggc	cttgccgggtg	8280
gtgctgacct	cggatgaagt	ctctagagct	ctagagggtt	cgcattcctc	gttttctgga	8340
aggcgagcat	cgtttggttc	cccagcttct	gtatggaacg	ggcatgcgga	tcagtgaagg	8400
tttgcaactg	cgggtcaagg	atctggattt	cgatcacggc	acgatcatcg	tgccggaggg	8460
caagggtccc	aaggatcggg	ccttgatgtt	acccgagagc	ttggcaccca	gcctgcgcga	8520
gcagggatcg	atccaacccc	tccgctgcta	tagtgagtc	ggcttctgac	gttcagtga	8580
gccgtcttct	gaaaacgaca	tgtcgcacaa	gtcctaagtt	acgcgacagg	ctgccgccct	8640
gcccttttcc	tggcggtttt	ttgtcgcgtg	ttttagtcgc	ataaagtaga	atacttgcca	8700
ctagaaccgg	agacattacg	ccatgaacaa	gagcgccgcc	gctggcctgc	tgggctatgc	8760

ccgcgtcagc	accgacgacc	aggacttgac	caaccaabgg	gccgaactgc	acgcggccgg	8820
ctgcaccaag	ctgttttccg	agaagatcad	cggcaccagg	cgcgaccgcc	cggagctggc	8880
caggatgctt	gaccacctac	gccctggoga	cgttgtgaca	gtgaccaggc	tagaccgcct	8940
ggcccgcagc	accgcgacc	tactggacat	tgcogagcgc	atccaggagg	ccggcgcggg	9000
cctgcgtagc	ctggcagagc	cgtgggcca	cagcaccacg	ccggccggcc	gcatggtgtt	9060
gaccgtgttc	gccggcattg	ccgagttcga	gogttcccta	atcatcgacc	gcacccggag	9120
cgggcgcgag	gccgccaagg	cccaggcgt	gaagtgtggc	ccccgcccta	ccctaccccc	9180
ggcacagatc	gcgcacgccc	gcgagctgat	cgaccaggaa	ggocgcaccg	tgaaagaggc	9240
ggctgcactg	cttggcgtgc	atcgctcgac	cctgtaccgc	gcacttgagc	gcagcgagga	9300
agtgcgccc	accgaggcca	ggcggcgcgg	tgccttcogt	gaggacgcac	tgaccgaggc	9360
cgacgccctg	gcggccgcgc	agaatgaacg	ccaagaggaa	caagcatgaa	accgcaccag	9420
gacggccagg	acgaaccgtt	tttcattacc	gaagagatcg	aggcggagab	gatcgcggcc	9480
gggtacgtgt	tcgagccgct	cgcgcacgtc	tcaacgttgc	ggctgcacga	aatcctggcc	9540
ggttttgtctg	atgccaagot	ggcggccgtg	cgggocaggt	tggccgctga	agaaaccgag	9600
cgcgcgcgtc	taaaaagggtg	atgtgtabtt	gagtaaaada	gcttgctca	tgcggtcgtc	9660
gcgtatatga	tgcgatgagt	aaataaaca	atacgcaagg	ggaacgcacg	aaggttatcg	9720
ctgtacttaa	ccagaaaggc	gggtcaggca	agacgaccat	cgcaacccat	ctagcccgcg	9780
ccctgcaact	cgccggggcc	gatgttctgt	tagtcgattc	cgatccccag	ggcagtgcc	9840
gcgattgggc	ggccgtgcgg	gaagatcaac	cgctaaccgt	tgtcggcatc	gaccgcccga	9900
cgattgaccg	cgacgtgaag	gcoatcgggc	ggcgcgactt	cgtagtgatc	gacggagcgc	9960
cccaggcggc	ggaottggct	gtgtccggga	tcaaggcaga	cgacttcgtg	ctgattcogg	10020
tgcagccaag	cccttaogad	abatgggga	cggccgacct	ggtagagctg	gttaagcagc	10080
gcattgaggt	cagcgatgga	aggctacaag	cggcctttgt	cgtgtcgcgg	gcgatcaaag	10140
gcacgcgcac	oggcgggtgag	gttgccggagg	cgttgccggg	gtacgagctg	cccattcttg	10200
agtcccgtat	cacgcagcgc	gtgagctacc	caggcactgc	cgcgcggcgc	aaacccgttc	10260
ttgaatcaga	acccgagggc	gacgctgccc	gcgaggtcca	ggcgtggcc	gctgaaatta	10320
aatcaaaact	catttgagtt	aatgaggtaa	agagaaatg	agcaaaagca	caaacacgct	10380
aagtgcggc	cgtccgagcg	cacgcagcag	caaggctgca	acgttggcga	gcctggcaga	10440
cacgcacgcc	atgaagcggg	tcaactttca	gttgccggcg	gaggatcaca	ccaagctgaa	10500
gatgtacgcg	gtacgccaa	gcaagaccat	gagcagctg	ctatctgaat	acatcgcgca	10560
gctaccagag	taaatgagca	aatgaataaa	tgaatgagtg	aatttttagcg	gctaaaggag	10620
gcggcatgga	aaatcaagaa	caacchggca	cggagcgcgt	ggaatgcccc	atgtgtggag	10680
gaacggggcg	ttggccaggc	gtaagcggct	gggttgtctg	ccggccctgc	aatggcactg	10740
gaacccccaa	gcccagaggaa	tcggcgtgac	gggtggcaaac	catccggccc	ggtacaaatc	10800
ggcgcggcgc	tgggtgatga	cctgggtggg	aagttgaagg	ccgcgcaggc	cgcccagcgg	10860
caacgcacgc	aggcagaagc	acgccccggt	gaatcgtggc	aagcggccgc	tgatcgaaatc	10920
cgcaaagaat	cccggcaacc	gccggcagcc	gggtgcgccgt	cgattaggaa	gccgccaag	10980
ggcgacgagc	aaccagattt	tttcgttccg	atgctctatg	acgtgggcac	ccgcgatagt	11040
cgcagcatca	tggacgtggc	cgttttccgt	ctgtcgaagc	gtgaccgacg	agctggcgag	11100
gtgatccgct	acgagcttcc	agacgggcac	gttagaggtt	ccgcagggcc	ggccggcatg	11160
gccagtgtgt	gggattacga	cctggtactg	atggcgggtt	cccatctaac	cgaatccatg	11220
aaccgatacc	gggaaggga	gggagacaag	cccggccgcg	tgttccgtcc	acacgttgcg	11280
gacgtactca	agttctgccc	gcgagccgat	ggcggaagc	agaaagacga	cctggtagaa	11340
acctgcattc	ggttaaaccac	cacgcacgtt	gccatgcagc	gtacgaagaa	ggccaagaac	11400
ggccgcctgg	tgacggatc	cgaggggtga	gccttgatta	gccgtacaa	gatcgtaaag	11460
agcgaaaccg	ggcggccgga	gtacatcgag	atcgagctag	ctgattggat	gtaccgcgag	11520
atcacagaag	gcaagaaccc	ggacgtgctg	acggttcacc	ccgattactt	tttgatcgat	11580
cccggcatcg	gccgttttct	ctaccgctg	gcacgccgcg	ccgcaggcaa	ggcagaagcc	11640
agatggttgt	tcaagacgat	ctacgaacgc	agtggcagcg	ccggagagtt	caagaagttc	11700
tgtttcaccg	tgcgcaagct	gatcgggtca	aatgacctgc	cggagtacga	tttgaaggag	11760
gaggcggggc	aggctggccc	gatcctagtc	atgcgtacc	gcaacctgat	cgagggcgaa	11820
gcatccgcgc	gttcctaata	tacggagcag	atgctagggc	aaattgccct	agcaggggaa	11880
aaaggctcga	aaggctctctt	tcctgtggat	agcacgtaca	ttgggaaccc	aaagccgtac	11940
attgggaacc	ggaacccgta	cattgggaac	ccaaagccgt	acattgggaa	ccggtcacac	12000
atgtaagtga	ctgatataaa	agagaaaaaa	ggcgattttt	ccgcctaaaa	ctctttaaaa	12060
cttattaaaa	ctcttaaaac	ccgcctggcc	tgtgcataac	tgtctggcca	gcgcacagcc	12120
gaagagctgc	aaaaagcgcc	tacccttcgg	tcgctgcgct	ccctacgccc	cgccgcttcg	12180
cgtcggccta	tcgcggccgc	tggccgctra	aaaatggctg	gcctacggcc	aggcaatcta	12240
ccagggcgcg	gacaagccgc	gccgtcgcca	ctcgaccgcc	ggcgcccaca	tcaaggcacc	12300
ctgcctcgcg	cgttttcggtg	atgacggtga	aaacctctga	cacatgcagc	tcccggagac	12360
ggtcacagct	tgtctgtaag	cggatgccgg	gagcagacaa	gcccgtcagg	gcgcgtcagc	12420

gggtgttggc ggggtgtcggg ggcagccat gaccagtc cgtagcgata gcggagtgt 12480
tactggctta actatg~~c~~ggc atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatgcggtgt 12540
gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggcgctcttc cgcttcctcg 12600
ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc tcactcaaaag 12660
gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa 12720
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc 12780
cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca 12840
ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg 12900
accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct 12960
catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt 13020
gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag 13080
tccaaccogg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc 13140
agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac 13200
actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga 13260
gttggttagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtgggtt ttttgtttgc 13320
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atccggaaaa cgcaagcgca 13380
aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat agctagactg ggcgggtttta 13440
tggaacagcaa gcgaaccgga attgcc 13466

<210> 10
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Consensus sequence 1 of PARC protein
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) (2)
<223> X represents any amino acid

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) (10)
<223> X represents any amino acid

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14) (17)
<223> X represents any amino acid

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19) (19)
<223> X represents any amino acid

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27) (29)
<223> X represents any amino acid

<400> 10
Leu Xaa Val Asp Phe Ala Asn Xaa Xaa Xaa Gly Gly Gly Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Gly Xaa Val Gln Glu Glu Ile Arg Phe Xaa Xaa Xaa Pro Glu
20 25 30

<210> 11
<211> 20
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Consensus sequence 2 for PARG protein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3) (3)

<223> X represents any amino acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10) (10)

<223> X represents any amino acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13) (14)

<223> X represents any amino acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17) (19)

<223> X represents any amino acid

<400> 11

Thr	Gly	Xaa	Trp	Gly	Cys	Gly	Ala	Phe	Xaa	Gly	Asp	Xaa	Xaa	Leu	Lys
1			5						10					15	

Xaa	Xaa	Xaa	Gln
			20

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Consensus sequence 3 for PARG protein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) (4)

<223> X represents any amino acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6) (9)

<223> X represents any amino acid

<400> 12

Asp	Xaa	Xaa	Xaa	Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Ala	Ile	Asp	Ala
1				5					10			

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Consensus sequence 4 for PARG protein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3) (4)
 <223> X represents any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7) (8)
 <223> X represents any amino acid

<400> 13
 Arg Glu Xaa Xaa Lys Ala Xaa Xaa Gly Phe
 1 5 10

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> conserved PARG region
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) (5)
 <223> X represents any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7) (7)
 <223> X represents any amino acid

<400> 14
 Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Tyr Thr Gly Tyr
 1 5 10

<210> 15
 <211> 1530
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) (1530)
 <223>

<400> 15 48
 atg gag gcg cgc ggc gac ctg cgc tcg atc ctg ccc tac ctc ccc gtc
 Met Glu Ala Arg Gly Asp Leu Arg Ser Ile Leu Pro Tyr Leu Pro Val
 1 5 10 15
 gtg ctc cgc ggc ggc gcg ctc ttc tgg ccg ccg gcg gcg cag gag gcg 96
 Val Leu Arg Gly Gly Ala Leu Phe Trp Pro Pro Ala Ala Gln Glu Ala
 20 25 30
 ctc aag gcg ctg gcg ctg ggc ccc gac gtg agc cgc gtc tcc tcc ggc 144
 Leu Lys Ala Leu Ala Leu Gly Pro Asp Val Ser Arg Val Ser Ser Gly
 35 40 45
 gac gtc ctc gcc gac gcc ctc acc gac ctc cgc ctc gcg ctc aac ctc 192
 Asp Val Leu Ala Asp Ala Leu Thr Asp Leu Arg Leu Ala Leu Asn Leu
 50 55 60
 gac cca ctc ccg cgc cgc gcc gcc gag ggc ttc gcg ctc ttc ttc gac 240
 Asp Pro Leu Pro Arg Arg Ala Ala Glu Gly Phe Ala Leu Phe Phe Asp
 65 70 75 80
 gac ctc ctg tcg cgg gcg cag gcg cgg gac tgg ttc gac cac gtc gcc 288
 Asp Leu Leu Ser Arg Ala Gln Ala Arg Asp Trp Phe Asp His Val Ala

										85										90										95																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
ccc	tcc	ctc	gcc	cgc	ctc	ctc	ctc	cgc	ctc	ccc	acg	ctg	ctc	gag	ggc																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		</

ttt ggt gga aac cct gaa atc aag agc atg att caa tgg att gct gca	1296
Phe Gly Gly Asn Pro Glu Ile Lys Ser Met Ile Gln Trp Ile Ala Ala	
420 425 430	
tca cag gca ctc cga tct ttt att aac tac tac act ttt gag tcc gaa	1344
Ser Gln Ala Leu Arg Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Thr Phe Glu Ser Glu	
435 440 445	
tca ctg aaa aga tta gaa gag gtg acc cag tgg ata ttg cgc cat agg	1392
Ser Leu Lys Arg Leu Glu Glu Val Thr Gln Trp Ile Leu Arg His Arg	
450 455 460	
tgg acg gtt ggc gag ttg tgg gac atg ctt gtg gag tat tca tcc cag	1440
Trp Thr Val Gly Glu Leu Trp Asp Met Leu Val Glu Tyr Ser Ser Gln	
465 470 475 480	
agg cta aga gga gac acc aat gag ggc ttt tta aca tgg cta ctt ccc	1488
Arg Leu Arg Gly Asp Thr Asn Glu Gly Phe Leu Thr Trp Leu Leu Pro	
485 490 495	
aag gac atc ccc aat ggt gat gta gat tac atg tgt gaa tag	1530
Lys Asp Ile Pro Asn Gly Asp Val Asp Tyr Met Cys Glu	
500 505	

<210> 16
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 16
 Met Glu Ala Arg Gly Asp Leu Arg Ser Ile Leu Pro Tyr Leu Pro Val
 1 5 10 15

Val Leu Arg Gly Gly Ala Leu Phe Trp Pro Pro Ala Ala Gln Glu Ala
 20 25 30

Leu Lys Ala Leu Ala Leu Gly Pro Asp Val Ser Arg Val Ser Ser Gly
 35 40 45

Asp Val Leu Ala Asp Ala Leu Thr Asp Leu Arg Leu Ala Leu Asn Leu
 50 55 60

Asp Pro Leu Pro Arg Arg Ala Ala Glu Gly Phe Ala Leu Phe Phe Asp
 65 70 75 80

Asp Leu Leu Ser Arg Ala Gln Ala Arg Asp Trp Phe Asp His Val Ala
 85 90 95

Pro Ser Leu Ala Arg Leu Leu Leu Arg Leu Pro Thr Leu Leu Glu Gly
 100 105 110

His Tyr Arg Ala Ala Gly Asp Glu Ala Arg Gly Leu Arg Ile Leu Ser
 115 120 125

Ser Gln Asp Ala Gly Leu Val Leu Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ala Ala
 130 135 140

Leu Leu Ala Cys Ala Leu Phe Cys Leu Phe Pro Thr Ala Asp Arg Ala
 145 150 155 160

Glu Ala Cys Leu Pro Ala Ile Asn Phe Asp Ser Leu Phe Ala Ala Leu
 165 170 175

Cys Tyr Asn Ser Arg Gln Ser Gln Glu Gln Lys Val Arg Cys Leu Val
 180 185 190

His Tyr Phe Asp Arg Val Thr Ala Ser Thr Pro Thr Gly Ser Val Ser
195 200 205

Phe Glu Arg Lys Val Leu Pro Arg Arg Pro Glu Ser Asp Gly Ile Thr
210 215 220

Tyr Pro Asp Met Asp Thr Trp Met Lys Ser Gly Val Pro Leu Cys Thr
225 230 235 240

Phe Arg Val Phe Ser Ser Gly Leu Ile Glu Asp Glu Glu Gln Glu Ala
245 250 255

Leu Glu Val Asp Phe Ala Asn Arg Tyr Leu Gly Gly Gly Ala Leu Ser
260 265 270

Arg Gly Cys Val Gln Glu Glu Ile Arg Phe Met Ile Asn Pro Glu Leu
275 280 285

Ile Val Gly Met Leu Phe Met Val Ser Met Glu Asp Asn Glu Ala Ile
290 295 300

Glu Ile Val Gly Ala Glu Arg Phe Ser Gln Tyr Met Gly Tyr Gly Ser
305 310 315 320

Ser Phe Arg Phe Thr Gly Asp Tyr Leu Asp Ser Lys Pro Phe Asp Ala
325 330 335

Met Gly Arg Arg Lys Thr Arg Ile Val Ala Ile Asp Ala Leu Asp Cys
340 345 350

Pro Thr Arg Leu Gln Phe Glu Ser Ser Gly Leu Leu Arg Glu Val Asn
355 360 365

Lys Ala Phe Cys Gly Phe Leu Asp Gln Ser Asn His Gln Leu Cys Ala
370 375 380

Lys Leu Val Gln Asp Leu Asn Thr Lys Asp Asn Cys Pro Ser Val Ile
385 390 395 400

Pro Asp Glu Cys Ile Gly Val Ser Thr Gly Asn Trp Gly Cys Gly Ala
405 410 415

Phe Gly Gly Asn Pro Glu Ile Lys Ser Met Ile Gln Trp Ile Ala Ala
420 425 430

Ser Gln Ala Leu Arg Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Thr Phe Glu Ser Glu
435 440 445

Ser Leu Lys Arg Leu Glu Glu Val Thr Gln Trp Ile Leu Arg His Arg
450 455 460

Trp Thr Val Gly Glu Leu Trp Asp Met Leu Val Glu Tyr Ser Ser Gln
465 470 475 480

Arg Leu Arg Gly Asp Thr Asn Glu Gly Phe Leu Thr Trp Leu Leu Pro
485 490 495

Lys Asp Ile Pro Asn Gly Asp Val Asp Tyr Met Cys Glu
500 505

<210> 17

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> degenerate oligonucleotide primer PG1
 <400> 17
 atgtbccaca rmtckccrac mgtcc 25

<210> 18
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> degenerate oligonucleotide primer PG2
 <400> 18
 gggtytccwc caaaaarcgcc rcawcccc 28

<210> 19
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> degenerate oligonucleotide primer PG3
 <400> 19
 gctatagaaa twgtyggtyg rgaaag 26

<210> 20
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> degenerate oligonucleotide primer PG4
 <400> 20
 agrggstggyg trcaggarga ratmcg 26

<210> 21
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> degenerate oligonucleotide primer PG5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18) (18)
 <223> n=any nucleotide

<400> 21
 atggargaya aygargcnat hga 23

<210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> degenerate oligonucleotide primer PG6

```

<400> 22                                     24
ccaytgdagc atrctyTtda gytc

<210> 23
<211> 603
<212> DNA
<213> zea mays

<400> 23
tagggctgtg tgcaggagga aatccgcttc atgataaacc ccgaattgat tgtgggtatg      60
ctattcttgt cttgtatgga agataacgag gctatagaaa tctttggtgc agaacgggtc      120
tcacagtata tgggttatgg ttctctcttt cgctttgttg gtgactattt agataccaaa      180
ccctttgatt cgatgggcag acggagaact aggattgtgg ctatcgatgc tttggactgt      240
ccagctaggt tacactatga atctggctgt ctccaaaggg aagtgaacaa ggcattttgt      300
ggatttttcg atcaatcgaa acaccatctc tatgcgaagc tttccagga tttgcacaac      360
aaggatgact tttcaagcat caattccagt gagtacgtag gagtttcaac aggaaactgg      420
ggttgtggtg cttttggtgg aaaccctgaa atcaagagca tgattcagtg gattgctgca      480
tcacaggctc ttccgccctt tgtaattac tacacttttg agaacgtgtc tctgcaaaga      540
ttagaggagg tgatccagtg gatacggctt catggctgga ctgtcggcga gctgtggaac      603
ata

/
<210> 24
<211> 12987
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> T DNA vector comprising a chimeric ParG expression reducing gene
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (25)
<223> complement of Left T DNA border

<220>
<221> misc_feature
<222> (58) (318)
<223> complement of 3 nos

<220>
<221> misc_feature
<222> (337) (888)
<223> bar coding region

<220>
<221> misc_feature
<222> (889) (1721)
<223> 35S promoter

<220>
<221> misc_feature
<222> (1728) (3123)
<223> 35S promoter

<220>
<221> misc_feature
<222> (3133) (3311)
<223> part of ParG homologue of Zea mays

<220>
<221> misc_feature
<222> (3344) (4085)

```

<223> Pdk intron_

<220>

<221> misc_feature

<222> (4119) (4297)

<223> part of ParG homologue of Zea mays (inverted)

<220>

<221> misc_feature

<222> (4310) (5020)

<223> 3 OCS

<220>

<221> misc_feature

<222> (5066) (5042)

<223> Right T DNA border

<400> 24

cggcaggata	tattcaattg	taaatggctc	catggcgatc	gctctagagg	atcttcccga	60
tctagtaaca	tagatgacac	cgcgcgcgat	aatttatcct	agtttgcgcg	ctatattttg	120
ttttctatcg	cgtattaaat	gtataattgc	gggactctaa	tcataaaaac	ccatctcata	180
aataacgtca	tgcattacat	gttaattatt	acatgcttaa	cgtaattcaa	cagaaattat	240
atgataatca	tcgcaagacc	ggcaacagga	ttcaatctta	agaaacttta	ttgccaaatg	300
tttgaacgat	ctgcttcgga	tcctagacgc	gtgagatcag	atctcgggtga	cgggcaggac	360
cggacggggc	ggtaccggca	ggctgaagtc	cagctgccag	aaaccacagt	catgccagtt	420
cccgtgcttg	aagccggccg	cccgcagcat	gccgcggggg	gcataatccga	gcgcctcgtg	480
catgcgcacg	ctcgggtcgt	tgggcagccc	gatgacagcg	accacgctct	tgaagccctg	540
tgctccagg	gacttcagca	ggtgggtgta	gagcgtggag	cccagtcctg	tccgctgggtg	600
gcggggggag	acgtacacgg	tcgactcggc	cgtccagtcg	taggcgttgc	gtgccttcca	660
ggggcccgcg	taggcgatgc	cggcgacctc	gccgtccacc	tcggcgacga	gccagggata	720
gcgctccgcg	agacggacga	ggtcgtccgt	ccactcctgc	ggttcctgcg	gctcggtagc	780
gaagttgacc	gtgcttgtct	cgatgtagtg	gttgacgatg	gtgcagaccg	ccggcatgtc	840
cgcctcggtg	gcacggcgga	tgtcggccgg	gcgtcgttct	gggtccatgg	ttatagagag	900
agagatagat	ttatagagag	agactggtga	tttcagcgtg	tcctctccaa	atgaaatgaa	960
cttccttata	tagaggaagg	gtcttgcgaa	ggatagtggg	attgtgcgtc	atcccttacg	1020
tcagtggaga	tgtcacatca	atccaactgc	tttgaagacg	tggttggaac	gtcttctttt	1080
tccacgatgc	tcctcgtggg	tgggggtcca	tctttgggac	cactgtcggc	agaggcatct	1140
tgaatgatag	cctttccttt	atcgcaatga	tggcatttgt	aggagccacc	ttccttttct	1200
actgtccttt	cgatgaagtg	acagatagct	gggcaatgga	atccgaggag	gtttcccga	1260
attatccttt	gttgaaaagt	ctcaatagcc	ctttggtctt	ctgagactgt	atctttgaca	1320
tttttgagtg	agaccagagt	gtcgtgctcc	accatgttga	cgaagatttt	cttcttgta	1380
ttgagtcgta	aaagactctg	tatgaactgt	tcgccagtct	tcacggcgag	ttctgttaga	1440
tcctcgattt	gaatcttaga	ctccatgcat	ggccttagat	tcagtaggaa	ctaccttttt	1500
agagactcca	atctctatta	cttgcccttg	tttatgaagc	aagccttgaa	tcgtccatac	1560
tggaatagta	cttctgatct	tgagaaatat	gtctttctct	gtgttcttga	tgcaattagt	1620
cctgaatcct	ttgactgcat	ctttaacctt	cttgggaagg	tatttgatct	cctggagatt	1680
gttactcggg	tagatcgtct	tgatgagacc	tgctgcgtag	gaacgcggcc	gcgtatacgt	1740
atcgatatct	tcgaattcga	gctcgtcgag	cggccgctcg	acgaattaat	tccaatccca	1800
caaaaatctg	agcttaacag	cacagttgct	cctctcagag	cagaatcggg	tattcaacac	1860
cctcatatca	actactacgt	tgtgtataac	ggtccacatg	ccggtatata	cgatgactgg	1920
ggttgtaaca	aggcggcaac	aaacggcggt	cccggagttg	cacacaagaa	atttgccact	1980
attacagagg	caagagcagc	agctgacgcg	tacacaacaa	gtcagcaaac	agacagggtg	2040
aacttcatcc	ccaaaggaga	agctcaactc	aagcccaaga	gctttgctaa	ggccctaaca	2100
agcccaccaa	agcaaaaagc	ccactggctc	acgctaggaa	ccaaaaggcc	cagcagtgat	2160
ccagcccca	aagagatctc	ctttgccccg	gagattacaa	tggaacgattt	cctctatctt	2220
tacgatctag	gaagggaagt	cgaagggtgaa	ggtgacgaca	ctatgttcac	cactgataat	2280
gagaagggtta	gcctcttcaa	tttcagaaaag	aatgctgacc	cacagatggg	tagagaggcc	2340
tacgcagcag	gtctcatcaa	gacgatctac	ccgagtaaca	atctccagga	gatcaaatac	2400
cttcccaaga	aggttaaaga	tgcagtcaaa	agattcagga	ctaattgcat	caagaacaca	2460
gagaaagaca	tatttctcaa	gatcagaagt	actattccag	tatggacgat	tcaaggcttg	2520
cttcataaac	caaggcaagt	aatagagatt	ggagtctcta	aaaaggtagt	tcctactgaa	2580

tctaaggcca	tgcattggagt	ctaagattca	aatcgaggat	ctaacagaac	tgcctgtgaa	2640
gactggcgaa	cagttcatac	agagtotttt	acgactcaat	gacaagaaga	aaatcttcgt	2700
caacatggtg	gagcacgaca	ctctggtota	ctccaaaaat	gtcaaagata	cagtctcaga	2760
agaccaaaag	gctattgaga	cttttcaaca	aaggataatt	tgggaaacc	tcctcggatt	2820
ccattgcca	gctatctgtc	acttcatcga	aaggacagta	gaaaaggaag	gtggctccta	2880
caaatgccat	cattgcgata	aaggaaaggc	tattcatttaa	gatctctctg	ccgacagtgg	2940
tcccaaagat	ggacccccac	ccacgaggag	ctctgtggaa	aaagaagacg	ttccaaccac	3000
gtcttcaaag	caagtggatt	gatgtgacat	ctccactgac	gtaagggatg	acgcacaatc	3060
ccactatcct	tgcgaagacc	cttctcttat	ataaggaagt	tcatttcatt	tggagaggac	3120
acgctcgagc	ccgaattgat	tgtgggtatg	ctattcttgt	cttgtatgga	agataacgag	3180
gctatagaaa	tctttggtgc	agaacgggtg	tcacagtata	tgggttatgg	ttcctccttt	3240
cgctttgttg	gtgactattt	agatacdaaa	ccotttgatt	cgatgggag	acggagaact	3300
aggattgtgg	cggtaaccca	gcttggtaag	gaataatta	ttttottttt	tccttttagt	3360
ataaaaatagt	taagtgatgt	tatttggat	gattatata	atatagbtgt	tataattgtg	3420
aaaaataaat	ttataaatat	attgtttaca	baaaacaacat	agtaatgtaa	aaaaatatga	3480
caagtgatgt	gtaagacgaa	gaagataaaa	ggtgagagta	agtatatatt	ttttaatgaa	3540
tttgatcgaa	catgtaagat	gatatactag	cattaatatt	tgttttaatc	ataatagtaa	3600
ttctagctgg	tttgatgaat	taaatatcaa	tgataaaaata	ctatagtaaa	aataagaata	3660
aataaattaa	aataatattt	ttttatgatt	natagtttat	tatataatta	aatatctata	3720
ccattactaa	atatttttagt	ttanaagtta	ataatattt	tgttagaaat	tccaatctgc	3780
ttgtaattta	tcaataaaca	aaabattttaa	taacaagcta	aagtaacaaa	taatatcaaa	3840
ctaatagaaa	cagtaatcta	atgbaaaaa	apapaatota	atgctaatat	aacaaagcgc	3900
aagatctatc	attttatata	gtattatttt	caatcaaat	tcttattaat	ttctaataaa	3960
tacttgtagt	tttattaact	tctaatggga	ttgaatatta	attaaatgaa	ttagtgcgaac	4020
atgaataaac	aaggtaacat	gatagatcat	gttaattgtg	tatcattgat	ottacatttg	4080
gattgattac	agttgggaag	ctgggttcga	aatcgatagc	cacaatcota	gttctccgtc	4140
tgcccatcga	atcaaagggg	ttggtatcta	aataagcaac	aacaaagoga	aaggaggaac	4200
cataacccat	atactgtgag	aaacgttctg	taaaagagat	ttctatagcc	tcggtatctt	4260
ccatacaaga	caagaatagc	atacccaaaa	taattccggg	tctagagtc	tgctttaatg	4320
agatatgcga	gacgcctatg	atcgatgat	atgtgcttcc	aattctgttg	tgacggttg	4380
aaaaaacctg	agcatgtgta	gctcagatcc	ttatggcggg	tttcggttca	ttctaataaa	4440
tatatcacc	gttactatcg	tattttatg	ataaatattc	tcggttcaat	ttactgattg	4500
taccctacta	cttatatgta	caatattaaa	atgaaaacaa	tatattgtgc	tgaatagggt	4560
tatagcgaca	tctatgatag	agcgccacaa	taacaaacaa	ttgcgtttta	ttattacaaa	4620
tccaatttta	aaaaaagcgg	cagaaocggg	caaacctaaa	agactgatta	cataaatctt	4680
attcaaattt	caaaagggcc	caggggctag	tatctacgac	acaccgagcg	gcgaactaat	4740
aacgttccat	gaaggggaact	ccggttcccc	gpcggcgccg	atgggtgaga	ttccttgaa	4800
ttgagtattg	gccgtccgct	ctaccgaaag	ttacgggdac	cattcaacc	ggtccagcac	4860
ggcgggccggg	taaccgactt	gctgcccaga	gaattatgca	gcattttttt	ggtgtatgtg	4920
ggccccaat	gaagtgcagg	tcaaaccttg	agagtgcga	caaatcgttg	ggcgggtcca	4980
ggcggaattt	tgcgacaaca	tgtogaggct	cagcaggacc	tgcaggtcga	cggccgagta	5040
ctggcaggat	atataccggt	gtaatttgct	gcgtgtgaat	aagtcgctgt	gtatgtttgt	5100
ttgattgttt	ctggtggagt	gcagcccat	tcaccggaca	agtcggctag	attgatttag	5160
ccctgatgaa	ctgccgaggg	gaagccatct	tgagcgcgga	atgggaatgg	atttcgttgt	5220
acaacgagac	gacagaacac	ccacgggacc	gagcttcgat	cgagcatcaa	atgaaactgc	5280
aattttattca	tatcaggatt	atcaatacca	tatttttgaa	aaagccggtt	ctgtaatgaa	5340
ggagaaaact	caccgaggca	gttccatagg	atggcaagat	cctgggtatcg	gtctgcgatt	5400
ccgactcgtc	caacatcaat	acaacctatl	aatttccctt	cgtcaaaaat	aaggttatca	5460
agtgagaaat	caccatgagt	gacgactgaa	tccggtgaga	atggcaaaa	tttatgcatt	5520
tctttccaga	cttgttcaac	aggccagcca	ttacgctcgt	catcaaaatc	actcgcatca	5580
accaaaccgt	tattcattcg	tgattgcgcc	tgagcgagac	gaaatacgcc	gctgttaaaa	5640
ggacaattac	aaacaggaat	cgaatgcaac	cggcgagga	acactgccag	cgcatcaaca	5700
atattttcac	ctgaatcagg	ataattctct	aatacctgga	atgctgtttt	tccggggatc	5760
gcagtggatg	gtaaccatgc	atcatcagga	gtacggataa	aatgcttgat	ggtcggaaga	5820
ggcataaatt	ccgtcagcca	gtttagtctg	accatctcat	ctgtaacatc	attggcaacg	5880
ctacctttgc	catgtttcag	aaacaactct	ggcgcatcgg	gcttcccata	caatcgatag	5940
attgtcgcac	ctgattgccc	gacattatcc	gaatctggca	attccggttc	gcttgctgtc	6000
cataaaaccg	cccagcttag	ctatcgccat	gtaagcccac	tgcaagctac	ctgctttctc	6060
tttgcgcttg	cgttttccgg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcgcgt	aatctgctgc	6120
ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttgtt	tgccggatca	agagctacca	6180
actctttttc	cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgacga	taccaaatat	tgtccttcta	6240

gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	cacgcctac	atacctcgct	6300
ctgctaattc	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	taccggggtg	6360
gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	gggttcgtgc	6420
acacagccca	gcttgagcg	aacgacctac	accgaactga	gatacctaca	gcgtgagcta	6480
tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	aagcggcagg	6540
gtcggaaacag	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	tctttatagt	6600
cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgtcgatttt	tgtgatgctc	gtcagggggg	6660
cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	cttttgctgg	6720
ccttttgctc	acatgttctt	tcctgcgtta	tcccttgatt	ctgtggataa	ccgtattacc	6780
gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	agccgaacga	ccgagcgag	cgagtcagtg	6840
agcgaggaag	cggaagagcg	cctgatgcgg	tattttctcc	ttacgcatct	gtgcgggtatt	6900
tcacaccgca	tatggtgcac	tctcagtaca	atctgctctg	atgccgcata	gttaagccag	6960
tatacactcc	gctatcgcta	cgtagctggg	tcatggctgc	gccccgacac	ccgccaacac	7020
ccgctgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcccggcac	cgcttacaga	caagctgtga	7080
ccgtctccgg	gagctgcatg	tgtcagaggt	tttcaccgctc	atcaccgaaa	cgcgcgaggc	7140
aggggtgcctt	gatgtgggcg	ccggcggtcg	agtggcgagc	gcgcggttg	tccgcgccct	7200
ggtagattgc	ctggccgtag	gccagccatt	tttgagcggc	cagcgccgc	gataggccga	7260
cgcgaaagcg	cggggcgtag	ggagcgcagc	gaccgaagg	taggcgcttt	ttgcagctct	7320
tcggctgtgc	gctggccaga	cagttatgca	caggccaggc	gggttttaag	agttttaata	7380
agttttaaag	agtttttaggc	ggaaaaaatcg	ccttttttct	cttttatatc	agtcacttac	7440
atgtgtgacc	ggttcccaat	gtacggcttt	gggttcccaa	tgtacgggtt	ccggttccca	7500
atgtacggct	ttgggttccc	aatgtacgtg	ctatccacag	gaaagagacc	ttttcgacct	7560
ttttcccctg	ctagggcaat	ttgccctagc	atctgctccg	tacattagga	accggcggtat	7620
gcttcgccct	cgatcagggt	gcggtagcgc	atgactagga	tcggggccagc	ctgccccgcc	7680
tcctccttca	aatcgtaact	cggcaggtea	tttgaccgga	tcagcttgcg	cacggtgaaa	7740
cagaacttct	tgaactctcc	ggcgtgcca	ctgcgttcgt	agatcgctct	gaacaacat	7800
ctggcttctg	ccttgctgc	ggcgcgcggt	gccaggcggt	agagaaaacg	gccgatgccg	7860
ggatcgatca	aaaagtaatc	ggggtgaacc	gtcagcacgt	ccgggttctt	gccttctgtg	7920
atctcgcggt	acatccaatc	agctagctcg	atctcgatgt	actccggccg	cccggtttcg	7980
ctctttacga	tcttgtagcg	gctaatacaag	gcttcacctt	cggataaccgt	caccaggcgg	8040
ccgttcttgg	ccttcttcgt	acgctgcatg	gcaacgtgcg	tggtgtttaa	ccgaatgcag	8100
gtttctacca	ggctgctctt	ctgctttccg	ccatcggtct	gccggcagaa	cttgagtacg	8160
tcgcgaacgt	gtggacggaa	cacgcggccg	ggcttgtctc	ccttcccttc	ccggtatcgg	8220
ttcatggatt	cgggttagatg	ggaaaaccgc	atcagtacca	ggtcgtaatc	ccacacactg	8280
gccatgccgg	ccggccctgc	ggaaaacctct	acgtgcccgt	ctggaagctc	gtagcggatc	8340
acctcgccag	ctcgtcggtc	acgtctcgac	agacggaaaa	cggccacgtc	catgatgctg	8400
cgactatcgc	gggtgcccac	gtcatagagc	atcggaacga	aaaaatctgg	ttgctcgctg	8460
cccttgggcg	gcttcctaatt	cgacggcgca	ccggctgccc	gcggttgccc	ggattctttg	8520
cggattcgat	cagcggccgc	ttgccacgat	tcaccggggc	gtgcttctgc	ctcgatgcgt	8580
tgccgctggg	cggcctgcgc	ggcettcaac	ttctccacca	ggtcataacc	cagcgccgcg	8640
ccgatttgta	ccgggcccga	tggtttgcga	ccgtcacgcc	gattcctcgg	gcttgggggt	8700
tccagtgcc	ttgcagggcc	ggcagacaac	ccagccgctt	acgcctggcc	aaccgcccgt	8760
tcctccacac	atggggcatt	ccacggcgctc	ggcgctgggt	tgcttctgat	tttccatgcc	8820
gcctccttta	gccgctaata	ttcatctact	catttattca	tttgctcatt	tactctggta	8880
gctgcgcgat	gtattcgat	agcagctcgg	taatggctct	gccttggcgt	accgcgtaca	8940
tcttcagctt	ggtgtgatcc	tccgccggca	actgaaagtt	gacccgcttc	atggctggcg	9000
tgtctgccag	gctggccaac	gttgacgctt	tgctgctgcg	tgcgctcgga	cggccggcac	9060
ttagcgtggt	tgtgcttttg	ctcattttct	ctttacctca	ttaaactcaaa	tgagttttga	9120
tttaatttca	gcggccagcg	cctggacctc	gcgggcagcg	tcgccctcgg	gttctgattc	9180
aagaacgggt	gtgccggcg	cggcagtgcc	tgggtagctc	acgcgctgcg	tgatacggga	9240
ctcaagaatg	ggcagctcgt	acccggccag	cgcctcggca	acctcaccgc	cgatgcgcgt	9300
gcctttgate	gcccgcgaca	cgacaaaggc	cgcttgtagc	cttccatccg	tgacctcaat	9360
gcgctgctta	accagctcca	ccaggtcggc	ggtagcccat	atgtcgtaag	ggcttggctg	9420
caccggaatc	agcacgaagt	cggctgcctt	gatcgcgga	acagccaagt	ccgccgcctg	9480
gggcgctccg	tcgatcacta	cgaagtgcgc	ccggccgatg	gccttcacgt	cgcgggtcaat	9540
cgctcgggcg	tcgatgccga	caacgggttag	cggttgatct	tccgcacgg	ccgccaatc	9600
gcgggcaactg	ccctggggat	cggaatcgac	taacagaaca	tcggccccgg	cgagttgcag	9660
ggcgcgggct	agatggggtg	cgatggctgt	cttgccctgac	ccgcctttct	ggttaagtac	9720
agcgataacc	ttcatgcgtt	ccccttgctg	atttgtttat	ttactcatcg	catcatatac	9780
gcagcgaccg	catgacgcaa	gctgttttac	tcaaatacac	atcacctttt	tagacggcgg	9840
cgctcgggtt	cttcagcggc	caagctggcc	ggccaggccg	ccagcttggc	atcacacaaa	9900

```

ccggccagga tttcatgcag ccgcacgggt gagacgtgcg cgggcggctc gaacacgtac 9960
ccggcccgga tcatctccgc ctcgatctct tggtaatga aaaacgggtc gtcctggccg 10020
tcttgggtg gtttcatgct tggtctctct ggcgttcatt ctggcgggcc gccagggcgt 10080
cggcctcgg caatgcgtcc tcacggaagg caccgcgcg cctggcctcg gtgggcgtca 10140
cttctctgct gcgtcaagt gcgcggtaca gggtcgagcg atgcacgcca agcagtgcag 10200
ccgcctcttt cacgggtgcg ccttcctggt cgatcagctc gcgggcgtgc gcgatctgtg 10260
ccgggggtgag ggtagggcg gggccaaact tcacgcctcg ggccttggcg gcctcgcgcc 10320
cgctccgggt gcggtcgatg attagggaa gctcgaactc ggcaatgccg gcgaacacgg 10380
tcaacacccat gcggccggcc ggcgtggtgg tgtcgggcca cggctctgcc aggttacgca 10440
ggcccgcgcc ggcctcctgg atgcgctcgg caatgtccag taggtcgcg gtgctgcggg 10500
ccaggcggtc tagcctggtc actgtcaca cgtcgccagg gcgtaggtgg tcaagcatcc 10560
tggccagctc cgggcggctc gcctggtgc cgggtgattt ctcggaaaac agcttgggtg 10620
agccggcgcg gtgcagttcg gccggttggg tggtaagtc ctggctcgct gtgctgacgc 10680
gggcatagcc cagcaggcca gcggcgcgcg tcttgttcat ggcgtaatgt ctccggttct 10740
agtcgcaagt attctacttt atgcgactaa aacacgcgac aagaaaacgc caggaaaagg 10800
gcaggcgggc agcctgtcgc gtaacttagg acttgtgcga catgtcgttt tcagaagacg 10860
gctgcactga acgtcagaag ccgactgcac tatagcagcg gaggggttg atcgatccct 10920
gctcgcgag gctgggtgcc aagctctcgg gtaacatcaa ggcccgatcc ttggagccct 10980
tgccctcccg cacgatgatc gtgccgtgat cgaatatccag atccttgacc cgcagttgca 11040
aaccctcact gatccgcatg cccgttccat acagaagctg ggcgaacaaa cgatgctcgc 11100
cttcagaaa accgaggatg cgaaccactt catccggggg cagcaccacc ggcaagcgcc 11160
cggacggccg aggtcttccg atctcctgaa gccagggcag atccgtgcac agcacttgcc 11220
gtagaagaac agcaaggccg ccaatgcctg acgatgcgtg gagaccgaaa ccttgcgctc 11280
gttcgccagc caggacagaa atgcctcgac ttcgctgctg cccaagggtg ccgggtgacg 11340
cacaccgtgg aaacggatga aggcacgaac ccagtggaca taagcctgtt ccgaacgcag 11400
gctgtaatgc aagtagcgta tgcgtcacg caactggtcc agaaccctga ccgaacgcag 11460
cggtggtaac ggcgagtggt cggttttcat ggcttgttat gactgttttt ttggggtaca 11520
gtctatgctt cgggcatcca agcagcaagc gcgttacgcc gtgggtcgat gtttgatgtt 11580
atggagcagc aacgatgtta cgcagcagg cagtcgacct aaaacaaagt taaacatcat 11640
gagggaaagc gtgatcgccg aagtatcgac tgcgtggcgt acatttgtac ggctccgcag tggatggcg 11700
gcgccatctc gaaccgacgt tgctggcgtt gggtacgggt accgtaaggc ttgatgaaac 11760
cctgaagcca cacagtgata ttgatttgct ggtaacttcg gcttccctcg gagagagcga 11820
aacgcggcga gctttgatca acgacctttt ggtgcacgac gacatcattc cgtggcggtt 11880
gattctccgc gctgtagaag tcaccattgt tggtagcgac aatgacattc ttgcaggtat 11940
tccagctaa ggcgaactgc aatttgaga atggcagcgc ctgacaaaag caagagaaca 12000
cttcgagcca gccacgatc acattgatct ggctatcttg gatccgggtc ctgaacagga 12060
tagcgttgcc ttggtaggtc cagcggcgga ggaactcttt gctatggaac tcgcccggcg actgggctgg 12120
tctatttgag gcgctaaatg aaaccttaac cgcatttggt tacagcgag cgcctgccgg cccagtatca 12180
cgatgagcga aatgtagtgc ttacgttggt ggcaatggag cgcctgccgg cccagtatca 12240
aatcgcgccg aaggatgtcg ctgccgactg ggcattggag gaagaagatc gcttggcctc 12300
gcccgtcata cttgaagcta gacaggctta tcttggaaca ggcgagatca ccaaggtagt 12360
gcgcgcagat cagttggaag aatttgtcca ctacgtgaaa ggcgagatca ccaaggtagt 12420
cggcaataaa tgtctaacaa ttcgttcaag ccgacgccgc ttcgcgcgcc ggcttaactc 12480
aagcggttaga tgcactaagc acataattgc tcacagccaa actatcaggt caagtctgct 12540
tttattattt ttaagcgtgc ataataagcc ctacacaaat tgggagatat atcatgaaag 12600
gctggctttt tcttggtatc gcaatagttg gcgaagtaat cgcaacatcc gcattaaaat 12660
ctagcgaggg ctttactaag ctagcttgct tggctgttcc ggtaccgtga acgtcggtc 12720
gattgtacct gcgttcaaat actttgcgat cgtgttgccg gcctgcccg tgcgtcggt 12780
gatctcacgg atcgactgct tctctcgcaa cgccatccga cggatgatgt ttaaaagtc 12840
catgtggatc actccgttgc cccgtcgctc accgtgttgg ggggaagggt cacatggctc 12900
agttctcaat ggaaattatc tgcctaaccg gctcagttct gcgtagaaac caacatgcaa 12960
gctccaccgg gtgcaaagcg gcagcgg 12987

```

<210> 25

<211> 13226

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> T DNA vector comprising a chimeric ParG expression reducing gene

<220>

ggggcccgcg	taggcgatgc	cggcgacctc	gccgtccacc	tcggcgacga	gccagggata	720
gcgctcccg	agacggagca	ggtcgtccgt	ccactcctgc	ggttcctgcg	gctcggtaag	780
gaagttgacc	gtgcttgtct	cgatgtagtg	gttgacgatg	gtgcagaccg	ccggcatgtc	840
cgctcgggtg	gcacggcgga	tgtcggccgg	gcgtcgttct	gggtccatgg	ttatagagag	900
agagatagat	ttatagagag	agactgggtga	tttcagcgtg	tcctctccaa	atgaaatgaa	960
cttccttata	tagaggaagg	gtcttgcgaa	ggatagtggt	attgtgcgtc	atcccttacg	1020
tcagtggaga	tgtcacatca	atccacttgc	tttgaagacg	tggttggaac	gtcttctttt	1080
tccacgatgc	tcctcgtggg	tgggggtcca	tccttgggac	cactgtcggc	agaggcatct	1140
tgaatgatag	cctttccttt	atcgcaatga	tggcatttgt	aggagccacc	ttccttttct	1200
actgtccttt	cgatgaagtg	acagatagct	gggcaatgga	atccgaggag	gtttcccgaa	1260
attatccttt	gttgaaaagt	ctcaatagcc	ccttgggtctt	ctgagactgt	atcctttgaca	1320
tttttggagt	agaccagagt	gtcgtgctcc	accatgttga	cgaagatttt	cttcttgtca	1380
ttgagtcgta	aaagactctg	tatgaactgt	tcgccagtct	tcacggcgag	ttctgttaga	1440
tcctcgtatt	gaatcttaga	ctccatgcat	ggccttagat	tcagttaggaa	ctaccttttt	1500
agagactcca	atctctatta	cttgccttgg	tttatgaagc	aagccttgaa	tcgtccatac	1560
tggaatagta	cttctgatct	tgagaaatat	gtctttctct	gtgttcttga	tgcaattagt	1620
cctgaatctt	ttgactgcat	ctttaacctt	cttgggaagg	tatttgatct	cctggagatt	1680
gttactcggg	tagatcgtct	tgatgagacc	tgctgcgtag	gaacgcggcc	gcgtatacgt	1740
atcgatatct	tcgaattcga	gctcgtcgag	cggccgctcg	adgaattaat	tccaatccaa	1800
caaaaatctg	agcttaacag	cacagttgct	cctctdagag	cagaatcggg	tattcaadac	1860
cctcatatca	actactagct	tgtgtataac	gggtccatag	ccgggtatata	cgatgactgg	1920
gggtgtgaga	aggcggcaac	aaacggcggt	ccgggggttg	ccacacagaa	atttgccact	1980
attacagagg	caagagtcagc	agctgacgcg	tacacacaaa	gtcagcaaac	agacaggttg	2040
aaactcatcc	ccaaaggaga	agctcaactc	aagcccaaga	gctttgctaa	ggccctaaca	2100
agcccaccaa	agcaaaaago	ccactggctc	acgctaggaa	ccaaaaggcc	cagcagtgat	2160
ccagcccca	aagagatctc	ctttgccccg	gagattacaa	fggacgattt	cctctatott	2220
tacgatctag	gaaggaagtt	cgaagggtga	ggtagcgaca	ctatgttcac	cactgataat	2280
gagaagggtta	gcctcttcaa	tttcagaaag	aatgctgacc	cacagatggt	tagagaggcc	2340
tacgcagcag	gtctcatcaa	gacgatctac	ccgagtaaca	atctccagga	gatcaaatat	2400
cttccaaga	aggttaaa	tgacgtcaaa	agattccagga	ctaattgcat	caagaacaca	2460
gagaaagaca	tattttctaa	gatcagaagt	actattccag	tatggacgat	tcaaggcttg	2520
cttcataaac	caaggcaagt	aatagagatt	ggagtctcta	aaaaggtagt	tcctactgaa	2580
tctaaggcca	tgcatggagt	ctaagattca	aatcgaggat	ctaacagaac	tcgccgtgaa	2640
gactggcgaa	cagttcatat	ctctggtcta	acgactcaat	gacaagaaga	aaatcttcgt	2700
caacatgggtg	gagcacgaca	ctctggtcta	tccaaaaat	gtcaaagata	cagtctcaga	2760
agaccaaagg	gctattgaga	cttttcaaca	aaggataatt	tcgggaaacc	tcctcggatt	2820
ccattgcccc	gctatctgtc	acttcatcga	aaggacagta	gaaaagggaag	gtggctccta	2880
caaatgccat	cattgcgata	aaggaaaggc	tatcattcaa	gatctctctg	ccgacagtgg	2940
tcccaaagat	ggacccccac	ccacgaggag	catcgtggaa	aaagaagacg	ttccaaccac	3000
gtcttcaaag	caagtggatt	gatgtgacat	ctccactgac	gtaagggatg	acgcacaatc	3060
ccactatcct	tcgcaagacc	cttcctctat	ataagggaagt	tcatttcat	tggagaggac	3120
acgctcgagg	aatctggctg	tctcctaagg	gaagtgaaca	aggcattttg	tggatttttc	3180
gatcaatcga	aacaccatct	ctatgcgaag	cttttccagg	atttgcacaa	caaggatgac	3240
ttttcaagca	tcaattccag	tgagtacgta	ggagtttcaa	caggaaactg	gggttgtggt	3300
gcttttgggtg	gaaaccctga	aatcaagagc	atgattcagt	ggattgctgc	atcacaggct	3360
cttcgccctt	ttgttaatta	ctacactttt	gagaacgtgt	ctctgcaaag	attagaggag	3420
gtgatccagt	gggtacccca	gcttggttaag	gaaataatta	ttttcttttt	tccttttagt	3480
ataaaatagt	taagtgtatg	taattagtat	gattataata	atatagttgt	tataattgtg	3540
aaaaaataat	ttataaatat	attgtttaca	taacaacat	agtaatgtaa	aaaaatatga	3600
caagtgtatg	gtaagacgaa	gaagataaaa	gttgagagta	agtatatatt	ttttaatgaa	3660
tttgatcgaa	catgtaagat	gatatactag	cattaatat	tgttttaatc	ataatagtaa	3720
ttctagctgg	tttgatgaat	taaatatcaa	tgataaaaata	ctatagttaa	aataagaata	3780
aataaattaa	aataatattt	ttttatgatt	aatagtttat	tatataatta	aatatctata	3840
ccattactaa	atatttttagt	ttaaaagtta	ataaatattt	tgtttagaaat	tccaatctgc	3900
ttgtaattta	tcaataaaca	aaatatataa	taacaagcta	aagtaacaaa	taatatcaaa	3960
ctaatagaaa	cagtaatcta	atgtaacaaa	acataatcta	atgctaatat	aacaaagcgc	4020
aagatctatc	attttatata	gtattatttt	caatcaacat	tcttattaat	ttctaaataa	4080
tacttgtagt	ttttattaact	tctaaatgga	ttgactatta	attaaatgaa	ttagtccgaac	4140
atgaataaac	aaggtaacat	gatagatcat	gtcattgtgt	tatcattgat	cttacatttg	4200
gattgattac	agttgggaag	ctgggttcga	aatcgatcac	tggatcacct	cctctaattct	4260
ttgcagagac	acgttctcaa	aagtgtagta	attaacaaaa	gggcgaagag	cctgtgatgc	4320

agcaatccac	tgaatcatgc	tcttgatttc	agggtttcca	ccaaaagcac	cacaacccca	4380
gtttcctgtt	gaaactccta	cgtactcact	ggaattgatg	cttgaaaagt	catccttgtt	4440
gtgcaaatcc	tggaaaagct	tgcgatagag	atggtgtttc	gattgatcga	aaaatccaca	4500
aaatgccttg	ttcacttccc	ttaggagaca	gcoagattct	ctagagtcct	gctttaatga	4560
gatatgcgag	acgcctatga	tgcgatgata	tttgctttca	attctgttgt	gcacgttgta	4620
aaaaacctga	gcatgtgtag	ctcagatcct	taccgccggt	ttcgggttcat	tctaataaat	4680
atatcaccgg	ttactatcgt	atttttatga	ataatattct	cogttcaatt	tactgattgt	4740
accctactac	ttatatgtac	aataattaaaa	tgaanaacaat	atattgtgct	gaatagggtt	4800
atagcgacat	ctatgataga	gcgccacaat	aacaacaab	tgcgttttat	tattacaant	4860
ccaattttta	aaaaagcggc	agaaccggto	aaacctaaaa	gaactgattac	ataaatctta	4920
ttcaaattto	aaaaggcccc	aggggctagt	atotacgaca	caccgagcgg	cgaactaata	4980
acgttactg	aagggaacte	cgggttcccc	ccggggggca	tgggtgagat	bccttgaagt	5040
tgagtattgg	cgcctcgctc	taccgaaagt	taagggcaco	attcaaacccg	gtccagaaog	5100
gcggccgggt	aaccgacttg	ctgcccggag	aattatgag	catttctttg	gtgtatgtgt	5160
gccccaaatg	adgtgcaggt	caaaccttga	gagtgagag	aaatggctgg	ggcggttcag	5220
ggcgaatttt	gcgacaacat	gtcgaaggct	agcaggagct	gcagggtogao	ggcogagtao	5280
tggcaggata	tataccggtg	taatttgctg	cgtgtgaata	agtcgctgtg	tatgtttgtt	5340
tgattgtttc	tgttgagtg	cagcccatct	caccggacaa	gtcggctaga	ttgatttago	5400
cctgatgaac	tgccgagggg	aagccatctt	gagcgcgga	tgggaatgga	tttcgttgta	5460
caacgagag	acagaacacc	cacgggaccc	agcttcgato	gagcatcaaa	tgaactgca	5520
atattatpat	acaggatba	tcaataccat	atcttcaaaa	aagccgtttc	tgaatgaag	5580
gagaaaactg	aocgaggcag	tccatagga	tgggaacttc	ctggatoggg	ctggcgatoo	5640
cgaptggcc	aaatcaata	caacatatta	atcttcccto	gtcaaaaata	aggttatcaa	5700
gtgagaaatc	accatgagtg	acgactgaat	ccgttgagaa	tggcaaaag	ttatgaattt	5760
ctttccagao	tgttcaacat	ggcaggtcat	taagctgcto	abcaaatcca	ctggatbcaa	5820
ccaaaccgtt	attcattcgt	gatttggcct	gagcgagacg	aaatacggcg	ctgttaaaag	5880
gacaattaca	aacaggaatc	gaatgcaacc	ggcgagggaa	cactgccagb	gcattcaaaa	5940
tattttcacc	tgaatcagga	tattottcta	atacogaaa	tgtgttttt	coggggtctg	6000
cagtgttgag	taacoatgca	tcatpaggag	taaggtataa	atgcttgata	gtcggaagag	6060
gcataaattc	cgtcagccag	tttagtctga	ccatctcttc	tgtaacatba	tggcaatgg	6120
tacctttgcc	atgtttcaga	aaqaactctg	ggcataggg	cttcccoatac	aatogataga	6180
ttgtcgcacc	tgattgcccg	acatbatccg	aatctggcaa	ttccggttcg	cttgbtgcct	6240
ataaaaaccg	ccagtctagc	tatcgccatg	taagcgaact	gcaagctacc	tgctttctct	6300
ttgcgcttgc	gttttcggga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct	6360
tgcaaaacaaa	aaaaccaccg	ctaocagcgg	tggtttgttt	gcgggatoaa	gagctaccaa	6420
ctcttttttc	gaaggtaact	ggcttcagca	gagcgagat	accaataact	gtccttctag	6480
tgtagccgta	gtttagccac	cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgctc	6540
tgctaactct	gttaccagtg	gctgotgcc	gtggcgataa	gtogtgtott	accgggttgg	6600
actcaagcag	atagttaccg	gataagggcg	agcggtoggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	6660
cagacccag	cttgtagcga	acgacctaca	ocgaactgag	atacctacag	cgtgagctat	6720
gagaaagcgc	cacgcttccc	gaagggagaa	aggcgagcag	gtatcdggba	agcggcaggg	6780
tcggaacagg	agagcgcacg	agggagcttc	caggggagaa	cgcctgggtat	ctttatagtc	6840
ctgtcggggt	tgcgcccttc	tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	6900
ggagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcgg	cottttttacg	gttctctggcc	ttttgctggc	6960
cttttgctca	catgttcttt	cctgcggttat	cccctgattc	tgtggataac	cgtattacog	7020
cctttgagtg	agctgatacc	gctcgccgca	gccgaacgac	cgagcgcagc	gagtcagtga	7080
gcgaggaagc	ggaagagcgc	ctgatgcggt	attttctcct	tacgcattctg	tgcgggtattt	7140
cacaccgcac	atggtgcact	ctcagtacaa	tctgctctga	tgcgcgatag	ttaagccagt	7200
atacactccg	ctatcgctac	gtgactgggt	catggctgcg	ccccgacacc	cgccaacacc	7260
cgtgacgcg	ccctgacggg	cttgtctgct	cccggcatcc	gcttacagac	aagctgtgac	7320
cgtctccggg	agctgcatgt	gtcagagggt	ttcacccgtca	tcaccgaaac	gcgcgaggca	7380
gggtgccttg	atgtgggcgc	cggcggtcga	gtggcgacgg	cgcggcttgt	ccgcgccttg	7440
gtagattgcc	tggccgtagg	ccagccattt	ttgagcggcc	agcggccggc	ataggccgac	7500
gcgaagcggc	ggggcgtagg	gagcgcagcg	accgaagggg	agggcgctttt	tgcagctctt	7560
cggctgtgcg	ctggccagac	agttatgcac	aggccaggcg	ggttttaaga	gttttaataa	7620
gttttaaaga	gttttaggcg	gaaaaatcgc	ctttttcttc	ttttatatca	gtcacttaca	7680
tgtgtgaccg	gttcccaatg	tacggctttg	ggttcccaat	gtacgggttc	cggttcccaa	7740
tgtacggctt	tgggttccca	atgtacgtgc	tatccacagg	aaagagacct	tttcgacctt	7800
tttccctcgc	tagggcaatt	tgccctagca	tctgctccgt	acattaggaa	ccggcggatg	7860
cttcgccctc	gatcaggttg	cggtagcgca	tgactaggat	cgggccagcc	tgccccgcct	7920
cctccttcaa	atcgtactcc	ggcaggtcat	ttgaccgat	cagcttgccg	acggtgaaac	7980

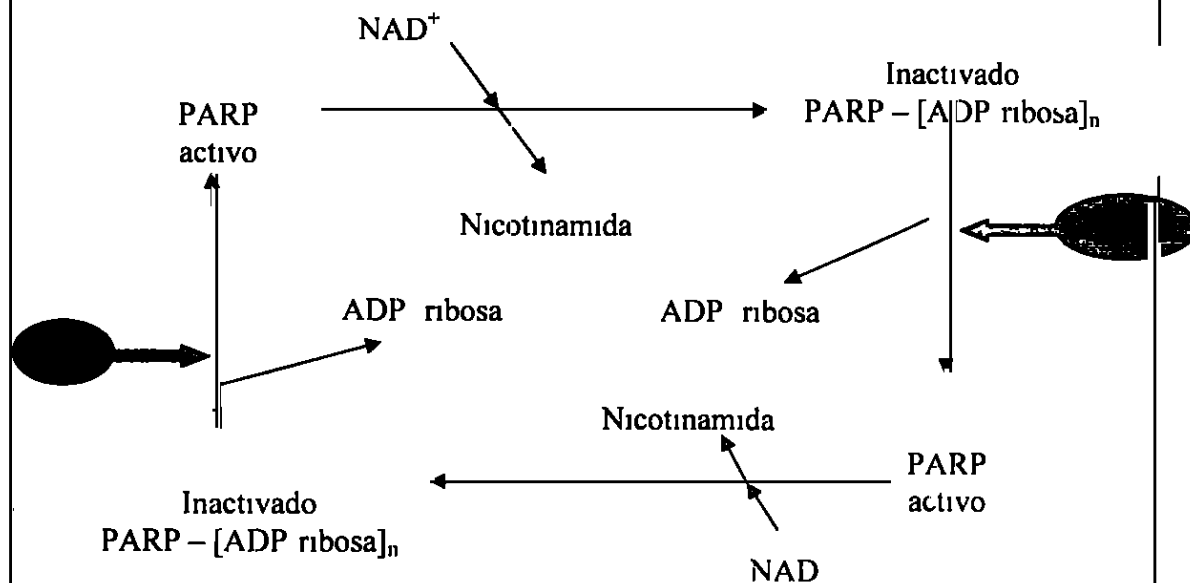
agaacttctt	gaactctccg	gcgctgccac	tgcgttcgta	gatcgtcttg	aacaaccatc	8040
tggtttctgc	cttgccctgcg	gcgcggcggtg	ccaggcggtg	gagaaaacgg	ccgatgccgg	8100
gatcgatcaa	aaagtaatcg	gggtgaaccg	tcagcacgtc	cggtttcttg	ccttctgtga	8160
tctcgcggta	catccaatca	gctagctcga	tctcgatgta	ctccggccgc	ccgttttcgc	8220
tctttacgat	cttgtagcgg	ctaataaagg	cttcaccctc	ggataaccgtc	accaggcggc	8280
cgtttcttggc	cttcttcgta	cgctgcatgg	caacgtgcgt	ggtgtttaac	cgaatgcagg	8340
tttctaccag	gtcgtctttc	tgcctttccgc	catcggtctg	ccggcagaaac	ttgagtacgt	8400
ccgcaacgtg	tggaacggaac	acgcggccgg	gcttgtctcc	cttcccttcc	cggtatcggg	8460
tcattggattc	ggtttagatgg	gaaaccgcca	tcagtaccag	gtcgtaatcc	cacacactgg	8520
ccatgccggc	cgcccttgcg	gaaacctcta	cgtgcccgtc	tggaagctcg	tagcggatca	8580
cctcgcacgc	tcgtcgggtca	cgcttcgaca	gacggaaaac	ggccacgtcc	atgatgctgc	8640
gactatcgcg	gggtgcccacg	tcataagagca	tcggaacgaa	aaaatctggg	tgctcgctgc	8700
ccttggggcg	cttccctaate	gacggcgccac	cggttgccgg	cggttgccgg	gattctttgc	8760
ggattcgatc	agcggccgct	tgccacgatt	caccggggcg	tgtttctgcc	tcgatgcgtt	8820
gccgctgggc	ggcctgcgcg	gccttcaact	tctccaccag	gtcatcacc	agcggccgc	8880
cgatttgatc	cgggcccggat	ggtttgcgac	cgtcacgccc	attcctcggg	cttggggggt	8940
ccagtgccat	tgagggggccg	gcagacaacc	cagccgctta	cgcttgccca	accgcccgtt	9000
cctccacaca	tgggggcattc	cacggcgctc	gtgcctgggt	gttcttgatt	ttccatgcgg	9060
cctcctttag	ccgctaaaaat	tcattctactc	atttattcat	ttgctcattt	actctggtag	9120
ctgcgcgatg	tattcagata	gcagctcggg	aatggctctg	ccttggcgta	ccgcgtacat	9180
cttcagcctg	gtgtgatcct	ccgcggcga	ctgaaagtgg	acccgcttca	tggctggcgt	9240
gtctgccagg	ctggcacaacg	ttgcagcctt	gctgctgcgt	gcgctcggac	ggccggcact	9300
tagcgtgttt	gtgtttttgc	tcattttctc	tttacctcat	taactcaaat	gagttttgat	9360
ttaatttcag	cggccagcgc	ctggacctcg	cgggcagcgt	cgccctcggg	ttctgattca	9420
agaacgggtg	tgccggcgccg	ggcagtgccct	gggtagctca	cgcgctgcgt	gatacgggac	9480
tcaagaatgg	gcagctcgtg	cccgccacgc	gcctcggcaa	cctcaccgcc	gatgcgcgtg	9540
cctttgatcg	cccgcgacac	gacaaaaggcc	gcttgtagcc	ttccatccgt	gacctcaatg	9600
cgctgcttaa	ccagctccac	caggtcggcg	gtggcccata	tgctgtaagg	gcttgctgc	9660
accggaatca	gcacgaagtc	ggctgccttg	atcgccgaca	cagccaagtc	cgccgcctgg	9720
ggcgctccgt	cgatcactac	gaagtgcgcg	cggccgatgg	ccttcacgtc	gcggtcaatc	9780
gtcgggcggt	cgatgccgac	aacggttagc	ggttgatctt	cccgcacggc	cgcccaatcg	9840
cgggcactgc	cctggggatc	ggaatcgact	aacagaacat	cggcccccgg	gagttgcagg	9900
gcgcgggcta	gatgggttgc	gatggctcgt	ttgcctgacc	cgcctttctg	gttaagtaca	9960
gcgataacct	tcattgcgttc	cccttgcgta	ttgttttatt	tactcatcgc	atcatatacg	10020
cagcgaccgc	atgacgcaag	ctgttttact	caaatacaca	tcaccttttt	agacggcggc	10080
gctcggtttc	ttcagcggcc	aagctggccg	gccaggccgc	cagcttgcca	tcagacaaac	10140
cggccaggat	ttcatgcagc	cgcacgggtg	agacgtgcgc	gggcggctcg	aacacgtacc	10200
cggccgcgat	catctccgcc	tcgatctctt	cggtaatgaa	aaacggttcg	tcctggccgt	10260
cctgggtgcg	tttcatgctt	gttccctctg	gcgttcattc	tcggcgccgc	ccaggcgctc	10320
ggcctcggtc	aatgcgtcct	cacggaaggc	accgcgccgc	ctggcctcgg	tgggcgtcac	10380
ttcctcgctg	cgctcaagtg	cgcggtacag	ggtcgagcga	tgacgcgcaa	gcagtgcagc	10440
cgcctcttct	acggtgcggc	cttccctggc	gatcagctcg	cgggcgtgcg	cgatctgtgc	10500
cggggtgagg	gtaggggcgg	ggccaaactt	cacgcctcgg	gccttgggcg	cctcgcgccc	10560
gctccgggtg	cggctcgatga	ttagggaaacg	ctcgaactcg	gcaatgccgg	cgaacacggg	10620
caacaccatg	cggccggccg	gcgtgggtgg	gtcggccccc	ggctctgcc	ggctacgcag	10680
gcccgcgcgc	gcctcctgga	tgcgctcggc	aatgtccagt	aggtcgcggg	tgctgcgggc	10740
caggcggtct	agcctgggtca	ctgtcacaaac	gtcggccagg	cgtaggtggg	caagcatcct	10800
ggccagctcc	gggcgggtcgc	gcctgggtgcc	ggtgatcttc	tcggaaaaca	gcttgggtgca	10860
gcccggccgc	tgcatgttcg	cccgttgggt	ggtcaagtcc	tggtcgtcgg	tgctgacgcg	10920
ggcatagccc	agcaggccag	cggcgggcgt	cttgttcatg	gcgtaatgtc	tccggttcta	10980
gtcgcaagta	ttctacttta	tgcgactaaa	acacgcgaca	agaaaacgcc	aggaaaaggg	11040
caggggcgga	gcctgtcgcg	taacttagga	cttgtgcgac	atgtcgtttt	cagaagacgg	11100
ctgcactgaa	cgtcagaagc	cgactgcact	atagcagcgg	aggggttggg	tcgatccctg	11160
ctcgcgcagg	ctgggtgcca	agctctcggg	taacatcaag	gcccgatcct	tggagccctt	11220
gcccctcccg	acgatgatcg	tgccgtgatc	gaaatccaga	tccttgaccc	gcagttgcaa	11280
accctcactg	atccgcacgc	ccgttccata	agaagctgg	gcgaacaaac	gatgctcgcc	11340
ttccagaaaa	ccgaggatgc	gaaccacttc	atccgggggtc	agcaccaccg	gcaagcgccc	11400
ggacggccga	ggtcttccga	tctcctgaag	ccagggcaga	tccgtgcaca	gcacttgccc	11460
tagaagaaca	gcaaggccgc	caatgcctga	cgatgcgtgg	agaccgaaac	cttgcgctcg	11520
ttcgccagcc	aggacagaaa	tgccctcgact	rcgctgctgc	ccaaggttgc	cgggtgacgc	11580
acaccgtgga	aacgggatgaa	ggcacgaaac	cagtggacat	aagcctgttc	ggttcgtaag	11640

ctgtaatgca	agtagcgat	gcgctcacgc	aactgggtcca	gaaccttgac	cgaacgcagc	11700
ggtaggtaacg	gcgcagtgcc	ggttttcatg	gcttggtatg	actgtttttt	tggggtacag	11760
tctatgcctc	gggcatccaa	gcagcaagcg	cgttacgccg	tgggtcgatg	tttgatgtta	11820
tggagcagca	acgatgttac	gcagcagggc	agtcgcccta	aaacaaagt	aaacatcatg	11880
agggaaagcgg	tgatcgccga	agtatcgact	caactatcag	aggtagttgg	cgatcatcgag	11940
cgccatctcg	aacgcagcgt	gctggccgta	catttgtacg	gctccgcagt	ggatggcggc	12000
ctgaagccac	acagtgatat	tgatttgctg	gttacgggtga	ccgtaaggct	tgatgaaaca	12060
acgcggcgag	ctttgatcaa	cgaccttttg	gaaacttcgg	cttcccctgg	agagagcgag	12120
attctccgcg	ctgtagaagt	caccattggt	gtgcacgacg	acatcattcc	gtggcggtat	12180
ccagctaagc	gcgaactgca	atttgagaa	tggcagcgca	atgacattct	tgcaggatc	12240
ttcgagccag	ccacgatcga	cattgatctg	gctatcttgc	tgacaaaagc	aagagaacat	12300
agcgttgcc	tggtaggtcc	agcggcgag	gaactctttg	atccgggtcc	tgaacaggat	12360
ctatttgagg	cgctaaatga	aaccttaacg	ctatggaact	cgccgcccga	ctgggctggc	12420
gatgagcgaa	atgtagtgct	tacgttgctc	cgcatcttgg	acagcgagc	aaccggcaaa	12480
atcgcgccga	aggatgtcgc	tgccgactgg	gcaatggagc	gcctgccggc	ccagtatcag	12540
cccgtcatac	ttgaagctag	acaggcttat	cttggacaag	aagaagatcg	cttggcctcg	12600
cgcgagatc	agttggaaga	atttgtccac	tacgtgaaag	gcgagatcac	caaggtagtc	12660
ggcaaataat	gtctaacaat	tcgttcaagc	cgacgccgct	tcgcggcgcg	gcttaactca	12720
agcgttagat	gcactaagca	cataattgct	cacagccaaa	ctatcaggct	aagtctgctt	12780
ttattatatt	taagcgtgca	taataagccc	tacaçaaatt	gggagatata	tcatgaaagg	12840
ctggcttttt	cttggttatcg	caatagttgg	cgaagtaatc	gcaacatccg	cattaaaatc	12900
tagcgagggc	tttactaagc	tagcttgctt	ggtcgttcçg	gtaccgtgaa	cgccggctcg	12960
attgtacctg	cgttcaaata	ctttgcgac	gtgttgcgcg	cctgcccggt	gcgtcggctg	13020
atctcacgga	tcgactgctt	ctctcgcaac	gccatccgac	ggatgatggt	taaaagtccc	13080
atgtggatca	ctccgttgcc	ccgtcgctca	ccgtgttggg	gggaagggtgc	acatggctca	13140
gttctcaatg	gaaattatct	gcctaaccgg	ctcagttctg	cgtagaaacc	aacatgcaag	13200
ctccaccggg	tgcaaagcgg	cagcgg				13226

(12) DEMANDA INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la propiedad intelectual oficina internacional	 PCT	
(43) Fecha de la publicación Internacional 21 de octubre de 2004 (21 10 2004)		(10) Numero de publicación internacional WO 2004/090140 A2
(51) Clasificación Internacional de las patentes C12N 15/82		
(21) Número de la demanda Internacional PCT/EP20047003495		
(22) Fecha del depósito internacional 9 de abril de 2004 (09 04 2004)		
(25) Idioma del depósito Inglés		
(26) Idioma de la publicación Inglés		
(30) Datos de prioridad		
03076044 1 9 de abril de 2003 (09 04 2003) 1		
60/496 688 21 de agosto de 2003 (21 08 2003) 1		
(71) Deponente (para todos los estados designados excepto US) BAYER BIOSCIENCE N Y [BI/BE] Technologicpark 38 B 9052 Gent (BE)		
(72) Inventores (75) Inventores/ deponentes (solo para US) DE BLOCK Marc [BF/BE] Ahrikostenstraat 26 H 9820		
(74) Representante común BAYER BIOSCIENCE N Y [BE/BE] Technologicpark 38 B 9052 Gent (BE)		
(81) Estados designados (a menos que se indique en otra forma por cada tipo de protección nacional disponible) AE AG AL AM		
	I AT AU AZ BA BB BC BR BW BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EF EG ES FI GB GD GE GH GI HM HY ID IE IN IS IL RE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NA NI NO NZ OM PG PH PI PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UC US UZ VC VN YU ZA ZM ZW (84) Estados designados (a menos que se indique en otra forma por cada tipo de protección nacional disponible) ARIPO (BW CH GM KE IS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW) Eurasian (AM AZ BY KC KZ MD RU TJ TM) Europea (AT BE CH CY CZ DE DK EG ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PL RO SE SL SK TR) OAPI (BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG) Declaraciones bajo la regla 4.17 — sobre la identidad del inventor (regla 4.17(i) para las siguientes designaciones sin reporte de investigación internacional si se publica en la recepción de un report AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BC BR BW BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EF EG ES FI GB GD GE GH GI HM HY ID IE IN IS IL RE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NA NI NO NZ OM PG PH PI PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UC US UZ VC VN YU ZA ZM ZW	

(54) Título MÉTODOS Y MEDIOS PARA INCREMENTAR LA TOLERANCIA DE LAS PLANTAS A LAS CONDICIONES DEL ESTRÉS



(57) Resumen los métodos y los medios son proporcionados para incrementar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico o a condiciones de crecimiento adversas, incluyendo sequía, altas intensidades de luz, altas temperaturas, limitaciones de nutrientes y similares, mediante la reducción de la actividad de las proteínas PARC endógenas en las plantas.

Metodos y medios para incrementar la tolerancia de las plantas a condiciones de estres

Campo de la invencion

[1] La presente invencion está relacionada con el uso de poli (ADP ribosa) glicohidrolasas en las plantas para incrementar la tolerancia de las plantas a condiciones adversas de crecimiento, incluyendo sequia, altas intensidades de luz, altas temperaturas, limitaciones de nutrientes y similares. Los metodos y medios son suministrados para producir plantas que sean tolerantes a condiciones de estres abiótico.

Antecedentes de la invencion

[2] Frecuentemente el estrés abiótico conlleva directamente o indirectamente a daño en el ADN de las células de las plantas expuestas a condiciones adversas. El daño genómico si no es reparado puede conllevar a muerte celular. La tolerancia a condiciones de estrés mostrada por las plantas es el resultado de la habilidad de las células de la planta expuestas a condiciones adversas para reducir y/o reparar el daño y sobrevivir.

[3] Las células de la planta así como otras células eucarióticas han desarrollado un sistema de reparación del ADN elaborado. La activación de la poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP) mediante el rompimiento de las ramificaciones del ADN a menudo es una de las primeras respuestas celulares al daño del ADN. El PARP cataliza la modificación post translacional de las proteínas mediante la adición sucesivamente de moléculas de ADP ribosa obtenidas de la conversión del dinucleótido nicotinámico (NAD) para formar polímeros multiramificados que contienen hasta 200 residuos de ADP ribosa (aproximadamente 40 residuos en las plantas). La dependencia de la síntesis de poli (ADP ribosa) sobre los rompimientos de las ramificaciones del ADN y la presencia de PARP en complejos multiproteínicos adicionales que contienen efectores claves de la reparación del ADN, las reacciones de replicación y transcripción sugieren fuertemente que esta modificación post transcripcional está involucrada en el metabolismo de los ácidos nucleicos y en la reparación del ADN. Además son indicaciones de que la síntesis de poli (ADP —ribosa) está involucrada en la regulación del ciclo celular y en la muerte celular.

[4] La poli (ADP ribosilacion) de las proteínas es migratoria en las células vivas. Los polímeros poli (ADP ribosa) son rápidamente superpuestos siendo convertidos en ADP ribosa libre mediante la actividad de la exoglicosidasa y la endoglicosidasa del poli (ADPribosa) glicohidrolasa (PARG E C 3 2 1 143). La unidad más proximal de ADP ribosa sobre el aceptor de la proteína es hidrolizada mediante la acción de otra enzima (Liasa de proteína ADP ribosil).

[5] Además de este efecto positivo (asociado con la reparación del ADN) del PARP sobre la supervivencia celular también existe un efecto negativo del PARP. El proceso de activación del PARP sobre el daño del ADN está asociado con una rápida disminución de los niveles de NAD⁺ puesto que cada unidad de ADP ribosa transferida por el PARP consume una molécula de NAD⁺. El agotamiento de NAD⁺ a su vez resulta en agotamiento de ATP puesto que la re síntesis de NAD⁺ requiere por lo menos (dependiendo de la vía de la biosíntesis) tres moléculas de ATP por molécula de NAD⁺. Además la actividad del bloque agota el NAD gliceraldehído —3 fosfato deshidrogenasa el cual es requerido para re sintetizar el ATP durante la glicólisis. Finalmente el NAD⁺ es un transportador clave de los electrones necesarios para generar el transporte de electrones vía el ATP y la fosforilación oxidativa.

[6] La consecuencia fisiológica del NAD⁺ y del agotamiento de ATP ha sido establecida en el contexto que el daño del ADN induce la muerte celular. Se ha demostrado que la terminación de la apoptosis depende absolutamente de la presencia de ATP y que en ausencia de este nucleótido del tipo de

interruptores de fallecimiento celular desde la apoptosis hasta la necrosis. Dado que la lisis celular asociada con la necrosis genera un daño adicional a las células vecinas, es preferible para los organismos multicelulares favorecer la muerte celular apoptótica en lugar de la necrosis.

[7] Además es muy importante considerar el equilibrio delicado de los efectos positivos y negativos de la acción de la poli (ADP ribosil) sobre el potencial de una célula para sobrevivir al daño del ADN.

[8] La WO 00/04173 describe los métodos para modular la muerte celular programada (PCD) en células y organismos eucarióticos, particularmente las células de las plantas y las plantas mediante la introducción de genes quiméricos de modulación del PCD que influyen en la expresión y/o actividad aparente de los genes poli (ADP ribosa) polimeraza (PARP) endógenos. La muerte celular programada puede ser inhibida o provocada. La intención, particularmente, está relacionada con el uso de las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas con la actividad PARP para modular el PCD para mejorar la tasa de crecimiento o para producir células y organismos tolerantes al estrés.

[9] Los genes de codificación PARG fueron identificados en un número de animales tales como los *Rattus norvegicus* (Números de acceso NM_031 339 NW 043030 ABO19366) *Mus musculus* (Números de acceso NT_039598 NM 003631 AF079557) *Homo sapiens* (Números de acceso NT_01 7696

NM003631 AF005043) *Bos taurus* (Numeros de acceso NM_174138 U78975)

Drosophila melanogaster (Numero de acceso AF079556)

[10] En las plantas una glicohidrolaza poli (ADP ribosa) fue identificada mediante un mapa basado en la clonacion de genes de tipo silvestre en un mutante afectado en la trascripcion controlada con reloj de genes en *Arabidopsis* y en la transicion dependiente del foto periodo desde el crecimiento vegetativo hasta el florecimiento (*tel*) La secuencia de nucleotidos del gen puede ser obtenida de bases de datos de nucleotidos bajo el numero de acceso AF394690 (Panda et al 2002 Dev Cell 3 51 61)

Resumen de la invencion

[11] La invencion ofrece un metodo para producir una planta tolerante a las condiciones de estres incluyendo los pasos de suministro de celulas de plantas con un gen quimerico para crear celulas de plantas transgenicas en donde el gen quimerico incluye los siguientes fragmentos de ADN vinculados operablemente un promotor expresible de la planta una region del ADN los cuales cuando son transcritos producen una molecula RNA inhibitoria ParG y una region final 3 involucrada en la terminacion de la trascripcion y la poliadenilacion Una poblacion de lineas de plantas transgenicas es regenerada desde la celula de la planta transgenica y una linea de plantas tolerante al estrés es identificada dentro de la poblacion de las lineas de plantas transgenicas La molecula de RNA inhibidora ParG puede incluir una

secuencia de nucleotidos de por lo menos 20 nucleotidos consecutivos del gen ParG presente en la celula de la planta (el gen ParG endogeno) La molecula de RNA inhibidora ParG tambien puede incluir una secuencia de nucleotidos de por lo menos 20 nucleotidos consecutivos del complemento de la secuencia de nucleotidos del gen ParG presente en la celula de la planta (el gen ParG endogeno) Inclusive en otra incorporacion el RNA inhibidor parC puede incluir una region de sentido que incluye una secuencia de nucleotidos de por lo menos 20 nucleotidos consecutivos de la secuencia de nucleotidos del gen ParG presente en la celula de la planta y una region anti sentido que incluye una secuencia de nucleotidos de por lo menos 20 nucleotidos consecutivos del complemento de la secuencia de nucleotidos del gen ParG presente en la celula de la planta en donde la region del sentido y del antisentido son capaces de formar una region de RNA de doble ramificación que incluya por lo menos 20 nucleótidos consecutivos El gen quimerico ademas puede incluir una region de ADN que codifica una ribozima auto empalante entre dicha codificacion de la region del ADN para la molecula de RNA inhibidora parC y la región final 3 Las condiciones de estrés pueden ser seleccionadas desde calor sequia agotamiento de nutrientes estrés oxidativo o condiciones de luz alta

[12] En otra personificacion de la invencion se suministra un metodo para producir una planta tolerante a condiciones de estres incluyendo los pasos de separacion de un fragmento de ADN de por lo menos 100 bp que incluye una parte del gen codificador parG de la planta de interes produciendo un gen

quimerico mediante la vinculacion operablemente de una region promotora expresible de la planta con el fragmento de ADN separado que incluye la parte del gen codificador parC de la planta en orientación directa comparado con la región promotora y al fragmento del ADN separado que incluye la parte del gen codificador parC de dicha planta en orientacion invertida comparado con la region promotora y una region final 3 involucrada en la terminacion de la transcripción y la poliadenilacion Estos genes quimericos luego son suministrados a las células de las plantas para crear células de plantas transgenicas Una poblacion de lineas de plantas transgenicas se regenera desde las células de las plantas transgenicas y una linea de plantas tolerantes al estrés es identificada dentro de la poblacion de lineas de plantas transgenicas La invención tambien está relacionada con células de plantas tolerantes al estrés y plantas obtenidas mediante este proceso

[13] Inclusive en otra personificación de la invencion se suministra un metodo para producir plantas tolerantes a condiciones del estrés incluyendo los pasos de suministro de células de plantas con un gen quimerico para crear plantas transgenicas incluyendo una region de ADN la cual cuando es transcrita produce una molécula de RNA inhibidora ParG en donde la region del ADN incluye una secuencia de nucleotidos de por lo menos 21 a 100 nucleotidos de una secuencia de nucleotidos que codifican una proteina que incluye la secuencia de aminoácidos SEQ ID No 1 2 o 16 o por lo menos 21 a 100 nucleotidos de una secuencia de nucleótidos SEQ ID 3 4 15 o 23 operablemente vinculadas a un promotor expresible de la planta y una region

final 3 involucradas en la terminación de la transcripción y la poliadenilación regenerando una población de líneas de plantas transgénicas de dicha célula de plantas transgénicas e identificando una línea de plantas tolerantes al estrés dentro de la población de líneas de plantas transgénicas

[14] La invención además proporciona moléculas de ADN que incluyen un promotor expresible de la planta operablemente vinculado a una región del ADN el cual cuando es transcrito produce una molécula de RNA inhibidora ParG y hasta una región final 3 involucrada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación. La molécula de RNA inhibidora ParG puede incluir una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos del gen ParG presente en la célula de la planta (el gen ParG endógeno). La molécula de RNA inhibidora ParG también puede incluir una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos del complemento de la secuencia de nucleótidos del gen ParG presente en la célula de la planta (el gen ParG endógeno). Inclusive en otra personificación el RNA inhibidor parG puede incluir una región de sentido que incluye una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos del gen ParG presente en la célula de la planta y una región anti sentido que incluye una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos del complemento de la secuencia de nucleótidos del gen ParG presente en la célula de la planta en donde la región del sentido y la anti sentido son capaces de formar un RNA de doble ramificación que incluye por lo menos 20 nucleótidos consecutivos. El gen

quimérico además puede incluir una región de ADN que codifica una ribozima auto vinculadora entre dicha codificación de la región del ADN para la molécula de RNA inhibidora parG y la región final 3'. El gen quimérico también puede incluir una secuencia de nucleótidos de por lo menos 21 a 100 nucleótidos de una secuencia de nucleótidos que codifican una proteína que incluye la secuencia de aminoácidos SEQ ID No 1, 2 o 16 o por lo menos 21 a 100 nucleótidos de una secuencia de nucleótidos de SEQ ID 3, 4, 15 o 23.

[15] Inclusive en otra personificación, la invención está relacionada con la célula de la planta que incluye la molécula de ADN de la invención y de las plantas que consisten esencialmente de dichas células de las plantas, así como con los procesos para la producción de plantas tolerantes al estrés, incluyendo el paso de cruce adicional de dichas plantas con otra planta. También se suministran las semillas y el material de propagación de dichas plantas que incluyen los genes quiméricos de la invención.

[16] La invención también está relacionada con un método para la obtención de plantas tolerantes al estrés que incluyen los pasos de sometimiento de una línea de células de la planta o una línea de plantas para mutagénesis, la identificación de estas células de la planta o plantas que tienen una mutación en un gen ParG endógeno, sometiendo las células de las plantas identificadas a condiciones de estrés e identificando las células de la planta o las plantas que toleran dichas condiciones de estrés mejor que las plantas de control. Alternativamente, las células de las plantas o las plantas pueden ser

seleccionadas por los inhibidores ParG y tratadas en la forma descrita en este paragrafo

[17] La invencion ademas esta relacionada con una celula de planta tolerante al estres o plantas que tengan una mutacion en el gen ParG endogeno

Breve descripcion de las figuras

[18] Figura 1 Representación esquemática del ciclo de polimerización / despolimerización del poli ADP ribosa mediante la acción del PARP/PARG en una célula eucariótica

[19] Figura 2 Diagrama del contenido de NAD⁺ y ATP en las líneas *Arabidopsis* bajo estrés de luz alta. Las casillas oscuras representan el contenido de NAD bajo condiciones de luz alta expresadas como el porcentaje del valor para el contenido de NAD determinado bajo condiciones de luz baja. Las casillas claras representan el contenido de ATP bajo condiciones de luz alta expresadas como el porcentaje del valor para el contenido de ATP determinado bajo condiciones de luz baja.

[20] Figura 3 Diagrama del contenido de NAD⁺ y ATP de las líneas de maíz bajo estrés de agotamiento de nitrógeno. Las casillas oscuras representan el contenido de NAD mientras que las casillas claras representan el contenido de ATP.

Descripción detallada de las personificaciones preferidas

[21] La invención se basa por cada parte en la demostración de que las células de las líneas de plantas resistentes al estrés incluyen un gen quimérico que reduce la expresión del gen PARP presentando un contenido de NAD/ATP más alto bajo condiciones adversas que las células de las líneas de las plantas no transformadas. Por otra parte se observó que el silenciamiento de la expresión del gen codificador PARG en el tabaco utilizando un vector de RNA silenciador migratorio basado en los virus del satélite resultó en un fenotipo similar al observado para el silenciamiento del gen codificador PARP que utiliza el mismo sistema silenciador. Además el silenciamiento de la expresión del gen codificador PARG en las plantas tales como Arabidopsis y tabaco resultó en plantas que fueron más resistentes a condiciones de estrés tales como por ejemplo aquellas impuestas por condiciones de luz alta.

[22] Aunque no se intenta limitar la invención a un modo de acción específico se espera que el silenciamiento de la expresión del gen PARG resulte en un fenotipo similar al silenciamiento de la expresión del gen PARP por las siguientes razones. Como se puede ver en la Figura 1 la polimerización del ADP ribosa catalizado por PARP que consume NAD es seguida por la despolimerización del poli ADP catalizado por PARG. La ribosilación ADP de la proteína PARP resulta en la inactivación de la proteína PARP. La velocidad a la cual ocurre el ciclo de polimerización/despolimerización de ADP ribosa en las células de las plantas conllevan a un agotamiento de NAD y

consecuentemente el agotamiento de ATP puede ser retardado o detenido mediante la reduccion de la expresion del gen PARP o de la actividad enzimática del PARP. Como resultado las células de las plantas y las plantas que incluyen dichas células son más resistentes a condiciones adversas. Los datos aquí suministrados indican que se puede obtener un efecto similar mediante el retardamiento o detención del ciclo reduciendo la expresión del gen PARP o la actividad PARP.

[23] La invención se relaciona con la reducción de la muerte celular en la planta como respuesta a condiciones ambientales adversas y consecuentemente la resistencia mejorada al estrés alternando el nivel de expresión de los genes ParG o alternando la actividad o la actividad aparente de las proteínas PARP en la célula de esa planta. Convenientemente el nivel de expresión de los genes ParG pueden ser controlados genéticamente mediante la introducción de genes quiméricos que alternan la expresión de los genes ParG o mediante la alternación de los genes PARP endógenos incluyendo las señales de expresión.

[24] En una personificación de la invención un método para producir plantas tolerantes a condiciones de estrés o condiciones de crecimiento adversas es suministrado ofreciendo los pasos de

suministro de células de plantas con un gen quimérico para crear células de plantas transgénicas en donde el gen quimérico incluye los siguientes fragmentos de ADN vinculados operablemente

un promotor expresible de la planta

una region del ADN la cual cuando es transcrita produce una molecula de
RNA inhibidora ParG

una region final 3 involucrada en la terminacion de la trascripcion y la
poliadenilacion

regeneracion de una poblacion de lineas de plantas transgenicas de dichas
celulas de plantas transgenicas e

identificacion de una linea de plantas tolerantes al estres dentro de dicha
poblacion de lineas de plantas transgenicas

[25] Como se utiliza aqui una planta tolerante al estres o una planta tolerante a condiciones de estres o condiciones adversas de crecimiento es una planta (particularmente una planta obtenida de acuerdo con los metodos de la invencion) la cual cuando es sometida a condiciones de crecimiento adversas durante un periodo de tiempo tales como pero sin limitar la sequia altas temperaturas suministro limitado de nutrientes (particularmente nitrogeno) intensidades de luz alta crece mejor que una planta de control no tratada de acuerdo con los metodos de la invención Esto sera usualmente aparente desde la apariencia general de las plantas y puede ser medido por ejemplo mediante la produccion incrementada de biomasa crecimiento vegetativo continuado bajo condiciones adversas mas alta produccion de semillas Las plantas tolerantes al estres tienen un espectro de crecimiento mas amplio por ejemplo están en capacidad de resistir un rango mas amplio de cambios climatologicos y otros cambios abioticos sin producir castigos

Bioquímicamente la tolerancia al estrés puede ser aparente entre más alto sea el contenido de NAD^+ NADH /ATP más baja es la producción de especies de oxígeno reactivos de plantas tolerantes al estrés en comparación con las plantas de control bajo condiciones de estrés. La tolerancia al estrés también puede ser aparente a medida que el contenido de clorofila es más alto, fotosíntesis más alta y fluorescencia más baja de la clorofila bajo condiciones de estrés en plantas tolerantes al estrés comparadas con las plantas de control bajo las mismas condiciones.

[26] Es claro que tampoco se requiere que la planta crezca continuamente bajo las condiciones adversas para que la tolerancia al estrés sea aparente. Usualmente la diferencia en la tolerancia al estrés entre una planta o una célula de la planta de acuerdo con la invención y una planta o célula de planta control será aparente inclusive solo cuando se enfrente a un periodo relativamente corto de condiciones adversas durante el crecimiento.

[27] Como se utiliza aquí una molécula de RNA inhibidora ParG es una molécula de RNA capaz de disminuir la expresión de los genes codificadores PARG endógenos de una célula de la planta preferiblemente mediante el silenciamiento post transcripcional. Será claro que inclusive cuando una molécula de RNA inhibidora ParG disminuye la expresión del gen codificador PARG mediante el silenciamiento post transcripcional, así como una molécula de RNA también puede ejercer otras funciones dentro de la célula tales como por ejemplo orientación de la metilación del ADN del gen ParG endógeno y

nuevamente conllevando a una expresión disminuida del gen codificador PARG. Además, la expresión de los genes codificadores PARG endógenos de una célula de la planta puede ser reducida mediante el silenciamiento transcripcional, por ejemplo, mediante el uso del RNAi o dsRNA objetivo contra la región promotora del gen ParG endógeno.

[28] Como aquí se utiliza un gen codificador PARG o un gen ParG es un gen capaz de codificar una proteína PARG (glicohidrolasa ADP ribosa) en donde la proteína PARG cataliza la despolimerización del poli ADP ribosa mediante la liberación de unidades de ADP ribosa libre o mediante la acción endoglicolítica o exoglicolítica.

[29] Los genes codificadores PARG pueden incluir una secuencia de nucleótidos que codifican una proteína que incluye la secuencia de aminoácidos SEQ ID No 1 (*Arabidopsis thaliana*) o SEQ ID No 2 (*Solanum tuberosum*) o SEQ ID No 16 (*Oryza sativa*) o partes de estas tales como un fragmento de ADN que incluye la secuencia de nucleótidos SEQ ID No 3 o SEQ ID 4 o SEQ ID No 15 o SEQ ID 23 (*Zea mays*).

[30] Sin embargo, será claro que la persona entrenada pueda separar las secuencias de ADN de otras especies de plantas mediante la hibridación con una sonda derivada de los genes codificadores PARG antes mencionados de las especies de plantas o inclusive con una sonda derivada de los genes codificadores PARG antes mencionados de especies animales. Para este fin, las sondas deben tener preferiblemente una secuencia de nucleótidos que

incluya por lo menos 40 nucleótidos consecutivos desde la región codificadora de aquellas secuencias de genes codificadores PARG preferiblemente desde la región codificadora de la SEQ ID No 3 o SEQ ID No 4. Las sondas sin embargo pueden incluir regiones más largas de secuencias de nucleótidos derivados de los genes ParG tales como aproximadamente 50 60 75 100 200 o 500 nucleótidos consecutivos de cualquiera de los genes ParG mencionados. Preferiblemente la sonda debe incluir la codificación de la secuencia de nucleótidos para una de las regiones altamente conservadas del dominio catalítico las cuales fueron identificadas mediante la alineación de las diferentes proteínas PARG de los animales. Estas regiones también están presentes en la proteína PARG identificada de *Arabidopsis thaliana* e incluye la secuencia de aminoácidos LXVDFANXXXCCG (correspondiente a la SEQ ID No 1 desde el aminoácido en la posición 252 hasta el aminoácido en la posición 264 X puede ser cualquier aminoácido) LXVDFANXXXGGGXXXXGXVQEEIRF (correspondiente a la SEQ ID No 1 desde el aminoácido en la posición 252 hasta el aminoácido en la posición 277) o LXVDFANXXXGGGXXXXGXVQEEIRFXXXPE (correspondiente a la SEQ ID No 1 desde el aminoácido en la posición 252 hasta el aminoácido en la posición 282) TGXWGCGXFXGD (correspondiente a la SEQ ID No 1 desde el aminoácido en la posición 449 hasta el aminoácido en la posición 460) o TGXWGCGAFXGDXXLKXXXQ (correspondiente a la SEQ ID No 1 desde el aminoácido en la posición 449 hasta el aminoácido en la posición 468). Otras regiones conservadas tienen la secuencia de aminoácidos DXXXRXXXXAIDA (correspondiente a la SEQ ID No 1 desde el aminoácido en la posición 335

hasta el aminoácido en la posición 344) o REXXKAXXGF (correspondiente a la SEQ ID No 1 desde el aminoácido en la posición 360 hasta el aminoácido en la posición 369) o GXXXXSXYTGY (correspondiente a la SEQ ID No 1 desde el aminoácido en la posición 303 hasta el aminoácido en la posición 313) La hibridización debe ser preferiblemente bajo condiciones severas

[31] Condiciones de hibridización severas como se utiliza aquí significa que la hibridización ocurrirá generalmente si existe por lo menos el 95% y preferiblemente por lo menos el 97% de identidad de la secuencia entre la sonda y la secuencia objetivo. Ejemplos de condiciones de hibridización severas son la incubación nocturna en una solución que incluya formamida 50% 5 x SSC (150 mM NaCl 15 mM citrato trisodio) 50 mM fosfato de sodio (pH 7.6) 5x solución de Denhardt 10% sulfato dextran y 20 pg/ml desnaturalizado ADN transportador trasquilado tales como ADN de esperma de salmón seguido por el lavado del soporte de la hibridización en 0.1 x SSC a aproximadamente 65 C por ejemplo durante aproximadamente 10 min (doble). Otra hibridización y las condiciones de lavado son conocidas y ejemplificadas en Sambrook et al Clonación molecular Un manual de laboratorio Segunda edición Cold Spring Harbor NY (1989) particularmente el capítulo 11

[32] Alternativamente los genes codificadores ParG o partes de estos también pueden ser separados mediante técnicas basadas en PCR utilizando como oligonucleótidos cebadores por lo menos 20 nucleótidos consecutivos de una

secuencia de nucleótidos de los genes codificadores PARG mencionados o su complemento. Dichos cebadores pueden incluir una secuencia de nucleótidos que codifican una región conservada tal como se mencionó anteriormente o ser complementarios a una secuencia de nucleótidos. Los oligonucleótidos que pueden ser utilizados para este propósito pueden incluir la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7 o SEQ ID No 8. Los oligonucleótidos que pueden ser utilizados también pueden ser degenerados tales como los cebadores oligonucleótidos de la SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 19, SEQ ID No 20, SEQ ID No 21 o SEQ ID No 22.

[33] Fragmentos de PCR específicos de los genes ParG, por ejemplo, pueden ser obtenidos utilizando combinaciones de oligonucleótidos que tengan la secuencia de nucleótidos SEQ ID No 5 y SEQ ID No 6, utilizando por ejemplo ADN o cDNA genómico de *Arabidopsis* como plantilla del ADN, o utilizando combinaciones de oligonucleótidos que tengan la secuencia de nucleótidos SEQ ID No 7 y SEQ ID No 8, utilizando por ejemplo ADN o cDNA genómico de papa como una plantilla de ADN, bajo condiciones de plantillaje severas.

[34] Las secuencias separadas pueden codificar una proteína PARG funcional o una parte de ella. Preferiblemente, las secuencias separadas deben incluir la codificación de una secuencia de nucleótidos para una o más regiones altamente conservadas del dominio catalítico de las proteínas PARG tal como se menciona en otra parte.

[35] Sin embargo para el propósito de la invención no se requiere que las secuencias separadas codifiquen una proteína ParG funcional ni que se aisle una región de codificación completa. De hecho todo lo que se requiere para la invención es que un gen quimérico puede ser designado o producido con base en la secuencia identificada o separada del gen ParG endógeno de una planta el cual es capaz de producir un RNA inhibidor ParG. Varios métodos alternativos están disponibles para producir dicha molécula de RNA inhibidora ParG.

[36] En una personificación la molécula de RNA inhibidora que codifica el gen quimérico está basada en la tecnología anti sentido. En otras palabras la región codificadora del gen quimérico incluye una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos del complemento de la secuencia de nucleótidos del gen ParG endógeno de la célula de la planta o de la planta la expresión desde la cual se pretende ser reducida. Dicho gen quimérico puede ser construido convenientemente mediante la vinculación operable de un fragmento de ADN que incluya por lo menos 20 nucleótidos del gen ParG separado o identificado o parte de dicho gen en orientación inversa hasta un promotor expresible de la planta y la región de formación final involucrada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación. Será inmediatamente claro que no existe la necesidad de conocer la secuencia exacta de nucleótidos o la secuencia completa de nucleótidos de dicho fragmento de ADN de un gen ParG separado.

[37] En otra personificación la molécula de RNA inhibidora ParG que codifica el gen quimérico se basa en la llamada tecnología de co supresión. En otras palabras la región codificadora del gen quimérico incluye una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos del gen ParG endógeno de la célula de la planta o de la planta la expresión que se pretende reducir. Dicho gen quimérico puede ser convenientemente construido mediante la vinculación operablemente de un fragmento de ADN que incluye por lo menos 20 nucleótidos del gen ParG separado o identificado o parte de dicho gen en orientación directa a un promotor expresible de la planta y la región de formación final 3 involucrada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación. Nuevamente no se requiere conocer la secuencia de nucleótidos exacta del fragmento de ADN utilizado del gen ParG separado.

[38] La eficacia de los genes quiméricos antes mencionados en la reducción de la expresión del gen ParG endógeno además puede ser mejorado mediante la inclusión de elementos de ADN que resulta en la expresión de la molécula de RNA inhibidora ParG aberrante y despoliadenilada. El elemento del ADN apropiado para ese propósito es una región de ADN que codifica una ribozima auto empalmadora tal como se describe en WO 00/01133.

[39] La eficacia de los genes quiméricos antes mencionados en la reducción de la expresión del gen ParG endógeno de una célula de la planta también puede ser mejorada mediante la inclusión en una célula de planta simultáneamente de

un gen quimérico tal como se describe para codificar una molécula de RNA inhibidora ParG anti sentido y un gen quimérico tal como es aquí descrito para codificar una molécula de RNA inhibidora ParG anti sentido y un gen quimérico para codificar una molécula de RNA inhibidora de sentido en donde dicha Molécula de RNA inhibidora ParCs anti sentido y de sentido son capaces de formar una región de RNA de doble enlace con base en el apareamiento entre los mencionados 20 nucleótidos consecutivos tal como se describe en WO 99/53050

[40] Como se describió en WO 99/53050 las regiones de RNA inhibidoras ParG de sentido y antisentido capaces de formar una región de RNA de doble ramificación pueden estar presentes en una molécula de RNA preferiblemente separadas por una región espacial

La región espacial puede incluir una secuencia intron. Dicho gen quimérico puede ser construido convenientemente mediante la vinculación operablemente de un fragmento de ADN que incluye por lo menos 20 nucleótidos del gen ParG endógeno identificado o separado a la expresión del cual se pretende reducir en una repetición invertida a un promotor expresible de la planta y una región de formación final 3 involucrada en la terminación de la transcripción y poliadenilación. Para lograr la construcción de dicho gen quimérico se puede hacer uso de los vectores descritos en WO02/059294

[41] Una personificación de la invención además concierne a un método para la

obtención de una línea de plantas tolerantes al estrés incluyendo los pasos de

Suministro de células de plantas con un gen quimérico para crear células de plantas transgénicas en donde el gen quimérico incluye los siguientes fragmentos de ADN vinculados operablemente

- un promotor expresible de la planta
- una región de ADN la cual cuando es transcrita produce una molécula de RNA inhibidora ParG que incluye una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos del gen ParG presente en dicha célula de la planta o
- una región del ADN la cual cuando es transcrita produce una molécula de RNA inhibidora ParG que incluye una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos del complemento de la secuencia de nucleótidos del gen ParG presente en dicha célula de la planta
- una región del ADN la cual cuando es transcrita produce una Molécula de RNA inhibidora ParG que incluye una región de sentido que incluye una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos del gen ParG presente en dicha célula de la planta y una región anti sentido que incluye a secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos del complemento de la secuencia de nucleótidos del gen ParG presente en dicha célula de la planta en donde dichas regiones de sentido y anti sentido pueden formar una región de RNA de doble ramificación que incluye dichos por lo menos 20 nucleótidos consecutivos

- Una region final 3 involucrada en la terminacion de la trascripción y poliadenilación
- Regeneracion de una poblacion de lineas de plantas transgenicas desde dicha celula de planta transgénica e
- Identificacion de una planta tolerante al estrés dentro de dicha poblacion de lineas de plantas transgénicas

[42] Como se utiliza aqui incluyendo interpreta en forma de especificación la presencia de las características numeros enteros pasos o componentes declarados en la forma referida en pero sin excluir la presencia o adición de una o más características numeros enteros pasos o componentes o grupos de estos Además por ejemplo un ácido nucleico o proteína que incluye una secuencia de nucleótidos o aminoácidos puede incluir más nucleótidos o aminoácidos que los citados realmente por ejemplo ser personificado en un ácido nucleico más grande o proteína Un gen quimérico que incluye una región de ADN la cual es funcionalmente y estructuralmente definida puede incluir regiones de ADN adicionales etc

[43] Además será claro que la secuencia mínima de nucleótidos de la region del RNA de sentido o anti sentido de aproximadamente 20nt de la region codificadora ParG puede estar incluida dentro de una molecula de RNA mas grande variando en tamaño desde 20nt hasta una longitud igual al tamaño del gen objetivo

[44] Las regiones de los nucleótidos de anti sentido o de sentido ademas pueden ser de aproximadamente 2nt hasta aproximadamente 5000nt de largo tales como 2nt 40nt 50nt 100nt 200nt 300nt 500nt 1000nt 2000nt o inclusive cerca de 5000nt o más grande de longitud

[45] Mas aun para el proposito de la invencion no se requiere que la secuencia de nucleotidos de la molecula de RNA inhibidora ParG utilizada o la region codificadora del gen quimérico sean completamente identicas o complementarias al gen ParG endógeno expresion de la cual se pretende deducir en la celula de las plantas Entre más larga la secuencia menos severo es el requerimiento para la identidad de la secuencia global Ademas las regiones del sentido o del anti sentido pueden tener una identidad de secuencia general de aproximadamente 40% o 50% o 60 % o 70% o 80% o 90 % o 100% para la secuencia de nucleótidos del gen ParG endogeno o su complemento Sin embargo como se mencionó las regiones de anti sentido o sentido deben incluir una secuencia de 20 nucleótidos consecutivos que tengan una identidad de secuencia de aproximadamente 100% para la secuencia de nucleotidos del gen ParG endogeno Preferiblemente la dilatacion de la identidad de secuencia del 100 % debe ser de aproximadamente 50 75 o 100nt

[46] Para fines de esta invención la identidad de la secuencia de dos secuencias de nucleotidos relacionados expresados como un porcentaje se refiere al numero de posiciones en las dos secuencias alineadas optimamente las cuales tienen residuos iguales (x100) dividido por el numero de posiciones

comparadas Una brecha por ejemplo una aposición en una alineación en donde este presente un residuo en una secuencia pero no en el otro esta relacionado con una posición con residuos no idénticos La alineación de las dos secuencias es realizada mediante el algoritmo Needleman y Wunsch (Needleman and Wunsch 1970) La alineación de la secuencia asistida por computador puede ser realizada convenientemente utilizando un programa de software estándar tal como GAP el cual es parte de la Versión Wisconsin Package 10.1 (Genetics Computer Group Madison Wisconsin USA) utilizando la matriz de calificación predeterminada con un castigo de creación de brecha de 50 y un castigo de extensión de brecha de 3

[47] Será claro que siempre que las secuencias de nucleótidos de las moléculas del RNA sean definidas por referencia a la secuencia de nucleótidos de las moléculas de ADN correspondientes la timina (T) en la secuencia de nucleótidos debe ser reemplazada por uracil (U) Si se hace referencia a las moléculas de RNA o ADN será claro desde el contexto de la aplicación

[48] Además será claro que los genes quiméricos capaces de producir genes ParG inhibidores para un gen ParG en particular en una variedad de plantas particulares o especies de plantas también pueden ser utilizados para inhibir la expresión del gen ParG en otras variedades de plantas o especies de plantas De hecho cuando exista suficiente homología entre la región de RNA inhibidora ParG y el gen ParG o cuando los genes ParG compartan la misma dilatación de 19 nucleótidos expresión de estos otros genes también serán

reguladas

[49] En vista del papel potencial del ParG en el metabolismo de ácido nucleico se puede sacar ventaja de que la expresión del gen ParG endógeno mediante el RNA inhibidor ParG no es completamente inhibida. La disminución de la regulación de la expresión de un gen particular mediante el silenciamiento del gen a través de la introducción de un gen quimérico que codifica el RNA inhibidor ParG resultará en una población de diferentes líneas transgénicas mostrando una distribución de diferentes grados de silenciamiento del gen ParG. La población además contendrá líneas de plantas transgénicas individuales en donde el gen ParG endógeno es silenciado hasta el grado de silenciamiento requerido. Una persona con habilidades en arte puede identificar fácilmente dichas líneas de plantas por ejemplo mediante el sometimiento de líneas de plantas a una condición adversa particular como alta intensidad de la luz, estrés oxidativo, sequía, calor, etc. y seleccionando aquellas plantas que tienen un desempeño satisfactorio y sobreviven mejor al tratamiento.

[50] Tal como se utiliza en este documento, el término promotor denota cualquier ADN que sea reconocido y ligado (directamente o indirectamente) mediante un ADN dependiente RNA polimerasa durante la iniciación de la transcripción. Un promotor incluye el sitio de iniciación de la transcripción y los sitios de vinculación para los factores de iniciación de la transcripción y RNA polimerasa, y puede incluir muchos otros sitios (por ejemplo, mejoradores) en los cuales las proteínas reguladoras de la expresión se puedan vincular.

[51] El término *region reguladora* tal como se utiliza en este documento significa cualquier ADN que este involucrado en la conducción de la transcripción y que controle (por ejemplo regulando) el tiempo y el nivel de la transcripción de una secuencia de ADN dada tal como un codificador ADN para una proteína o polipeptido. Por ejemplo una *region reguladora de 5* (o *region promotora*) es una secuencia de ADN ubicada en la parte de arriba (por ejemplo 5') de una secuencia de codificación y que incluye el promotor y la secuencia líder 5' no trasladada. Una *region reguladora de 3* es una secuencia de ADN ubicada en la parte de abajo (por ejemplo 3') de la secuencia de codificación y que incluye la terminación apropiada de las señales de terminación apropiada de la transcripción (y /o regulación) incluyendo una o mas señales de la poliadenilación.

[52] En una personificación de la invención el promotor es un promotor constitutivo. En otra personificación de la invención la actividad del promotor es mejorada mediante el estímulo externo o interno (promotor inducible) tales como pero sin limitación de las hormonas, los compuestos químicos, impulsos mecánicos, condiciones de estrés abiótico o biótico. La actividad del promotor también puede ser regulada de una manera temporal o espacial (promotores específicos de tejido, promotores regulados desarrolladamente).

[53] Para fines de la invención el promotor es un promotor expresible de la planta. Tal como se utiliza en este documento el término *promotor expresible*

de la planta significa una secuencia de ADN capaz de controlar la transcripción en la célula de la planta. Esto incluye cualquier promotor de origen vegetal pero también cualquier promotor de origen no vegetal capaz de dirigir la transcripción en una célula vegetal por ejemplo ciertos promotores de origen bacteriano o viral tales como el CaMV35S (Hapster et al 1988) el promotor del virus del trébol subterráneo No 4 o No 7 (W09606932) o los promotores del gen T bNA sino también los promotores específicos del tejido o específicos de los órganos incluyendo sin limitación a los promotores específicos de la semilla (por ejemplo W089/03887) los promotores específicos de los órganos primordiales (An et al 1996) promotores específicos del vástago (Keller et al 1988) promotores específicos de las hojas (Hudspeth et al 1989) promotores específicos del mesófilo (tales como los promotores Rubisco inducibles de luz) promotores específicos de la raíz (Keller et al 1989) Promotores específicos del tubérculo (Keil et al 1989) promotores específicos del tejido vascular (Peleman et al 1989) promotores selectivos del estambre (W08/10396 WO 92/13956) promotores específicos de la zona de dehiscencia (WO 97/13865) entre otros

[54] Los métodos para la introducción de los genes quiméricos en las plantas son bien conocidos en el arte e incluyen la transformación mediada por *Agrobacterium*, liberación de pistolas de partículas, microinyección, electroporación de células intactas, transformación del protoplasto mediado por polietilenglicol, electroporación de protoplastos, transformación mediada por liposoma, transformación mediada por sílica, pelos de bigote, etc. Las células

transformadas obtenidas en esta forma luego pueden ser regeneradas en plantas fértiles maduras

[55] Las células de las plantas transgénicas y las líneas de plantas de acuerdo con la invención además puede incluir genes quiméricos que reduzcan la expresión de los genes PARP en la forma descrita en WO 00/04173. Estos genes quiméricos adicionales pueden ser introducidos por ejemplo mediante el cruce de líneas de plantas transgénicas de la invención actual con plantas transgénicas que contengan la expresión del gen PARP que reduce los genes quiméricos. Las células de plantas transgénicas o las líneas de plantas también pueden ser obtenidas mediante la introducción o transformación de los genes quiméricos de la invención en las células de plantas transgénicas que incluyan la expresión del gen PARP que reduce los genes quiméricos o viceversa. Alternativamente, las regiones del RNA inhibidoras PARP y PARG pueden ser codificadas mediante un gen quimérico y transcrito como una molécula de RNA.

[56] Los genes quiméricos de la invención (o las moléculas de RNA inhibidoras que les corresponden) también pueden ser introducidos en las células de las plantas de una manera migratoria por ejemplo utilizando vectores virales tales como vectores de RNA virales en la forma descrita en WO 00/63397 o WO 02/13964.

[57] Habiendo leído esta especificación será inmediatamente claro para el artesano entrenado que las células mutantes de la planta y las líneas de

plantas en donde la actividad PARC es reducida pueden ser utilizadas para el mismo efecto que las células de plantas transgénicas o líneas de plantas descritos en este documento. Los mutantes en el gen ParG de una célula de la planta o planta pueden ser identificados fácilmente utilizando métodos de escaneografía o conocidos en el arte en donde la mutagenesis química tales como por ejemplo mutagenesis de EMS se combina con los métodos de detección sensitivos (tales como por ejemplo desnaturalización del HPLC). Un ejemplo de dicha técnica es el método llamado Lecciones locales inducidas objetivas en genomas tal como se describe en McCallum et al. *Plant Physiology* 123 439-442 o WO 01/75167. Sin embargo otros métodos para detectar las mutaciones en regiones particulares del genoma o inclusive alelos también están disponibles e incluyen la escanografía de las bibliotecas de líneas de plantas mutantes de inserción existentes o recién generadas en donde los grupos de ADN genómico de estas líneas de plantas mutantes son sometidos a la ampliación PCR utilizando cebadores específicos para el fragmento de ADN insertado y cebadores específicos para la región genómica o alelo en donde se espera la inserción (ver por ejemplo Maes et al. 1999 *Trends in Plant Science* 4 pp 90-96).

[58] Las líneas de células de la planta y las líneas de plantas también pueden ser sometidas a mutagenesis mediante la selección por resistencia a los inhibidores ParG tales como las gallotanninas (Ying et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98(21) 12227-12232; Ying W, Swanson R A (2000) *NeuroReport* 11(7) 1385-1388).

[59] Además en el arte están disponibles métodos para identificar las células de las plantas y las líneas de plantas que incluyen una mutación en el gen ParG. Esta población de células mutantes o líneas de plantas luego pueden ser sometidas a diferentes estrés abióticos y su fenotipo o supervivencia pueden ser fácilmente determinados. Adicionalmente el contenido de NAD y/o ATP de las células estresadas pueden ser determinados y comparados con los resultados de dichas determinaciones de las células no estresadas. En células tolerantes al estrés la reducción del contenido de NAD bajo condiciones de estrés cuando es comparado con células no estresadas debe ser más bajo que las células de control correspondientes.

[60] Además un objeto de la invención es proporcionar células de plantas y plantas que contengan los genes quiméricos o las moléculas de RNA de acuerdo con la invención. Gametos, semillas, embriones, cigotos o somáticos, linaje o híbridos de plantas que incluyan los genes quiméricos de la presente invención, los cuales son producidos mediante métodos de producción tradicional también están incluidos dentro del alcance de la presente invención.

[61] Las plantas obtenidas mediante los métodos aquí descritos también pueden ser cruzados a través de técnicas de producción tradicionales con otras plantas para obtener plantas de linaje tolerantes al estrés que incluyan los genes quiméricos de la presente invención.

[62] Se cree que los metodos y medios aqui descritos son apropiados para todas las celulas de las plantas y las plantas celulas de plantas dicotiledoneas y monocotiledoneas incluyendo sin limitacion el algodón los vegetales Brassica aceite de semilla trigo maiz o mazorca cebada alfalfa mani girasol arroz caña de azucar soya pasto cebada centeno sorgo caña de azucar vegetales (incluyendo chicoria lechuga tomate calabacin pimenton berenjena cohombro melon cebolla puerro) tabaco papa remolacha azucarera papaya pina mango *Arabidopsis (hal/lana* pero tambien las plantas utilizadas en horticultura floricultura o selvicultura (alamo abeto eucalipto etc)

[63] Los siguientes ejemplos sin limitacion describen el metodo y los medios para incrementar la tolerancia al estres en las plantas de acuerdo con la invención

[64] A menos que sea declarado en otra forma en los ejemplos todas las tecnicas de ADN recombinante son llevadas a cabo de acuerdo con los protocolos estándar tal como es descrito en Sambrook et al (1989) Clonacion Molecular Un manual de laboratorio segunda edición Cold Spring Harbor Laboratory Press NY y en volumenes 1 y 2 de Ausubet et at (1994) Protocolos actuales en biologia molecular Protocolos actuales USA Materiales y metodos estandar para el trabajo molecular de la planta son descritos en Plant Molecular Biology Labfax (1993) by R D D Croy publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd (UK) y Blackwell Scientific Publications UK Otras

referencias para las técnicas de biología molecular estandar incluyen Sambrook y Russell (2001) Clonación molecular Un manual de laboratorio Tercera edición Cold Spring Harbor Laboratory Press NY volúmenes 1 y 2 (I de Brown (1998) Biología molecular LabFax segunda edición Academic Press (UK) Materiales y métodos estandar para reacciones en cadena de la polimerasa pueden ser encontradas en Dieffenbach y Dveksler (1995) Cebador PCR Un manual de laboratorio Cold Spring Harbor Laboratory Press y en McPherson et al (2000) PCR Fundamentos desde los antecedentes hasta Bench primera edición Springer Verlag Alemania

[65] Mediante la descripción y los ejemplos la referencia es hecha con las siguientes secuencias

[66] SEQ ID N 1 la secuencia de aminoácidos de la proteína ParG de la *Arabidopsis thaliana*

[67] SEQ ID N 2 secuencia de aminoácidos de parte de la proteína ParG del *Solanum tuberosum*

[68] SEQ ID N 3 secuencia de nucleótidos que codifica la proteína ParG de la *Arabidopsis thaliana*

[69] SEQ ID N 4 secuencia de nucleótidos que codifica la parte de la proteína ParG de la *Solanum tuberosum*

[70] SEQ ID N 5 secuencia de nucleótidos de un cebador oligonucleótido apropiado para amplificación del PCR de parte de un fragmento de ADN codificador de la proteína ParG

[71] SEQ ID N 6 secuencia de nucleótidos de un cebador oligonucleótido

apropiado para amplificación del PCR de parte de un fragmento de ADN codificador de la proteína ParG

[72] SEQ ID N 7 secuencia de nucleótidos de un cebador oligonucleótido apropiado para amplificación del PCR de parte de un fragmento de ADN codificador de la proteína ParG

[73] SEQ ID N 8 secuencia de nucleótidos de un cebador de oligonucleótido apropiado para amplificación del PCR de parte un fragmento de ADN codificador de la proteína ParG

[74] SEQ ID N 9 secuencia de nucleótidos del vector 1 ADN que contienen la expresión ParG que reduce el gen quimerico con base en la secuencia del gen ParG *de la Arabidopsis*

[75] SEQ ID N 10 secuencia de aminoácidos de la secuencia conservada de 1 de las proteínas PARG

[76] SEQ ID N°11 secuencia de aminoácidos de la secuencia conservada 2 de las proteínas PARG

[77] SEQ ID N 12 secuencia de aminoácidos de la secuencia conservada 3 de las proteínas PARG

[78] SEQ ID N 13 secuencia de aminoácidos de la secuencia conservada 4 de las proteínas PARG

[79] SEQ ID N 14 secuencia de aminoácidos de la secuencia conservada 5 de las proteínas PARG

[80] SEQ ID N 15 secuencia de nucleótidos de la proteína ParG de la *Oryza sativa*

[81] SEQ ID N 16 secuencia de aminoácidos de la proteína ParG de la

Oryza sativa

[82] SEQ ID N° 17 secuencia de nucleotidos de un cebador oligonucleotido PG1 apropiado para la amplificación de PCR de parte de un fragmento de ADN codificador de la proteína ParG

[83] SEQ ID N 18 secuencia de nucleotidos de un cebador oligonucleotido PG2 apropiado para amplificación del PCR de parte de un fragmento de ADN codificador de la proteína ParG

[84] SEQ ID N 19 secuencia de nucleótidos de un cebador oligonucleotido PG3 apropiado para amplificación de PCR de parte de un fragmento de ADN codificador de la proteína ParG

[85] SEQ ID N 20 secuencia de nucleotidos de un cebador oligonucleotido PG4 apropiado para amplificación de PCR de parte de un fragmento de ADN codificador de la proteína ParG

[86] SEQ ID N 21 secuencia de nucleotidos de un cebador oligonucleotido P05 apropiado para amplificación del PCR de parte de un fragmento de ADN codificador de la proteína ParG

[87] SEQ ID N 22 secuencia de nucleotidos de un cebador oligonucleotido PG6 apropiado para amplificación del PCR de parte de un fragmento de ADN codificador de la proteína ParG

[88] SEQ ID N 23 secuencia de nucleotidos codificadora de la proteína ParG de la *Zea mays*

[89] SEQ ID N 24 secuencia de nucleotidos de un vector T ADN que incluya un gen quimérico capaz de reducir la expresión PARC

[90] SEQ ID N 25 secuencia de nucleotidos de un vector T ADN que incluye

un gen quimerico capaz de reducir la expresion PARG

[91] Ejemplos

Ejemplo 1 Analisis de la influencia del estres sobre la eficiencia de la produccion de energia de las lineas de plantas tolerantes al estres que contienen la expresion del gen PARG que reduce los genes quimericos

[92] Los hipocotileos de las plantas *Brassica napus* transgenicas que incluyen una expresion del gen PARG que reduce los genes quimericos en la forma descrita en WO 00/04173 fueron cultivados durante 5 dias sobre un medio de crecimiento. Los explantes luego fueron transferidos a un medio liquido que incluye 30 mg/L de aspirina o acido acetilsalicilico (resultando en condiciones de estrés oxidativo) durante un dia. En experimentos de control los hipocotileos de la planta *Brassica napus* no transgenicas N90 740 fueron cultivados en el mismo medio de crecimiento y luego fueron incubados durante un dia en un medio liquido que contiene 30 mg/L de aspirina. Ademas los hipocotileos de la linea transgenica y de la linea de control fueron cultivados en el mismo medio de crecimiento sin aspirina.

[93] Despues del periodo de cultivo, el contenido de ATP de 25 explantes fue determinado para cada experimento. Adicionalmente se determino el oxigeno consumido en 3 horas por los 125 explantes. Los resultados se resumen en la Tabla 1. El error estandar del medio fue de menos del 6%. Considerando que la proporcion de moles ATP por mg de oxigeno consumido en las plantas de

control disminuyo en las plantas de control cuando se aplicó estrés oxidativo La misma proporcion en las lineas de plantas transgenicas tolerantes al estres realmente se incremento bajo condiciones de estres y fue considerablemente más alta (aproximadamente 24%) que en las plantas de control Las lineas transgénicas resistentes al estres también mantuvieron una eficiencia de produccion de energia constante considerando que las lineas de control presentaron una disminucion en la eficiencia de la producción de energia Además la produccion de superoxido expresado como un porcentaje de la produccion de superóxidos en las plantas de control no fue sometida al estres oxidativo no se incremento en las plantas tolerantes al estres sometidas a condiciones de estres

[94] Tabla 1 Influencia del estres sobre la eficiencia de la producción de energia de explanes de hipocotileos de Brassica napus cultivados durante 5 dias

Línea de planta	Estres	moles ATP por 125 explanes	02 mg/L consumidos en 3 horas por 125 explanes	mg	Superoxido producido
				consumidos	
N90 740 (control)	Ninguno	12 4x O ´	2 96 4 06	4 19x10 ´	100%
	30mg/L aspirina	13 2 x10 7		3 25x10 7	167%
Línea transgénica	Ninguno	9 3 x 10 ´	2 33	3 99 x 10 ´	108%

	30mg/L aspirina	11.4×10^{-7}	2.82	4.04×10^{-7}	100%
--	--------------------	-----------------------	------	-----------------------	------

•

[95] En otro experimento el NAD^+ y el contenido ATP de 4 líneas diferentes de *Arabidopsis* transgénicas que incluyen la expresión del gen PARP que reduce los genes quiméricos tal como se describe en WO 00/04173 fueron determinadas sobre condiciones de luz alta y baja y fue comparado con los valores obtenidos para una línea de control no transformada bajo las mismas condiciones. Las 4 líneas presentaron diferentes grados de resistencia al estrés tal como fue evidenciado por ejemplo mediante su habilidad para resistir condiciones de calor y/o sequía. Los valores obtenidos para los contenidos de NAD and ATP bajo estrés de luz alta son expresados como porcentaje de los valores para los contenidos de NAD^+ y ATP bajo condiciones de luz baja y son trazados en la figura 2.

[96] Los resultados muestran que el estrés de luz alta conlleva a una reducción significativa del NAD en las células de las plantas de control y en la línea de plantas transgénicas que son menos resistentes al estrés. Las líneas de plantas transgénicas más resistentes al estrés son la reducción del NAD menos significativa bajo condiciones de estrés de luz alta.

(97) En otro experimento el contenido de NAD^+ y ATP de una población de segregación que resulta de un cruce entre las líneas de maíz transgénicas que incluyen la expresión del gen PARP que reduce los genes quiméricos en la

forma descrita en WO 00/04173 y una linea de maiz no transformada fueron determinadas bajo condiciones de agotamiento de nutrientes (nitrogeno) y comparado con los valores obtenidos para una linea de control no transformada bajo las mismas condiciones. La figura 3 es una representacion gráfica de los resultados obtenidos. Las linea hemicigota o acigota fueron discriminadas mediante la verificación de la presencia de un gen marcador seleccionable. El contenido de NAD⁺ y ATP fue significativamente mas alto en los hemicigotos de las plantas tolerantes al estres que en las plantas de control no transformadas o las plantas acigoto.

Ejemplo 2 Construcción de la expresión del gen ParG que reduce los genes quimericos

[98] Para reducir la expresión del gen PARG por ejemplo en las plantas *Arabidopsis* y relacionadas se construyó un gen quimérico capaz de expresar un dsRNA que incluye tanto una región de sentido como una anti sentido que pueden formar un RNA de doble ramificación. Dicho dsRNA es muy efectivo en la reducción de la expresión de los genes con los cuales comparte la homología de la secuencia mediante el silenciamiento post transcripcional. El gen quimérico incluye los siguientes fragmentos de ADN:

Una region promotora del virus Cauliflower mosaic (CaMV 35S)

Un fragmento de ADN que incluya 163bp del gen ParG de la *Arabidopsis thaliana* en orientación directa (numero de acceso Genbank AF394690 de la posición del nucleotido 973 a 1135)

Un fragmento de ADN que codifica el intron 2 del gen pdk de la *Flaveria*

El fragmento del ADN que incluye 163 bp del gen ParG de la *Arabidopsis thaliana* en orientación invertida (Número de acceso Genbank AF394690 de la posición del nucleótido 973 a 1135)

Un fragmento del final no trasladado 3' del gen sintetasa octopina de la *Agrobacterium tumefaciens*

[99] Este gen quimérico fue introducido en un vector 1 ADN entre las secuencias de los bordes izquierdo y derecho del T ADN junto con un gen marcador seleccionable que ofrece resistencia a la fosfinoticina herbicida

[100] Para reducir la expresión del gen PARG por ejemplo en las papas y en las plantas relacionadas se construye un gen quimérico capaz de expresar un dsRNA que incluye tanto una región de sentido como de anti sentido de una secuencia de cADN de la papa que es capaz de codificar una proteína que tenga una identidad de secuencia alta con la parte N terminal de la proteína PARG del *Arabidopsis*. El gen quimérico incluye los siguientes fragmentos de ADN

Una región promotora del virus Cauliflower mosaic (CaMV 35S)

Un fragmento del ADN que incluye una secuencia de por lo menos 100 bp del ParG homólogo del *Solanum tuberosum* en orientación directa (Número de acceso Genbank BE340510)

Un fragmento de ADN que codifica el intrón 2 del gen pdk de *Flaveria*

El fragmento de ADN que incluye la secuencia de por lo menos 100 bp del ParG homólogo de la *Solanum tuberosum* en orientación invertida (Número

de acceso Genbank BE340510)

Un fragmento del extremo no trasladado 3' del gen sintetasa octopina del *Agrobacterium tumefaciens*

[101] Este gen quimérico se introduce en un vector T ADN entre las secuencias de los bordes izquierdos y derechos del T ADN junto con un gen marcador seleccionable que proporciona resistencia a la fosfinotricina herbicida

Ejemplo 3 Análisis de las líneas de plantas transgénicas que incluyen la expresión del gen ParG que reduce los genes quiméricos

[102] Los genes quiméricos del Ejemplo 2 son introducidos en un *Arabidopsis* o papa respectivamente mediante la transformación mediada del *Agrobacterium*

[103] La población de las líneas transgénicas obtenidas se sometió a las siguientes condiciones de estrés junto con las plantas de control

Calor incrementado durante un periodo de días (invernáculo) u horas (in vitro)

Sequía durante un periodo de días

Condiciones de luz alta durante un periodo de días

[104] Se seleccionaron líneas de plantas individuales que sobreviven bien a las

condiciones de estrés antes mencionadas

[105] El contenido de NAD y el contenido de ATP para las plantas antes mencionadas son determinados bajo condiciones de control y estrés

Ejemplo 4 Determinación cuantitativa de NAD ATP y radicales superóxidos en células de plantas

[106] La cuantificación del ATP en los tejidos de las plantas fue realizada básicamente en la forma descrita por Rawlyer et al (1999) Plant Physiol 120 293 300 El ensayo fue utilizado para la determinación del contenido de ATP de los explantes de hipocotileos que fueron cultivados durante 4 5 días o medio A2S3 o 2 semanas en plantas *Arabidopsis* cultivadas in vitro Todas las manipulaciones fueron realizadas sobre hielo triturado a menos que se indicara en otra forma

[107] Extracción del ATP

- Congelar el material de la planta con nitrógeno líquido
 - 100 explantes de hipocotileo
 - $\pm$ 700mg plantas *Arabidopsis* (raíces + retoños)
(aproximadamente 32 37 plantas C24 de 18 días)
- Colocar los hipocotileos congelados en el mortero y agregar 6ml de ácido perclórico al 6%
- Se puede hacer la extracción a temperatura ambiente utilizando un

majadero Después de la extracción colocar las muestras lo más pronto posible en hielo

- Centrifugar a 24 000g (Sorvall rotor SS34 a 14 000rpm) durante 10min a 4 °C
- El supernatante es neutralizado con 5M K_2CO_3 (agregar 350µl de 5M K_2CO_3 hasta 3ml de supernatante)
- El $KClO_4$ es retirado mediante el hilado en la forma descrita anteriormente

[108] Determinación bio luminiscente cuantitativa del ATP

Se utiliza el kit de prueba bio luminiscente del ATP de Sigma (FL AA)

Diluir el extracto 6000 x (aproximadamente 6mL de extracto desde el cual se toman 100µl diluido 1000 veces) Las diluciones se hacen con el bufer de la dilución de la mezcla de la prueba del ATP (FL AAB) del kit de prueba bio luminiscente del ATP

La cantidad de luz que es producida se mide con el Luminómetro TD 20/20 de Turner Designs (Sunnyvale USA)

Curva estándar disolver ATP estándar del kit (FL AAS) en 10ml de agua (2×10^6 moles)

[109] Se realizó la cuantificación del NAD^+ y del NADH en los tejidos de las plantas esencialmente en la forma descrita por Karp et al (1983) o Filipovic et al (1999) sobre el siguiente material de la planta

Brassica napus 150 muestras/explanos de hipocotileo cultivados 5 días

Arabidopsis 1000mg de plantas crecidas in vitro de 18 dias (retoños +
raíces)/muestra (corresponde a ± 60 plantas C24)

[110] Solucion de prueba

(A) Para medir el NADH 25mM bufer de fosfato de potasio con pH7
0 1mM DIT
3pM FMN (Fluka 83810)
30 μ M n decanal (Sigma D 7384)

(B) Para medir el NAD⁺ + NADH

Ídem como para medir NADH solo +2pg/mL
deshidrogenasa de alcohol (Roche 102 717)

[111] Extraccion

Congelar con nitrogeno liquido

Colocar material de planta congelado en un mortero frio (enfriado a -20 °C) y
agregar 5mL bufer de la extraccion

Moler el material utilizando un majadero

Centrifugar a 24 000g (Sorvall rotor SS34 a 14000rpm) durante 15 minutos
a 4°C

Tomar 1mL de supernatante para analisis

[112] Ensayo

NADH

390 μ L de solucion de ensayo A

- +10µL de extracto
- + 2 µL NAD(P)H FMN oxidoreductasa
- + 100 µL solución luciferasa

NAD⁺ + NADH

- 390µL de solución de prueba B
- +10µL de extracto
- 2 minutos a temperatura ambiente
- + 2µL NAD(P)H FMN oxidoreductasa
- + 100µL de solución luciferasa

La cantidad de luz producida es medida con el luminómetro TD 20/20 de Turner Designs (Sunnyvale USA)

NADH estándar

Solución de almacenamiento de NADH 1mM (7 mg/10mL H₂O)

NADH sal disodio Roche 107 735

Serie de dilución en 10mM de buffer de fosfato de potasio pH7 (102) 5×10^{-3}

2×10^{-3} 10^{-3} 5×10^{-4}

Agregar 10µL de diluciones en 390µL de solución de ensayo A y llevar a cabo la reacción

Hacer una curva estándar

,

[1131 La producción de radicales de superóxidos fue medida mediante la cuantificación de la reducción del XTT tal como es descrito en De Block y De Brouwer (2002) Plant Physiol Biochem 40 845 852

[114] BRASSICA NAPUS

[115] Medios y buferes de reaccion

Medio de siembra (medio 201)

Sales de Murashige y Skoog medio concentradas

2% sucrosa

pH 5.8

0.6% agar (Difco Bacto Agar)

250mg/l triacilina

Callos que inducen el medio A2S3

Medio MS 0.5g/l Mes (pH 5.8) 3% sucrosa 40mg/L adenina SO_4 0.5%

agarosa 1mg/l 2,4-D 0.25mg/l NAA 1mg/l BAP 250mg/l triacilina

Medio de incubación

25mM bufer K fosfato pH5.8

2% sucrosa

1 gota Tween20 para 25ml del medio

Bufer de reacción

50mM K bufer fosfato pH7.4

1 mM sodio 3-[1-[fenilamino carbonil]-3,4-tetrazolio]bis(4-metoxi-6-nitro) = XTT (bts Alemania cat n° 2525)

1 gota de Tween20 por 25ml de bufer

[116] Esterilizacion de las semillas – pre germinacion de las semillas

crecimiento de las plantas de semilleros Las semillas son empapadas en etanol al 70% durante 2min luego surfacesterilizados durante 15 mm en una solución de hipoclorito de sodio (con aproximadamente cloruro activo al 6%) que contenga 0.1% Tween20 Finalmente las semillas son enjuagadas con 1lt de agua de llave esteril Incubar las semillas durante aproximadamente una hora en agua de llave esteril (permitir la difusion de las semillas de los componentes que pueden inhibir la germinacion) Las semillas son colocadas en frascos elenmeyer de 250mL que contengan 50mL de agua de llave esteril (+ 250mg/l triaciUin) Agitar durante aproximadamente 20 horas Las semillas desde las cuales el radical es producido son colocadas en contenedores in Vitro Vent de Duchefa que contengan aproximadamente 125mL de medio de siembra (10 semillas/vaso no muchas para reducir la pérdida de la semilla debido a la contaminacion) Las semillas son germinadas a $\pm 24^{\circ}\text{C}$ y 10 30 Einstein/s¹m² con un dia de 16 horas

[117] Precultivar los explanes de hipocotileos e inducir el estres

12-14 dias después de la siembra los hipocotileos son cortados en aproximadamente 7-10mm segmentos

Los explanes de hipocotileos (25 hipocotileos/Optilux Petridish Falcon S1005 Denmark) son cultivados durante 5 dias en el medio A2S3 a 25 °C (a 10 300 Einstein/s¹m²)

(118) XTT prueba

Transferir 150 explanes de hipocotileos a un tubo Falcon de 50mL

Lavar con bufer de reaccion (sin XTT)

Agregar 20mL de bufer de reaccion + XTT

(Los explanes deben ser sumergidos pero no infiltrar al vacio)

Incubar en la oscuridad a 26 C durante aproximadamente 3 horas

Medir la absorción del medio de reacción a 470nm

[119] *ARABIDOPSIS THALIANA*

[120] Medios y buferes de reaccion

Medio de la planta

Sales de Murashige y Skoog medio concentrados

Vitaminas B5

1 5% sucrosa

pH 5.8

0.7% agar Difco

Medio de incubacion

10mM bufer K fosfato pH5.8

2% sucrosa

1 gota de Tween20 por 25mL de bufer de reacción del medio

50mM bufer K fosfato buffer pH7.4

1 mM sodio 3-[4-(fenilamino carbonil)-3,4-tetrazolio]bis(4-metoxi-6-nitro) = XTT (bts Alemania cat n 2525)

1 gota de Tween20 por 25mL de bufer

[121] Plantas *Arabidopsis*

Lineas *Arabidopsis* control

Lineas a probar

Esterilización de las semillas de *Arabidopsis*

2mm de etanol al 70%

10 mm de blanqueador (cloruro activo al 6%) + 1 gota de ween 20 por
20mL de solución

Lavar 5 veces con agua de llave esteril

Pregerminación de las semillas

En 9cm Optilux Pefridishes (Falcon) que contengan 12mL de agua de
llave esteril

Luz baja toda la noche hasta 24 horas

Crecimiento de las plantas *Arabidopsis*

Las semillas son sembradas en discos de Cultivo de Tejido Intergid de Falcon
(nr 3025) que contengan ± 125 ml del medio de la planta 1 semilla/rejilla

Las plantas crecen a 24 C

$30 \mu\text{Einstein s}^{-1} \text{m}^{-2}$

16 horas luz – 8 horas de oscuridad

Durante aproximadamente 3 semanas (antes de enclavado)

[122] XTT prueba

Condición de control (sin estrés)

Recolección de retoños (raíces incluidas) de los platos de agar y colocarlos
directamente en un tubo Falcon de 50mL que contenga bufer de reacción (sin

XII)

Retoños estresados

Transferir los retoños a tubos Falcon de 50ml que contengan bufer de reaccion

(Sin XTT)

Remplazar el bufer de reacción con bufer que contenga XTT (40mL/tubo)

Los retoños deben ser sumergidos pero no infiltrar al vacío

Incubar en la oscuridad a 26 °C durante aproximadamente 3 horas

Medir la absorción del medio de reaccion a 470nm

[123] Se realizó la cuantificación de la respiración mediante la medición del consumo de oxígeno utilizando un electrodo polarográfico oscuro en la siguiente forma

[124] Material de la planta

Brassica napus

150 – 200 explantes de hipocotileos

Cultivado durante 5 días a 25 °C

(dr Ensayo de vigor del protocolo)

* 150 explantes error <10% 200 explantes error <6%

Arabidopsis

Para plantas C24 $\pm$ 1000mg* *in vitro* (retoños + raíces) (corresponde con ~50 de 18 días)

Pregerminar las semillas antes de sembrar

Crece durante 18 días a 24 °C

(dr Protocolo en crecimiento in Vitro de Arabidopsis)

* por error <8%

[125] Medio de incubación

Brassica napus

25mM buffer K fosfato pH 5.8

2% sucrosa

Tween20 (1 gota/25ml)

Arabidopsis

10mM buffer K fosfato pH 5.8

2% sucrosa

Tween20 (1 gota/25ml)

Antes de uso airear (saturar con oxígeno) bien el medio agitando por lo menos unas pocas horas

[126] Prueba

Colocar los explantes en botellas de vidrio de 100ml (Schott Alemania) llenadas con medio de incubación Colocar el mismo peso de retoños en cada botella ($\pm$ 700mg)

Llenar las botellas hasta rebosar y cerrar herméticamente (evitar las burbujas grandes de aire) 3114728001

Llenar también una botella con medio de incubación que no

contenga explanes (blanco)

Incubar a 24 C a luz baja durante 3 4 horas (*Brassica napus*) 3 horas (*Arabidopsis*)

Agitar suavemente durante la incubacion (evitar el agotamiento de oxigeno del medio y alrededor de los explanes)

Medir la concentración del oxigeno (mg/l) del medio de incubación utilizando un medidor de oxigeno disuelto mantenido con la mano (Cyberscan DO 310 Eutech Instruments Singapore)

mg/l oxigeno consumido = [oxigeno] blanco — [oxigeno] muestra

Ejemplo 5 Analisis de las lineas de plantas transgenicas que incluyen la expresi3n del gen ParG que reduce los genes quimericos

[127] Los genes quim3ricos del Ejemplo 2 fueron introducidos en las *Arabidopsis* nicotina del tabaco c v Petit Havana SRI mediante la transformacion mediada de la *Agrobacterium*

[128] Las semillas transg3nicas fueron germinadas sobre un medio con sales MS /2 vitaminas B5 1 5% sacarosa pH5 8 y 0 7% agar Difco Las semillas germinadas fueron sometidas a luz baja (flujo de foton fotosintetico de aproximadamente $30\mu\text{mol m}^{-1}\text{s}^{-1}$ durante 14 a 18 dias despues del cual la intensidad de la luz fue incrementada en aproximadamente 6 pliegues (flujo de foton fotosintetico de aproximadamente $190\mu\text{mol m}^{-1}\text{s}^{-1}$) Despues de 1 dia los contenidos de NAD y NADH fueron determinados utilizando el m3todo ciclico enzimático (Karp et al (1983) Anal Biochem 128 pp 175 180) Una parte de

las semillas fueron cultivadas además bajo condiciones de luz alta durante aproximadamente 3 días después de lo cual el daño fue medido. El daño fue visible a medida del oscurecimiento de las hojas jóvenes y la punta del retoño, blanqueamiento de las hojas viejas y retardación del crecimiento. Los resultados se resumen en la Tabla 1 para *Arabidopsis* y en la Tabla 2 para el tabaco.

129] Tabla 1 Analisis de Arabidopsis (Columbia) ±R indica que se observo alguna pigmentacion oscura ND no determinado

	Tolerancia a la luz alta	NAD+NADH contenido en 1 grama de tejido (10 ³ µM)	% de capacidad de reduccion de TTC vs control
Control no transgénico	S	17 3	100
Línea transgénica 9	R	28 2	ND
Linea transgénica 10	R	31 7	ND
Línea transgénica 11	±R	26 5	ND
Línea transgénica 12	S	19 4	ND
Línea transgénica 26	R	33 2	55
Línea transgénica 27	S	21 3	100
Linea transgénica 28	±R	26 5	75
Línea transgénica 29	S	17 7	102
Línea transgénica 30	R	28 3	66

[130] Tabla 2 Analisis del tabaco de nicotina c v Petit Havana SRi ±R indica que se observo alguna pigmentación oscura El R/S indica que el fenotipo de la resistencia no fue muy claro

	Tolerancia a la luz alta	% de la capacidad de reduccion del TTC vs control
Control no transgénico	S	100
Linea transgenica 1	R/S	88
Linea transgenica 2	±R	79
Linea transgenica	R	53

[131] Existe una correlacion positiva entre la resistencia al estres de la luz alta en las plantas transgénicas y el contenido de NAD+NADH de las celulas Una correlación inversa puede ser vista entre la capacidad de reduccion del TTC y la tolerancia a la luz alta

Ejemplo 6 Construccin de la expresion del gen ParG que reduce los genes quimericos apropiados para uso en plantas de cereal

[132] Para reducir la expresion del gen PARG por ejemplo en cereales tales como el arroz o el maiz (mazorca) y plantas relacionadas se construye un gen quimérico el cual es capaz de expresar un dsRNA que incluye una región de sentido y una de anti-sentido de secuencia de nucleotidos del arroz capaz de

codificar una proteína que tenga una identidad de secuencia alta con las secuencias de los nucleótidos de codificación de la proteína PARG. El gen quimérico incluye los siguientes fragmentos del ADN:

Una región promotora del virus Cauliflower mosaic (CaMV 35S)

Un fragmento del ADN que incluye una secuencia de por lo menos 100 bp del ParG homólogo de la *Oryza sativa* (SEQ ID No 15) en orientación directa

Un fragmento del ADN que codifica el intrón 2 del gen *pdk* de la *Flaveria*

Un fragmento del ADN que incluye una secuencia de por lo menos 100 bp del ParG homólogo de la *Oryza sativa* (SEQ ID No 15) en orientación invertida

Un fragmento del extremo no trasladado 3' del gen de sintetasa octopina de la *Agrobacterium tumefaciens*

[133] Este gen quimérico es introducido en un vector 1 ADN entre las secuencias del borde izquierdo y derecho del 1 ADN junto con un gen marcado seleccionable que proporciona la resistencia a por ejemplo la fosfinotricina herbicida

[134] Para reducir la expresión del gen PARG por ejemplo en cereales tales como el arroz y el maíz (mazorca) y plantas relacionadas se construyó un gen quimérico el cual es capaz de expresar un dsRNA que incluye tanto una región anti sentido como una de sentido de la secuencia de nucleótidos del arroz que es capaz de codificar una proteína que tenga una identidad de secuencia alta

con la proteína PARC que codifica las secuencias del nucleótido. El gen quimérico incluye los siguientes fragmentos del ADN:

Una región promotora del virus Cauliflower mosaic (CaMV 35S)

Un fragmento de ADN que incluye una secuencia de por lo menos 100 bp del PARC homólogo del *Zea mays* (SEQ ID No 23) en orientación directa

Un fragmento de ADN que codifica el intrón 2 del gen *pdk* de la *Flaveria*

Un fragmento de ADN que incluye una secuencia de por lo menos 100 bp del PARC homólogo de la *Zea mays* (SEQ ID No 23) en orientación invertida

Un fragmento del extremo no trasladado 3' del gen sintetasa octopina de la *Agrobacterium tumefaciens*

[135] Este gen quimérico se introduce en un vector 1 ADN entre las secuencias del borde izquierdo y derecho del T ADN junto con un gen de marcador seleccionable que ofrece resistencia a por ejemplo el fosfinotricina herbicida. La secuencia de nucleótidos de dos ejemplos de dichos vectores T ADN que incluyen dos genes quiméricos diferentes tal como se describen en el párrafo anterior se representó en SEQ ID Nos 24 y 25.

Ejemplo 7 Análisis de las líneas de plantas transgénicas que incluyen la expresión del gen PARC que reduce los genes quiméricos

[136] Los genes quiméricos del Ejemplo 6 son introducidos en el arroz y el maíz respectivamente mediante la transformación mediada de la *Agrobacterium*

[137] La poblacion de lineas transgénicas obtenidas se sometio a las siguientes condiciones de estres junto con las plantas de control

Calor incrementado durante un periodo de dias (invernaculo) u horas (in vitro)

Sequia durante un periodo de dias

Condiciones de luz alta durante un periodo de dias

Agotamiento de nutrientes

[138] Se seleccionaron lineas de plantas individuales que sobreviven bien a las condiciones de estrés antes mencionadas

[139] El contenido de NAD y el contenido de ATP para las plantas antes mencionadas se determinan bajo condiciones de control y estrés

Reivindicaciones

- 1 Un método para producir una tolerancia de la planta a las condiciones de estrés que incluyen los pasos de
 - (a) proporcionar a las células de las plantas un gen quimerico para crear las celulas de plantas transgenicas dicho gen quimerico incluye los siguientes fragmentos de ADN vinculados operablemente
 - (i) Un promotor expresible de la planta
 - (ii) Una region ADN la cual cuando es transcrita produce una Molécula de RNA inhibidora ParG
 - (iii) una región final 3 involucrada en la terminacion de la trascripción y poliadenilación
 - (b) Regeneracion de una poblacion de las lineas de plantas transgenicas de dichas celulas de plantas transgénicas e
 - (c) Identificacion de una linea de plantas tolerantes al estres dentro de dicha poblacion de lineas de plantas transgénicas
- 2 El método de acuerdo con la reivindicacion 1 en donde dicha molécula de RNA inhibidora ParG incluye una secuencia de nucleotidos de por lo menos 20 nucleotidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos del gen ParG presente en dicha célula de la planta
- 3 El método de acuerdo con la reivindicacion 1 en donde dicha molecula de RNA inhibidora ParG incluye una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleotidos consecutivos del complemento de secuencia de nucleótidos del gen

ParG presente en dicha célula de la planta

- 4 El método de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 en donde dicho gen quimerico además incluye una región de ADN que codifica un ribosoma auto empalmante entre dicha región de ADN que codifica dicha molécula de RNA inhibidora ParG y dicha región final 3
- 5 El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicho RNA inhibidor parG incluye una región de sentido que incluye una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos del gen ParG presente en dicha planta célula de la planta en donde dicha región de sentido y de anti sentido son capaces de formar una región de RNA de doble ramificación que incluye por lo menos dichos 20 nucleótidos consecutivos
- 6 El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 en donde dichas condiciones de estrés son seleccionadas entre calor sequia agotamiento de nutrientes estrés oxidativa o condiciones de luz alta
- 7 El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6 que incluyen el cruce adicional de dicha línea de plantas transgénicas con otra línea de plantas para obtener las plantas de linaje tolerantes al estrés
- 8 Un método para producir una planta tolerante a las condiciones de estrés

que incluyen los pasos de

- (a) Aislamiento de un fragmento de ADN de por lo menos 100 bp que incluyen una parte del gen de codificación parG de dicha planta
- (b) Producción de un gen quimérico mediante el enlace operable de los siguientes fragmentos de ADN
 - (i) una región promotora expresible de la planta
 - (ii) dicho fragmento de ADN separado que incluye la parte del gen codificador de dicha planta en orientación directa comparado con la región del promotor
 - (iii) dicho fragmento de ADN separado que incluye parte del gen codificador parG de dicha planta en orientación invertida comparado con la región promotora
 - (iv) una región final 3 involucrada en la terminación de la transcripción y la poliadenización
- (c) suministro de células de la planta con dicho gen quimérico para crear células de plantas transgénicas
- (d) regeneración de las líneas de plantas transgénicas de dicha célula de la planta transgénica e
- (e) identificación de la línea de plantas tolerantes al estrés dentro de dicha población de líneas de plantas transgénicas

9 Una molécula de ADN que incluye

- (i) un promotor expresible de la planta
- (ii) una región del ADN la cual cuando es trasladada produce una Molécula

de RNA inhibidora ParG

(iii) una region final 3 involucrada en la terminacion de la trascripcion y poliadenilación

10 La molecula de ADN de acuerdo con la reivindicacion 9 en donde dicha región del ADN incluye una secuencia de nucleótidos de por lo menos 21 a 100 nucleótidos de una secuencia de nucleotidos que codifica una proteina que incluye la secuencia de aminoacidos SEQ ID No 1 2 o 16 o por lo menos 21 a 100 nucleótidos de una secuencia de nucleotidos de SEQ ID 3 4 15 o 23

11 Una celula de la planta que incluye la molecula de ADN de la reivindicacion 9 o 10

12 Una planta que consiste principalmente de la reivindicacion 11

13 Un proceso para producción de plantas tolerantes al estres que incluye el paso de cruce adicional de una planta de la reivindicación 12 con otra planta

14 Las semillas y el material de propagacion de una planta de acuerdo con la reivindicacion 12 que incluye el gen quimerico de la reivindicacion 9 o 10

15 Las plantas obtenibles u obtenidas mediante el proceso de la reivindicacion 8

16 Un metodo para producir una planta tolerante a las condiciones del estres que incluye los pasos de

(a) proporcionar celulas de plantas con un gen quimérico para crear celulas de plantas transgénicas dicho gen quimérico que incluye los siguientes fragmentos de ADN vinculados operablemente

(i) Un promotor expresible de la planta

(ii) Una región del ADN la cual cuando es transcrita produce una molecula de RNA inhibidora ParG dicha region del ADN incluye una secuencia de nucleótidos de por lo menos 21 a 100 nucleotidos de una secuencia de nucleótidos que codifican una proteina que incluye la secuencia de aminoácidos SEQ ID No 1 2 o 16 o por lo menos 21 a 100 nucleotidos de una secuencia de nucleotidos SEQ ID3 4 15 o 23

(iii) una region final 3 involucrada en la terminacion de la trascripcion y la poliadenilacion

(b) regeneración de una población de lineas de plantas transgénicas de dicha celula de la planta transgenica e

(c) identificación de una linea de plantas tolerante al estrés dentro de dicha poblacion de lineas de plantas transgénicas

17 Un metodo para producir una planta tolerante a las condiciones del estrés que incluyen los pasos de

(a) sometimiento de una linea de celulas de la planta o una planta o linea de plantas a la mutagenesis

(b) identificacion de aquellas células de las plantas o plantas que tienen

una mutacion en un gen ParG endógeno

(c) sometimiento de las células de la planta identificada o plantas a condiciones de estrés

(d) identificación de las células de las plantas o plantas que toleran dichas condiciones de estrés mejor que las plantas de control

18 Un método para producir una planta tolerante a las condiciones de estrés que incluyen los pasos de

(a) selección de una línea de células de planta o una planta o línea de plantas resistentes a un inhibidor ParG

(b) identificación de aquellas células de la planta o plantas que tienen una mutación en un gen ParG endógeno

(c) sometimiento de las células de la planta identificadas o plantas a condiciones de estrés

(d) identificación de las células de las plantas o plantas que toleran dichas condiciones de estrés mejor que las plantas de control

19 Una célula de la planta o plantas tolerantes al estrés que incluyen una mutación en un gen ParG endógeno

RESUMEN

Los metodos y medios son suministrados para incrementar la tolerancia de las plantas al estres abiotico o a las condiciones adversas sequia limitaciones de nutrientes temperatura entre otros mediante la reduccion de la actividad de los endogenos de las proteinas PARG en las plantas

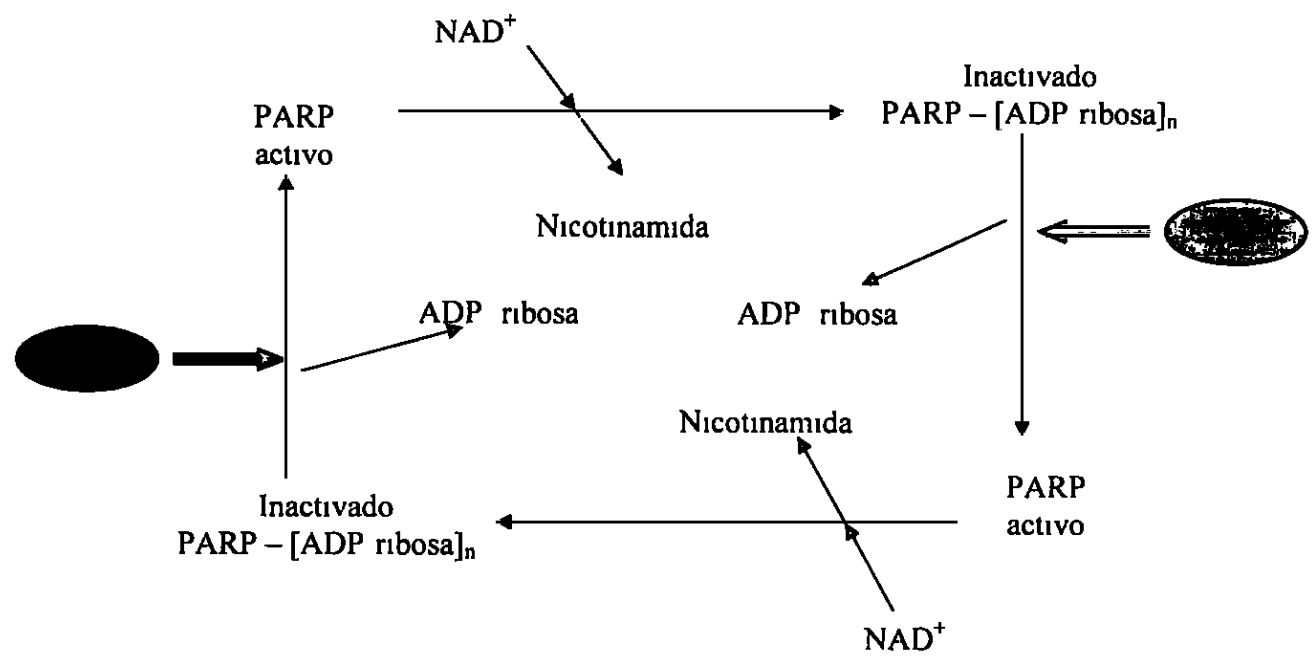


Figura 1

% [NAD⁺] – [ATP] versus luz baja

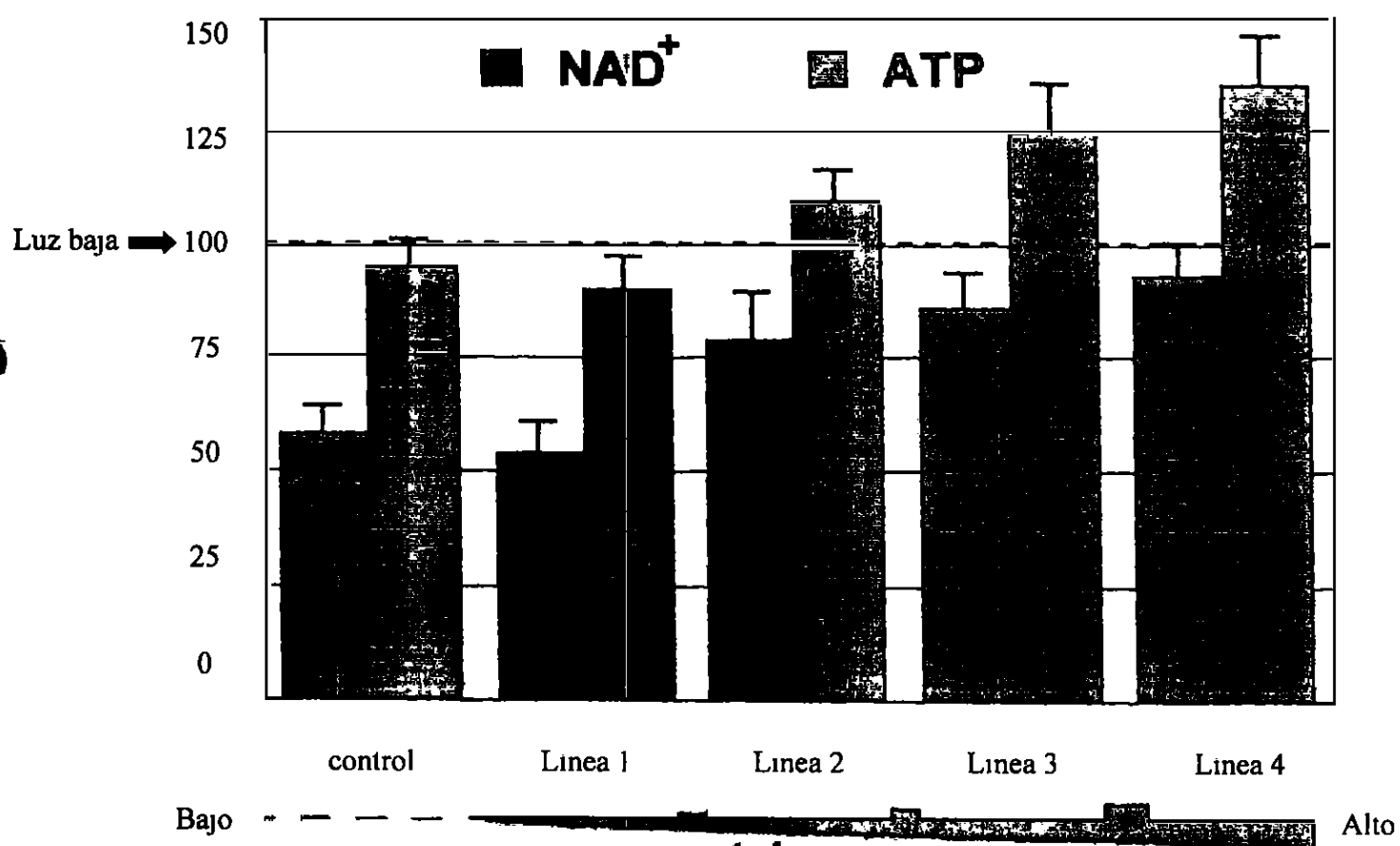
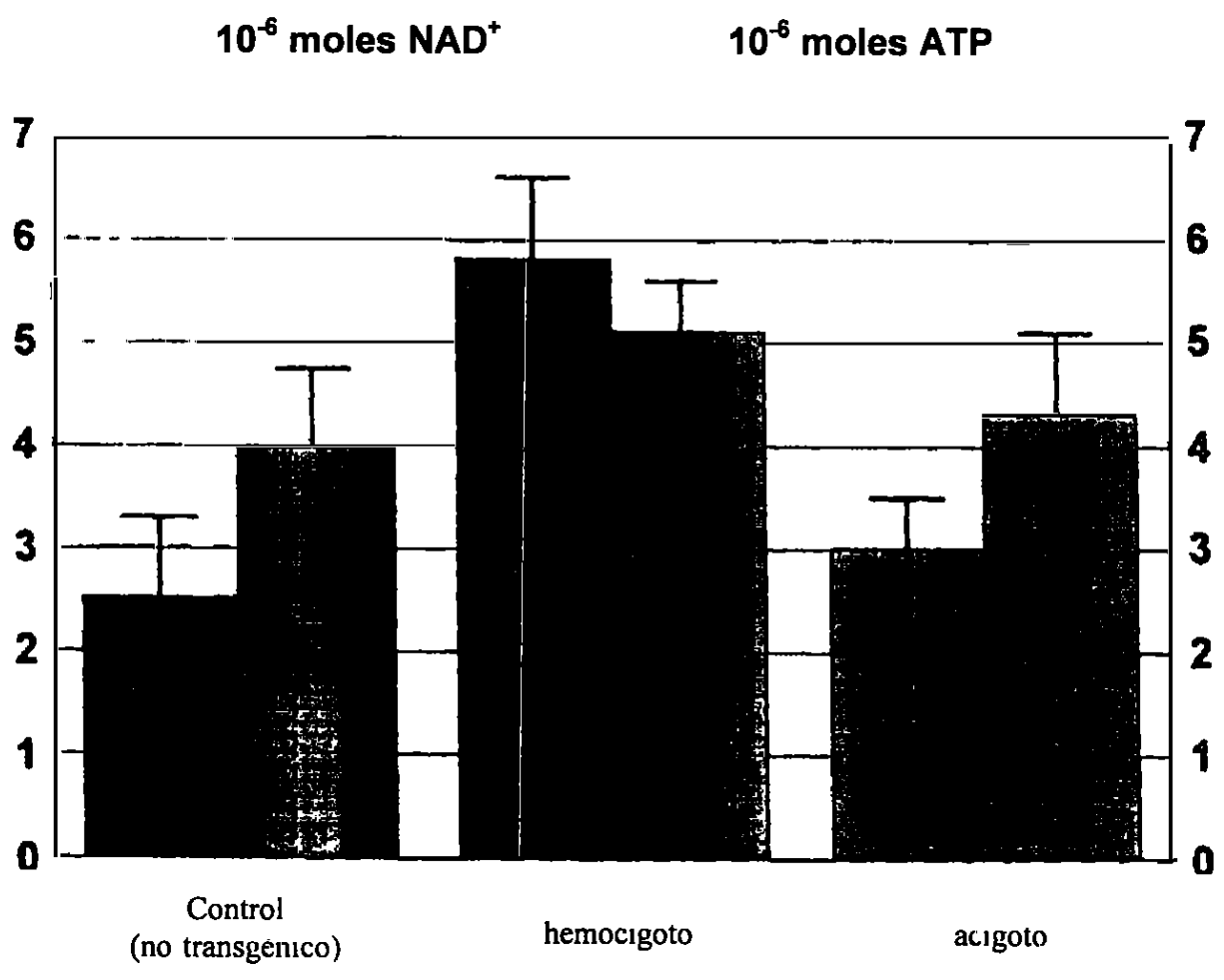


Figura 2



LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Bayer BioScience N y
De Block Marc
- <120> Metodos y medios para incrementar la tolerancia de las plantas a las
condiciones de estrés
- <130> BCS 03 2002 ~40i
- <150> EP03076044 1
- <151> 2003 04 09
- <150> US 60/496 688
- <151> 2003 08 21
- <160> 25
- <170> versión patente 3 1
- <210> 1
- <211> 548
- <212> PRT
- <213> Arabidopsis Thaliana
- <400> 1

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

145					150					155				160	
Asp	Asn	Arg	Gly	Ala	Lys	His	Leu	Pro	Val	Ile	Asn	Phe	Asp	His	Leu
				165					170					175	
Phe	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gln	Ser	Gln	Glu	Ser	Lys	Ile
			180					185						190	
Arg	Cys	Ile	Met	His	Tyr	Phe	Glu	Arg	Phe	Cys	Ser	Cys	Val	Pro	Ile
		195					200					205			
Gly	Ile	Val	Ser	Phe	Glu	Arg	Lys	Ile	Thr	Ala	Ala	Pro	Asp	Ala	Asp
	210					215					220				
Phe	Trp	Ser	Lys	Ser	Asp	Val	Ser	Leu	Cys	Ala	Phe	Lys	Val	His	Ser
225					230					235					240
Phe	Gly	Leu	Ile	Glu	Asp	Gln	Pro	Asp	Asn	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Phe
				245					250					255	
Ala	Asn	Lys	Tyr	Leu	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Gly	Cys	Val	Gln
			260					265					270		
Glu	Glu	Ile	Arg	Phe	Met	Ile	Aen	Pro	Glu	Leu	Ile	Ala	Gly	Met	Leu
		275					280					285			
Phe	Leu	Pro	Arg	Met	Asp	Asp	Asn	Glu	Ala	Ile	Glu	Ile	Val	Gly	Ala
	290					295					300				
Glu	Arg	Phe	Ser	Cys	Tyr	Thr	Gly	Tyr	Ala	Ser	Ser	Phe	Arg	Phe	Ala
305					310					315					320
Gly	Glu	Tyr	Ile	Asp	Lys	Lys	Ala	Met	Asp	Pro	Phe	Lys	Arg	Arg	Arg
				325					330					335	
Thr	Arg	Ile	Val	Ala	Ile	Asp	Ala	Leu	Cys	Thr	Pro	Lys	Met	Arg	His
			340					345					350		
Phe	Lys	Asp	Ile	Cys	Leu	Leu	Arg	Glu	Ile	Asn	Lys	Ala	Leu	Cys	Gly
		355					360					365			
Phe	Leu	Ass	Cys	Ser	Lys	Ala	Trp	Glu	His	Gln	Aen	Ile	Phe	Met	Asp
	370					375					380				
Glu	Gly	Asp	Asn	Glu	Ile	Gln	Leu	Val	Arg	Asn	Gly	Arg	Asp	Ser	Gly
385					390					395					400
Leu	Leu	Arg	Thr	Glu	Thr	Thr	Ala	Ser	His	Arg	Thr	Pro	Leu	Aen	Asp
				405					410					415	
Val	Glu	Met	Asn	Arg	Glu	Lys	Pro	Ala	Asn	Asn	Leu	Ile	Arg	Asp	Phe
			420					425					430		
Tyr	Val	Glu	Gly	Val	Asp	Asn	Glu	Asp	His	Glu	Asp	Asp	Gly	Val	Ala
		435					440					445			
Thr	Gly	Asn	Trp	Gly	Cys	Gly	Val	Phe	Gly	Gly	Asp	Pro	Glu	Leu	Lys
	450					455					460				
Ala	Thr	Ile	Gln	Trp	Leu	Ala	Ala	Ser	Gln	Thr	Arg	Arg	Pro	Phe	Ile
465					470					475					480
Ser	Tyr	Tyr	Thr	Phe	Gly	Val	Glu	Ala	Leu	Arg	Asn	Leu	Asp	Gln	Val
				485					490					495	
Thr	Lys	Trp	Ile	Leu	Ser	His	Lys	Trp	Thr	Val	Gly	Asp	Leu	Trp	Asn
			500					505					510		
Met	Met	Leu	Glu	Tyr	Ser	Ala	Gln	Arg	Leu	Tyr	Lys	Gln	Thr	Ser	Val
		515					520					525			
Gly	Phe	Phe	Ser	Trp	Leu	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Thr	Thr	Aen	Lys	Ala

530

535

540

Ile Gin Pro Pro

545

<210> 2

<211> 169

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 2

Met Glu Aen Arg Glu Asp Val Lye Ser Ile Leu Pro Phe Leu Pro Val

1 5 10 15

Cys Leu Arg Ser Ser Ser Leu Phe Trp Pro Pro Leu Val Val Glu Ala

20 25 30

Leu Lys Ala Leu Ser Glu Gly Pro His Tyr Ser Asn Val Asn Ser Gly

35 40 45

Gin Val Leu Phe Leu Ala Ile Ser Asp Ile Arg Asn Ser Leu Ser Leu

50 55 60

Pro Asp Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ala Ser Asp Gly Phe Ser Leu Leu

65 70 75 80

Phe Asp Asp Leu Ile Pro Ary Asp Glu Ala Val Lye Trp Phe Lye Glu

85 90 95

Val Val Pro Lys Met Ala Asp Leu Leu Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu

100 105 110

Glu Ala His Tyr Glu Lye Ala Asp Gly Gly Ile Val Lys Gly Val Aen

115 120 125

Thr Gly Leu Arg Leu Leu Glu Ser Gln Gln Pro Gly Ile Val Phe Leu

130 135 140

Ser Gln Glu Leu Val Gly Ala Leu Leu Ala Cys Ser Phe Phe Cys Tyr

145 150 155 160

Ser Leu Pro Met Ile Glu Val Ser Val

165

<210> 3

<211> 1647

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

atggagaatc	gcgaagatct	taactcaatt	cttccgtacc	ttccacttgt	aattcggtcg	60
tcgtcgctgt	attggccgcc	gcgtgtggtg	gaggcggtta	aggcaatgtc	tgaaggacca	120
tctcacagcc	aagttgactc	aggagagggt	ctacggcaag	ctattttcga	tatgagacga	180
tccttatctt	tctctactct	cgagccatct	gcttctaata	gctacgcatt	tctctttgac	240
gaattgattg	atgagaaaga	atcaaagaga	tggttcgatg	agattatccc	agcattggcg	300
agcttacttc	taoagtttcc	atctctgtta	gaagtgcatt	tccaaaatgc	tgataatatt	360
gtagtggaag	tcaaaaccgg	tcttcgtttg	ttaaattccc	aacaagctg	gcattgtttc	420
ctcagccagg	agttgattgg	agctcttctt	gcatgctctt	tctttgtttt	gtttccgat	480
gataatagag	gtgcaaaac	acctccagtc	atcaactttg	atcatttgtt	tgcaagcctt	540

tatataagtt	atagtcaaag	tcaagaaagc	aagataagat	gtattatgca	ttacttgaa	600
agggtttgct	cctgcgtgcc	tattggtatt	gtttcatttg	aacgcaagat	taccgctgct	660
cctgatgctg	atttctggag	caagtctgac	gtttctcttt	gtgcatttaa	gggtcactct	720
ttgggttaa	ttgaagatca	acctgacaat	gctctcgaag	tggactttgc	aaacaagtat	780
ctcggagggtg	gttccctaag	tagaggggtgc	gtgcaggaag	agatacgctt	catgattaac	840
cctgaattaa	tcgctggcat	gcttttcttg	cctcggatgg	atgacaatga	agctatagaa	900
atagttgggtg	cggaaagatt	ttcatgttac	acagggtatg	catcttcgtt	tcggtttgct	960
ggtagtaca	ttgacaaaaa	ggcaatggat	cctttcaaaa	ggcgaagaa	ccagaattgtt	1020
gcaattgatg	cattatgtac	accgaagatg	agacacttta	aagatatatg	tcttttaagg	1080
gaaattaata	aggcactatg	tggcttttta	aattgtagca	aggcttgga	gcaccagaat	1140
atattcatgg	atgaaggaga	taatgaaatt	cagctgtcc	gaaacggcag	agattctggt	1200
cttctgcgta	cagaaactac	tgcgtcacac	cgaactccac	taaatgatgt	tgagatgaat	1260
agagaaaagc	ctgctaacaa	tcttatcaga	gatttttatg	tgaaggagt	tgataacgag	1320
gatcatgaag	atgatggtgt	cgcgacaggg	aattggggat	gtggtgtttt	tggaggagac	1380
ccagagctaa	aggctacgat	acaatggctt	gctgcttccc	agactcgaag	accatttata	1440
tcatattaca	cctttggagt	agaggcactc	cgaaacctag	atcagggtgac	gaagtggatt	1500
ctttcccata	aatggactgt	tggagatctg	tgaacatga	tgtagaata	ttctgtctcaa	1560
aggctctaca	agcaaaccag	tgttggtctc	ttttctggc	tacttccatc	tctagctacc	1620
accaacaaag	ctatccagcc	gccttga				1647

<210> 4
 <211> 598
 <212> ADN
 <213> Solanum tuberosum

<400> 4						
gcaatggaga	atagagaaga	cgtgaagtca	atccttccct	tttgccggt	gtgtctccga	60
tcattctctc	ttttctggcc	gccgctagtt	gtgaagcac	tgaaagccct	ctctgaaggc	120
cctcattaca	gcaatgttaa	ctccggccaa	gtcctcttcc	tcgcaatctc	cgacattcgg	180
aattcccttt	cactacctga	ttctcaatt	tcctctctctg	<i>cttcagacgg</i>	atcttctctc	240
ttatttgatg	atttaattcc	tagggatgaa	gctgttaaatt	ggtcaaaga	agtggtgccg	300
aaaatggcgg	atttgctatt	gcggtgcct	cccttattgg	aggctcacta	tgagaaggct	360
gatggtgga	ttgttaaagg	agtcaacact	ggcctcgcct	tattggaatc	acaacagcct	420
ggcattgttt	tcctcagtca	ggaattagtc	ggttgctcttc	ttqcatgttc	cttcttttqc	480
tattccctac	caatgataga	ggtatctgta	tgatcagtat	gacgagaaat	ttgaaaataa	540
attgaagtgc	attcttcact	attttgagag	gattggctca	ttgataacctg	cgggctac	598

<210> 5
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleótido ParGAt1
 <400> 5

ggatcccctg caggacaaaa aggcaatgga tcctttc

<210> 6
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotidoParGAt2
<400> 6
gcacgaattc gcggccgcgg tgctccaag ccttgctac 39

<210> 7
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotido ParGSt1
<400> 7
ggatcccctg caggctcact atgagaaggc tgatggtgg 39

<210> 8
<211> 43
<212>
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotido ParGSt2
<400> 8
gcacgaattc gcggccgcgt catactgac atacagatac ctc 43

<210> 9
<211> 13466
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de nucleotidos de pTVE428
<220>
<221> misc caracteristica
<222> (198) (222)
<223> Border T ADN derecho

<220>
<221> misc caracteristica
<222> (983) (273)
<223> 3 0cc (final no trasladado 3 del gen sintasa octopina)

<220>

<221> misc característica
<222> (995) (1155)
<223> parte de poli (ADP ribosa) glicohidrolasa

<220>
<221> misc característica
<222> (1929) (1188)
<223> intron 2 del gen Pdk gene de Fiaveria

<220>
<221> misc característica
<222> (212) (1962)
<223> parte de poli (ADP ribosa) glicohidrolasa

<220>
<221> misc característica
<222> (3476) (2131)
<223> Region promotora 35S del virus Cauliflower Mosaic

<220>
<221> misc característica
<222> (3948) (3737)
<223> final no trasladado 3' del gen 7 de la Agrobacterium tumefaciens

<220>
<221> misc_característica
<222> (4521) (3970)
<223> region codificadora de barras

<220>
<221> misc_característica
<222> (6247) (4522)
<223> region promotora

<220>
<221> misc_característica
<222> (6415) (6439)
<223> región del borde izquierdo de T ADN de Agrobacterium tumefaciens

<400> 9

agattcgaag	ctcgggtccc	tgggtgttct	gtcgtctcgt	tgtacaacga	aatccattcc	60
cattccgcgc	tcaagatggc	ttccctcgg	cagttcatca	gggctaaatc	aatctagccg	120
acttgtccgg	tgaaatgggc	tgactccaa	cagaaacaat	caaacaaaca	tacacagcga	180
cttattcaca	cgcgacaaat	tacaacggta	tatatcctgc	cagtactcgg	ccgtcgaccg	240
cggtaccccc	gaattaagct	tgcatgcctg	caggctcctgc	tgagcctcga	catgttgtcg	300
caaaattcgc	cctggacccg	cccaacgatt	gtcgtcact	gtcaagggtt	gacctgcact	360
tcatttgggg	cccacatata	ccaaaaaat	gctgcataat	tctcggggca	gcaagtcggt	420

tacccggccg	ccgtgctgga	ccgggttgaa	tggtgcccgt	aactttcggg	agagcgggacg	480
gccaatactc	aacttcaagg	aatctcacc	atgcgcgccg	gcggggaacc	ggagttccct	540
tcagtgaacg	ttattagttc	gccgctcgg	gtgtcgtaga	tactagcccc	tggggccttt	600
tgaaatttga	ataagattta	tgtaatcagt	cttttaggtt	tgaccgggtc	tgccgccttt	660
tttaaaattg	gatttgaat	aataaaacgc	aattgtttgt	tattgtggcg	ctctatcata	720
gatgtcgcta	taaacctatt	cagcacaata	tattgttttc	attttaatat	tgtacatata	780
agtagtaggg	tacaatcagt	aaattgaacg	gagaatatta	ttcataaaaa	tacgatagta	840
acgggtgata	tattcattag	aatgaacga	aaccggcggt	aaggatctga	gctacacatg	900
ctcagggttt	ttacaacgtg	cacaacagaa	ttgaaagcaa	atatcatgcg	atcataggcg	960
tctcgcatat	ctcattaaag	caggactcta	gagacaaaaa	ggcaatggat	cctttcaaaa	1020
ggcgaagaac	cagaattgtt	gcaattgatg	cattatgtac	accgaagatg	agacacttta	1080
aagatatatg	tcttttaagg	gaaattaata	aggcactatg	tggcttttta	aattgtagca	1140
aggcttggga	gcaccatcga	tttgaacc	agcttcccaa	ctgtaatcaa	tccaaatgta	1200
agatcaatga	taacacaatg	acatgatcta	tcatgttacc	ttgtttattc	atgttcgact	1260
aattcattta	attaatagtc	aatccattta	gaagttaata	aaactacaag	tattatttag	1320
aaattaataa	gaatgtgat	tgaaaataat	actatataaa	atgatagatc	ttgcgcttg	1380
ttatattagc	attagattat	gtttgttac	attagattac	tgtttctatt	agtttgatat	1440
tattgttac	tttagctgt	tatttaatal	ttgtttatt	gataaattac	aagcagattg	1500
gaatttctaa	caaaaatttt	attaacttti	aaactaaaat	atttagtaat	ggtatagata	1560
tttaattata	taataaacta	ttaatcataa	aaaaatatta	tttaattta	tttattctta	1620
ttttactat	agtattttat	cattgatatt	taattcatca	aaccagctag	aattactatt	1680
atgattaaaa	caaataataa	tgctagtata	tcatcttaca	tgttcgatca	aattcattaa	1740
aaataatata	cttacttca	actttatct	tcttcgtctt	acacatcact	tgtcatattt	1800
ttttacatta	ctatgttgtt	tatgtaaaca	atatatttat	aaattatttt	ttcacaatta	1860
taacaactat	attattataa	tcatacta	taacatcact	taactatttt	atactaaaag	1920
gaaaaaagaa	aataattatt	tccttacc	gctggggtag	cgggtgctccc	aagccttgct	1980
caatttaaa	aagccacata	gtgccttatt	aatttccctt	aaaagacata	tatctttaaa	2040
gtgtctcatc	ttcgggtgac	ataatgcac	aattgcaaca	attctgggtc	ttcgcctttt	2100
gaaaggatcc	attgcctttt	tgctctcgag	cgtgtcctct	ccaaatgaaa	tgaacttcct	2160
tatatagagg	aagggtcttg	cgaaggatag	tggtattgtg	cgtcatccct	tacgtcagtg	2220
gagatgtcac	atcaatccac	ttgcttgaa	gacgtgggtg	gaacgtcttc	ttttccacg	2280
atgctcctcg	tgggtggggg	tccatctttg	ggaccactgt	cggcagagag	atcttgaatg	2340
atagcctttc	ctttatcgca	atgatggcat	ttgtaggagc	caccttcctt	ttctactgtc	2400
ctttcgatga	agtgacagat	agctgggcaa	tggaaatccga	ggagggttcc	cgaaattatc	2460
ctttgttgaa	aagtctcaat	agccctttgg	tcttctgaga	ctgtatcttt	gacatttttg	2520
gagtagacca	gagtgctgtg	ctccaccatg	ttgacgaaga	tttcttctt	gtcattgagt	2580
cgtaaaagac	tctgtatgaa	ctgttcgcca	gtcttcacgg	cgagttctgt	tagatcctcg	2640
atttgaatct	tagactccat	gcatggcctt	agattcagta	ggaactacct	tttagagac	2700
tccaatctct	attacttgcc	ttggtttatg	aagcaagcct	tgaatcgtcc	atactggaat	2760
agtacttctg	atcttgagaa	atatgtcttt	ctctgtgttc	ttgatgcaat	tagtcttgaa	2820
tcttttgact	gcacttttaa	ccttcttggg	aagggtattg	atctcctgga	gattgttact	2880
cgggtagatc	gtcttgatga	gacctgcctc	gtaggcctct	ctaaccatct	gtgggtcagc	2940
attctttctg	aaattgaaga	ggctaaccct	ctcattatca	gtgggtgaaca	tagtgtcgtc	3000
accttcacct	tcgaacttcc	ttcctagatc	gtaaagatag	aggaaatcgt	ccatttgaat	3060
ctccgggggca	aaggagatct	cttttggggc	tggatcactg	ctgggccttt	tggttcctag	3120
cgtgagccag	tgggcctttt	gcttgggtgg	gcttgttagg	gccttagcaa	agctcttggg	3180
cttgagttga	gcttctcctt	tggggatgaa	gttcaacctg	tctgtttgct	gacttgttgt	3240
gtacgcgtca	gctgctgctc	ttgcctctgt	aatagtggca	aatttctgt	gtgcaactcc	3300

gggaacgccg	ttgttgccg	cctttgtaca	accccagtc	tcgtatatac	cggcattgtg	3360
accgttatac	acaacgtagt	agttgataig	aggggtgtga	atacccgatt	ctgctctgag	3420
aggagcaact	gtgctgttaa	gctcagattt	ttgtgggatt	ggaattaatt	cgtcgagcgg	3480
ccgctcgacg	agcgcgccga	tatcgcgac	gcccggggccg	gccatttaaa	tgaattcgag	3540
ctcggtagcc	aaacgcggcc	gcaagctata	acttcgtata	gcatacatta	tacgaagtta	3600
ttcgactcta	gaggatccca	attcccatgc	atggagtcaa	agattcaaat	agaggacact	3660
tctcgaactc	ggccgtcgaa	ctcggccgtc	gagtacatgg	tcgataagaa	aaggcaattt	3720
gtagatgtta	attcccatct	tgaaagaaat	atagtttaaa	tatttattga	taaaataaca	3780
agtcagggtat	tatagtccaa	gcaaaaacat	aaatttattg	atgcaagttt	aaattcagaa	3840
atatttcaat	aactgattat	atcagctggg	acattgccgt	agatgaaaga	ctgagtgcga	3900
Lattatgtgt	aatacataaa	ttgatgatat	agctagctta	gctcatcggg	ggatcctaga	3960
cgcgtagagat	cagatctcgg	tgacgggg	ag gaccggacgg	ggcggtagccg	gcaggctgaa	4020
gtccagctgc	cagaaaccca	cgatcatgcca	gttcccgtgc	ttgaagccgg	ccgcccgcag	4080
catgccgcgg	ggggcatact	cgagcgccctc	gtgcatgcgc	acgctcgggt	cgttgggcag	4140
cccgatgaca	gcgaccacgc	tctgaagcc	ctgtgcctcc	agggacttca	gcagggtgggt	4200
tagagcgtg	gagcccagtc	ccgtccgctg	gtggcggggg	gagacgtaca	cggtcgactc	4260
ggccgtccag	tcgtaggcgt	tgctgcctt	ccaggggccc	gcgtaggcga	tgccggcgac	4320
ctcgcgctcc	acctcggcga	cgagccaggg	atagcgctcc	cgcagacgga	tgaggctgct	4380
cgtccactcc	tgcggttctt	gcggctcggg	acggaagttg	accgtgcttg	tctcgatgta	4440
gtggtgacg	atgggtcaga	ccgccggcat	gtccgcctcg	gtggcacggc	ggatgtcggc	4500
cgggcgctgt	tctgggtcca	ttgttctct	ttactctttg	tgtgactgag	gtttgttcta	4560
gtgctttggt	catctatata	taatgataac	aacaatgaga	acaagctttg	gagtgatcgg	4620
aggggtctagg	atacatgaga	ttcaagtgga	ctaggatcta	caccgttgga	ttttgagtgt	4680
ggatatgtgt	gagggttaatt	ttacttggtta	acggccacaa	aggcctaagg	agagggtgtg	4740
agacccttat	cggttgaac	cgctggaata	atgccacgtg	gaagataaatt	ccatgaatct	4800
tatcgttatc	tatgagtga	attgtgtgat	gggtggagtgg	tgcttgctca	ttttacttgc	4860
ctgggtgcjact	tgccctttc	cttatgggga	atttatattt	tacttactat	agagctttca	4920
tacctttttt	ttaccttgga	tttagttaat	atataatggt	atgattcatg	aataaaaaatg	4980
ggaaattttt	gaattgtac	tgctaaatgc	ataagattag	gtgaaactgt	ggaatatata	5040
ttttttcat	ttaaaagcaa	aatttgcctt	ttactagaat	tataaatata	gaaaaaatata	5100
taacattcaa	ataaaaaatga	aaataagaac	tttcaaaaaa	cagaactatg	tttaatgtgt	5160
aaagattagt	cgcacatcaa	gtcatctgtt	acaatatgtt	acaacaagtc	ataagcccaa	5220
caaagttagc	acgtctaaat	aaaccaaaaga	gtccacgaaa	atattacaaa	tcataagccc	5280
aacaaagtta	ttgatcaaaa	aaaaaaaacg	cccaacaaag	ctaaacaaag	tccaaaaaaa	5340
acttctcaag	tctccatctt	cctttatgaa	cattgaaaac	tatacacaaa	acaagtcaga	5400
taaatctctt	tctgggcctg	tcttcccaac	cttctacatc	acttccctat	cggattgaat	5460
gttttacttg	taccttttcc	gttgcaatga	tattgatagt	atgtttgtga	aaactaatag	5520
ggttaacaat	cgaagtcatg	gaatatggat	ttgggtccaag	attttccgag	agctttctag	5580
tagaaagccc	atcaccagaa	atttactagt	aaaataaatc	accaattagg	tttcttatta	5640
tgtgccaaat	tcaatataat	tatagaggat	atttcaaagt	aaaacgtatg	aatgttatta	5700
gtaaatggtc	aggtaagaca	ttaaaaaat	cctacgtcag	atattcaact	ttaaaaattc	5760
gatcagtggt	gaattgtaca	aaaatttggg	atctactata	tatatataat	gctttacaac	5820
acttggattt	tttttggag	gctggaattt	ttaatctaca	tatttgtttt	ggccatgcac	5880
caactcattg	tttagtgtaa	tactttgatt	ttgtcaaata	tatgtgttcg	tgtatatttg	5940
tataagaatt	tcttgacca	tatacacaca	cacatatata	tatatatata	tatattatat	6000
atcatgcact	tttaattgaa	aaaataatat	atatatatat	agtgcatttt	ttctaacaac	6060
catatatgtt	gcgattgatc	tgcaaaaata	ctgctagagt	aatgaaaaat	ataatctatt	6120
gctgaaatta	tctcagatgt	taagattttc	ttaaagtaaa	ttctttcaaa	ttttagctaa	6180

aagtcttcta	ataactaaag	aataatar ac	aatctcgacc	acggaaaaaa	aacacataat	6240
aaatttgaat	ttcgaccgcg	gtacccggaa	ttgggttata	attacctcag	gtcgaggaat	6300
taattcggt	cgtacctaat	aacttcgtat	agcatacatt	atacgaagtt	atatggatct	6360
cgaggcatta	cggcattacg	gcactcgt ga	gggtcccaat	tcgagcatgg	agccatttac	6420
aattgaatat	atcctgccgc	cgctgccgct	ttgcacccgg	tgagagcttc	atgttggtt	6480
ctacgcagaa	ctgagccggt	taggcagata	atttcattg	agaactgagc	catgtgcacc	6540
ttcccccaa	cacggtgagc	gacggggcaa	cggagtgatc	cacatgggac	tttaaacaat	6600
catccgtcgg	atggcggttc	gagagaagca	gtcgatccgt	gagatcagcc	gacgcaccgg	6660
gcaggcgctc	aacacgatcg	aaagtattt	gaacgcaggt	acaatcgagc	cgacggtcac	6720
ggtaccggaa	cgaccaagca	agctagctta	gtaaagccct	cgctagattt	taatcggat	6780
gttgcgatta	cttcgccaac	tattgcgata	acaagaaaaa	gccagcctt	catgatata	6840
ctcccaattt	gtgtagggct	tattatgcac	gcttaaaaaat	aataaaaagca	gacttgacct	6900
gatagtttgg	ctgtgagcaa	ttatgtgctt	agtgcattca	acgcttgagt	taagccgcgc	6960
cgcgaagcgg	cgtcggcttg	aacgaattgt	tagacattat	ttgccgacta	ccttggtgat	7020
ctcgcctttc	acgtagtggg	caaattcttc	caactgatct	gcgcgcgagg	ccaagcgatc	7080
ttctcttgt	ccaagataag	cctgtctagc	ttcaagtatg	acgggctgat	actgggcccgg	7140
caggcgctcc	attgccaggt	cggcagcgac	atccttcggc	gcgattttgc	cggttactgc	7200
gctgtacca	atgcgggaca	acgtaagcac	tacatttcgc	tcacgcccag	cccagtcggg	7260
cggcgagttc	catagcgta	aggtttcatt	tagcgcccca	aatagatcct	gttcaggaac	7320
cggatcaaag	agttcctccg	ccgctggacc	taccaaggca	acgctatgtt	ctcttgctt	7380
gtcagcaag	atagccagat	caatgtcgat	cgtggctggc	tcgaagatac	ctgcaagaat	7440
gtcattgcgc	tgccattctc	caaattgcag	ttcgcgctta	gctggataac	gccacggaat	7500
gatgtcgtcg	tgcaacaaca	tggtgacttc	tacagcgcg	agaatctcgc	tctctccagg	7560
ggaagccgaa	gtttccaaaa	ggtcgttgat	caaagctcgc	cgcggtgttt	catcaagcct	7620
tacggtcacc	gtaaccagca	aatcaatata	actgtgtggc	ttcaggccgc	catccactgc	7680
ggagccgtac	aaatgtacgg	ccagcaacgt	cggctcgaga	tggcgctcga	tgacgccaac	7740
tacctctgat	agttgagtcg	atacttcggc	gatcaccgct	tcctcatga	tgtttaactt	7800
tgtttaggg	cgactgccct	gctgcgtaac	atcgttgctg	ctccataaca	tcaaacatcg	7860
accacggcg	taacgcgctt	gctgcttgga	tgcccgaggc	atagactgta	ccccaaaaaa	7920
acagtcataa	caagccatga	aaaccgacac	tgccgcttta	ccaccgctgc	gttcggtcaa	7980
ggttctggac	cagttgcgtg	agcgcatacg	ctacttgcac	tacagcttac	gaaccgaaca	8040
ggcttatgtc	cactgggttc	gtgccttcac	ccgtttccac	gggtgtgcgtc	accggaac	8100
ttgggcagc	agcgaagtcg	aggcatttct	gtcctggctg	gccaacgagc	gcaaggttc	8160
ggtctccacg	catcgtcagg	cattggcggc	cttgctgttc	ttctacggca	agtgtgtgtc	8220
acggatctgc	cctggcttca	ggagatcgga	agacctcggc	cgtccggggc	cttgccggtg	8280
gtgctgacc	cggatgaagt	ctctagagct	ctagagggtc	cgcacccctc	gtttctgga	8340
aggcgagcat	cgttgttcg	cccagcttct	gtatggaacg	ggcatgcgga	tcagttaggg	8400
tttgcaactg	cgggtcaagg	atctggatrt	cgatcacggc	acgatcatcg	tgcgggagg	8460
caagggctcc	aaggatcggg	ccttgatgtt	acccgagagc	ttggcacc	gcctgcgcga	8520
gcagggatcg	atccaacccc	tccgctgcta	tagtgacgtc	ggcttctgac	gttcagtga	8580
gccgtcttct	gaaaacgaca	tgctgcacaa	gtcctaagtt	acgcgacagg	ctgccgccct	8640
gcccttttcc	tggcgttttc	ttgtcgcgtg	tttagtcgc	ataaagtaga	atactgcga	8700
ctagaaccgg	agacattacg	ccatgaacaa	gagcgccggc	gctggcctgc	tgggctatgc	8760
ccgctcagc	accgacgacc	aggacttgac	caaccaabgg	qccgaactgc	acgcggccgg	8820
ctgcaccaag	ctgtttaccg	agaagatcac	cggcaccagg	cgcgaccgcc	cggagctggc	8880
caggatgctt	gaccacctac	gccctggaga	cgttgtgaca	gtgaccaggc	tagaccgcct	8940
ggcccgagc	acccgcgacc	tactggacat	tgccgagcgc	atccaggagg	ccggcgcggg	9000
cctgcgtagc	ctggcagagc	cgtgggcccga	caccaacacg	ccggccggcc	gcatggtgtt	9060

gaccgtgttc gccggcattg ccgagttcga gcgbtcccta atcatcgacc gcacccggag 9120
 cgggcgcgag gccgccaagg cccgaggcgt gaagtttggc ccccgcccta ccctacccc 9180
 ggcacagatc gcgcacgccc gcgagctgat cgaccaggaa ggcicgcaccg tgaaagaggc 9240
 ggctgcactg cttggcgtgc atcgctcgac cctgtaccgc gcacttgagc gcagcgagga 9300
 agtgacgccc accgaggcca ggcggcgcgg tgccttccgt gaggacgcat tgaccgaggc 9360
 cgacgccctg gcggccgccc agaataaacg ccaagaggaa caagcatgaa accgcaccag 9420
 gacggccagg acgaaccgtt ttccattaca gaagagatcg aggcggagat gatcgcgcc 9480
 gggtagctgt tcgagccgcc cgcgcadgtc tcaaccgtgc ggcctgcatga aatcctgacc 9540
 gggttgtctg atgccaagct ggcggccttt ccggccagct bggccgctga agaaaccgag 9600
 cgccgccgtc taaaaagggt atgtgbabtt gagtaaaca gcttgcgtca tgcggtcgt 9660
 gcgtatatga tgcgatgagt aaataaaca atacgcaagg ggaacgcatg aaggttatcg 9720
 ctgtacttaa ccagaaaggc gggtcaggca agacgacat cgcaacccat ctagcccgcg 9780
 ccctgcaact cgccggggcc gatgttctgt tagtcgattc cgatcccag ggcagtgcc 9840
 gcgattgggc ggccgtgcgg gaagatcaac cgctaaccgt tgcggcatc gaccgcccga 9900
 cgattgaccg cgacgtgaag gccatcgcc ggcgcgactt cgtagtgatc gacggagcgc 9960
 cccaggcggc ggacttgct gtgtccgcga tcaaggcagc cgacttcgtgt ctgattccgg 10020
 tgcagccaag occttacgaa atatgggcca ccgcgacct ggtggaqctg gttaaagcagc 10080
 gcattgaggt cacggatgga aggctacaag cggcctttct cgttgcgcgg gcgatcaaag 10140
 gcacgcgcat cggcggtag gtgtccgagg cgctggccgg gtacgagctg cccattcttg 10200
 agtcccgtat cacgcagcgc gtgagctacc caggtagtc cgccgccggc acaaccgttc 10260
 tgaatcaga acccgaggc gacgctgccc gcgaggtcca ggcgctggcc gctgaaatta 10320
 aatcaaaact catttgagtt aatgaggtaa agagaaatg agcaaaaagca caaacacgct 10380
 aagtgccggc cgtccgagcg cacgcagcag caagctgca acgttggqca gcctggcaga 10440
 cacgccagcc atgaagcggg tcaacttca gttgcggcg gaggatcaca ccaagctgaa 10500
 gatgtacgcg gtacgccaag gcaagaccat taccgagctg ctatctgaat acatcgcgca 10560
 gctaccagag taaatgagca aatgaataaa tgagtagatg aatttagcg gctaaaggag 10620
 gcggcatgga aaatcaagaa caaccaggca ccgacgccgt ggaatgcccc atgtgtggag 10680
 gaacggggcg ttggccaggc glaacggct ggggtgtctg ccggccctgc aatggcactg 10740
 aacccccaa gcccgaggaa tcggcgtagc ggtcgcaaac catccggccc ggtacaaatc 10800
 ggcgcggcgc tgggtgatga cctggtgag aagttgaagg ccgcgcaggc cgcccagcgg 10860
 caacgcacg aggcagaagc acgccccgt gaatcgtggc aagcgggcgc tgatcgaatc 10920
 cgaaagaaL cccggcaacc gccggcagcc ggtgcgccgt cgattaggaa gccgccaag 10980
 ggcgacgagc aaccagattt ttcgttccg atgctctatg acgtgggcac ccgcgatagt 11040
 cgcagcatca tggacgtggc cgtttccgt ctgtcgaagc gtgaccgacg agctggcgag 11100
 gtgatccgt acgagcttcc aacgggcac gtaaggttt ccgcagggcc ggccggcatg 11160
 gccagtgtgt gggattacga cctggtactg atggcggtt cccatctaac cgaatccatg 11220
 aaccgatacc gggaaggga gggagacaag cccggccgcg tgttccgtcc acacgttgcg 11280
 gacgtactca agttctgccg gcgagccgat ggcggaaagc agaaagacga cctggtagaa 11340
 acctgcattc ggtaaacac cacgcacgtt gccatgcagc gtacgaagaa ggccaagaac 11400
 ggccgcctgg tgacggtatc cgagggtgaa gccttgatta gccgctacaa gatcgtaaag 11460
 agcgaacccg ggcggccgga gtacatcgag atcgagctag ctgattggat gtaccgag 11520
 atcacagaag gcaagaaccc ggacgtgctg acggttacc ccgattactt ttgatcgat 11580
 cccggcatcg gccgtttct ctaccgctg gcacgccgcg ccgcaggcaa ggcagaagcc 11640
 agatgggtLgt tcaagacgat ctacgaacgc agtggcagcg ccgagagtt caagaagttc 11700
 tgttLcaccg tgcgcaagct gatcgggtca aatgacctgc cggagtacga ttgaaggag 11760
 gaggcggggc aggttgccc gatcctagtc atgcgctacc gcaacctgat cgagggcgaa 11820
 gcatccgccg gttcctaag tacggagcag atgctagggc aaattgccct agcaggggaa 11880
 aaaggtcgaa aaggtctctt tcctgtgat agcacgtaca ttgggaaccc aaagccgtac 11940

```

attggaacc ggaacccgta cattggaac ccaaagccgt acattgggaa ccggtcacac 12000
atgtaagtga ctgatataaa agagaaaaaa ggcgattttt ccgcctaaaa ctcttataaa 12060
cttattaaaa cttaaaac ccgcctggcc tgtgcataac tgtctggcca gcgcacagcc 12120
gaagagctgc aaaaagcgcc tacccttcgg tcgctgcgct ccctacgccc cgccgcttcg 12180
cqtccggcta tcgcgccgc tggccgctca aaatggctg gcctacggcc aggcaatcta 12240
ccagggcgcg gacaagccgc gccgtcgcca ctgaccgcc ggcgcccaca tcaaggcacc 12300
ctgcctcgcg cgttcggtg atgacgggta aaacctctga cacatgcagc tcccgagac 12360
ggtcacagct tgtctgaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc 12420
gggtgttggc ggggtgtcggg gcgcagccat gaccagtcga cgtagcgata gcggagtgt 12480
tactggctta actatgggc atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatcggtgt 12540
gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggcgtcttc cgcttcctcg 12600
ctcactgact cgctgcgctc ggctgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactaaag 12660
gcggtaatat ggatatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa 12720
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaa aag gccgcgttgc tggcgtttt ccataggctc 12780
cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca 12840
ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg 12900
accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc ttctccctt cgggaagcgt ggcgcttct 12960
catagctcac gctgtagga tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgtccaa gctgggctgt 13020
gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag 13080
tccaacccgg taagacacga ctatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc 13140
agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttctgaagt ggtggcctaa ctacggctac 13200
actagaagga cagtatttg tatctgcgt t ctgctgaagc cagttacct cggaaaaaga 13260
gttggtagct ctgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggtt tttgtttgc 13320
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atccggaaaa cgcaagcgca 13380
aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat agctagactg ggcggttta 13440
tggacagcaa gcgaaccgga attgcc                                     13466

```

<210> 10
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia consenso 1 de la proteina PARG
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (2) (2)
 <223> X representa cualquier aminoacido

<220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (8) (10)
 <223> X representa cualquier aminoacido

<220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (14) (17)
 <223> X representa cualquier aminoacido

<220>
<221> MISC CHARACTERÍSTICA
<222> (19) (19)
<223> X representa cualquier aminoacido

<220>
<221> MISC CHARACTERÍSTICA
<222> (27) (29)
<223> X representa cualquier aminoácido
<400> 10

Leu	Xaa	Val	Asp	Phe	Ala	Asn	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Gly	Gly	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10					15	
Xaa	Gly	Xaa	Val	Gln	Glu	Glu	Ile	Ary	Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Glu	
			20					25					30		

<210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia consenso 2 para proteina PARG
<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (3) (3)
<223> X representa cualquier aminoacido

<220>
<221> MISC CHARACTERISTICA
<222> (10)(10)
<223> X representa cualquier aminoacido

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (13)(14)
<223> X representa cualquier aminoacido

<220>
<221> MISC CHARACTERISTICA
<222> (17)(19)
<223> X representa cualquier aminoacido

<400> 11

Leu Xaa Val Asp Phe Ala Asn Xaa Xaa Xaa Gly Gly Gly Xaa Xaa Xaa

Thr Gly Xaa Trp Gly Cys Gly Ala Phe Xaa Gly Asp Xaa Xaa Leu Lys
5 10 15
Xaa Xaa Xaa Gin
20

- <210> 12
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> secuencia consenso 3 para proteina PARG

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (2) (4)
- <223> X representa cualquier aminoacido

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (6) (9)
- <223> X representa cualquier aminoacido

<400> 12

Asp Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Ile Asp Ala
1 5 10

- <210> 13
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> secuencia consenso 4 para proteina PARG

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERISTICA
- <222> (3) (4)
- <223> X representa cualquier aminoacido

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERISTICA
- <222> (7) (8)
- <223> X representa cualquier aminoácido

<400> 13

Arg Glu Xaa Xaa Lys Ala Xaa Xaa Ile Phe

1	5	10
<210>	14	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	Secuencia artificial	

<220>
<223> region PARG conservada
<220>
<221> MISC_CHARACTERISTICA
<222> (2) (5)
<223> X representa cualquier aminoacido

<220>
<221> MISC_CHARACTERISTICA
<222> (7) (7)
<223> X representa cualquier aminoacido

<400> 14

Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Tyr Thr Gly Tyr
1 5 10

<210>	15
<211>	1530
<212>	ADN
<213>	Oryza sativa

<220>
<221> CDS
<222> (1) (1530)
<223>

<400> 15

atg	gag	gcg	cgc	ggc	gac	ctg	cgc	tcg	atc	ctg	ccc	tac	etc	ccc	gte	48
Met	Glu	Ala	Arg	Gly	Asp	Leu	Arg	Ser	Ile	Leu	Pro	Tyr	Leu	Pro	Val	
1				5				10						15		
gtg	etc	cgc	ggc	ggc	gcg	etc	ttc	tgg	ccg	ccg	gcg	gcg	cag	gag	gcg	96
Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Ala	Leu	Phe	Trp	Pro	Pro	Ala	Ala	Gln	Glu	Ala	
			20					25					30			
etc	aag	gcg	ctg	gcg	ctg	ggc	ccc	gac	gtg	age	eye	gte	tec	tee	gyc	144
Leu	Lys	Ala	Leu	Ala	Leu	Gly	Pro	Asp	Val	Ser	Arg	Val	Ser	Ser	Gly	
		35					40					45				
gac	gte	etc	gee	gac	gee	etc	ace	gac	etc	eye	etc	gcg	etc	aac	etc	192
Asp	Val	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Asp	Leu	Arg	Leu	Ala	Leu	Asn	Leu	
		50				55					60					
gac	cca	etc	ccg	eye	eye	gee	gee	gag	gge	ttc	geg	etc	ttc	ttc	gac	240

Asp 65	Pro	Leu	Pro	Arg	Arg	Ala	Ala	Glu	Gly	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Asp 80	
gac	ctc	ctg	tcg	cgg	gcg	cag	gcg	cgg	gac	tgg	ttc	gac	cac	gte	gee	288
Asp	Leu	Leu	Ser	Arg	Ala	Gln	Ala	Arg	Asp	Trp	Phe	Asp	His	Val	Ala	
				85					90					95		
ccc	tcc	ctc	gcc	cgc	ctc	ctc	ctc	cgc	ctc	ccc	acg	ctg	ctc	gag	ggc	336
Pro	Ser	Leu	Ala	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Pro	Thr	Leu	Leu	Glu	Gly	
			100					105					110			
cac	tac	cgc	gcc	gcc	ggc	gac	gag	gct	cgc	ggg	ctc	cgc	atc	ctg	agc	384
His	Tyr	Arg	Ala	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Arg	Gly	Leu	Arg	Ile	Leu	Ser	
		115					120				125					
tcg	cay	gat	gcc	ggg	ctc	gtg	ctc	ctc	agc	cag	gag	ctc	gcc	gcc	gcg	432
Ser	Gln	Asp	Ala	Gly	Leu	Val	Leu	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	
	130					135					140					
ctg	ctc	gcc	tgc	gcg	ctc	ttc	tgc	ctg	ttc	ccc	acc	gcc	gat	agg	gcc	480
Leu	Leu	Ala	Cys	Ala	Leu	Phe	Cys	Leu	Phe	Pro	Thr	Ala	Asp	Arg	Ala	
					150					155				160		
gag	gcg	tgc	ctc	ccg	gag	atc	aat	ttc	gat	agc	eta	ttt	geg	gca	ctg	528
Glu	Ala	Cys	Leu	Pro	Ala	Ile	Asn	Phe	Asp	Ser	Leu	Phe	Ala	Ala	Leu	
				165					170					175		
tgt	tat	aat	tcg	agg	caa	agc	cag	gag	cay	aag	gtg	agg	tgc	ctt	gtt	576
Cys	Tyr	Asn	Ser	Arg	Gln	Ser	Gln	Glu	Gln	Lys	Val	Arg	Cys	Leu	Val	
			180					185					190			
cae	tat	ttt	gae	agg	gtg	ace	get	tet	aea	cet	act	ggg	tee	gtt	teg	624
His	Tyr	Phe	Asp	Arg	Val	Thr	Ala	Ser	Thr	Pro	Thr	Gly	Ser	Val	Ser	
		195					200					205				
ttt	gag	cgt	aag	gtt	ctt	cct	cgc	cgt	cct	gaa	tct	gat	ggc	att	acg	672
Phe	Glu	Arg	Lys	Val	Leu	Pro	Arg	Arg	Pro	Glu	Ser	Asp	Gly	Ile	Thr	
	210					215						220				
tac	cet	gac	atg	gat	act	tgg	atg	aaa	tct	ggg	gtt	ccc	ctt	tgc	aca	720
Tyr	Pro	Asp	Met	Asp	Thr	Trp	Met	Lys	Ser	Gly	Val	Pro	Leu	Cys	Thr	
					230					235				240		
ttc	cgg	gta	ttt	tcc	tca	ggc	ttg	ata	gaa	gat	gag	gaa	caa	gaa	gcc	768
Phe	Arg	Val	Phe	Ser	Ser	Gly	Leu	Ile	Glu	Asp	Glu	Glu	Gln	Glu	Ala	
				245					250					255		
ctt	gaa	gtt	gac	ttt	yea	aat	aga	tat	ttg	gga	ggg	ggc	gca	ctt	tee	816
Leu	Glu	Val	Asp	Phe	Ala	Asn	Arg	Tyr	Leu	Gly	Gly	Gly	Ala	Leu	Ser	
			260					265					270			
aga	ggc	tgc	gtg	cay	gaa	gaa	atc	cgg	ttc	atg	ata	aac	cca	gaa	ttg	864
Arg	Gly	Cys	Val	Gln	Glu	Glu	Ile	Arg	Phe	Met	Ile	Asn	Pro	Glu	Leu	
		275					280					285				
ate	gtg	ggc	atg	ctc	ttc	atg	gtt	tca	atg	gaa	gat	aat	gaa	gct	ata	91
Ile	Val	Gly	Met	Leu	Phe	Met	Val	Ser	Met	Glu	Asp	Asn	Glu	Ala	Ile	
	290					295					300					
gaa	att	gtt	ggg	yca	gaa	agg	tte	tca	cag	tac	atg	ggg	tat	ggg	tcc	960
Glu	Ile	Val	Gly	Ala	Glu	Arg	Phe	Ser	Gln	Tyr	Met	Gly	Tyr	Gly	Ser	
	305				310					315					320	
tea	ttc	cgt	ttt	act	ggg	gac	tac	tta	gat	agc	aaa	ccc	ttt	gat	gcg	1008

Ser	Phe	Arg	Phe	Thr	Gly	Asp	Tyr	Leu	Asp	Ser	Lys	Pro	Phe	Asp	Ala	
				325					330						335	
atg	ggg	aga	cgg	aaa	act	agg	ata	gtg	yca	att	gat	gct	ttg	gac	tgt	1056
Met	Gly	Arg	Arg	Lys	Thr	Arg	Ile	Val	Ala	Ile	Asp	Ala	Leu	Asp	Cys	
			340					345					350			
cca	act	agg	tta	cag	ttt	gaa	tct	agt	ggg	ctt	cta	agg	gaa	gtg	aac	1104
Pro	Thr	Arg	Leu	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Gly	Leu	Leu	Arg	Glu	Val	Asn	
		355					360					365				
aag	get	ttt	tgt	gga	ttt	ttg	gat	caa	tca	aat	cat	cay	ctc	tgt	gca	1152
Lys	Ala	Phe	Cys	Gly	Phe	Leu	Asp	Gln	Ser	Ann	His	Gln	Leu	Cys	Ala	
	370					375					380					
aag	ctt	gte	cay	gat	tta	aat	aca	aag	gat	aac	tgt	cca	agt	gtc	att	1200
Lys	Leu	Val	Gln	Asp	Leu	Ann	Thr	Lys	Asp	Ann	Cys	Pro	Ser	Val	Ile	
185					390					395					400	
cct	gat	gaa	tyc	ata	yga	gtt	tca	act	gga	aac	tgg	ggg	tgc	gyg	gct	1248
Pro	Asp	Glu	Cys	Ile	Gly	Val	Ser	Thr	Gly	Asn	Trp	Gly	Cys	Gly	Ala	
			405						410					415		
ttt	ggg	gga	aac	cat	gaa	atc	aag	agc	atg	att	caa	tgg	att	gct	gca	1296
Phe	Gly	Gly	Asn	Pro	Glu	Ile	Lys	Ser	Met	Ile	Gln	Trp	Ile	Ala	Ala	
			420					425					430			
tca	cag	gca	ctc	cga	tct	ttt	att	aac	tac	tac	act	ttt	gag	tcc	gaa	1344
Ser	Gln	Ala	Leu	Arg	Ser	Phe	Ile	Asn	Tyr	Tyr	Thr	Phe	Glu	Ser	Glu	
		435				440						445				
tea	ctg	aaa	aga	tta	gaa	gag	gtg	acc	cag	tgg	ata	ttg	cgc	cat	agg	1392
Ser	Leu	Lys	Arg	Leu	Glu	Glu	Val	Thr	Gln	Trp	Ile	Leu	Arg	His	Arg	
	450				455						460					
tgg	acg	gtt	ggc	gag	ttg	tgg	gac	atg	ctt	gtg	gag	tat	tca	tcc	cag	1440
Trp	Thr	Val	Gly	Glu	Leu	Trp	Asp	Met	Leu	Val	Glu	Tyr	Ser	Ser	Gln	
465				470						475					480	
agg	cta	aga	gga	gac	acc	aat	gag	ggc	ttt	tta	aca	tgg	cta	ctt	ccc	1488
Arg	Leu	Arg	Gly	Asp	Thr	Ann	Glu	Gly	Phe	Leu	Thr	Trp	Leu	Leu	Pro	
			485					490						495		
aag	gac	atc	ccc	aat	ggg	gat	gta	gat	tac	atg	tgt	gaa	tag			1530
Lys	Asp	Ile	Pro	Ann	Gly	Asp	Val	Asp	Tyr	Met	Cys	Glu				
			500					505								

<210> 16
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400>	16															
aag	gac	atc	ccc	aat	ggg	gat	gta	gat	tac	atg	tgt	gaa	tag			1530
Met	Glu	Ala	Arg	Gly	Asp	Leu	Arg	Ser	Ile	Leu	Pro	Tyr	Leu	Pro	Val	
1				5				10					1			
Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Ala	Leu	Phe	Trp	Pro	Pro	Ala	Ala	Gln	Glu	Ala	
			20					25				30				
Leu	Lys	Ala	Leu	Ala	Leu	Gly	Pro	Asp	Val	Ser	Arg	Val	Ser	Ser	Gly	

			420					425					430			
Ser	Gln	Ala	Leu	Arg	Ser	Phe	Ile	Ann	Tyr	Tyr	Thr	Phe	Glu	Ser	Glu	
		435					440					445				
Ser	Leu	Lys	Arg	Leu	Glu	Glu	Val	Thr	Gln	Trp	Ile	Leu	Arg	His	Arg	
	450					455					460					
Trp	Thr	Val	Gly	Glu	Leu	Trp	Asp	Met	Leu	Val	Glu	Tyr	Ser	Ser	Gln	
465					470				475						480	
Arg	Leu	Arg	Gly	Asp	Thr	Ann	Glu	Gly	Phe	Leu	Thr	Trp	Leu	Leu	Pro	
			485					490						495		
Lyn	Asp	Ile	Pro	Ann	Gly	Asp	Val	Anp	Tyr	Met	Cys	Glu				
			500					505								

<210> 17
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotido degenerado PG1
<400> 17

atgtbccaca rmtckccrac mgtcc 25

<210> 18
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotido degenerado PG2
<400> 18

gggtgtccwc caaaaremee rcawceec 28

<210> 19
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotido degenerado PG3
<400> 19

gctatagaaa twgtgggtgg rgaaag 26

<210> 20
<211> 26
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotido degenerado PG4

<400> 20

agrggstggg treaggarga ratmcg 26

<210> 21

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotido degenerado PG5

<220>

<221> misc_caracteristica

<222> (18) (18)

<223> n=cualquier nucleótido

<400> 21

atggargaga aggargcnat hga 23

<210> 22

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotido degenerado PG6

<400> 22

ccaytgdage atrctyttida gyte 24

<210> 23

<211> 603

<212> ADN

<213> zea mays

<400> 23

tagggctgtg	tcaggagga	aatccgcttc	atgataaacc	ccgaattgat	tgtgggtatg	60
ctattcttgt	cttgtatgga	agataacgag	gctatagaaa	tcttggtgc	agaacggttc	120
tcacagtata	tgggttatgg	ttcctccttt	cgctttgttg	gtgactattt	agataccaaa	180
ccctttgatt	cgatgggeag	acggagaact	aggattgtgg	ctatcgatgc	ttggactgt	240
ccagctaggt	tacactatga	atctggctgt	ctcctaaggg	aagtgaacaa	ggcattttgt	300

gatttttcg	atcaatcgaa	acaccatctc	tatgcgaagc	tttccagga	ttgcacaac	360
aaggatgact	tttcaagcat	caattccagt	gagtacgtag	gagttcaac	aggaaactgg	420
gggtgtggtg	cttttggtgg	aaaccctgaa	atcaagagca	tgattcagtg	gattgctgca	480
tcacaggctc	ttcgcccttt	tgtaattac	tacactttg	agaacgtgtc	tctgcaaaga	540
ttagaggagg	tgatccagtg	gatacggctt	catggctgga	ctgtcggcga	gctgtggaac	600
ata						603

<210> 24
<211> 12987
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Vector T ADN que incluye una expresion ParG quimerica que reduce el gen
<220>
<221> misc_caracteristica
<222> (1) (25)
<223> complemento del borde T ADN izquierdo

<220>
<221> misc_caracteristica
<222> (58) (318)
<223> complemento de 3 nos

<220>
<221> misc caracteristica
<222> (337) (888)
<223> region de codificacion de barra

<220>
<221> misc caracteristica
<222> (889) (1721)
<223> Promotor 35S

<220>
<221> misc caracteristica
<222> (1728) (3123)
<223> promotor 35S

<220>
<221> misc_caracteristica
<222> (3133) (3311)
<223> parte del ParG homologo del Zea mays

<220>
<221> misc caracteristica
<222> (3344) (4085)

<223> intron Pdk

<220>

<221> misc_caracteristica

<222> (4119) (4297)

<223> parte del ParG homologo de Zea mays (invertido)

<220>

<221> misc_caracteristica

<222> (4310) (5020)

<223> 3 OCS

<220>

<221> misc_caracteristica

<222> (5066) (5042)

<223> Border T ADN derecho

<400> 24

cggcaggata	tattcaattg	taaatggctc	catggcgatc	gctctagagg	atcttcccga	60
tctagtaaca	tagatgacac	cgcgcgcgat	aatttatcct	agtttgcgcg	ctatatattg	120
ttttctatcg	cgtattaaat	gtataattgc	gggactctaa	tcataaaaac	ccatctcata	180
aataacgtca	tgcattacat	gttaattat	acatgcttaa	cgtaattcaa	cagaaattat	240
atgataatca	tcgcaagacc	ggcaacagga	ttcaatctta	agaaacttta	ttgccaaatg	300
tttgaacgat	ctgcttcgga	tcctagacgc	gtgagatcag	atctcggtga	cgggcaggac	360
cggacggggc	ggtaccggca	ggctgaagtc	cagctgccag	aaacccacgt	catgccagtt	420
cccgtgcttg	aagccggccg	cccgcagcat	gccgcggggg	gcataatccga	gcgcctcgtg	480
catgcgcacg	ctcgggtcgt	tgggcagccc	gatgacagcg	accacgctct	tgaagccctg	540
tgctccagg	gacttcagca	ggtgggtgta	gagcgtggag	cccagtcctcg	tccgctgggtg	600
gcgggggggag	acgtacacgg	tcgactcggc	cgtccagtcg	taggcgttgc	gtgccttcca	660
ggggcccgcg	taggcgatgc	cggcgacctc	gccgtccacc	tcggcgacga	gccagggata	720
gcgctcccgc	agacggacga	ggtcgtccgt	ccactcctgc	ggttcctgcg	gctcggtagc	780
gaagttgacc	gtgcttgtct	cgatgtagtg	gttgacgatg	gtgcagaccg	ccggcatgtc	840
cgcctcgggtg	gcacggcgga	tgtcggccgg	gcgtcgttct	gggtccatgg	ttatagagag	900
agagatagat	ttatagagag	agactggtga	tttcagcgtg	tcctctccaa	atgaaatgaa	960
cttccttata	tagaggaagg	gtcttgcgaa	ggatagtggg	attgtgcgtc	atcccttacg	1020
tcagtggaga	tgtcacatca	atccacttgc	tttgaagacg	tggttggaac	gtcttctttt	1080
tccacgatgc	tcctcgtggg	tgggggtcca	tctttgggac	cactgtcggc	agaggcatct	1140
tgaatgatag	cctttccttt	atcgcaatga	tggcatttgt	aggagccacc	ttccttttct	1200
actgtccttt	cgatgaagtg	acagatagct	gggcaatgga	atccgaggag	gtttcccgaa	1260
attatccttt	gttgaaaagt	ctcaatagcc	cittggtctt	ctgagactgt	atctttgaca	1320
tttttgagtg	agaccagagt	gtcgtgctcc	accatgttga	cgaagatttt	cttcttgtca	1380
ttgagtcgta	aaagactctg	tatgaactgt	tcgccagtc	tcacggcgag	ttctgttaga	1440
tcctcgattt	gaatcttaga	ctccatgcat	ggccttagat	tcagtaggaa	ctaccttttt	1500
agagactcca	atctctatta	cttgccttgg	tttatgaagc	aagccttgaa	tcgtccatac	1560
tggaatagta	cttctgatct	tgagaaatat	gtcttctct	gtgttcttga	tgcaattagt	1620
cctgaatcct	ttgactgcat	ctttaacctt	cttgggaagg	tatttgatct	cctggagatt	1680
gttactcggg	tagatcgtct	tgatgagacc	tgctgcgtag	gaacgcggcc	gcgtatacgt	1740

atcgatatct	tcgaattcga	gctcgtcgag	cggccgctcg	acgaattaat	tccaatccca	1800
caaaaatctg	agcttaacag	cacagttgct	cctctcagag	cagaatcggg	tattcaacac	1860
cctcatatca	actactacgt	tgtgtataac	ggtccacatg	ccggtatata	cgatgactgg	1920
ggttgtacaa	aggcggcaac	aaacggcggt	cccgaggttg	cacacaagaa	atttgccact	1980
attacagagg	caagagcagc	agctgacgcg	tacacaacaa	gtcagcaaac	agacaggttg	2040
aacttcatcc	ccaaaggaga	agctcaacca	agcccaaqa	gctttgcaa	ggccctaaca	2100
agcccaccaa	agcaaaaagc	ccactggctc	acgctaggaa	ccaaaaggcc	cagcagtgat	2160
ccagcccaa	aagagatctc	ctttgccccg	gagattacaa	tggacgattt	cctctatctt	2220
tacgatctag	gaaggaagtt	cgaaggtgaa	ggtgacgaca	ctatgttcac	cactcjataat	2280
gagaagggtt	gcctcttcaa	ttcagaaaag	aatgctgacc	cacagatggc	tagagaggcc	2340
tacgcagcag	gtctcatcaa	gacatctac	ccgaqtaaca	atctccagga	gatcaaatac	2400
cttccaaga	aggttaaaga	tgcagtcaaa	agattcagga	ctaattgcat	caagaacaca	2460
gagaaagaca	tatttctcaa	gatcagaagt	actattccag	tatggacgat	tcaaggcttg	2520
cttcataaac	caaggcaagt	aatagagatt	ggagtctcta	aaaaggtagt	tcctactgaa	2580
tctaaggcca	tgcatggagt	ctaagattca	aatcgaggat	ctaacagaac	tcgccgtgaa	2640
gactggcgaa	cagtctac	agagtdtttt	acgactcaat	gacaagaaga	aaatcttcgt	2700
caacatggtg	gagcacgaca	ctctggctia	ctccaaaaat	gtcaaagata	cagtctcaga	2760
agaccaaagg	gctattgaga	cttttcaaca	aaggataaatt	tcgggaaacc	tcctcggatt	2820
ccattgcccc	gctatctgtc	acttcatcga	aaggacagta	gaaaaggaag	gtggctccta	2880
caaattgccat	cattgcgata	aaggaaaggc	tatcattcaa	gatctctctg	ccgacagtgg	2940
tcccaaagat	ggacccccac	ccacgaggag	catcgtqgaa	aaagaagacg	ttccaaccac	3000
gtcttcaaag	caagtggatt	gatgtgacat	ctcoactqac	gtaagggatg	acgcacaatc	3060
ccactatcct	tcgcaagacc	cttctctat	ataaggaagt	tcatttcatt	tggagaggac	3120
acgctcgagc	ccgaattgat	tgtgggtatg	ctattcttgt	cttgtatgga	agataacgag	3180
gctatagaaa	tctttggtgc	agaacggttc	tcacagtata	tgggttatgg	ttcctccttt	3240
cgctttgttg	gtgactattt	agatacicaaa	cccttt9att	cgatqggcag	acggagaact	3300
aggattgtgg	cggtaaccca	gcttggttaag	gaaataatta	ttttotttt	tccttttagt	3360
ataaaatagt	taagtgatgt	taattagtat	gattataata	atatagttgt	tataattgtg	3420
aaaaaataat	ttataaatat	attgt taca	taaacaaaat	agtaatgtaa	aaaaatatga	3480
caagtgatgt	gtaagacgaa	gaagataaaa	gttgagagta	agtatattat	ttttaatgaa	3540
tttgatcgaa	catgtaagat	gatatactag	caltaaatatt	tgttttaatc	ataatagtaa	3600
ttctagctgq	tttgatgaat	taaatatcaa	tgataaaaata	ctatagtaaa	aataagaata	3660
aataaattaa	aataatattt	ttttataatt	aatagtttat	tatataatta	aatactata	3720
ccattactaa	atatttttagt	ttaaaagtta	ataaatattt	tgttagaaat	tccaatctgc	3780
ttgtaattta	tcaataaaca	aaatatitaaa	taacaagcta	aaqtaacaaa	taatatcaaa	3840
ctaatagaaa	cagtaatcta	atgtaacaaa	açataatcta	atgctaatat	aacaaagcgc	3900
aagatctatc	attttatata	gtattatttt	caatcaacat	tcttattaat	ttctaaataa	3960
tactttagt	tttatttaact	tctaaatgga	ttgactatta	attaaatgaa	ttagtccaac	4020
itgaataaac	aaggtaacat	gatatatcat	gtcatttgtgt	tatcattgat	attacatttg	4080
gattgattac	agttgggaag	ctgggttcga	aatcgatagc	cacaatccta	gttctccgtc	4140
tgcccatcga	atcaaaggg	ttggtatcta	aatagtcacc	aacaaaggga	aaggaggaac	4200
cataacccat	atactgtgag	aaccgttcig	caccaaagat	ttctatagcc	tcgttatcct	4260
ccatacaaga	caagaatagc	ataccacaaa	tcaattcggg	tctagagtcc	tgctttaatg	4320
agatatgcga	gacgcctatg	atcgcatga	atttgccttc	aattctgttg	tgcacgttgt	4380
aaaaaacctg	agcatgtgta	gctcagatcc	ttaccgccgg	ttcggttca	ttctaataa	4440
tatatcacc	gttactatcg	tatttttatg	aataatattc	tccgttcaat	ttactgatig	4500
taccctacta	cttatatgta	caatattaata	atgaaaacaa	tatattgtgc	tgaatagggt	4560
tatagcgaca	tctatgatag	agcgccacaa	taacaaacaa	ttgcgtttta	ttattacaaa	4620

tccaatttta	aaaaaagcgg	cagaacaggt	caaacctaaa	agactgatta	cataaatctt	4680
attcaaat	caaaaggccc	caggggctag	tatctacgac	acaccgagcg	gcgaactaat	4740
aacgttca	gaagggaact	ccggttcccc	gccggcgcg	atgggtgaga	ttcctgaag	4800
ttgagtattg	gccgtccgct	ctaccgaaag	ttacgggcac	cattcaaccc	ggiccagcac	4860
ggcgccggg	taaccgactt	gctgccccga	gaattatgca	gcatttttt	gggtgatgtg	4920
ggccccaat	gaagtgcagg	tcaaaccttg	acagtgcga	caaatcggtg	ggcgggtcca	4980
gggcgaattt	tgcgacaaca	tgctgaaggct	cagcaggacc	tgagggtcga	cggccgagta	5040
ctggcaggat	atataccggt	gtaattgtc	gcgtgtgaat	aagtcgctgt	gtatgtttgt	5100
ttgattgttt	ctgttggagt	gcagcccatt	tcaccggaca	agtcggctag	attgatttag	5160
ccctgatgaa	ctgccgagg	gaagccatct	tgagcgcgga	atgggaatgg	atttcgttgt	5220
acaacgagac	gacagaacac	ccacgggacc	gagcttcgat	cgagcatcaa	atgaaactgc	5280
aatttattca	tatcaggatt	atcaatacca	tattttgaa	aaagccggtt	ctgtaatgaa	5340
ggagaaaact	caccgaggca	gttccatagg	atggcaagat	cctggtatcg	gtctgcgatt	5400
ccgactcgtc	caacatcaat	acaacctatt	aatttccct	cgtcaaaaat	aaggttatca	5460
agtgagaaat	cacatgagt	gacgactgaa	tccggtgaga	atggcaaaaag	tttatgcatt	5520
tctttccaga	ctgttcaac	aggccaqcca	ttacgctcgt	catcaaaaatc	actcgcatca	5580
accaaaccgt	tattcattcg	tgattgcgcc	tgagcgagac	gaaatacgcc	gctgttaaaa	5640
ggacaattac	aaacaggaat	cgaatgcaac	cggcgagga	acactgccag	cgcatcaaca	5700
atattttcac	ctgaatcagg	atattcttct	aatacctgga	atgctgtttt	tccggggatc	5760
gcagtggatga	gtaaccatgc	atcatcagga	gtacggataa	aatgcttgat	ggtcggaaga	5820
qgcataaatt	ccgtcagcca	gtttagtctg	accatctcat	ctgtaacatc	attggcaacg	5880
ctacctttgc	catgtttcag	aaacaactct	ggcgcatcgg	gcttcccata	caatcgatag	5940
attgtcgcac	ctgattgccc	gacattatcc	gaatctggca	attccgggtc	gctgtcgtgc	6000
rataaaaccg	cccagtctag	ctatcgccat	gtaagcccac	tgcaagctac	ctgttttctc	6060
tttgcgcttg	cgttttccgg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcgcgt	aatctgctgc	6120
ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttgtt	tgccggatca	agagctacca	6180
actctttttc	cgaaggtaac	tggtctcagc	agagcgagga	taccaaatac	tgcttctcta	6240
tgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	atacctcgct	6300
ctgctaattcc	tgttacgagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	taccgggttg	6360
gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	gggttcgtgc	6420
acacagccca	gcttgagcgg	aacgacctac	accgaactga	gatacctaca	gcgtgagcta	6480
gagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	aagcggcagg	6540
gtcggaaacag	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	tctttatagt	6600
ccgtgcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgctgatttt	tgtgatgctc	gtcagggggg	6660
cggagccctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	cttttgctgg	6720
ccttttgctc	acatgttctt	tcttgcgtta	tccctgatt	ctgtggataa	ccgtattacc	6780
gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	agccgaacga	ccgagcgag	cgagtcagtg	6840
agcgaggaag	cggaagagcg	cctgatgcgg	tattttctcc	ttacgcatct	gtgcggtatt	6900
tcacaccgca	tatggtgcac	tctcagtaca	atctgctctg	atgccgcata	gttaagccag	6960
tatacactcc	gctatcgcta	cgtgactggg	tcatggctgc	gccccgacac	ccgccaacac	7020
ccgctgagc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcccgcatc	cgcttacaga	caagctgtga	7080
ccgtctccgg	gagctgcatg	tgctagaggt	tttaccgctc	atcaccgaaa	cgcgcgaggc	7140
aggggtgcctt	gatgtgggcg	ccggcggtcg	agtggcgacg	gcgcggcttg	tccgcgccct	7200
ggtagattgc	ctggccgtag	gccagccatt	tttagcggc	cagcggccgc	gataggccga	7260
cgcaagcgg	cggggcgtag	ggagcgcagc	gaccgaagg	taggcgcttt	ttgcagctct	7320
tcggctgtgc	gctggccaga	cagttatgca	caggccaggc	gggttttaag	agttttaata	7380
agttttaaag	agttttaggc	ggaaaaatcg	cctttttct	cttttataatc	agtcacttac	7440
atgtgtgacc	ggttcccaat	gtacggcttt	gggttcccaa	tgtacgggtt	ccggttccca	7500

atgtacggct	ttgggttccc	aatgtacgtg	ctatccacag	gaaagagacc	tttctgacct	7560
ttttcccctg	ctaggggcaat	tigccctagc	atctgctccg	tacattagga	accggcggat	7620
gcttcgccc	cgatcagggt	gcggtagcgc	atgactagga	tcgggccagc	ctgccccgcc	7680
tcctccttca	aatcgctact	cggcaggtca	ttgacccga	tcagcttgcg	cacggtgaaa	7740
cagaacttct	tgaactctcc	ggcgctgcca	ctgcgttcgt	agatcgtctt	gaacaacccat	7800
ctggcttctg	ccttgccctgc	ggcgcgqcg	gccaggcggt	agagaaaacg	gccgatgccg	7860
ggatcgatca	aaaagtaatc	gggggtgaacc	gtcagcacgt	ccgggttctt	gccttctgtg	7920
atctcgcggt	acatccaatc	agctagctcg	atctcgatgt	actccggccg	cccggtttcg	7980
ctctttacga	tctttagcgc	gctaatacaag	gcttcaccc	cggataccgt	caccaggcg	8040
ccgttcttgg	ccttcttctg	acgctgcctg	gcaacgtgcg	tgtgttttaa	ccgaatgcag	8100
gtttctacca	ggcgtctt	ctgctttccg	ccatcggctc	gccggcagaa	cttgagtacg	8160
tccgcaacgt	gtggacggaa	cacgcggccg	ggcttgtctc	ccttcccttc	ccggatccg	8220
ttcatggatt	cggtagatg	ggaaaccgcc	atcagtacca	ggtcgtaatc	ccacacactg	8280
gccatgccgg	ccggccctgc	ggaaacctct	acgtgcccg	ctggaagctc	gtagcggatc	8340
acctcgccag	ctcgctgggc	acgcttcgac	agacggaaaa	cggccacgtc	catgatgctg	8400
cgactatcgc	gggtgcccac	gtcatagagc	atcggaaacga	aaaaatctgg	ttgctcgtcg	8460
cccttgggcg	gcttctaat	cgacggcgca	ccggctgccc	gcgggtgccg	ggattctttg	8520
cggattcgat	cagcggccgc	ttgccacgat	tcaccggggc	gtgcttctgc	ctcgatgcgt	8580
tgcgctggg	cggcctgcgc	ggccttcaac	ttctccacca	ggtcatcacc	cagcgccgcg	8640
ccgatttcta	ccgggccgga	tgtttgcga	ccgtcacgcc	gattcctcgg	gcttgggggt	8700
tccagtgcc	ttgcagggcc	ggcagacaac	ccagccgctt	acgcctggcc	aaccgcccgt	8760
tcctccacac	atggggcatt	ccacggcgct	gtgcctgg	tgttcttgat	ttccatgcc	8820
gcctccttta	gccgctaaaa	ttcatctact	catttattca	tttgctcatt	tactctggt	8880
gctgcgcgat	gtattcagat	agcagctcgg	taatggctt	gccttggcgt	accgcgtaca	8940
tcctcagctt	ggtgtgatcc	tccgccggca	actgaaagtt	gacccgcttc	atggctggcg	9000
tgtctgccag	gctggccaac	gttgcagcct	tgtctctgcg	tgcgctcgga	cggccggcac	9060
ttagcgtgtt	tgtgctttg	ctcattttct	ctttacctca	ttactcaaa	tgagtttga	9120
tttaatttca	gcggccagcg	cctggacctc	gcgggcagcg	tcgccctcgg	gctctgattc	9180
aagaacgggt	gtgccggcgg	cggcagtgcc	tgggtagctc	acgcgctgcg	tgatacggga	9240
ctcaagaatg	ggcagctcgt	acccggccag	cgcctcgga	acctcaccgc	cgatgcgcgt	9300
gcctttgatc	gcccgcgaca	cgacaaaggc	cgctttagtc	cttccatccg	tgacctcaat	9360
gcgctgctta	accagctcca	ccaggtcggc	ggtggcccat	atgtcgtaag	ggcttggctg	9420
caccggaatc	agcacgaagt	cggctgcctt	gatcgcgac	acagccaagt	ccgccgcctg	9480
ggcgctccg	tcgatcacta	cgaagtgcgc	ccggccgatg	gccttcacgt	cgcggtcaat	9540
cgctggggcg	tcgatgccga	caacggtag	cggttgatct	tcccgcacgg	ccgccaatc	9600
gcgggcactg	ccctggggat	cggaatcgac	taacagaaca	tcggcccccg	cgagttgcag	9660
qqcggggct	agatgggtt	cgatggctgt	cttgctgac	ccgcctttct	ggttaaagtac	9720
agcgataacc	ttcatgcgtt	ccccttgcgt	atttgttat	ttactcatcg	catcatatac	9780
gcagcgaccg	catgacgcaa	gctgttttac	tcaaatacac	atcacctttt	tagacggcgg	9840
cgctcgggtt	cttcagcggc	caagctggcc	ggccaggccg	ccagcttggc	atcagacaaa	9900
ccggccagga	ttcatgcag	ccgcacgggt	gagacgtgcg	cgggcgggctc	gaacacgtac	9960
ccggccgcga	tcattcctgc	ctcgatctct	tcggtaatga	aaaacgggtc	gtcctggccg	10020
tcctggtgcg	gtttcatgct	tgttctctt	ggcgttcatt	ctcggcggcc	gccaggcggt	10080
cggcctcgg	caatgcgtcc	tcacggaagg	caccgcgccg	cctggcctcg	gtgggcgtca	10140
cttctctgct	gcgctcaagt	gcgcggtaca	gggtcgagcg	atgcacgcca	agcagtgcg	10200
ccgcctcttt	cacggtgcgg	ccttctggt	cgatcagctc	gcgggcgtgc	gcgatctgtg	10260
ccggggtag	ggtagggcgg	gggcaaaact	tcacgcctcg	ggccttggcg	gcctcgcgcc	10320
cgctccgggt	gcggtcgatg	attaggaac	gctcgaactc	ggcaatgccg	gcgaacacgg	10380

tcaacaccat	gcggccggcc	ggcgtggtg	tgtcgccca	cggctctgcc	aggctacgca	10440
ggcccgcgcc	ggcctcctgg	atgcgctcgg	caatgtccag	taggtcgcg	gtgctgcggg	10500
ccaggcggtc	tagcctggtc	actgtcacia	cgctgcagg	gcgtaggtg	tcaagcatcc	10560
tggccagctc	cgggcggtcg	cgctgggtgc	cggtgatctt	ctcgaaaac	agcttgggtc	10620
agccggccgc	gtgcagttcg	gcccgttgg	tggtcaagtc	ctggctgctg	gtgctgacgc	10680
gggcatagcc	cagcaggcca	gcggcggcg	ctgtgtcat	ggcgtaatgt	ctccggttct	10740
agtcgcaagt	attctacttt	atgcgacaa	aacacgcgac	aagaaaacgc	caggaaaagg	10800
gcaggcgggc	agcctgtcgc	gtaacttagg	actgtgcga	catgtcgttt	tcagaagacg	10860
gctgcactga	acgtcagaag	ccgactgcac	tatagcagcg	gaggggttgg	atcgatccct	10920
gctcgcgcag	gctgggtgcc	aagctctcgg	gtaacatcaa	ggcccgatcc	ttggagccct	10980
tgccctcccg	cacgatgatc	gtgccgtgat	cgaaatccag	atccttgacc	cgcagttgca	11040
aaccctcact	gatccgcgat	cccgttccat	acagaagctg	ggcgaacaaa	cgaigtctgc	11100
ttccagaaa	accgaggatg	cgaaccactt	catccggggg	cagcaccacc	ggcaagcgcc	11160
cgqacggccg	aggctctccg	atctcctgaa	gccagggcag	atccgtgcac	agcacttgcc	11220
gtagaagaac	agcaaggccg	ccaatgcctg	acgatgcgtg	gagaccgaaa	ccttgcgctc	11280
gttcgccagc	caggacagaa	atgcctcgac	ttcgctgctg	cccaagggtg	ccgggtgacg	11340
cacaccgtgg	aaacggatga	aggcacgaac	ccagtggaca	taagcctggt	cggttcgtaa	11400
gctgtaatgc	aagtagcgta	tgcgctcacg	caactgggcc	agaacctga	ccgaacgcag	11460
cggtggtaac	ggcgcagtgg	cggttttcat	ggcttgttat	gactgttttt	ttgggggtaca	11520
gtctatgcct	cgggcatcca	agcagcaagc	gcgttacgcc	gtgggtcgat	gtttgatgtt	11580
tggagcagc	aacgatgtta	cgcagcaggg	cagtcgccct	aaaacaaagt	taaacaatcat	11640
gaggggaagcg	gtgatcgccg	aagtatcgac	tcaactatca	gaggtagtgt	gcgtcatcga	11700
gcgccatctc	gaaccgacgt	tgctggccgt	acatttgtac	ggctccgcag	tggtatggcg	11760
ctqaagcca	cacagtgata	ttqatttgct	ggttacgggtg	acgtaaggc	ttgatgaaac	11820
aacqcggcga	gctttgatca	acgacctttt	ggaaacttcg	gcttcccctg	gagagagcga	11880
gattctccgc	gctgtagaag	tcaccattgt	tgtqcacgac	gacatcatc	cgtggcggtta	11940
tccagctaag	cgcgaaactgc	aatttggaga	atggcagcgc	aatgacattc	ttgcagggtat	12000
cttcgagcca	gccacgatcg	acattgatct	ggctatcttg	ctgacaaaag	caagagaaca	12060
tagcgttqcc	ttggtaggtc	cagcggcgga	qqaactcttt	gatccgggtc	ctgaacagga	12120
tctatttgag	gcqctaaatg	aaaccttaac	gctatggaac	tcgccgccc	actgggctgg	12180
cqatgagcga	aatgtagtgc	ttacgttgtc	ccgcatttgg	tacagcgag	taaccggcaa	12240
aatcgcgccg	aaggatgtcg	ctgccgactg	ggcaatggag	cgctgccgg	cccagtatca	12300
gcccgtcata	cttgaagcta	gacaggctta	tcttggacaa	gaagaagatc	gcttggcctc	12360
gcgcgcagat	cagttggaag	aatttgtcca	ctacgtgaaa	ggcgagatca	ccaaggtagt	12420
cqqcaaataa	tgtctaacia	ttcgttcaag	ccgacgcgcg	ttcgcgcg	ggcttaactc	12480
aaqcggtaga	tgcactaagc	acataattc	tcacagccaa	actatcaggt	caagtctgct	12540
ttattatttt	ttaaqcggtc	ataataaqcc	ctacacaaat	tggagatat	atcatgaaag	12600
gctggctttt	tcttgttatc	gcaatagtgt	gcqaagtaat	cgcaacatcc	gcattaaaat	12660
ctaqqaggg	ctttactaaq	ctagcttgrt	tggtcgttcc	ggtaccgtga	acgtcggctc	12720
gattgtacct	gcgttcaa	actttgcgat	cgtgttcgcg	gcctgcccg	tgcgtcggct	12780
gatctcacgg	atcgactgct	tctctcgcaa	cgccatccga	cggatgatgt	ttaaaagtcc	12840
catgtggatc	actccgttgc	ccgctcgctc	accgtgttgg	ggggaagggtg	cacatggctc	12900
agttctcaat	ggaaattatc	tgcctaaccg	gctcagttct	gcgtagaaac	caacatgcaa	12960
gctccaccgg	gtgcaaagcg	gcagcgg				12987

<210> 25

<211> 13226

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Vector T ADN que incluye una expresion ParG quimerica que reduce el gen

(

<220>
 <221> misc_caracteristica
 <222> (1) (25)
 <223> Borde T ADN izquierdo (C)

<220>
 <221> misc_caracteristica
 <222> (58) (318)
 <223> 3 nos (C)

<220>
 <221> misc_caracteristica
 <222> (33 7) (888)
 <223> region de codificacion de barras (C)

<220>
 <221> misc_caracteristica
 <222> (889) (1721)
 <223> Region promotora 35S3 (C)

<220>
 <221> misc_caracteristica
 <222> (1778) (3123)
 <223> region promotora 35S

<220>
 <221> misc_caracteristica
 <222> (3130) (3431)
 <223> parte del ParG homologo del Zea mays

<220>
 <221> misc caracteristica
 <222> (3464) (4205)
 <223> Pdk—intron

<220>
 <221> misc_caracteristica
 <222> (4238) (4536)
 <223> parte del ParG homologo del Zea mays (C)

<220>
 <221> misc_caracteristica
 <222> (4549) (5259)
 <223> 3 ocs

<220>
 <221> misc_caracteristica
 <222> (5281) (5305)

<223> Borde T ADN derecho (C)

<400>25

cggcaggata	tattcaattg	taaatggctc	catggcgatc	gctctagagg	atcttcccga	60
tctagtaaca	tagatgacac	cgcgcgcat	aatttatcct	agttgcgcg	ctatatttg	120
tttctatcg	cgtattaaat	gtataatgc	gggactctaa	tcataaaaac	ccatctcata	180
aataacgtca	tgcatcat	gttaattatt	acatgcttaa	cgtaattcaa	cagaaattat	240
atgataatca	tcgcaagacc	ggcaacagga	ttcaatctta	agaaacttta	ttgccaatg	300
ttgaacgat	ctgcttcgga	tcctagacgc	gtgagatcag	atctcgggta	cgggcaggac	360
cggacggggc	ggtaccggca	ggctgaagtc	cagctgccag	aaaccacgt	catgccagtt	420
cccgtgcttg	aagccggccg	cccgcagcat	gccgcggggg	gcataccga	gcgcctcgtg	480
catgcgcacg	ctcgggtcgt	tgggcagccc	gatgacagcg	accacgccct	tgaagccctg	540
gcctccagg	gacttcagca	ggtgggtgta	gagcgtggag	cccagtcccg	tccgtcgggtg	600
gcggggggag	acgtacacgg	tcgactcggc	cgtccagtcg	taggcgttgc	gtgcccttcca	660
ggggcccgcg	taggcgatgc	cggcgacctc	gccgtccacc	tcggcgacga	gccagggata	720
gcgtccccgc	agacgacga	ggctgtccgt	ccactcctgc	ggttcctgcg	gctcggtagc	780
gaagttgacc	gtgctgtct	cgatgtagt	gttgacgatg	gtgcagaccg	ccggcatgtc	840
cgctcgggtg	gcacggcgga	tgtcggcggg	gcgtcgttct	gggtccatgg	ttatagagag	900
agagatagat	ttatagagag	agactggtga	tttcagcgtg	tccttccaa	atgaaatgaa	960
cttccttata	tagaggaagg	gtcttgcgaa	ggatagtggg	attgtgcgtc	atcccttacg	1020
tcagtggaga	tgtcacatca	atccacttgc	ttgaagacg	tggttgaac	gtcttctttt	1080
tccacgatgc	tcctcgtggg	tgggggtcca	tccttgggac	cactgtcggc	agaggcatct	1140
tgaatgatag	ccttctctt	atcgcaatga	tggcatttgt	aggagccacc	ttccttttct	1200
actgtccttt	cgatgaagt	acagatagct	gggcaatgga	atccgaggag	gtttcccgaa	1260
attatccttt	gttgaaaagt	ctcaatagcc	cttggctct	ctgagactgt	atctttgaca	1320
ttttggagt	agaccagagt	gtcgtgcctc	accatgttga	cgaagatttt	cttctgtca	1380
ttgagtcgta	aaagactctg	tatgaactgt	tcgccagtct	tcacggcgag	ttctgttaga	1440
tcctcgattt	gaatcttaga	ctccatgcac	ggccttagat	tcagtaggaa	ctacctttt	1500
agagactcca	atctctatta	cttgccttgg	ttatgaagc	aagccttgaa	tcgtccatacr	1560
tggaatagta	cttctgatct	tgagaaatat	gtcttctct	gtgttcttga	tgcaattagt	1620
cctgaatcct	ttgactgcat	ctttaacctt	cttgggaagg	tatttgatct	cctggagatt	1680
gttactcggg	tagatcgtct	tgatgagacc	tgtcgcgtag	gaacgcggcc	gcgtatacgt	1740
atcgatatct	tcgaattcga	gctcgtcag	cggccgctcg	adgaattaat	tccaatccca	1800
caaaaatctg	agcttaacag	cacagttgct	cctctcagag	cagaatcggg	tattcaacac	1860
cctcatatca	actactacgt	tgtgtataac	ggtcoagatg	ccggtatata	cgatgctgg	1920
ggttgtadaa	aggcggcaac	aaacgggogt	cccggagttg	cacacaagaa	attgccact	1980
attacagagg	caagagcagc	agctgacgcg	tacacaacaa	gtcagcaaad	agacagggtg	2040
aacttcatcc	ccaaaggaga	agctcaactc	aagcccaaga	gctttgctaa	ggccctaaca	2100
agcccaccaa	agcaaaaagc	ccactggctc	acgctaggaa	ccaaaaggcc	cagcagtgat	2160
ccagcccaa	aagagatctc	ctttgccc	gagattacaa	tggacgattt	cctctatctt	2220
tacgatctag	gaaggaagtt	cgaagggtgaa	ggtgacgaca	ctatgttcac	cactgataat	2280
gagaagggtta	gcctcttcaa	tttcagaaag	aatgctgacc	cacagatggt	tagagaggcc	2340
tacgcagcag	gtctcatcaa	gacgatctac	ccgagtaaca	atctccagga	gatcaaatac	2400
cttccaaga	aggttaaaga	tgcagtcaaa	agattcagga	ctaattgcat	caagaadac	2460
gagaaagaca	tatttctcaa	gatcagaagt	actattccag	tatggacgat	tcaaggcttg	2520
cttcataaac	caaggcaagt	aatagagatt	ggagtctcta	aaaaggtagt	tcctactgaa	2580
tctaaggcca	tgcattggagt	ctaagattca	aatcgaggat	ctaacagaac	tcgccgtgaa	2640

gactggcgaa	cagttcatat	agagtcttt	acgactcaat	gacaagaaga	aaatcttctg	2700
caacatggg	gagcacgaca	ctctgggtcta	ctccaaaaat	gtcaaagata	cagttctcaga	2760
agaccaaagg	gctattgaga	ctttcaaca	aaggataatt	tcgggaaacc	tcctcggatt	2820
ccattgcca	gctatctgtc	acttcatcga	aaggacagta	gaaaaggaag	gtggctccta	2880
caaatgccat	cattgcgata	aaggaaaggc	tatcattcaa	gatctctctg	ccgacagtgg	2940
tcccaaagat	ggacccccac	ccacgaggag	catcgtggaa	aaagaagacg	ttccaaccac	3000
gtcttcaaag	caagtggatt	gatgtgacat	ctccactgac	gtaagggatg	acgcacaatc	3060
ccactatcct	tcgcaagacc	cttctctat	ataaggaagt	tcatttcatt	tggagaggac	3120
acgctcgagg	aatctggctg	tctcctaagg	gaagtgaaca	aggcattttg	tggatttttc	3180
gatcaatcga	aacaccatct	ctatgcgaag	ctttccagg	atttgcacaa	caaggatgac	3240
tttcaagca	tcaattccag	tgagtacgta	ggagtttcaa	caggaaactg	gggtgtgggt	3300
gctttgggtg	gaaaccttga	aatcaagagc	atgattcagt	ggattgctgc	atcacaggct	3360
cttcgcccct	ttgttaatta	ctacactttt	gagaacgtgt	ctctgcaaag	attagaggag	3420
gtgatccagt	gggtacccca	gcttggtaag	gaaataatta	ttttctttt	tccttttagt	3480
ataaaatagt	taagtgatgt	taattagtat	gattataata	alatatgtgt	tataattgtg	3540
aaaaaataat	ttataaatat	attgtttaca	taaacaacat	agtaatgtaa	aaaaatatga	3600
caagtgatgt	gtaagacgaa	gaagataaaa	gttgagagta	agtatattat	tttaaatgaa	3660
tttgatcgaa	catgtaagat	gatatactag	cattaatatt	tgttttaatc	ataatagtaa	3720
ttctagctgg	tttgatgaat	taaatatcaa	tgataaaaata	ctatagtaaa	aataagaata	3780
aataaattaa	aataatattt	tttatgatt	aatagtttat	tatataatta	aatatctata	3840
ccattactaa	atattttagt	ttaaaagtta	ataaatattt	tgtagaaat	tccaatctgc	3900
ttgtaattta	tcaataaaca	aaatattaaa	taacaagcta	aagtaacaaa	taatatacaa	3960
ctaatagaaa	cagtaatcta	atgtaacaaa	acataatcta	atgctaatat	aacaaagcgc	4020
aagatctatc	attttatata	gtattatttt	caatcaacat	tcttattaat	ttctaaataa	4080
tactttagtg	tttattaact	tctaaatgga	ttgactatta	attaaatgaa	ttagtcgaac	4140
atgaataaac	aaggtaacat	gataqatcat	gtcatttgtt	tatcattgat	cttacatttg	4200
gattgattac	agttgggaag	ctgggttcga	aatcgatcac	tggatcacct	cctctaactt	4260
ttgcagagac	acgttctcaa	aagtgtagta	attaacaaaa	gggccaagag	cctgtgatgc	4320
agcaatccac	tgaatcatgc	tcttgatttc	agggtttcca	ccaaaagcac	cacaacccca	4380
gtttcctggt	gaaactccta	cgtactcact	ggaattgatg	cttgaaaagt	catccttggt	4440
gtgcaaatcc	tggaaagct	tcgcatagag	atgggtgttc	gattgatcga	aaaatccaca	4500
aaatgccttg	ttcacttccc	ttaggagaca	gccagattct	ctagagtcct	gctttaatga	4560
gatatgcgag	acgcctatga	tcgcatgata	tttgctttca	attctgttgt	gcacgttgta	4620
aaaaacctga	gcatgtgtag	ctcagatcct	taccgccggt	ttcggttcat	tctaataaat	4680
atatcaccgg	ttactatcgt	atttttatga	ataatatctt	ccgttcaatt	tactgattgt	4740
accctactac	ttatatgtac	aatattaaaa	tgdaaacaac	atattgtgct	gaatagggtt	4800
atagcgacat	ctatgataga	gcgccacaat	aacaaacaat	tgcgttttat	tattacdaat	4860
ccaattttaa	aaaaagcggc	agaaccggtc	aaacctaaaa	gactgattac	ataaatctta	4920
ttcaaattto	aaaaggcccc	aggggctagt	atctacgaca	caccgagcgg	cgactaata	4980
acgttcactg	aagggaactc	cggttccccg	ccggcgcgca	tgggtgagat	tccttgaagt	5040
tgagtattgg	ccgtccgctc	taccgaaagt	tacgggcacc	attcaaccgg	gtccagcacg	5100
gcggccgggt	aaccgacttg	ctgccccgag	aatcatgcag	catttttttg	gtgtatcttg	5160
gccccaaatg	aagtgcaggt	caaaccttga	aagtgcagac	aaatcggttg	gcgggtccag	5220
ggcgaatttt	gcgacaacat	gtcgaggctc	agcaggacct	gcaggtcgtc	ggccgagtac	5280
tggcaggata	tataccgtcg	taatttgtcg	cgtgtgaata	agtcgctgtg	tatgtttgtt	5340
tgattgtttc	tgttggagtg	cagcccattt	caccggacaa	gtcggctaga	ttgatttagc	5400
cctgatgaac	tgccgagggg	aagccatctt	gagcgcggaa	cgggaatgga	tttcgttgta	5460
caacgagacg	acagaacacc	cacgggac	cg agcttcgatc	gagcatcaaa	tgaactgacd	5520

atttattcat	atcaggatta	tcaataccat	atittgaaa	aagccgtttc	tgtaatgaag	5580
gagaaactc	accgaggcag	ttccatagga	tggcaagatc	ctggtatcgg	tctgcgattc	5640
cgactctcc	aacatcaata	caacctatta	atttcccctc	ggtcaaaaata	aggttatcaa	5700
gtgagaaatc	accatgagtg	acgactgaat	ccggtgagaa	tggcaaaagt	ttatgcattt	5760
ctttccagac	ttgttcaaca	ggccagccat	tacgctcgtc	atcaaaatca	ctcgcataca	5820
ccaaaccgtt	attcartcgt	gattgcgcct	gagcgagacg	aaatacgccg	ctgttaaaag	5880
gacaattaca	aacaggaatc	gaatgcaacc	ggcgcaggaa	cactgccaga	gcatcaacaa	5940
tattttcdcc	tgaatcagga	tattcttcta	atacgtggaa	tgctgtttt	ccgggatcgc	6000
cagtggtgag	taacctgca	tcatcaggag	tacggataaa	atgcttgatg	tcggaagag	6060
gcataaattc	cgtcagccag	tttagtctga	ccatctcatc	tgtaacatca	ttggcaacgc	6120
tacctttgcc	atgtttcaga	aacaactctg	gcgcatcggg	cttcccatac	aatcgataga	6180
ttgtcgcacc	tgattgcccg	acattatccg	aatctggcaa	ttccggttcg	cttgctgtcc	6240
taaaaccgc	ccagtctagc	tatcgccatg	taagccaact	gcaatgctacc	tgctttctct	6300
ttgcgcttgc	gttttccgga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgc	6360
tgcaaacaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	cggtttgttt	gccggatcaa	gagctacca	6420
ctctttttcc	gaaggtaact	ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	gtccttctag	6480
tgtagccgta	gttaggccac	cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgtc	6540
tgctaactct	gttaccagtg	gctgctgcca	gcggcgataa	gtcgtgtctt	accgggttgg	6600
actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcqtgca	6660
acagcccag	cttggagcga	acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	cgtgagctat	6720
gagaaagcgc	cacgcttccc	gaagggagaa	aggcggacag	gtatccgqta	agcggcaggg	6780
tcggaacagg	agagcgcdeg	agggagcttc	cagggggaaa	cgcttggtat	ctttatagtc	6840
ctgtcggggt	tcgccacctc	tgacctgagc	gccgatttlt	gtgatgctcg	tcagggggggc	6900
ggagccctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcgg	cctttttacg	gttcctggcc	ttttgctggc	6960
cttttgctca	catgttcttt	cctgcgttat	cccctqatc	tgtggataac	cgtattaccg	7020
cctttgagtg	agctgatacc	gctcgcgcga	gccgaacgac	cgagcgcagc	gagtcagtga	7080
gcgaggaagc	ggaagagcgc	ctgatgcggt	attttctcct	tacgcatctg	tcgggtattt	7140
cacaccgcat	atggtgcact	ctcagtacaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagt	7200
atacactccg	ctatcgctac	gtgactgggt	catggctgcg	ccccgacacc	cgccaacacc	7260
cgctgacgcg	ccctgacggg	cttgtctgct	cccggcatcc	gcttacagac	aagctgtgac	7320
cgctctccggg	agctgcatgt	gtcagagggt	ttcaccgtca	tcaccgaaac	gcgcgaggca	7380
gggtgccttg	atgtgggcgc	cggcggtcga	gtggcgacgg	cgcggttgt	ccgcgccctg	7440
gtagattgcc	tggccgtagg	ccagccattt	ttgagcggcc	agcggccgcg	ataggccgac	7500
gcgaagcggc	ggggcgtagg	gagcgcagcg	accgaagggt	aggcgctttt	tcagctctt	7560
cggctgtgcg	ctggccagac	agttatgcac	aggccaggcg	ggttttaaga	gttttaataa	7620
gttttaaaga	gttttaggcg	gaaaaatcgc	ctttttctc	ttttatatca	gtcacttaca	7680
tgtgtgaccg	gttcccaatg	tacggctttg	ggttcccaat	gtacgggttc	cggttcccaa	7740
tgtacggctt	tgggttccca	atgtacgtgc	tatccacagg	aaagagacct	tttcgacctt	7800
ttcccctgc	tagggcaatt	tgccctagca	tctgctccgt	acattaggaa	ccggcggatg	7860
cttcgccctc	gatcagggtg	cggtagcgca	tgactaggat	cgggccagcc	tgccccgcct	7920
cctccttcaa	atcgtactcc	ggcagggtcat	ttgacctgat	cagcttgcgc	acggtgaaac	7980
agaacttctt	gaactctccg	gcgctgccac	tgcgttcgta	gatcgtcttg	aacaaccatc	8040
tggtctctgc	cttgccctgcg	gcgcggcggtg	ccaggcggtg	gagaaaacgg	ccgatgccgg	8100
gatcgatcaa	aaagtaatcg	gggtgaaccg	tcagcacgctc	cgggttcttg	ccttcgtga	8160
tctcgcggta	catccaatca	gctagctcga	tctcgatgta	ctccggccgc	ccggtttcgc	8220
tctttacgat	ctttagcggg	ctaataaagg	cttcaccctc	ggataccgctc	accaggcggc	8280
cgttcttggc	cttcttcgta	cgttgcattg	caacgtgcgt	ggtgtttaac	cgaatgcagg	8340
ttctaccag	gtcgtctttc	tgctttccgc	catcggtcgc	ccggcagaa	ttgagtacgt	8400

ccgcaacgtg	tggacggaac	acgcggc	cgg	gcttgtctcc	ctccctcc	cggtatcggt	8460
tcatggattc	ggtagatgg	gaaaccgcca	tcagtaccag	gtcgtaatcc	cacacactgg		8520
ccatgccggc	cggccctgcg	gaaacctcta	cgtgcccgtc	tggaagctcg	tagcggatca		8580
cctcgccagc	tcgtcggta	cgcttcgaca	gacggaaaac	ggccacgtcc	atgatgctgc		8640
gactatcgcg	ggtgcccacg	tcatagagca	tcggaacgaa	aaaatctggt	tgctcgctgc		8700
ccttgggcgg	cttctaate	gacggcgcac	cggctgccgg	cggttgccgg	gattctttgc		8760
ggattcgatc	agcggccgct	tgccacgatt	caccggggcg	tgcttctgcc	tcgatgcgtt		8820
gccgtggggc	ggcctgcgcg	gccttcaact	tctccaccag	gtcatcacc	agcggccgcg		8880
cgatttgtac	cgggccggat	ggtttgcgac	cgtcacgccg	attcctcggg	cttggggggt		8940
ccagtgccat	tgaggggccg	gcagacaacc	cagccgctta	cgcctggcca	accgcccgtt		9000
cctccacaca	tggggcattc	cacggcgctcg	gtgcctggtt	gttcttgatt	ttccatgcg		9060
cctcctttag	ccgctaaaat	tcatctactc	atttattcat	ttgctcattt	actctggtag		9120
ctgcgcgatg	tattcagata	gcagctcggt	aatggtcttg	ccttggcgta	ccgcgtacat		9180
cttcagcttg	gtgtgatcct	ccgcccggcaa	ctgaaagttg	acccgcttca	tggctggcgt		9240
gtctgccagg	ctggccaacg	ttgcagcctt	gctgtcgctg	gcgctcggac	ggccggcact		9300
tagcgtgttt	gtgcttttgc	tattttctc	tttacctcat	taactcaaat	gagttttgat		9360
ttaatttcag	cggccagcgc	ctggacctcg	cgggcagcgt	cgcctcggg	ttctgattca		9420
agaacggttg	tgccggcggc	ggcagtgctt	gggtagctca	cgcgctgcgt	gatacgggac		9480
tcaagaatgg	gcagctcgta	cccggc	agc	gcctcggcaa	cctcaccgcc	gatgcgcgtg	9540
cctttgatcg	cccgcgacac	gacaaaggcc	gcttgtagcc	ttccatccgt	gacctcaatg		9600
cgctgcttaa	ccagctccac	caggtcggcg	gtggcccata	tgctgtaagg	gcttggctgc		9660
accggaatca	gcacgaagtc	ggctgccttg	atcgcggaca	cagccaagtc	cgccgccttg		9720
ggcgctccgt	cgatcactac	gaagtcgcgc	cggccgatgg	ccttcacgtc	gcggtcaatc		9780
gtcggggcgt	cgatgccgac	aacggttagc	ggtgatctt	cccgcacggc	cgcccaatcg		9840
gggcactgc	cctggggatc	ggaatcgact	aacagaacat	cggccccggc	gagttgcagg		9900
gcgcqggcta	gatgggttgc	gatggtcgtc	ttqcctgacc	cgcctttctg	gttaagtaca		9960
gcgataacct	tcatgcgttc	cccttgcgta	ttgtttatt	tactcatcgc	atcatatacg		10020
cagcgaccgc	atgacgcaag	ctgttttact	caaatacaca	tcacctttt	agacggcggc		10080
gctcggtttc	ttcagcggcc	aagctggccg	gccaggccgc	cagcttggca	tcagacaaac		10140
cggccaggat	ttcatgcagc	cgcacggttg	agacgtgcgc	gggcggctcg	aacacgtacc		10200
cggcccgcat	catctccgcc	tcgatctctt	cggtaatgaa	aaacggttcg	tcctggccgt		10260
cctggtgcgg	tttcatgctt	gttctcttg	gcgttcattc	tcggcggccg	ccagggcgtc		10320
ggcctcggtc	aatgcgtcct	cacggaaggc	accgcgccgc	ctggcctcgg	tgggcgtcac		10380
ttcctcgtcg	cgctcaagtg	cgcggtacag	ggtcgagcga	tgacgcca	gcagtgcagc		10440
cgcctctttc	acgggtcggc	cttcttggtc	gatcagctcg	cgggcgtgcg	cgatctgtgc		10500
cgggggtagg	gtagggcggg	ggccaaactt	cacgcctcgg	gccttggcgg	cctcgcgcc		10560
gctccgggtg	cggtcgatga	ttagggaacg	ctcgaactcg	gcaatgccgg	cgaacacggt		10620
caacaccatg	cggccggccc	gcgtggtggt	gtcggcccac	ggctctgcca	ggctacgcag		10680
gcccgcgcgg	gcctcctgga	tgcgctcggc	aatgtccagt	aggctcgcgg	tgctgcgggc		10740
caggcgggtct	agcctggtca	ctgtcacaac	gtcgccaggg	cgtaggtggt	caagcatcct		10800
ggccagctcc	gggcggtcgc	gcctggtgcc	ggtgatcttc	tcggaaaaca	gcttggtgca		10860
gccggccgcg	tgagttcgg	cccgttggtt	ggtcaagtcc	tggtcgtcgg	tgctgacgcg		10920
ggcatagccc	agcaggccag	cggcggcgct	ctgttcatg	gcgtaatgtc	tccggttcta		10980
gtcgcaagta	ttctacttta	tgcgactaaa	acacgcgaca	agaaaacgcc	aggaaaaggg		11040
cagggcggca	gccigtgcgc	taacttagga	cttgtgcgac	atgtcgttt	cagaagacgg		11100
ctqactgaa	cgtcagaagc	cgactgcact	atagcagcgg	aggggttga	tcgatccctg		11160
ctcgcgcagg	ctgggtgcca	agctctcggg	taacatcaag	gcccgatcct	tggagccctt		11220
gccctcccgc	acgatgaccg	tgccgtgatc	gaaatccaga	tccttgacct	gcagttgcaa		11280

accctcactg	atccgcatgc	ccgttcata	cagaagctgg	gcgaacaaac	gatgctcgcc	11340
ttccagaaaa	ccgaqgatgc	gaaccacttc	atccggggtc	agcaccaccg	gcaagcgccc	11400
qqacggccga	ggtcttccga	tctctgaag	ccagggcaga	tccgtgcaca	gcacttgccg	11460
taqaagaaca	qcaaggccgc	caatgcctga	cgatgcgtgg	agaccgaaac	cttgcgctcg	11520
ttcgccagcc	aggacagaaa	tgctctgact	tcgctqctgc	ccaagggtgc	cggggtgacgc	11580
acaccgtgga	aacggatgaa	ggcacgaacc	cagtggacat	aagcctgttc	ggttcgtaag	11640
ctgtaatgca	agtagcgtat	qcqctcacgc	aactgggtcca	gaaccttgac	cgaacgagc	11700
ggtggtaacg	gcgcagtgcc	ggttttcaltg	gcttggtatg	actgttttt	tggggtacag	11820
tggagcagca	acgatgttac	gcagcagggc	agtcgcccta	aaacaaagtt	aaacatcatg	11880
aggggaagcgg	tgatcgccga	agtaatcgact	caactatcag	aggtagtgg	cgtcatcgag	11940
cgccatctcg	aaccgacgtt	gctggccgta	cattgttacg	gctccgcagt	ggatggcggc	12000
ctgaagccac	acagtgalat	tgatttgctg	gttacggtga	ccgtaaggct	tgatgaaaca	12060
acgcggcgca	ctttgatcaa	cgacctttig	gaaacttcgg	ctccccctgg	agagagcgag	12120
attctccgcg	ctgtagaagt	caccattgtt	gtgcacgacg	acatcattcc	gtggcggtat	12180
ccagctaagc	gcgaactgca	atttgagaaa	tggcagcgca	atgacattct	tgcaggtatc	12240
ttcgagccag	ccacgatcga	cattgatctg	gctatcttgc	tgacaaaagc	aagagaacat	12300
agcgtgcct	tggtaggtcc	agcggcgagg	gaactctttg	atccggttcc	tgaacaggat	12360
ctatttgagg	cgctaaatga	aaccttaacg	ctatggaact	cgccgcccga	ctgggctggc	12420
gatgagcgaa	atgtagtgtc	tacgttgtcc	cgcatgtgtt	acagcgcagt	aaccggcaaa	12480
atcgcgccga	aggatgtcgc	tgccgactgg	gcaatggagc	gcctgccggc	ccagtatcag	12540
cccgtcatac	ttgaagctag	acaggcttat	cttggacaag	aagaagatcg	cttggccctcg	12600
cgcgagatc	agttggaaga	atttgtccac	tacgtgaaag	gcgagatcac	caaggtagtc	12660
ggcaaataat	gtctaacaat	tcgttcaagc	cgacgccgct	tcgcggcgcg	gcttaactca	12720
agcgttagat	gcactaagca	cataattgct	cacagccaaa	ctatcaggtc	aagtctgctt	12780
ttattatttt	taagcgtgca	taataagccc	tacacaaatt	gggagatata	tcatgaaagg	12840
ctggcttttt	cttgttatcg	caatagttgg	cgaagtaatc	gcaacatccg	cattaaaatc	12900
tagcgagggc	tttactaagc	tagcttgctt	ggtcgttccg	gtaccgtgaa	cgtcggctcg	12960
attgtacctg	cgttcaaata	ctttgcgac	gtgttgcgcg	cctgcccggt	gcgtcggctg	13020
atctcacgga	tcgactgctt	ctctcgcaac	gccatccgac	ggatgatgtt	taaaagtccc	13080
atgtggatca	ctccgttgcc	ccgtcgctca	ccgtgttggg	gggaagggtc	acatggctca	13140
gttctcaatg	gaaattatct	gcctaaccgg	ctcagttctg	cgtagaaacc	aacatgcaag	13200
ctccaccggg	tgcaaagcgg	cagcgg				13226

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	003/2002/1/007905
0-2	International Filing Date	09 04 04
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	EUROPEAN PATENT OFFICE T O N A L APPLICATION
0-4	Form PCT/ROH01 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY model] Version 3 50 (Build 0002 153)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	European Patent Office (EPO) (RO/EP)
0-7	Applicant's or agent's file reference	BCS03-2002
I	Title of Invention	METHODS AND MEANS FOR INCREASING THE TOLERANCE OF PLANTS TO STRESS CONDITIONS
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	BAYER BIOSCIENCE N V
II-5	Address:	Jozef Plateaustraat 22 9000 Gent Belgium
II-6	State of nationality	BE
II-7	State of residence	BE
II-8	Telephone No.	+32 9 235 84 72
II-9	Facsimile No.	+32 9 223 19 23
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST First)	DE BLOCK Marc
III-1-5	Address:	Abrikozenstraat 26 9820 Merelbeke Belgium
III-1-6	State of nationality	BE
III-1-7	State of residence	BE

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IV 1	Agent or common representative or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	common representative
IV 1 1	Name	BAYER BIOSCIENCE N V
IV 1 2	Address	Jozef Plateaustraat 22 9000 Gent Belgium
IV 1 3	Telephone No.	+32 9 235 84 72
IV 1 4	Facsimile No.	+32 9 223 19 23
IV 1 5	e-mail	Jan.Desomer@bayercropscience.com
☒ V	DESIGNATIONS	
V 1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier regional application	
VI-1 1	Filing date	09 April 2003 (09 04 2003)
VI-1 2	Number	03076044 1
VI-1 3	Regional Office	EP
VI-2	Priority claim of earlier national application	
VI-2 1	Filing date	21 August 2003 (21 08 2003)
VI-2 2	Number	60/496 688
VI-2 3	Country	US
VI-3	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s).	VI-1
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)

CONFIRMATION COPY

144

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-3-1	Declaration Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4 17(III) and 51bis 1(a)(III)) Name	in relation to this international application BAYER BIOSCIENCE N V is entitled to claim priority of earlier application No 60/496,688 by virtue of the following
VIII-3-1(iv)		an assignment from DE BLOCK Marc to BAYER BIOSCIENCE N V dated 10 October 2003 (10 10 2003)
VIII-3-1(x)	This declaration is made for the purposes of:	all designations

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

Declarations		Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	1	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date to apply for and be granted a patent	1	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date to claim the priority of the earlier application	1	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	1	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

CONFIRMATION COPY

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-1 1	Declaration Identity of the Inventor Declaration as to the identity of the inventor (Rules 4 17(I) and 51bis.1(a)(I))	in relation to this international application
	Name (LAST First) Address.	DE BLOCK, Marc of Abrikozenstraat 26 9820 Merelbeke Belgium is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	This declaration is made for the purposes of	all designations except the designation of the United States of America

CONFIRMATION COPY

VIII-2 1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4 17(ii) and 51bis 1(a)(ii)) in a case where the declaration under Rule 4 17(iv) is not appropriate: Name (LAST First)	in relation to this international application BAYER BIOSCIENCE N V is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following
VIII-2 1(ii)		BAYER BIOSCIENCE N V is entitled as <u>employer</u> of the inventor DE BLOCK Marc
VIII-2 1(iv)		an assignment from DE BLOCK Marc to BAYER BIOSCIENCE N V dated 10 October 2003 (10 10 2003)
VIII-2 1(bx)	This declaration is made for the purposes of:	all designations except the designation of the United States of America

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-4-1	Declaration Inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) Declaration of Inventorship (Rules 4 17(iv) and 51bis 1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America	I hereby declare that I believe I am the original, first and sole (if only one inventor is listed below) or joint (if more than one inventor is listed below) inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application) I hereby declare that my residence mailing address, and citizenship are as stated next to my name I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified international application including the claims of said application I have identified in the request of said application, in compliance with PCT Rule 4 10 any claim to foreign priority and I have identified below, under the heading "Prior Applications" by application number country or Member of the World Trade Organization day month and year of filing any application for a patent or inventor's certificate filed in a country other than the United States of America, including any PCT international application designating at least one country other than the United States of America, having a filing date before that of the application on which foreign priority is claimed
VIII-4 1 1	Prior applications	03076044 1 EP 09 April 2003 (09 04 2003) 60/496 688 US 21 August 2003 (21 08 2003)

CONFIRMATION COPY

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

		I hereby acknowledge the duty to disclose information that is known by me to be material to patentability as defined by 37 C F R § 1 56, including for continuation-in-part applications material information which became available between the filing date of the prior application and the PCT international filing date of the continuation-in-part application I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon
VIII- 4-1 1 1	Name (LAST First)	DE BLOCK Marc
VIII- 4-1 1 2	Residence: (city and either US State if applicable or country)	Merelbeke Belgium
VIII- 4-1 1 3	Mailing address:	Abrikozenstraat 26 B-9820 Merelbeke Belgium Merelbeke Belgium
VIII- 4 1 1-4	Citizenship:	BE
VIII- 4-1 1 5	Inventor's Signature: (if not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application. The signature must be that of the inventor not that of the agent)	
VIII- 4 1 1-6	Date (of signature which is not contained in the request, or of the declaration that is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application)	

CONFIRMATION COPY

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IX	(check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX 1	Request (including declaration sheets)	10	-
IX 2	Description (excluding sequence listing part)	39	-
IX 3	Claims	4	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX 5	Drawings	3	-
IX 7a	Sub-total number of sheets	57	-
IX-8a	Sequence listing part of description filed in computer readable form in addition to being filed in paper form (under Section 801(a)(II))	25	-
IX 7	TOTAL	82	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX 11	Copy of general power of attorney	reference no GA22268	-
IX 13	Priority document(s)	Item(s) VI-1	-
IX 16(A)	Sequence listing in computer readable form		
IX 16(A)-(ii)	additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	-	1 Diskette
IX 17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX 18	other	Accompanying letter	
IX 18	other	EPC Form 1031	
IX 18	other	Statement of Concordance	
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	1	
IX 20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X 1 1	Name (LAST First)	BAYER BIOSCIENCE N V	
X 1 2	Name of signatory	Jan DESOMER	
X 1-3	Capacity	Authorized Representative	

CONFIRMATION COPY

151

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	09 APR 2004	09.04.04
10-2	Drawings		
10-2.1	Received		
10-2.2	Not received		
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application		
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)		
10-5	International Searching Authority	ISA/EP	
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid		

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11.1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

VIII-4-1	Declaration Inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) Declaration of Inventorship (Rules 4 17(IV) and 51bis 1(a)(IV)) for the purposes of the designation of the United States of America.	I hereby declare that I believe I am the original first and sole (if only one inventor is listed below) or joint (if more than one inventor is listed below) inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought This declaration is directed to international application (if furnishing declaration pursuant to Rule 26ter) I hereby declare that my residence, mailing address and citizenship are as stated next to my name I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified international application including the claims of said application I have identified in the request of said application, in compliance with PCT Rule 4 10, any claim to foreign priority and I have identified below under the heading "Prior Applications" by application number country or Member of the World Trade Organization day month and year of filing any application for a patent or inventor's certificate filed in a country other than the United States of America including any PCT international application designating at least one country other than the United States of America having a filing date before that of the application on which foreign priority is claimed
VIII 4 1 1	Prior applications.	03076044 1 EP 09 April 2003 (09 04 2003) 60/496 688 US 21 August 2003 (21 08 2003)

PCT

Original (for SUBMISSION)

		I hereby acknowledge the duty to disclose information that is known by me to be material to patentability as defined by 37 C F R § 1 56 including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the PCT international filing date of the continuation-in-part application I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment or both under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon
VIII 4 1 1 1	Name (LAST First)	DE BLOCK, Marc
VIII 4-1 1 2	Residence: (city and either US State if applicable or country)	Merelbeke Belgium
VIII 4 1 1 3	Mailing address.	Abrikozenstraat 26 B-9820 Merelbeke Belgium Merelbeke Belgium
VIII 4-1 1-4	Citizenship.	BE
VIII 4 1 1 5	Inventor's Signature: (If not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application. The signature must be that of the inventor not that of the agent)	
VIII 4 1 1-6	Date (of signature which is not contained in the request, or of the declaration that is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application)	04-13-04

PCT

Original (para ENTREGA)

VIII-4-1

Declaración Inventario (unicamente para los propósitos de la designación de los Estados Unidos de América)

Declaración de inventario (Normas 4 17(iv) y 5 1bis 1(a)(iv)) para los propósitos de la designación de los E U A

Declaro mediante la presente que yo creo que yo soy el inventor original, primero y unico (si solamente se indica un inventor abajo) o inventor conjunto (si se indica más de un inventor abajo) del asunto que es reivindicado y para el cual se busca obtener patente

Esta declaración es dirigida a la solicitud internacional (si se presenta la declaración conforme a la Norma 26ter) Declaro mediante la presente que mi domicilio, mi dirección postal y ciudadanía son las declaradas en seguida de mi nombre

Declaro mediante la presente que he revisado y entiendo el contenido de la solicitud internacional identificada arriba, incluyendo las reivindicaciones de dicha solicitud De conformidad con la Norma 4 10 PCT, yo he identificado en el pedido de dicha solicitud, toda reivindicación a prioridad extranjera y yo he identificado abajo, bajo el titulo "Solicitudes Anteriores", mediante numero de solicitud, país o Miembro de la Organización Mundial del Comercio, toda solicitud de patente o de certificado de inventor presentados en otro país distinto de los Estados Unidos de América, incluyendo toda solicitud internacional PCT que designe al menos un país distinto de los Estados Unidos de América y que tenga una fecha de presentación anterior a la de la solicitud en la cual se reivindica una prioridad extranjera

VIII-4-1-1

Solicitudes Anteriores

03076044 1, EP, 09 Abril 2003 (09 04 2003) 60/496,688, US, 21 Agosto 2003 (21 08 2003)

Mediante la presente reconozco la obligación de revelar la información que yo sé que es material de patentabilidad tal como lo define 37 C F R § 1 56, incluyendo solicitudes de continuación en parte, información material que se hizo disponible entre la fecha de presentación de la solicitud anterior y la fecha de presentación internacional PCT de la solicitud de continuación en parte

Declaro mediante la presente que todas las declaraciones hechas aquí por mi propio conocimiento son ciertas y que creo que todas las declaraciones hechas con base en información y convencimiento son ciertas y además que estas declaraciones fueron hechas en el conocimiento de que las declaraciones falsas intencionales y similares son punibles mediante multa o encarcelamiento o mediante ambos, de conformidad con la Sección 1001 del Título 18 del Código Civil de los Estados Unidos y que tales declaraciones falsas intencionales pueden poner en peligro la validez de la solicitud o de toda patente expedida con base en ella

VIII-4-1-1-1 Nombre (APELLIDO, Nombre) DE BLOCK, Marc

VIII-4-1-1-2 Domicilio Merelbeke, Bélgica

VIII-4-1-1-3 Dirección postal

Abrikonzenstraat 26 B-9820 Merelbeke

Bélgica

Merelbeke Bélgica

VIII-4-1-1-4 Ciudadania BE

VIII-1-1-1-5 Firma del inventor [firma]

(si no está contenida en la solicitud o si la declaración se corrige o se adiciona conforme a la Norma 26ter luego de presentar la solicitud internacional La firma tiene que ser la del invento, no la del representante)

VIII-1-1-1-6 Fecha 04-13-04

(de la firma que no está contenida en la solicitud o de la declaración que es corregida o adicionada conforme a la Norma 26ter luego de la presentación de la solicitud internacional

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis 1)Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 belowInternational application No
PCT/EP2004/003995International filing date (day/month/year)
09 04 2004Priority date (day/month/year)
09 04 2003International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C12N15/82 C12N15/11 A01H5/00Applicant
BAYER BIOSCIENCE N V

1 This opinion contains indications relating to the following items

- ☒ Box No I Basis of the opinion
- ☒ Box No II Priority
- ☐ Box No III Non-establishment of opinion with regard to novelty inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No V Reasoned statement under Rule 43bis 1(a)(i) with regard to novelty inventive step or industrial applicability citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No VI Certain documents cited
- ☒ Box No VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No VIII Certain observations on the international application

2 FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority (IPEA). However this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66 1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered

If this opinion is as provided above considered to be a written opinion of the IPEA the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together where appropriate with amendments before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date whichever expires later

For further options see Form PCT/ISA/220

3 For further details see notes to Form PCT/ISA/220

Name and mailing address of the ISA



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel +49 89 2399 0 Tx 523656 epmu d
Fax +49 89 2399 4465

Authorized Officer

Zellner E

Telephone No. +49 89 2399-8427



Box No. 1 Basis of the opinion

- 1 With regard to the **language** this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed unless otherwise indicated under this item
- ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
- 2 With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention this opinion has been established on the basis of
- a type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b format of material
- ☐ in written format
- ☒ in computer readable form
- c time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☐ filed together with the international application in computer readable form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
- 3 ☐ In addition in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed as appropriate were furnished
- 4 Additional comments

Box No. II Priority

- 1 ☒ The following document has not been furnished
- ☒ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis 1 and 66 7(a))
 - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis 1 and 66 7(b))
- Consequently it has not been possible to consider the validity of the priority claim. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date
- 2 ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis 1 and 64 1). Thus for the purposes of this opinion the international filing date indicated above is considered to be the relevant date
- 3 Additional observations, if necessary

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty Inventive step or Industrial applicability, citations and explanations supporting such statement

- 1 Statement
- | | | | |
|-------------------------------|-----|--------|-------|
| Novelty (N) | Yes | Claims | 1 16 |
| | No | Claims | 17 19 |
| Inventive step (IS) | Yes | Claims | |
| | No | Claims | 1 19 |
| Industrial applicability (IA) | Yes | Claims | 1 19 |
| | No | Claims | |
- 2 Citations and explanations
- see separate sheet

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description are made

see separate sheet

Re Item V

1 The following document are referred to in this communication

- D1 PANDA SATCHIDANANDA ET AL "tej defines a role for poly(ADP ribosyl)ation in establishing period length of the Arabidopsis circadian oscillator" DEVELOPMENTAL CELL vol 3 no 1 July 2002 (2002 07) pages 51 61 XP009035930 ISSN 1534 5807
- D2 US 2002/040490 A1 (ALLEN KEITH ET AL) 4 April 2002 (2002 04 04)
- D3 WO 03/000898 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG GOFF STEPHEN ARTHUR (US) CHEN WENQIONG () 3 January 2003 (2003 01 03)
- D4 WO 03/008540 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG KATAGIRI FUMIYAKI (US), COOPER BRET (US),) 30 January 2003 (2003 01 30)

2 Novelty

The present application refers to transgenic plants having an increased tolerance to stress such as drought high light intensities and so on Said plants are generated by altering parG gene coding for (poly (ADP nbose) glycohydrolase) One way is to use ParG inhibitory RNA (co suppression antisense RNAi) the second manner is to mutageneise the ParG gene

In D1 poly(ADP nbose) glycohydrolase (PARG) has been identified by map based cloning of TEJ mutation Said mutation acts independently of light quality and quantity and affects clock controlled transcription of genes in Arabidopsis

The TEJ genes code for a PARG (D1 page 52 left column pargr 2 and 3 and page 58 left column paragraph 3)

Therefore the mutants and their method of production of D1 fall under the definition of Claims 17 19 and are not allowable under Art 33(2) PCT

3 Inventive step

The closest prior art document is represented by D1 As pointed out above said document describes a TEJ mutant coding for PARG TEJ defines a key role of poly ADP ribosylation in setting a pace of the Arabidopsis circadian oscillator (TEJ mutation acts independently of light quantity and quality) Therefore the structure and the role in stress tolerance of PARG in plants is known from D1

In difference to D1 the present Claims 1-16 disclose methods to produce plant tolerant to stress conditions via ParG inhibitory RNA molecules whereas in D1 mutants of PARG are produced

The problem is thus the production of stress tolerant plants. The solution i.e. the inhibition of ParG by inhibitory RNA is obviously derivable from the D2 or D3

In D2 the tolerance to environmental stress in plants is increased by antisense technology (page 1 right column paragraph [0010]). As an example PARG is also selected (SEQ ID NO 424)

D1 in combination with D3 also attacks inventive step of claims 1-16. In D3 PARG of plants (SEQ ID NO 550 being 100% identical with SEQ ID NO 15 and 99.9% identical with SEQ ID NO 3) is inhibited by antisense inhibition, co-suppression, dsRNAi (page 34 lines 23-29)

D1 in combination with D4 again attacks inventive step. In D4 the production of stress tolerant plants by inhibitory RNA is described (p. 95)

Thus the present Claims 1-16 do not involve an inventive step

Re Item VIII

In the description of the present application it is not demonstrated that the problem has indeed been solved i.e. that stress tolerant plants have indeed been made by inhibitory RNA or mutagenesis (Art. 5 PCT)

Re Item VIII

Independent Claims 1 and 9 are defined by generic terms which are not defined by true essential technical features such as ParG inhibitory RNA molecule (Art. 6 PCT)

TRATADO DE COOPERACION EN PATENTES**PCT****OPINION ESCRITA****DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

(Norma 43bis 1 PCT)

Remitente AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para ver Formulario PCT/ISA/220

Fecha de envío ver Formulario PCT/ISA/210 (hoja segunda)

Referencia del solicitante o abogado ver Formul PCT/ISA/220

PROCEDIMIENTO ADICIONAL ver Punto 2 abajo

Numero de referencia internacional PCT/EP2004/003995

Fecha de solicitud internacional 09 04 2004

Fecha de prioridad 09 04 2003

Clasificación internacional de patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC

C12N15/82, C12N15/11, A01H5/00

Solicitante BAYER BIOSCIENCE N V

1 Esta certificación contiene datos sobre los siguientes puntos

- | | | |
|------|----------|---|
| I | <u>X</u> | Fundamento de la opinión |
| II | <u>X</u> | Prioridad |
| III | — | No establecimiento de opinión respecto a novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial |
| IV | — | Falta de unidad de la invención |
| V | <u>X</u> | Opinión fundamentada conforme la Norma 66 2(a)(11) respecto a la novedad la actividad inventiva o la aplicabilidad industrial citas y explicaciones sobre las cuales se apoya dicha opinión |
| VI | — | Determinado documento citado |
| VII | <u>X</u> | Determinadas fallas en la solicitud internacional |
| VIII | <u>X</u> | Determinadas observaciones respecto a la solicitud internacional |

2 PROCEDIMIENTO ADICIONAL

Si se hace una solicitud de examen provisional internacional, entonces esta certificación es válida como certificación escrita de la autoridad encargada del examen provisional internacional (IPEA') este no es el caso cuando el solicitante elige otra autoridad distinta a esta como IPEA y la IPEA elegida ha comunicado a la Oficina Internacional según la Norma 66 1bis b) que las certificaciones escritas de esta autoridad de búsqueda internacional no son reconocidas

Si, como esta previsto arriba, esta certificación es válida como certificación escrita de la IPEA, entonces se le pide al solicitante presentar ante la IPEA una opinión escrita y, de ser relevante, las modificaciones antes de la conclusión de 3 meses a partir del día en que fue enviado el formulario PCT/ISA/220 o antes de concluir 22 meses a partir de la fecha de prioridad, dependiendo de que plazo termina de último

Otras opciones ver Formulario PCT/ISA/220

3 Detalles más específicos ver Observaciones al Formulario PCT/ISA/220

Nombre y dirección postal de la autoridad de búsqueda internacional

Oficina Europea de Patentes
D-80298 Munich

Funcionario autorizado Zellner, E

[Sello Oficina Europea de Patentes]

Casilla No I Base de la opinión

- 1 Respecto al idioma, esta opinión ha sido establecida sobre la base de la solicitud internacional en el idioma en el que ésta fue presentada, en tanto bajo este Punto no se indique otra cosa distinta
 - ☐ La opinión se estableció sobre la base de una traducción del idioma original al siguiente idioma que es el idioma de la traducción la cual fue presentada para la búsqueda internacional (conforme a Normas 12 3 y 23 1 (b))
- 2 Respecto a la secuencia nucleótida y/o de aminoácidos revelada en la solicitud internacional y que es necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se estableció sobre la base de
 - a tipo de material
 - ☒ un listado de secuencia
 - ☐ tablas relacionadas con el listado de secuencia
 - b formato del material
 - ☐ en formato escrito
 - ☒ en forma legible por computadora
 - c momento de presentación
 - ☒ está contenido en la solicitud internacional tal como fue presentada
 - ☐ fue entregado posteriormente a la Autoridad en forma legible por computadora
 - ☐ fue entregado posteriormente a esta Autoridad para el propósito de la búsqueda
- 3 ☐ además, en el caso de que se haya presentado más de una versión o copia del listado de secuencia o de las tablas relacionadas, entonces se presentaron las declaraciones requeridas de que la información en las copias posteriores o adicionales, según sea el caso, es idéntica a la información en la solicitud tal como ésta fue presentada o no va más allá de la solicitud tal como fue presentada

4 Comentarios adicionales**Casilla No II Prioridad**

- 1 ☒ El siguiente documento no ha sido presentado aun
 - ☒ copia de la anterior solicitud, cuya prioridad ha sido reivindicada (Norma 43bis 1 y 66 7(a)) }
 - ☐ traducción de la anterior solicitud cuya prioridad ha sido reivindicada (Norma 43bis 1 y 66 7(a))

Por eso no fue posible examinar la validez de la reivindicación de prioridad No obstante la certificación se elaboró bajo el supuesto de que la fecha de prioridad reivindicada es la fecha normativa

2 _ Esta certificación fue elaborada sin considerar la prioridad reivindicada puesto que la reivindicación de prioridad ha mostrado ser inválida (Normas 43bis 1 y 64 1) Para los fines de esta certificación es válida como fecha normativa la fecha de la solicitud internacional arriba mencionada

3 Eventuales observaciones adicionales

Casilla No V Opinión fundamentada conforme la Norma 66 2(a)(ii) respecto a la novedad, la actividad inventiva o la aplicabilidad industrial, citas y explicaciones sobre las cuales se apoya dicha opinión

1 Constatación

Novedad	Sí	Reivindicaciones	1-16
	No	Reivindicaciones	17-19
Actividad inventiva	Sí	Reivindicaciones	
	No	Reivindicaciones	1-19
Aplicabilidad Industrial	Sí	Reivindicaciones	1-19
	No	Reivindicaciones	

2 Citas y explicaciones

ver Hoja adjunta

Casilla No VII Ciertos defectos en la solicitud Internacional
Se observaron los siguientes defectos en la forma o en el contenido de la solicitud internacional

Ver Hoja adjunta

Casilla No VIII Ciertas observaciones respecto a la solicitud internacional

Se hacen las siguientes observaciones respecto a la claridad de las reivindicaciones de patente a la descripción y a los dibujos o respecto a la cuestión de si las reivindicaciones están sustentadas en todo su alcance por la descripción

ver Hoja adjunta

OPINION ESCRITA

DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA
INTERNACIONAL (HOJA ADJUNTA)

No de Ref internacional
PCT/EP2004/003995

Respecto al item V

1 En la presente comunicación se hace referencia a los siguientes documentos

- D1 PANDA SATCHIDANANDA Y (OLAB "tej define un rol para poli(ADP-ribosil)ación al establecer longitud de período del oscilador circadiano de la Arabidopsis" DEVELOPMENTAL CELL, vol 3 No 1, Julio 2002, páginas 51-61, XP009035930 ISSN 1534-5807
- D2 US 2002/040490 A1 (ALLIN KEITH Y COLAB) 4 abril 2002
- D3 WO 03/000898 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG GOFF STEPHEN ARTHUR (US) CHEN WENQIONG () 3 enero 2003
- D4 WO 03/008540 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG KATAGIRI FUMIYAKI (US), COOPER BRET (US),) 30 Enero 2003

2 Novedad

La presente solicitud se refiere a plantas transgénicas que tienen tolerancia incrementada a stress tal como por ejemplo sequía, altas intensidades de luz, etc Dichas plantas son generadas alterando la codificación del gene ParG para (poli(ADP-ribosa)glicohidrolasa) Una manera es usar RNA inhibitorio de ParG (RNAi de co-supresión, antisentido), la segunda manera es mutagenizar el gene ParG

En D1 ha sido indentificada poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa (PARG) mediante clonación basada en mapa de la mutación TEJ Dicha mutación actua independientemente de la calidad y de la cantidad de luz y afecta la transcripción controlada horariamente de los genes en la Arabidopsis

El código de genes TEJ para un PARG (D1, página 52, columna izquierda, párrafos 2 y 3 y página 58, columna izquierda, párrafo 3)

Por consiguiente los mutantes y su método de producción de D1 cae bajo la definición de las reivindicaciones 17-19 y no es permisible conforme al Art 33(2) PCT

3 Actividad inventiva

D1 representa el documento del estado de la técnica anterior más cercano Tal como se señaló arriba dicho documento describe una codificación mutante TEJ para PARG TEJ define un rol clave de poli ADP-ribosilación estableciendo un ritmo del oscilador circadiano de la Arabidopsis (la mutación TEJ actúa independientemente de la cantidad y de la calidad de la luz Por consiguiente la estructura y el rol en la tolerancia al stress por parte de PARG en las plantas ya es conocida en D1

A diferencia de D1, las presentes reivindicaciones 1-6 revelan métodos para producir en plantas tolerantes a las condiciones de stress mediante moléculas de RNA inhibitorias de ParG, mientras que en D1 se producen mutantes de PARG

El problema es entonces la producción de plantas tolerantes al stress La solución, es decir la inhibición de ParG mediante RNA inhibitorio es obviamente derivable de los documentos D2 o D3 En D2 la tolerancia de las plantas al stress medioambiental se incrementa mediante tecnología antisentido (página 1, columna derecha, párrafo [0010]) Como ejemplo se selecciona también PARG (SEQ ID No 424)

D1 en combinación con D3 también ataca la actividad inventiva de las reivindicaciones 1-16 En D3 el PARG de las plantas (siendo SEQ ID 550 100% idéntica a SEQ ID No 15 y 99% idéntica a SEQ ID No 3) es inhibido mediante dsRNA1 de co-supresión, de inhibición antisentido (página 34, renglones 23-29)

D1 en combinación con D4 también ataca la actividad inventiva En D4 se describe la producción de plantas tolerantes al stress mediante RNA inhibitorio (p 95)

Así, las presentes reivindicaciones 1-16 no involucran actividad inventiva

Respecto al ítem VII

En la descripción de la presente solicitud ciertamente no se demuestra que el problema haya sido solucionado, es decir que mediante RNA inhibitorio o mutagénesis se hayan producido ciertamente plantas tolerantes al stress (Art 5 PCT)

Respecto al ítem VIII

Las reivindicaciones independientes 1 y 9 son definidas mediante términos genéricos que no son definidos mediante verdaderas características técnicas esenciales tales como molécula RNA inhibitoria de ParG (Art 6 PCT)

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference BCS03-2002	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below	
International application No. PCT/EP2004/003995	International filing date (day/month/year) 09/04/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 09/04/2003
Applicant BAYER BIOSCIENCE N V		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1 Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4 With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows.

5 With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established according to Rule 38.2(b) by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6 With regards to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1

☒ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1 b of the first sheet)

- 1 With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention the international search was carried out on the basis of
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☐ in written format
- ☒ in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☐ filed together with the international application in computer readable form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
- 2 ☐ In addition in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed as appropriate were furnished
- 3 Additional comments.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82 C12N15/11 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS EMBL MEDLINE WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PANDA SATCHIDANANDA ET AL tej defines a role for poly(ADP-ribosyl)ation in establishing period length of the Arabidopsis circadian oscillator DEVELOPMENTAL CELL vol 3 no 1 July 2002 (2002-07) pages 51-61 XP009035930 ISSN 1534-5807	1-19
Y	page 52 left-hand column, paragraphs 2 3 page 58 left-hand column, paragraph 3	1-16
X	US 2002/040490 A1 (ALLEN KEITH ET AL) 4 April 2002 (2002-04-04) SEQ ID No 424 page 1 right-hand column paragraph 10 ----- -/--	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex

Special categories of cited documents

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 September 2004

Date of mailing of the international search report

28/09/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zellner E

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/000898 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG GOFF STEPHEN ARTHUR (US) CHEN WENQIONG () 3 January 2003 (2003-01-03) SEQ ID No 550 page 34 lines 23-29 -----	1-16
Y	WO 03/008540 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG KATAGIRI FUMIYAKI (US), COOPER BRET (US),) 30 January 2003 (2003-01-30) page 95 lines 13-32 -----	1-16
A	WO 99/53050 A (WANG MING BO COMMW SCIENT IND RES ORG (AU) GRAHAM MICHAEL WAYNE (AU) 21 October 1999 (1999-10-21) abstract -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

172

PCT/EP2004/003995

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002040490	A1	04-04-2002	NONE	
WO 03000898	A	03-01-2003	WO 03000898 A1	03-01-2003
			EP 1402037 A1	31-03-2004
WO 03008540	A	30-01-2003	WO 03000897 A2	03-01-2003
			WO 03000904 A2	03-01-2003
			EP 1402038 A2	31-03-2004
			EP 1399561 A2	24-03-2004
			EP 1409696 A2	21-04-2004
			EP 1402042 A2	31-03-2004
			WO 03000905 A2	03-01-2003
			WO 03000906 A2	03-01-2003
			WO 03008540 A2	30-01-2003
			WO 03007699 A2	30-01-2003
			WO 03027249 A2	03-04-2003
			US 2003135888 A1	17-07-2003
			US 2004010815 A1	15-01-2004
			US 2004016025 A1	22-01-2004
WO 9953050	A	21-10-1999	AU 760041 B2	08-05-2003
			AU 2951499 A	01-11-1999
			CA 2325344 A1	21-10-1999
			CN 1306571 T	01-08-2001
			EP 1068311 A1	17-01-2001
			WO 9953050 A1	21-10-1999
			JP 2002511258 T	16-04-2002
			NZ 507093 A	29-08-2003

TRATADO DE COOPERACION EN PATENTES**PCT****REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

(Artículo 18 y Normas 43 y 44 PCT)

Referencia del solicitante o representante BCS03-2002

PROCEDIMIENTO ADICIONAL ver Formulario PCT/ISA/220 y, si es relevante, el Punto 5 más abajo

Numero de referencia internacional PCT/EP2004/003995

Fecha de solicitud internacional 09/04/2004

Fecha (más antigua) de prioridad 09/04/2004

Solicitante BAYER BIOSCIENCE N V

Este Reporte de Busqueda Internacional fue elaborado por esta Autoridad de Busqueda Internacional y se le envía al solicitante conforme al Artículo 18 Una copia se envía a la Oficina Internacional

Este Reporte de Busqueda Internacional contiene 5 hojas

X Se adjunta demás una copia de los documentos respecto al estado de la técnica mencionados en este reporte

1 Base del Reporte

- a Respecto al idioma, la busqueda internacional se hizo sobre la base de la solicitud internacional en el idioma en el que ésta fue presentada, en tanto bajo este Punto no se indique otra cosa distinta

 La Busqueda Internacional se hizo sobre la base de una traducción de la solicitud internacional presentada ante la Autoridad (Norma 23 1 b)

- b X Respecto cualquier secuencia nucleótida y/o de aminoácidos revelada en la solicitud internacional, ver Casilla No 1

- 2 ☐ Ciertas reivindicaciones no pudieron ser sometidas a búsqueda (**ver Casilla II**)
- 3 ☐ Falta unidad de la invención (**ver Casilla III**)
- 4 Respecto al título de la invención
 ☒ Se acepta el texto presentado por el solicitante
 ☐ La Autoridad estableció el texto como sigue -
- 5 Respecto al resumen
 ☒ Se acepta el texto presentado por el solicitante
 ☒ el texto ha sido establecido, conforme a la Norma 38 2(b), por esta Autoridad tal como aparece en la Casilla No IV El solicitante puede presentar sus comentarios a esta Autoridad dentro del plazo de un mes luego de la fecha del envío de este reporte de búsqueda internacional
- 6 Con respecto a los dibujos
 a La figura de los dibujos que se ha de publicar con el resumen es la Figura No 1
 ☒ como lo sugiere el solicitante
 ☐ porque el solicitante no sugirió ninguna Figura
 ☐ porque esta Figura identifica mejor la invención
- b ☒ ninguna de las figuras

Casilla No I Secuencia nucleótida y/o de amino ácidos
(continuación del punto 1 b de la primera hoja)

- 1 Respecto a la secuencia nucleótida y/o de aminoácidos revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, la Búsqueda Internacional se hizo sobre la base del
- a tipo de material
 ☒ un listado de secuencia
 ☐ tablas relacionadas con el listado de secuencia

- b formato del material
- ☐ en formato escrito
 - ☒ en forma legible por computadora
- c momento de presentación
- ☒ está contenido en la solicitud internacional tal como fue presentada
 - ☒ fue entregado posteriormente a la Autoridad en legible por computadora
 - ☐ fue entregado posteriormente a esta Autoridad para el propósito de la búsqueda
- 2 ☐ además, en el caso de que se haya presentado más de una versión o copia del listado de secuencia o de las tablas relacionadas, entonces se presentaron las declaraciones requeridas de que la información en las copias posteriores o adicionales, según sea el caso, es idéntica a la información en la solicitud tal como ésta fue presentada o no va más allá de la solicitud tal como ésta fue presentada
- 3 Comentarios adicionales

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No PCT/EP2004/003995

A CLASIFICACION DEL ASUNTO

IPC 7 C12N15/82 C12N15/11 A01H5/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o
tanto con la clasificación nacional como con la IPC

B AREAS BUSCADAS

Documentación mínima sometida a búsqueda (sistema de clasificación
seguido por símbolos de clasificación)

IPC 7 C12N A01H

Documentación buscada que no hace parte del material mínimo de exa-
men si ella pertenece a las áreas buscadas -

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacio-
nal (nombre de la base de datos términos de búsqueda usados)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBL, MEDLINE, WPI Data

C DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

<u>Categoría*</u>	<u>Documento</u>	<u>No. de reivindicación relevante</u>
X	PANDA SATCHIDANANDA Y COLAB *tey define un rol para poli(ADP ribosil)ación en establecer longitud de período del oscilador circadiano de Arabidopsis vol 3 No. 1 Julio 2002 paginas 51 61, Xp009035930 ISSN 1534 5807	1 19
Y	página 52 columna mano izquierda párrafos 2 3 pagina 58 columna mano izquierda párrafo 3	1 16
X	US 2002/040490 A1 (ALLI N KEITH Y COLAB) 4 Abril 2002 SEQ ID No 424 pagina 1 columna mano derecha párrafo 10	1 16

X En la continuación de la casilla C se citan otros documentos

X Ver en Anexo miembros de la familia de patentes

* Categorías especiales de los documentos citados

- "A" Documento que define el estado general de la técnica y que no es considerado como particularmente relevante
- "E" Documento anterior pero publicado en la fecha de presentación internacional o posteriormente
- "L" documento que puede hacer aparecer dudosa la reivindicación de prioridad o que se cita para establecerla fecha de publicación de otro documento o por otra razón especial (especificada)
- "O" Documento referente a una revelación oral, un uso, una exhibición u otros medios
- "P" Documento publicado ante de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada
- "T" Documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o de la fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero que se cita para comprender el principio o la teoría subyacente a la invención
- "X" Documento de particular relevancia la invención reivindicada no puede ser considerada novedosa o no puede ser considerada basada en una actividad inventiva cuando el documento se toma individualmente
- "Y" Documento de particular relevancia no se puede considerar que la invención reivindicada involucre un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o con varios de dichos documentos siendo tal combinación obvia para las personas que tienen experiencia en este campo de la técnica

Fecha de la conclusión de la búsqueda internacional
10 de Septiembre de 2004

Fecha de envío del reporte de búsqueda internacional
28/09/2004

Nombre y dirección postal de la autoridad internacional de búsqueda
Oficina Europea de Patentes
P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk

Funcionario autorizado
Zellner E

C (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documento	No. de reivindicación relevante
X	WO 03/000898 A (SYGENTA PARTICIPATIONS AG GOFF STEPHEN ARTHUR (US) CHEN WENQIONG () 3 Enero 2003 SEQ ID No 550 pagina 34 renglones 23 29	1 16
Y	WO 03/008540 A (SYNGENTA PARTCIPATIONS AG KATAGIRI FUMIYAKI (US) COOPER BRET (US) 30 Enero 2003 página 95 renglones 13 32	1 16
A	WO 99/53050 A (WANG MING BO COMMW SCIENT IND RES ORG (AU) GRAHAM MICHAEL WAYNE (AU) 21 Octubre 1999 resumen	1 16

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de la familia de patentes

Solicitud internacional No PCT/EP2004/003995

Documento Patente citado en el reporte de búsqueda		Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 2002040490	A1	04-04 2002	NINGUNO	

WO 03000898	A	03-01 2003	WO 03000898 A1	03-01-2003
			EP 1402037 A1	31-03 2004

WO 03008540	A	30-01 2003	WO 03000897 A2	03-01 2003
			WO 03000904 A2	03-01-2003
			EP 1402038 A2	31-03 2004
			EP 1399561 A2	24-03 2004
			EP 1409696 A2	21-04 2004
			EP 1402042 A2	31-03 2004
			WO 03000905 A2	03-01 3002
			WO 03000906 A2	03-01 2003
			WO 030008540 A2	30-01 2003
			WO 030007699 A2	30-01 2003
			WO 03027249 A2	03-04 2003
			US 20023135888 A1	17-07 2003
			US 2004010815A1	15-01 2004
			US 2004016025A1	22-01 2004

WO 9953050	A	21 10-1999	AU 760041 B2	08-05-2003
			AU 2951499 A	01 11 1999
			CA 2325344 A1	21 10-1999
			CN 1306571 T	01-08-2001
			EP 1068311 A1	17-01 2001
			WO 9953050 A1	21 10-1999
			JP 2002511258T	16-04 2002
			NZ 507093 A	29-08-2003

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis 1 and
Administrative Instructions Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To

BAYER BIOSCIENCE N V
Technologiepark 38
B 9052 Gent
BelgiumDate of mailing (day/month/year)
13 July 2004 (13 07 2004)Applicant's or agent's file reference
BCS03 2002International application No.
PCT/EP2004/003995

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
09 April 2004 (09 04 2004)

1 The following indications appeared on record concerning

☐ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☒ the common representative

Name and Address

BAYER BIOSCIENCE N V
Jozef Plateaustraat 22
B 9000 Gent
Belgium

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

+32 9 235 84 72

Facsimile No.

+32 9 223 19 23

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

BAYER BIOSCIENCE N V
Technologiepark 38
B 9052 Gent
Belgium

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

+32 9 243 0485

Facsimile No.

+32 9 223 19 23

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary

4. A copy of this notification has been sent to

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ otherThe International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41 22) 338 70 80

Authorized officer

Kari HUYNH KHUONG (Fax 338 89 75)

Telephone No. (41 22) 338 9780

TRATADO DE COOPERACION EN PATENTES

PCT

NOTIFICACION DEL REGISTRO DE UN CAMBIO

(Norma PCT 92bis 1 e Instrucciones Administrativas, Sección 422)

De la OFICINA INTERNACIONAL

Para BAYER BIOSCIENCE N V

Tecnologiepark Höchst 38

B-9052 Gent

Bélgica

Fecha de envío 13 de Julio de 2004

Referencia del solicitante o representante BCS03-2002

NOTIFICACION IMPORTANTE

No de solicitud internacional PCT/EP2004/003995

Fecha de solicitud internacional 09 de Abril de 2004

1 Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro respecto a

☐ el solicitante

☐ el inventor

☐ el representante

☒ el representante conjunto

Nombre y dirección

BAYER BIOSCIENCE N V

Jozef Plateaustraat 22

B-9000 Gent

Bélgica

2 La oficina internacional notifica al solicitante que se ha efectuado el registro del siguiente cambio respecto a

☐ la persona

☐ la razón social

☒ la dirección

☐ la nacionalidad

☐ el domicilio

Nombre y dirección

BAYER BIOSCIENCE N V

Tecnologiepark 38

B-9000 Gent

Bélgica

3 Otras observaciones en caso necesario -

- 4 Una copia de la notificación ha sido enviada a
- ☒ la oficina receptora
 - ☐ las oficinas designadas involucradas
 - ☒ la autoridad de búsqueda internacional
 - ☐ las oficinas designadas involucradas
 - ☐ la autoridad examinadora preliminar internacional
 - ☐ otras -

La Oficina Internacional de WIPO
34, Chemin des Colombettes
1211 Ginebra 20, Suiza

Funcionario autorizado

Kari HUYNH-KHUONG (Fax 338 89 75)

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION <i>PCT</i> MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicacion de que se solicita la concesion de una patente	()	(X)
- Datos de identificacion del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	(X)
- Descripcion de la invencion	()	(X)
- Dibujos de ser estos pertinentes	()	(X)
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	(X)
COMPLETA (X)		
INCOMPLETA ()		
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicacion de que se solicita el regi tro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	(X)	()
- Representacion grafica o fotografica del Diseño Industrial o muestra del Material que Incorpora el diseño	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()		
INCOMPLETA ()		
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicacion de que solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()
- Datos de Identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud	()	()
- Representación grafica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()		
INCOMPLETA ()		

Firma Responsable

Fecha

184

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá
2020

Doctor(a)
PATIÑO LEYVA LUIS

REFERENCIA	Radicación No	5 111700
	Solicitud internacional	EP2004/003995
	Fecha inicio fase nacional	09/11/2005
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No	11506

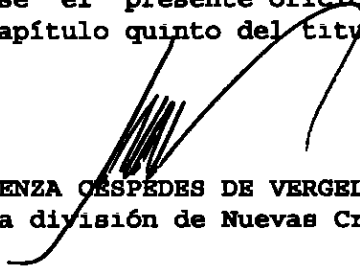
Como resultado del examen de forma realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT) regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio se le comunica que

1 Si fuere el caso el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art 36 2 b) del tratado PCT

2 La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil Adicionalmente deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante cuando ésta fuere persona jurídica

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486 se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio complete los requisitos anteriormente enunciados En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5 2 literal e) del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No 10 de 2001


ALIX CARMENZA OROPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 08 DIC 2005
adpa11