(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 408 345**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2005** **E 05818939 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013** **EP 1817419**

(54) Título: **Plantas que tienen mayor rendimiento y un método para su elaboración**

(30) Prioridad:

25.11.2004 EP 04106065
01.12.2004 US 632273 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.06.2013

(73) Titular/es:

CROPDESIGN N.V. (100%)
TECHNOLOGIEPARK 3
9052 ZWIJNAARDE-GENT, BE

(72) Inventor/es:

FRANKARD, VALERIE

(74) Agente/Representante:

Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 408 345 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas que tienen mayor rendimiento y un método para su elaboración

La presente invención se refiere en general al campo de la biología molecular y se refiere a un método para aumentar el rendimiento de las plantas en relación con las correspondientes plantas de tipo silvestre. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para aumentar rendimiento de semillas por parte de la planta mediante el incremento de la actividad en una planta de un polipéptido tipo MADS18 de Oryza sativa (Os) o un homólogo del mismo. La presente invención también se refiere a plantas que tienen una mayor actividad de un polipéptido tipo OsMADS18 o un homólogo del mismo, cuyas plantas tienen mayor rendimiento de semilla con relación a las correspondientes plantas de tipo silvestre. La invención también proporciona construcciones útiles en los métodos de la invención.

La población mundial en continuo crecimiento y la disminución de la oferta de tierras cultivables disponibles para la agricultura estimula la investigación para mejorar la eficiencia de la agricultura. Los medios convencionales para mejoras hortícolas y de los cultivos utilizan técnicas selectivas de fitomejoramiento para identificar plantas con características deseables. Sin embargo, tales técnicas selectivas de fitomejoramiento presentan diferentes inconvenientes, a saber, que estas técnicas son típicamente de labor intensiva y resultan en plantas que a menudo contienen componentes genéticos heterogéneos que no siempre pueden resultar en el rasgo deseable que pasa desde las plantas progenitoras. Los avances en biología molecular han permitido a la humanidad modificar el germoplasma de animales y plantas. La ingeniería genética de las plantas implica el aislamiento y manipulación de material genético (típicamente en la forma de ADN o ARN) y la posterior introducción de ese material genético en una planta. Tal tecnología tiene la capacidad de suministrar cultivos o plantas que tienen diferentes rasgos económicos, agronómicos u hortícolas mejorados.

Un rasgo de interés económico particular es el rendimiento. El rendimiento se define normalmente como el producto medible de valor económico de un cultivo. Esto se puede definir en términos de cantidad y/o calidad. El rendimiento es directamente dependiente de diferentes factores, por ejemplo, el número y tamaño de los órganos, la arquitectura de la planta (por ejemplo, el número de ramas), la producción de semillas y más. El desarrollo de las raíces, la absorción de nutrientes y la tolerancia al estrés también pueden ser factores importantes en la determinación del rendimiento. La optimización uno de los factores antes mencionados puede aumentar por lo tanto el rendimiento del cultivo.

La capacidad para aumentar el rendimiento de la planta podría tener muchas aplicaciones en áreas tales como la agricultura, incluida la producción de plantas ornamentales, la arboricultura, la horticultura y la silvicultura.

Ahora se ha encontrado que el aumento de la actividad en una planta de un polipéptido similar a OsMADS18 produce plantas que tienen mayor rendimiento de semillas con relación a las correspondientes plantas de tipo silvestre.

Los genes de la caja MADS (MCM1 en la levadura, Agamous y Deficiens en las plantas, y SRF (factor de respuesta al suero) en humanos) constituyen una gran familia de genes de reguladores transcripcionales eucariotas involucrados en diversos aspectos del desarrollo de levaduras, plantas y animales. Los genes de la caja MADS codifican un dominio MADS fuertemente conservado responsable por el enlazamiento del ADN con cajas específicas en la región reguladora de sus genes objetivo. La familia de genes se puede dividir en dos linajes principales, el tipo I y el tipo II. Los genes de tipo II también se denominan proteínas de tipo MIKC, que hacen referencia a los cuatro dominios funcionales que poseen (véase la Figura 1, de Jack (2001) Plant Molec Biol. 46: 515 - 520):

-MADS para el enlazamiento de ADN, aproximadamente de 60 aminoácidos (altamente conservados) localizados en el extremo del terminal N de la proteína;

-I para el dominio interviniente (menos conservado), implicado en la formación selectiva del dímero MADS;

-K para el dominio de queratina (bien conservado) responsable de la dimerización;

-C para la región del terminal C (variable en secuencia y longitud) implicada en la activación transcripcional, o en la formación de un complejo multimérico del factor de transcripción.

Más de 100 genes de la caja MADS han sido identificados en *Arabidopsis*, y han sido clasificados filogenéticamente en 12 clados, teniendo cada clado desviaciones específicas del consenso de MADS (Thiessen et al., (1996) J Mol Evol 43: 484 - 516). OsMADS18 (anteriormente llamado FDRMADS7 o OsMADS28) pertenece al clado SQUA (para SQUAMOSA, de *Antirrhinum majus*), junto con los siguientes genes de *Arabidopsis*: FUL/Agl8 (FRUITFULL), CAL/Agl10 (CAULIFLOWER), AP1/Agl7 (APETALA1) y el menos caracterizado MADS AGL79. Los genes del clado

SQUA son genes para identificación del órgano de la función A con referencia al modelo para especificación de la identidad del órgano floral ABC como lo propusieron Coen y Meyerowitz en 1991 (Nature 353: 31 - 7). El arroz posee cuatro genes del grupo A: OsMADS14, OsMADS15, OsMADS18 y OsMADS20, siendo cada uno miembro del clado SQUA.

El clado SQUA en dicotiledóneas se subdivide en dos subgrupos, los subclados AP1 y FUL. Estos subclados divergen esencialmente con respecto a los motivos de aminoácidos específicos ubicados en el terminal C de sus respectivas proteínas (Litt y Irish (2003) Genetics 165: 821 - 833). Además de la presencia de un motivo de aminoácidos específicos de AP1, las proteínas relacionadas con el clado AP1 de dicotiledóneas usualmente comprenden un motivo farnesilación en su terminal C (este motivo es CAAX, donde C es cisteína, A es usualmente un aminoácido alifático, y X es metionina, glutamina, serina, cisteína o alanina). En monocotiledóneas, las proteínas del clado SQUA también se subdividen en dos grupos principales, que pueden distinguirse con base en motivos conservados del terminal C localizados dentro de los últimos 15 aminoácidos de las proteínas: LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) y LPPWMLSH (SEQ ID NO: 19) (Figura 2). En contraste con las secuencias de dicotiledóneas del clado SQUA, las secuencias de monocotiledóneas del clado SQUA no poseen un motivo farnesilación en su terminal C.

OsMADS18 se agrupa con el polipéptido ZMM28 del maíz y el polipéptido m3 de la cebada (Becker y Thiessen (2003) Mol Phylogenet Evol 29 (3): 464 - 89). Las tres proteínas incluyen el motivo de aminoácidos LPPWMLRT aproximadamente dentro de los últimos 15 aminoácidos de su terminal C. Otras dos proteínas de la caja MADS del arroz del clado SQUA, OsMADS14 y OsMADS15, pertenecen al subclado con el motivo LPPWMLSH aproximadamente dentro de los últimos 15 aminoácidos de su terminal C. Para ambos de estos motivos, LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) y LPPWMLSH (SEQ ID NO: 19), los aminoácidos más conservados se localizan en la segunda (P para prolina) y cuarta posiciones (W para triptófano).

OsMADS18 es un gen ampliamente expresado y su ARN puede ser detectado en raíces, hojas, inflorescencia y tejido de la semilla en desarrollo (Masiero et al. (2002) J. Biol. Chem. 277 (29): 26429 - 35). OsMADS18 puede estar implicado en la transición del crecimiento vegetativo hasta la floración (Fornara et al. (2004) Plant Physiol 135 (4): 2207 - 19). La sobreexpresión constitutiva de OsMADS18 en arroz conduce a plantas enanas y a una floración temprana como consecuencia de una maduración acelerada de la planta.

En experimentos de doble híbrido en levadura, OsMADS18 ha demostrado que forma heterodímeros con OsMADS6, OsMADS24, OsMADS45 y OsMADS47. También interactúa específicamente con OsNF-YB1, que comparte la identidad de secuencia más alta con el Cotiledón Frondoso 1 de *Arabidopsis* (LEC1 o AtNF-YB9). También se ha demostrado la formación del complejo ternario entre las tres proteínas OsMADS18, OsMADS6 y OsNF-YB1 (Masiero et al., (2002) J. Biol. Chem. 277 (29): 26429 - 35).

En la patente de los Estados Unidos No. 6.229.068 B1, Yanofsky et al., describen un método para aumentar el tamaño de la semilla (o fruto) en una planta mediante el uso de un producto génico relacionado con AGL8 y que lo expresa ectópicamente en la planta. Los elementos reguladores preferidos mencionados en el documento para la expresión ectópica de un producto génico relacionado con AGL8 son elementos constitutivos, preferidos de la semilla o inducibles.

La solicitud internacional de patente WO 02/33091 da a conocer un factor de transcripción de la caja MADS de monocotiledónea (de ballico perenne) para la manipulación de la floración y la arquitectura de la planta. La solicitud internacional de patente WO 03/057877 divulga un ADNc de la caja MADS que tiene un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) entre diferentes variedades de cebada.

De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona un método para aumentar el rendimiento de semillas de una planta, que comprende aumentar la actividad por sobreexpresión en una planta de un polipéptido tipo OsMADS18 o un homólogo del mismo, en donde el polipéptido tipo OsMADS18 o su homólogo es: (i) un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado SQUAMOSA, y (ii) tiene actividad de enlazamiento de ADN y de proteína; y (iii) comprende el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) en los últimos 15 aminoácidos del terminal C de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo, pero no en la segunda y cuarta posiciones del motivo, que son respectivamente una prolina y un triptófano; y (iv) tiene al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2.

Convenientemente, el desempeño de los métodos de acuerdo con la presente invención da como resultado plantas que tienen mayor rendimiento, particularmente rendimiento de semilla.

El término "mayor rendimiento" como se define aquí se pretende que signifique un incremento en uno cualquiera o más de lo siguiente, cada uno con relación a las correspondientes plantas de tipo silvestre: (i) aumento de la biomasa (peso) de una o más partes de una planta, en particular las partes por encima del suelo (cosechables) o aumento de la biomasa de cualquier otra parte cosechable; (ii) aumento del rendimiento de semilla, que incluye un incremento en la biomasa de semilla (peso de semilla) y que puede ser un aumento en el peso de semilla por planta

o con base en una semilla individual o un aumento del peso de la semilla por hectárea o por acre, (iii) aumento del número de flores (flósculos) por panícula, que se expresa como una relación del número de semillas llenas sobre el número de panículas primarias; (iv) aumento del número de semillas (llenas); (v) aumento de la tasa de rellenado de semillas (que es el número de semillas llenas dividido por el número total de semillas y multiplicado por 100); (vi) aumento de tamaño de la semilla, que también puede influenciar la composición de las semillas, (vii) aumento del volumen de la semilla, que también pueden influir en la composición de las semillas (por ejemplo debido a un aumento en la cantidad o un cambio en la composición del aceite, proteínas o carbohidratos), (viii) mayor área de la semilla; (ix) aumento de la longitud de semilla; (x) mayor ancho de semilla; (x) mayor perímetro de la semilla; (xi) aumentó el índice de cosecha, que se expresa como la relación del rendimiento de las partes cosechables, tales como semillas, sobre la biomasa total, y (xii) aumentó del peso de mil granos (TKW), que se extrapola a partir del número de semillas llenas contadas y su peso total. Un aumento del TKW puede resultar de un aumento del tamaño de la semilla y / o del peso de semilla y también puede resultar de un aumento en el tamaño del embrión y/o el tamaño del endospermo.

Tomando el maíz como ejemplo, un aumento en el rendimiento se puede manifestar como uno o más de lo siguiente: incremento en el número de plantas por hectárea o por acre, un incremento en el número de mazorcas por planta, un incremento en el número de filas, en el número de granos por hilera, en el peso del grano, en el peso de mil granos, en la longitud /diámetro de la mazorca, entre otros. Tomando el arroz como ejemplo, un aumento en el rendimiento se puede manifestar por medio de un incremento en uno o más de lo siguiente: número de plantas por hectárea o por acre, número de panículas por planta, número de espiguillas por panícula, número de flores por panícula, incremento en la tasa de llenado de las semilla, incremento en el peso de mil granos, entre otros. Un aumento del rendimiento también puede resultar en una arquitectura modificada, o puede ocurrir como resultado de la arquitectura modificada.

De acuerdo con una característica preferida, el desempeño de los métodos de la invención resulta en plantas que tienen mayor rendimiento de semilla. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para aumentar el rendimiento de semillas de una planta, en donde el método comprende incrementar la actividad en una planta de un polipéptido tipo OsMADS18 o un homólogo del mismo.

Ya que las plantas transgénicas de acuerdo con la presente invención han aumentado el rendimiento, es probable que estas plantas exhiban una mayor tasa de crecimiento (al menos durante parte de su ciclo de vida), con relación a la tasa de crecimiento de las correspondientes plantas de tipo silvestre en una etapa correspondiente de su ciclo de vida. La mayor tasa de crecimiento puede ser específica para una o más partes de una planta (incluidas las semillas), o puede ser sustancialmente a través de toda la planta. Una planta que tiene una mayor tasa de crecimiento puede exhibir incluso una floración temprana. El aumento de la tasa de crecimiento puede tener lugar en una o más etapas en el ciclo de vida de una planta o sustancialmente durante todo el ciclo de vida de la planta. El aumento de la tasa de crecimiento durante las primeras etapas en el ciclo de vida de una planta puede reflejar un mayor vigor. El aumento de la tasa de crecimiento puede alterar el ciclo de cosecha de una planta permitiendo que las plantas se siembran más tarde y/o sea cosechadas más pronto de lo que sería posible. Si la tasa de crecimiento se incrementa suficientemente, puede permitir la siembra adicional de semillas de la misma especie vegetal (por ejemplo siembra y cosecha de plantas de arroz seguido por la siembra y cosecha de plantas de arroz adicionales todo dentro de un período convencional de crecimiento). Del mismo modo, si se incrementa suficientemente la tasa de crecimiento, esto puede permitir la siembra adicional de semillas de diferentes especies de plantas (por ejemplo la siembra y cosecha de plantas de arroz seguido, por ejemplo, por la siembra y cosecha opcional de soja, patatas o cualquier otra planta adecuada). También puede ser posible cosechar varias veces a partir del mismo rizoma en el caso de algunas plantas de cultivo. La alteración del ciclo de cosecha de una planta puede conducir a un aumento en la producción anual de biomasa por acre (debido a un aumento en el número de veces (digamos en un año) que cualquier planta particular puede ser cultivada y cosechada). Un aumento en la tasa de crecimiento puede permitir también el cultivo de plantas transgénicas en un área geográfica más amplia que sus contrapartes de tipo silvestre, ya que las limitaciones territoriales para el crecimiento de un cultivo son a menudo determinadas por condiciones ambientales adversas ya sea en el momento de la siembra (principios de la temporada) o en el momento de la cosecha (final de la temporada). Tales condiciones adversas se pueden evitar si se acorta el ciclo de cosecha. La tasa de crecimiento se puede determinar derivando diferentes parámetros a partir de las curvas de crecimiento, tales parámetros pueden ser: T-Mid (el tiempo que le toma a las plantas alcanzar el 50% de su tamaño máximo) y T-90 (tiempo que le toma a las plantas alcanzar el 90% de su tamaño máximo), entre otros.

El rendimiento de los métodos divulgados produce plantas que tienen una mayor tasa de crecimiento. Por lo tanto, de acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un método para aumentar el rendimiento en las plantas, cuyo método comprende aumentar la actividad en una planta de un polipéptido similar a OsMADS18 o un homólogo del mismo.

Un aumento del rendimiento y/o la tasa de crecimiento se produce si la planta está bajo condiciones no estresadas o si se expone la planta a diversos estreses en comparación con las plantas de control / de tipo silvestre. Las plantas responden típicamente a la exposición al estrés creciendo más lentamente. En condiciones de estrés severo, la

planta incluso pueden dejar de crecer por completo. El estrés suave por otro lado se define aquí como cualquier estrés al que se expone una planta que no resulta en que la planta deje de crecer completamente sin la capacidad para reanudar el crecimiento. Debido a los avances en las prácticas agrícolas (riego, fertilización, tratamientos con pesticidas) no se encuentra estreses severos a menudo en las plantas de cultivo cultivadas. Como consecuencia, el crecimiento comprometido inducido por estrés leve es a menudo una característica indeseable para la agricultura. Los estreses suaves son los estreses típicos a los que puede verse expuesta una planta. Estos estreses pueden ser estreses bióticos y/o abióticos (ambientales). Los estreses abióticos o ambientales típicos incluyen estreses por temperatura causados por temperaturas frías / congelación o calientes en forma atípica; estrés por salinidad; estrés por agua (sequía o exceso de agua). Los productos químicos también pueden causar estrés abiótico. Los estreses bióticos son típicamente aquellos estreses causados por patógenos, tales como bacterias, virus, hongos e insectos.

Los aumentos anteriormente mencionados en rendimiento se puede obtener convenientemente en cualquier planta después de la realización de los métodos de la invención.

El término "planta" como se usa aquí abarca plantas enteras, ancestros y progenie de las plantas y partes de plantas, incluyendo semillas, brotes, tallos, hojas, raíces (incluidos tubérculos), flores, y tejidos y órganos, en donde cada uno de los anteriormente mencionados incluyen al gen / ácido nucleico de interés. El término "planta" también abarca células vegetales, cultivos en suspensión, tejido de callo, embriones, regiones meristemáticas, gametofitos, esporofitos, polen, y microesporas, de nuevo en donde cada uno de los anteriormente mencionados incluyen al gen/ácido nucleico de interés.

Las plantas que son particularmente útiles en los métodos de la invención incluyen todas las plantas que pertenecen a la superfamilia Viridiplantae, en particular plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, incluyendo forraje o leguminosas forrajeras, plantas ornamentales, cultivos de alimentos, árboles o arbustos seleccionados de la lista que incluye Acacia spp., Acer spp., *Actinidia* spp., *Aesculus* spp., *Agathis australis, Albizia amara, Alsophila tricolor, Andropogon* spp., *Arachis spp, Areca catechu, Astelia fragrans, Astragalus cicer, Baikiaea plurijuga, Betula* spp., *Brassica* spp., *Bruguiera gymnorrhiza, Burkea africana, Butea frondosa, Cadaba farinosa, Calliandra spp, Camellia sinensis, Canna indica, Capsicum* spp., *Cassia* spp., *Centroema pubescens, Chaenomeles* spp., *Cinnamomum cassia, Coffea arabica, Colophospermum mopane, Coronillia varia, Cotoneaster serotina, Crataegus* spp., *Cucumis* spp., *Cupressus* spp. *Cyathea dealbata,, Cydonia oblonga, Cryptomeria japonica, Cymbopogon* spp., *Cynthea dealbata, Cydonia oblonga, Dalbergia monetaria, Davallia divaricata, Desmodium* spp., *Dicksonia squarosa, Diheteropogon amplectens, Dioclea spp, Dolichos* spp., *Dorycnium rectum, Echinochloa pyramidalis, Ehrartia* spp., *Eleusine coracana, Eragrestis* spp., *Erythrina* spp., *Eucalyptus* spp., *Euclea schimperi, Eulalia villosa, Fagopyrum* spp., *Feijoa sellowiana, Fragaria* spp., *Flemingia* spp., *Freycinetia banksii, Geranium thunbergii, Ginkgo biloba, Glicina javanica, Gliricidia spp, Gossypium hirsutum, Grevillea* spp., *Guibourtia coleosperma, Hedysarum* spp., *Hemarthia altissima, Heteropogon contortus, Hordeum vulgare, Hyparrhenia rufa, Hypericum erectum, Hyperthelia dissoluta, Indigo incarnata, Iris* spp., *Leptarrhena pyrolifolia, Lespediza* spp., *Lettuca* spp., *Leucaena leucocephala, Loudetia simplex, Lotonus bainesii, Lotus* spp., *Macrotyloma axillare , Malus* spp., *Manihot esculenta, Medicago sativa, Metasequoia glyptostroboides, Musa sapientum, Nicotianum* spp., *Onobrychis* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp., *Peltophorum africanum, Pennisetum* spp., *Persea gratissima, Petunia* spp., *Phaseolus* spp., *Phoenix canariensis, Phormium cookianum, Photinia* spp., *Picea glauca, Pinus* spp., *Pisum sativum, Podocarpus totara, Pogonarthria fleckii, Pogonarthria squarrosa, Populus* spp., *Prosopis cineraria, Pseudotsuga menziesii, Pterolobium stellatum, Pyrus communis, Quercus* spp., *Rhaphiolepsis umbellata, Rhopalostylis sapida, Rhus natalensis, Ribes grossularia, Ribes* spp., *Robinia pseudoacacia, Rosa* spp., *Rubus* spp., *Salix* spp., *Schyzachyrium sanguineum, Sciadopitys verticillata, Sequoia sempervirens, Sequoiadendron giganteum, Sorghum bicolor, Spinacia* spp., *Sporobolus fimbriatus, Stiburus alopecuroides, Stylosanthos humilis, Tadehagi* spp., *Taxodium distichum, Themeda triandra, Trifolium* spp., *Triticum* spp., *Tsuga heterophylla, Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vitis vinifera, Watsonia pyramidata, Zantedeschia aethiopica, Zea mays*, amaranto , alcachofa, espárrago, brócoli, coles de Bruselas, repollo, canola, zanahoria, coliflor, apio, hojas de col, lino, col rizada, lenteja, colza, okra, cebolla, patata, arroz, soja, fresas, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, tomate, calabaza, té y algas, entre otros. De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la planta es una planta de cultivo tal como soja, girasol, canola, alfalfa, colza, algodón, tomate, patata o tabaco. Además preferiblemente, la planta es una planta monocotiledónea, tal como caña de azúcar. Más preferiblemente, la planta es un cereal, tal como arroz, maíz, trigo, cebada, mijo, centeno, sorgo o avena.

La actividad de un polipéptido similar a OsMADS18 se puede incrementar al aumentar los niveles del polipéptido. Los niveles de ARNm de OsMADS18 también se puede incrementar. Alternativamente, también puede aumentar la actividad cuando no hay ningún cambio en los niveles de un polipéptido similar a OsMADS18, o incluso cuando existe una reducción en los niveles de un polipéptido similar a OsMADS18. Esto puede ocurrir cuando se alteran las propiedades intrínsecas del polipéptido, por ejemplo, haciendo versiones mutantes que son más activas que el polipéptido de tipo silvestre.

El término "polipéptido similar a OsMADS18 o un homólogo del mismo" como se define en la presente memoria se refiere a un polipéptido (i) que es un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado

SQUAMOSA, y (ii) que tiene actividad de enlazamiento de ADN y de proteína; y (iii) que comprende el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) en los últimos 15 aminoácidos del terminal C de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo, pero no en las posiciones segunda y cuarta del motivo, que son respectivamente una prolina y un triptófano, y (iv) que tiene al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2. La sustitución en el motivo puede ser una sustitución conservadora, pero no se limita a sustituciones conservadoras. La sustitución conservadora de aminoácidos puede reemplazar a uno cualquiera o más de los residuos de aminoácidos del motivo antes mencionado, incluyendo en las posiciones 2 y 4 como las ocupadas por prolina y triptófano, respectivamente. Las tablas de sustitución conservadora se encuentran fácilmente disponibles en la técnica. La tabla siguiente muestra ejemplos de sustituciones conservadas de aminoácidos.

Tabla 1: Ejemplos de sustituciones conservadas de aminoácidos

Residuo	Substituciones conservadoras	Residuo	Substituciones conservadoras
Ala	Ser	Leu	Ile; Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr; Gly
Cys	Ser	Thr	Ser; Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp; Phe
His	Asn; Gln	Val	Ile; Leu
Ile	Leu, Val		

Un "polipéptido similar a OsMADS18 o un homólogo del mismo" pueden ser fácilmente identificados utilizando técnicas de rutina bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la actividad de enlazamiento de ADN y las interacciones proteína-proteína se pueden determinar fácilmente *in vitro* o *in vivo* usando técnicas bien conocidas en la técnica. Los ejemplos de ensayos *in vitro* para la actividad de enlazamiento de ADN incluyen: análisis de retardo en gel utilizando dominios de enlazamiento conocidos de ADN de la caja MADS (West et al., (1998) Nucl Acid Res 26 (23): 5277 - 87), o ensayos de un híbrido en levadura. Un ejemplo de un ensayo *in vitro* para interacciones proteína-proteína es el ensayo doble híbrido en levadura (Fields y Song (1989) Nature 340: 245 - 6).

Por otra parte, el motivo definido anteriormente (SEQ ID NO: 18) también puede ser fácilmente identificado por una persona experta en la técnica simplemente haciendo una alineación y buscando el motivo en el extremo del terminal C de un polipéptido. De manera similar, un polipéptido que tiene al menos 65% de identidad con la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 también puede ser fácilmente establecido por medio de la alineación de secuencias. Los métodos para la alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica; tales métodos incluyen GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA. GAP utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch ((1970) J Mol Biol. 48: 443 - 453) para encontrar la alineación de dos secuencias completas lo que maximiza el número de coincidencias y minimiza el número de espacios. El algoritmo BLAST (Altschul et al., (1990) J Mol Biol. 215: 403 - 10) calcula el porcentaje de identidad de secuencia y realiza un análisis estadístico de la similitud entre las dos secuencias. El software para realizar análisis BLAST se encuentre públicamente disponible a través del Centro Nacional para Información de Biotecnología. Homólogos de OsMADS18 que contienen el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) dentro de al menos los últimos 15 aminoácidos de la proteína, y que tienen al menos 65% de identidad con las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NO: 2 se puede identificar fácilmente utilizando, por ejemplo, el algoritmo de alineación de secuencias múltiples ClustalW (versión 1,83) disponible en http://clustalw.genome.jp/sit-bin/nph-clustalw, con los siguientes parámetros de alineamiento por pares: tamaño de K-tuple (palabra) de 1, tamaño de ventana de 5, penalización por hueco de 4, número de diagonal superior de 5, y un método de puntuación en porcentaje.

Los ejemplos de polipéptidos derivados de plantas cubiertos por el término "polipéptido similar a OsMADS18 o un homólogo del mismo" incluyen (véase también la Tabla 2): OsMADS18 AF091458 de *Oryza sativa* (SEQ ID NO: 2), o ZMM28 (o m28) AJ430695 de *Zea mays* (SEQ ID NO: 4), MADS3 AY198328 de *Lolium perenne* (SEQ ID NO: 6), m3 AJ249143 de *Hordeum vulgare* (SEQ ID NO: 8). Una proteína similar a ZMM28 se dedujo de un cóntigo de diferentes EST que se superponen de *Saccharum officinarum*, CA285442 (SEQ ID NO: 9), CA200888 (SEQ ID NO: 10), CA247266 (SEQ ID NO: 11), CA282968 (SEQ ID NO: 12), y CA299090 (SEQ ID NO: 13). La proteína de *Saccharum officinarum* (SEQ ID NO: 15) se dedujo de la secuencia de consenso (SEQ ID NO: 14) obtenida mediante la alineación de cinco EST diferentes. La SEQ ID NO: 16 es una segunda secuencia de consenso de nucleótidos con un cambio de nucleótido (G por T) en la posición 578 pb desde el ATG, en comparación con la SEQ ID NO: 14. El polipéptido de la SEQ ID NO: 17 se dedujo de la SEQ ID NO: 16, y es idéntica a la SEQ ID NO: 15, excepto por un cambio de aminoácido en la posición 193 de la proteína (V193G).

Tabla 2: Ejemplos de ortólogos de monocotiledóneas similares a OsMADS18

	Nombre del gen	Número de acceso	ADN SEQ ID N°	Proteína SEQ ID NO	Fuente
1	OsMADS18	AF091458	1	2	*Oryza sativa*
2	ZMM28	AJ430695	3	4	*Zea mays*
3	MADS3	AY198328	5	6	*Lolium perenne*
4	m3	AJ249143	7	8	*Hordeum vulgare*
5	Similar a ZMM28	CA285442 CA200888 CA247266 CA282968 CA299090	14, 16 (predicha)	15,17 (predicha)	*Saccharum officinarum*

Se debe entender que las secuencias que caen bajo la definición de "polipéptido similar a OsMADS18 o un homólogo del mismo" no se limitan a las secuencias representadas por la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6 , la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 17, pero que cualquier polipéptido de reúna los criterios de: (i) ser un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado SQUAMOSA; y (ii) tener actividad de enlazamiento de ADN y de proteína; y (iii) incluir el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) en al menos los últimos 15 aminoácidos en el terminal C de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo, pero no en la segunda y cuarta posiciones del motivo, que son respectivamente una prolina y un triptófano; y (iv) tener al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2 puede ser adecuado para uso en los métodos de la invención y para obtener plantas que tienen mayor rendimiento con relación a las correspondientes plantas de tipo silvestre.

El ácido nucleico que codifica un polipéptido similar a OsMADS18 o un homólogo del mismo puede ser cualquier ácido nucleico natural o sintético. Por lo tanto el término "gen / ácido nucleico similar a OsMADS18" como se define aquí es cualquier gen / ácido nucleico que codifica un polipéptido similar a OsMADS18 o un homólogo del mismo como se definió aquí anteriormente. Los ejemplos de ácidos nucleicos similares a OsMADS18 incluyen a aquellos representados por cualquiera de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 16. Los genes / ácidos nucleicos similares a OsMADS18 y variantes de los mismos pueden ser adecuados en la práctica de los métodos de la invención. Los genes / ácido nucleicos similares a variantes de OsMADS18 incluyen pociones de un gen / ácido nucleico similar a OsMADS18 y/o ácidos nucleicos capaces de hibridar con un gen / ácido nucleico similar a OsMADS18.

El término porción como se define aquí se refiere a un pedazo de ADN (un gen / ácido nucleico similar a OsMADS18) que comprende al menos 747 nucleótidos cuya porción codifica un polipéptido de al menos 249 aminoácidos, cuyo polipéptido comprende al menos las características (i) y (ii) como sigue, preferiblemente junto con la característica (iii) y/o la característica (iv), siendo las características (i) a (iv): (i) un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado SQUAMOSA; (ii) que tiene actividad de enlazamiento de ADN y de proteína; y (iii) que comprende el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) en los últimos 15 aminoácidos del terminal C de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo pero no en las posiciones segunda y cuarta del motivo, que son, respectivamente, una prolina y un triptófano; y (iv) que tiene al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2. Una parte puede ser preparada, por ejemplo, haciendo una o más supresiones en un ácido nucleico similar a OsMADS18. Las porciones

se pueden usar en forma aislada o pueden ser fusionados a otras secuencias de codificación (o no codificadoras) con el fin de, por ejemplo, producir una proteína que combina diferentes actividades. Cuando se fusionan a otras secuencias de codificación, el polipéptido resultante producido después de la traducción puede ser más grande que el predicho para el fragmento similar a OsMADS18. Preferiblemente, la porción funcional es una porción de un ácido nucleico como la representada por una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 16.

Otra variante de un gen / ácido nucleico similar a OsMADS18 es un ácido nucleico capaz de hibridar en condiciones de rigurosidad reducida, preferiblemente bajo condiciones rigurosas, con un gen / ácido nucleico similar a OsMADS18 como se definió aquí anteriormente, cuya secuencia de hibridación codifica un polipéptido que comprende al menos las características (i) y (ii) como sigue, preferiblemente junto con la característica (iii) y/o la característica (iv), siendo las características (i) a (iv): (i) un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado SQUAMOSA, y (ii) un polipéptido que tiene actividad de enlazamiento de ADN y de proteína, y (iii) un polipéptido que comprende el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) localizado en al menos los últimos 15 aminoácidos de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo, pero no en las posiciones segunda y cuarta del motivo, que son respectivamente una prolina y un triptófano; y (iv) que tiene al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2. Además de tener las características antes mencionadas, preferiblemente la secuencia de hibridación es una que es capaz de hibridarse con un ácido nucleico como el representado por cualquiera de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 16, o con una porción de cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente como se definió aquí anteriormente.

El término "hibridación" como se define aquí es un proceso en el que las secuencias de nucleótidos complementarias sustancialmente homólogas hibridan entre sí. El proceso de hibridación puede ocurrir enteramente en solución, es decir ambos ácidos nucleicos complementarios están en solución. El proceso de hibridación también puede ocurrir con uno de los ácidos nucleicos complementarios inmovilizados a una matriz tal como cuentas magnéticas, cuentas de Sefarosa o cualquier otra resina. El proceso de hibridación puede ocurrir además con uno de los ácidos nucleicos complementarios inmovilizados a un soporte sólido tal como una membrana de nitrocelulosa o de nilón o inmovilizado por ejemplo mediante fotolitografía, por ejemplo, a un soporte de vidrio silíceo (este último conocido como arreglos de ácido nucleico o microarreglos o chips de ácido nucleico). A fin de permitir que se produzca la hibridación, las moléculas de ácido nucleico generalmente se desnaturalizan térmica o químicamente para fundir una cadena doble en dos cadenas sencillas y/o para remover horquillas u otras estructuras secundarias de ácidos nucleicos monocatenarios. La rigurosidad de la hibridación está influenciada por condiciones tales como temperatura, concentración de sal, fuerza iónica y composición amortiguadora de hibridación.

"Condiciones rigurosas de hibridación" y "condiciones rigurosas de lavado de hibridación" en el contexto de los experimentos de hibridación de ácido nucleico tales como hibridaciones tipo Southern y tipo Northern son dependientes de la secuencia y son distintas bajo diferentes parámetros ambientales. El experto en la técnica es consciente de diferentes parámetros que pueden ser alterados durante la hibridación ya sea para mantener o para cambiar las condiciones de rigurosidad.

La T_m es la temperatura bajo una fuerza iónica y pH definidos, a la cual 50% de la secuencia objetivo hibrida con una sonda perfectamente emparejada. La T_m depende de las condiciones de la solución y la composición base y la longitud de la sonda. Por ejemplo, las secuencias más largas hibridan específicamente a mayores temperaturas. La tasa máxima de hibridación se obtiene aproximadamente desde 16ºC hasta 32ºC por debajo de T_m. La presencia de cationes monovalentes en la solución de hibridación reduce la repulsión electrostática entre las dos cadenas de ácido nucleico promoviendo así la formación del híbrido; este efecto es visible para concentraciones de sodio de hasta 0.4M. La formamida reduce la temperatura de fusión de los dúplex de ADN-ADN y ADN-ARN con 0,6 a 0,7ºC para cada formamida en porcentaje, y la adición de 50% de formamida permite que se lleve a cabo la hibridación a 30 hasta 45º aunque la tasa de hibridación se disminuirá. La falta de correspondencia de pares de bases reducir la tasa de hibridación y la estabilidad térmica de los dúplex. En promedio y para sondas grandes, la T_m disminuye aproximadamente 1º C por falta de correspondencia de las bases en %. La T_m se puede calcular utilizando las siguientes ecuaciones, dependiendo de los tipos de híbridos:

1. Híbridos de ADN-ADN (Meinkoth y Wahl, Anal. Biochem, 138: 267 - 284, 1984):

$$T_m = 81{,}5^{o}\,C + 16.6 \times \log[Na^+]^a + 0.41 \times \%\,[G/C^b] - 500 \times [L^c]^{-1} - 0.61 \times \%\text{ de formamida}$$

2. Híbridos de ADN-ARN o ARN-ARN:

$$T_m = 79{,}8 + 18{,}5\,(\mathrm{Log}_{10}[Na^+]^a) + 0{,}58\,(\%G/C^b) + 11{,}8\,(\%G/C^b)^2 - 820/L^c$$

3. Híbridos de oligo-ADN u oligo-ARN[d]:

Para <20 nucleótidos: $T_m = 2\ (/_n)$

Para 20-35 nucleótidos: $T_m = 22 + 1{,}46\ (/_n)$

[a] o para otro catión monovalente, pero solo preciso en el rango de 0,01 - 0,4 M.

[b] sólo preciso para% de GC en el rango de 30% a 75%.

[c] L = longitud del dúplex en pares de bases.

[d] Oligo, oligonucleótido; $/_n$, longitud efectiva del cebador = 2 x (no. de G/C) + (no. de A/T).

Nota: para cada 1% de formamida, el T_m se reduce en aproximadamente 0,6 a 0,7º C, mientras que la presencia de urea 6 M reduce la T_m en aproximadamente 30ºC.

La especificidad de la hibridación es típicamente la función de los lavados post-hibridación. Para eliminar el fondo resultante de una hibridación no específica, las muestras se lavan con soluciones de sal diluidas. Los factores críticos de tales lavados incluyen la fuerza iónica y la temperatura de la solución final de lavado: entre más baja la concentración de sal y más alta la temperatura de lavado, más alta la rigurosidad del lavado. Las condiciones de lavado se realizan típicamente en o por debajo de la rigurosidad de hibridación. En general, condiciones rigurosas adecuadas para ensayos de hibridación de ácidos nucleicos o procedimientos de detección de amplificación de genes son como se estableció anteriormente. También se pueden seleccionar condiciones de mayor o menor rigurosidad. Generalmente, las condiciones de baja rigurosidad se seleccionan para que estén alrededor de 50ºC por debajo del punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica con una fuerza iónica y pH definidos. Las condiciones de rigurosidad media son cuando la temperatura están 20ºC por debajo de la T_m, y las condiciones de alta rigurosidad son cuando la temperatura está 10ºC por debajo de la T_m. Por ejemplo, condiciones rigurosas son aquellas que son al menos tan rigurosas como, por ejemplo, las condiciones A-L; y condiciones de rigurosidad reducida son al menos tan rigurosas como, por ejemplo, las condiciones M-R. El enlazamiento no específico se puede controlar usando una cualquiera entre una cantidad de técnicas conocidas tales como, por ejemplo, bloqueo de la membrana con soluciones que contienen proteína, adiciones de ARN, ADN heterólogo, y SDS al amortiguador de hibridación, y tratamiento con ARNasa. Ejemplos de condiciones de hibridación y de lavado se enumeran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Ejemplos de condiciones de hibridación y de lavado

Condición de rigurosidad	Híbrido de polinucleótido ±	Longitud del híbrido (pb) ‡	Temperatura de hibridación y amortiguador †	Temperatura de lavado y amortiguador†
A	ADN:ADN	> o igual a 50	65°C 1 X SSC; o 42°C, 1 X SSC y 50% de formamida	65°C; 0,3 X SSC
B	ADN:ADN	<50	Tb*; 1 X SSC	Tb*; 1 X SSC
C	ADN:ARN	> o igual a 50	67°C 1 X SSC; o 45°C, 1 X SSC y 50% de formamida	67°C; 0,3 X SSC
D	ADN:ARN	<50	Td*; 1 X SSC	Td*; 1 X SSC
E	ARN:ARN	> o igual a 50	70°C 1 X SSC; o 50°C, 1 X SSC y 50% de formamida	70°C; 0,3 X SSC
F	ARN:ARN	<50	Tf*; 1 X SSC	Tf*; 1 X SSC

(continuación)

Condición de rigurosidad	Híbrido de polinucleótido ±	Longitud del híbrido (pb) ‡	Temperatura de hibridación y amortiguador †	Temperatura de lavado y amortiguador†
G	ADN:ADN	> o igual a 50	65°C 4 X SSC; o 45°C, 4 X SSC y 50% de formamida	65°C; 1 X SSC
H	ADN:ADN	<50	Th*; 4 3SSC	Th*; 4 X SSC
I	ADN:ARN	> o igual a 50	67°C 4 X SSC; o 45°C, 4 X SSC y 50% de formamida	67°C; 1 X SSC
J	ADN:ARN	<50	Tj*; 4 X SSC	Tj*; 4 X SSC
K	ARN:ARN	> o igual a 50	70°C 4 X SSC; o 40°C, 6 X SSC y 50% de formamida	67°C; 1 X SSC
L	ARN:ARN	<50	Tl*; 2 X SSC	Tl*; 2 X SSC
M	ADN:ADN	> o igual a 50	50°C 4 X SSC; o 40°C, 6 X SSC y 50% de formamida	50°C; 2 X SSC
N	ADN:ADN	<50	Tn*; 6 X SSC	Tn*; 6 X SSC
O	ADN:ARN	> o igual a 50	55°C 4 X SSC; o 42°C, 6 X SSC y 50% de formamida	55°C; 2 X SSC
P	ADN:ARN	<50	Tp*; 6 X SSC	Tp*; 6 X SSC
Q	ARN:ARN	> o igual a 50	60°C 4 X SSC; o 45°C, 6 X SSC y 50% de formamida	60°C.; 2 X SSC
R	ARN:ARN	<50	Tr*; 4 X SSC	Tr*; 4 X SSC

‡ La "longitud del híbrido" es la longitud anticipada para la hibridación del ácido nucleico. Cuando los ácidos nucleicos de secuencia conocida se hibridan, la longitud del híbrido puede determinarse alineando las secuencias y e identificando las regiones conservadas descritas aquí.

† SSPE (1 X SSPE es NaCl 0,15 M, NaH_2PO_4 10 mM, y EDTA 1,25 mM, pH 7,4) puede ser sustituido por SSC (1 X SSC es NaCl 0,15 M y citrato de sodio 15 mM) en los amortiguadores de hibridación y de lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos después de completada la hibridación. Las hibridaciones y los lavados pueden incluir adicionalmente reactivo de Denhardt 5 X, 0,5 - 1,0% de SDS, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y fragmentado, 0,5% de pirofosfato de sodio, y hasta 50% de formamida.

* Tb-Tr: La temperatura de hibridación para los híbridos que se anticipó que eran menores a 50 pares de bases de longitud debe ser 5 - 10º C menor que la temperatura de fusión T_m de los híbridos; la T_m se determina de acuerdo con la ecuaciones mencionadas anteriormente.

± La presente invención también abarca la sustitución de una cualquiera, o más compañeros de ADN o ARN híbrido, ya sea con un PNA, o un ácido nucleico modificado.

Para los propósitos de definir el nivel de rigurosidad, se puede hacer referencia a Sambrook et al., (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ra Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, Nueva York o a Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1989).

El ácido nucleico similar a OsMADS18 o una variante del mismo se pueden derivar de cualquier fuente natural o artificial. El gen / ácido nucleico o una variante del mismo se puede aislar de una fuente microbiana, tal como levadura u hongos, o de una fuente tal como una planta, alga o animal (incluidos los humanos). Este ácido nucleico puede ser modificado a partir de su forma nativa en composición y/o ambiente genómico a través de manipulación humana deliberada. El ácido nucleico es preferiblemente de origen vegetal, ya sea de la misma especie vegetal (por ejemplo de aquella en la que se va a introducir) o bien de una especie de planta diferente. El ácido nucleico se puede aislar de una especie monocotiledónea, preferiblemente de la familia Poaceae, más preferiblemente de *Oryza sativa*. Más preferiblemente, el ácido nucleico similar a OsMADS18 aislado de *Oryza sativa* está representado por la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos similar a OsMADS18 es como la representada por la SEQ ID NO: 2.

La actividad de un polipéptido similar a OsMADS18 o un homólogo del mismo se puede incrementar mediante la introducción de una modificación genética (preferiblemente en el locus de un gen similar a OsMADS18). El locus de un gen como se define aquí se entiende como una región genómica, que incluye al gen de interés y 10 kb hacia arriba o hacia abajo de la región codificadora.

La modificación genética se puede introducir, por ejemplo, mediante uno cualquiera (o más) de los siguientes métodos: activación de T-ADN, TILLING, mutagénesis dirigida al sitio, evolución dirigida, recombinación homóloga o mediante la introducción y expresión en una planta de un ácido nucleico que codifica un polipéptido similar a OsMADS18 o un homólogo del mismo. Después de la introducción de la modificación genética, sigue una etapa de selección para el aumento de la actividad de un polipéptido similar a OsMADS18, en donde el aumento en la actividad produce plantas que tienen mayor rendimiento.

La marcación de la activación del T-ADN (Hayashi et al. Science (1992) 1350 - 1353) involucra la inserción de T-ADN, que usualmente contiene un promotor (puede ser también un reforzador de la traducción o un intrón), en la región genómica del gen de interés o 10 kb secuencia arriba o secuencia abajo de la región de codificación de un gen en una configuración tal que el promotor dirige la expresión del gen objetivo. Típicamente, la regulación de la expresión del gen objetivo por su promotor natural se interrumpe y el gen cae bajo el control del promotor recientemente introducido. El promotor está típicamente embebido en un T-ADN. Este T-ADN se inserta aleatoriamente en el genoma de la planta, por ejemplo, a través de infección de Agrobacterium y conduce a la sobreexpresión de genes cerca del T-ADN insertado. Las plantas transgénicas resultantes muestran fenotipos dominantes debido a la sobreexpresión de genes cercanos al promotor introducido. El promotor que se introduce puede ser cualquier promotor capaz de dirigir la expresión de un gen en el organismo deseado, en este caso una planta. Por ejemplo, los promotores constitutivos inducibles y preferidos de tipo celular, preferidos del tejido, son todos adecuados para uso en la activación del T-ADN.

También se puede introducir una modificación genética en el locus de un gen similar a OsMADS18 usando la técnica de TILLING (Detección de lesiones locales inducidas en genomas). Esta tecnología de mutagénesis es útil para generar, identificar y aislar variantes sometidas a mutación de un ácido nucleico similar a OsMADS18 capaz de exhibir actividad similar a la de OsMADS18. TILLING también permite la selección de las plantas portadoras de dichas variantes mutantes. Estas variantes mutantes pueden exhibir incluso una mayor actividad similar a la de OsMADS18 que la exhibida por el gen en su forma natural. TILLNG combina mutagénesis de alta densidad con métodos de selección de alto rendimiento. Las etapas típicamente seguidas en TILLING son: (a) mutagénesis EMS (Redei GP y Koncz C (1992) en Methods in Arabidopsis Research, Koncz C, Chua NH, Schell J, eds. Singapur, World Scientific Publishing Co, páginas 16 - 82; Feldmann et al., (1994) en Meyerowitz E. M., Somerville CR, eds., Arabidopsis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, páginas 137 - 172; Lightner J y Caspar T (1998) en J Martinez-Zapater, J Salinas, eds., Methods on Molecular Biology, Vol. 82. Humana Press, Totowa, NJ, páginas 91 - 104), (b) preparación de ADN y agrupamiento de individuos; (c) amplificación por PCR de una región de interés; (d) desnaturalización e hibridación para permitir la formación de heterodúplex; (e) DHPLC, donde la presencia de un heterodúplex en un grupo se detecta como un pico extra en el cromatograma; (T) identificación del individuo mutante, y (g) secuenciación del producto mutante de la PCR. Los métodos para TILLING son bien conocidos en la técnica (McCallum et al., (2000) Nat Biotechnol 18: 455 - 457; revisado por Stemple (2004) Nat Rev Genet 5 (2): 145 - 50).

La mutagénesis dirigida al sitio se puede utilizar para generar variantes de ácidos nucleicos similares a OsMADS18. Existen varios métodos disponibles para lograr mutagénesis dirigida al sitio, siendo los más comunes los métodos basados en la PCR (protocolos actuales en biología molecular. Wiley Eds. http://www.4ulr.com/products/currentprotocols/index.html).

También se puede utilizar evolución dirigida para generar variantes de ácidos nucleicos similares a OsMADS18. Esta consiste de iteraciones de arrastre de ADN seguido por detección y/o selección apropiadas para generar

variantes de ácidos nucleicos similares a OsMADS18 o variantes de los mismos que codifican polipéptidos similares a OsMADS18 u homólogos de los mismos que tienen una actividad biológica modificada (Castle et al., (2004) Science 304 (5674): 1151 - 4; patentes de los Estados Unidos No. 5.811.238 y 6.395.547).

Activación de T-ADN, TILLING, mutagénesis dirigida al sitio y evolución dirigida son ejemplos de tecnologías que permiten la generación de nuevos alelos y variantes similares a OsMADS18.

La recombinación homóloga permite la introducción en un genoma de un ácido nucleico seleccionado en una posición definida seleccionada. La recombinación homóloga es una tecnología estándar utilizada rutinariamente en ciencias biológicas para organismos inferiores tales como levadura o el musgo *Physcomitrella*. Los métodos para llevar a cabo la recombinación homóloga en plantas han sido descritos no solamente para plantas modelo (Offringa et al. (1990) EMBO J 9 (10): 3077 - 84) sino también para plantas de cultivo, por ejemplo arroz (Terada et al. (2002) Nat. Biotech 20 (10): 1030 - 4; lida y Terada (2004) Curr Opin Biotech 15 (2): 132 - 8). El ácido nucleico que va a ser dirigido (que puede ser un ácido nucleico similar a OsMADS18 o una variante del mismo como se definió aquí anteriormente) no necesita ser dirigido al locus de un gen similar a OsMADS18, sino que puede ser introducido, por ejemplo, en regiones de alta expresión. El ácido nucleico que va a ser dirigido puede ser un alelo mejorado utilizado para reemplazar el gen endógeno o puede ser introducido además al gen endógeno.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el rendimiento de la planta se puede mejorar mediante la introducción y expresión en una planta de un ácido nucleico que codifica un polipéptido similar a OsMADS18 o un homólogo del mismo.

Un método preferido para introducir una modificación genética (que en este caso no necesita estar en el locus de un gen similar a OsMADS18) es introducir y expresar en una planta un ácido nucleico que codifica un polipéptido similar a OsMADS18 o un homólogo del mismo. Un polipéptido similar a OsMADS18 o un homólogo del mismo como se mencionó anteriormente es (i) un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado SQUAMOSA; y (ii) tiene actividad de enlazamiento de ADN y de proteína; y (iii) comprende el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) localizado en los últimos 15 aminoácidos de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo, pero no en las posiciones segunda y cuarta del motivo, que son respectivamente una prolina y un triptófano; y (iv) tiene al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2. El ácido nucleico que va a ser introducido en una planta puede ser un ácido nucleico de longitud completa o puede ser una porción o una secuencia de hibridación como se definió aquí anteriormente.

Los "homólogos" de una proteína abarcan péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que tienen sustituciones, supresiones y/o inserciones de aminoácidos con relación a la proteína no modificada en cuestión y que tienen actividad biológica y funcional similar a la de la proteína no modificada de la cual se derivan. Para producir tales homólogos, los aminoácidos de la proteína pueden ser reemplazados por otros aminoácidos que tengan propiedades similares (tales como hidrofobicidad, hidrofilicidad, antigenicidad, propensión a formar o romper estructuras α-helicoidales o estructuras de lámina β, similares). Las tablas de sustitución conservadora son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo Creighton (1984) Proteins. W. H. Freeman and Company y la Tabla 1 anterior).

También están abarcados por el término "homólogos" dos formas especiales de homología, que incluyen secuencias ortólogas y secuencias parálogas, que abarcan conceptos evolucionarios utilizados para describir relaciones ancestrales de genes. El término "parálogo" se refiere a las duplicaciones de genes dentro del genoma de una especie lo que conduce a genes parálogos. El término "ortólogo" se refiere a genes homólogos en organismos diferentes, debido a la especiación.

Los ortólogos, por ejemplo, en otras especies de plantas monocotiledóneas pueden ser encontrados fácilmente realizando la así llamada búsqueda por BLAST recíproco. Esto se puede hacer por medio de un primer procedimiento por medio de blast que involucra someter a blast una secuencia de consulta (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2) contra cualquier base de datos de secuencias, tal como la base de datos NCBI disponible públicamente que se puede encontrar en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov. BLASTn o tBLASTX (utilizando valores estándar predeterminados) se pueden utilizar cuando se parte de una secuencia de nucleótidos y BLASTP o TBLASTN (utilizando valores estándar predeterminados) se pueden utilizar cuando se parte de una secuencia de proteína. Los resultados de BLAST pueden ser opcionalmente filtrados. Las secuencias ya sea de los resultados filtrados o no filtrados se someten de nuevo a BLAST (segundo BLAST) contra las secuencias del mismo organismo que el organismo de la secuencia de consulta, (donde la secuencia de consulta es la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 el segundo blast sería por lo tanto contra secuencias de *Oryza sativa* (arroz)). Los resultados del primero y el segundo BLAST se comparan entonces. Un parálogo se identifica si un alto nivel de éxito del segundo blast es de la misma especie que aquella de la que se deriva la secuencia de consulta; un ortólogo se identifica si un alto nivel de éxito no es de la misma especie que aquella de la que se deriva la secuencia de consulta. Altos niveles de éxito son aquellos que tienen un bajo valor de E. Cuanto menor sea el valor de E, más significativa es la puntuación (o en

otras palabras, más baja será la probabilidad de que el éxito se encuentre por casualidad). El cálculo del valor de E es bien conocido en la técnica. En el caso de familias grandes, se puede utilizar ClustalW, seguido por un árbol filogenético de unión de vecinos, para ayudar a visualizar la agrupación de genes relacionados y para identificar ortólogos y parálogos.

Un homólogo puede estar en la forma de una "variante de sustitución" de una proteína, es decir, donde al menos un residuo en una secuencia de aminoácidos ha sido eliminado y se ha insertado un resto diferente en su lugar. Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de residuos individuales, pero pueden agruparse también dependiendo de las restricciones funcionales colocadas sobre el polipéptido; las inserciones normalmente serán del orden de aproximadamente 1 a 10 residuos de aminoácidos. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones conservadoras de aminoácidos.

Un homólogo puede estar también en la forma de una "variante de inserción" de una proteína, es decir, donde se introducen uno o más residuos de aminoácidos en un sitio predeterminado en una proteína. Las inserciones pueden comprender fusiones en el terminal amino y/o en el terminal carboxilo, así como inserciones dentro de la secuencia de un solo aminoácido o de múltiples aminoácidos. Generalmente, las inserciones dentro de la secuencia de aminoácidos serán más pequeñas que las fusiones en el terminal amino o en el terminal carboxilo, del orden de aproximadamente 1 a 10 residuos. Los ejemplos de proteínas o péptidos de fusión en el terminal amino o en el terminal carboxilo incluyen al dominio de enlazamiento o al dominio de activación de un activador transcripcional como el que se utiliza en el sistema doble híbrido en levadura, las proteínas de recubrimiento de fago, etiqueta de (histidina)-6, etiqueta de glutationa S transferasa, proteína A, proteína de enlazamiento de maltosa, dihidrofolato reductasa, epítopo de Tag·100, epítopo de c-myc, epítopo de FLAG®, lacZ, CMP (péptido de enlazamiento de calmodulina), epítopo de HA, epítopo de proteína C y epítopo del VSV.

Los homólogos en la forma de "variantes de supresión" de una proteína se caracterizan por la remoción de uno o más aminoácidos de una proteína.

Las variantes de aminoácidos de una proteína pueden elaborarse fácilmente utilizando técnicas de síntesis de péptidos bien conocidas en la técnica, tales como la síntesis de péptidos en fase sólida y similares, o por medio de manipulaciones de ADN recombinante. Los métodos para la manipulación de secuencias de ADN para producir variantes de sustitución, inserción o supresión de una proteína son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las técnicas para hacer mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en el ADN son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen mutagénesis M13, mutagénesis *in vitro* del gen de T7 (USB, Cleveland, OH), mutagénesis Dirigida al Sitio QuickChange (Stratagene, San Diego, CA), mutagénesis dirigida al sitio mediada por PCR u otros protocolos de mutagénesis dirigida al sitio.

El polipéptido similar a OsMADS18 o un homólogo del mismo puede ser un derivado. Los "derivados" incluyen péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que pueden incluir sustituciones, supresiones o adiciones de residuos de aminoácidos de ocurrencia natural y no natural en comparación con la secuencia de aminoácidos de una forma de ocurrencia natural de la proteína, por ejemplo, como la presentada en la SEQ ID NO: 2. Los "derivados" de una proteína abarcan péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que pueden incluir residuos de aminoácidos de origen natural alterados, glicosilados, acilados o de origen no natural en comparación con la secuencia de aminoácidos de una forma de origen natural del polipéptido. Un derivado también puede incluir uno o más sustituyentes que no son de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cual se deriva, por ejemplo una molécula reportera u otro ligando, enlazado en forma covalentemente o no covalentemente a la secuencia de aminoácidos, tal como una molécula reportera molécula que se enlaza para facilitar su detección, y residuos de aminoácidos de origen no natural con respecto a la secuencia de aminoácidos de una proteína de origen natural.

El polipéptido similar a OsMADS18 o un homólogo del mismo pueden ser codificados por una variante alternativa de empalme de un ácido nucleico / gen similar a OsMADS18. El término "variante alternativa de empalme" como se utiliza aquí abarca variantes de una secuencia de ácido nucleico en la que los intrones y/o los exones seleccionados han sido cortados, reemplazados o añadidos, o en el que los intrones han sido acortados o alargados. Tales variantes serán aquellas en las que se retiene la actividad biológica de la proteína, que pueden ser logradas por medio de segmentos funcionales que se retienen selectivamente de la proteína. Tales variantes de empalme se pueden encontrar en la naturaleza o pueden ser hechas por el hombre. Los métodos para elaborar tales variantes de empalme son bien conocidos en la técnica. Las variantes de empalme preferidas son las variantes de empalme de ácido nucleico representadas por las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 16. Adicionalmente se prefieren las variantes de empalme que codifican un polipéptido que comprende al menos las características (i) y (ii) como sigue, preferiblemente junto con la característica (iii) y/o la característica (iv), siendo las características (i) a (iv): (i) un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado SQUAMOSA, y (ii) que tiene actividad de enlazamiento de ADN y de proteína; y (iii) que comprende el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18), que se encuentra en los últimos 15 aminoácidos de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo excepto en las posiciones segunda y cuarta del motivo, que

son respectivamente una prolina y un triptófano; y (iv) que tiene al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína similar a OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2.

El homólogo también puede ser codificado por una variante alélica de un ácido nucleico que codifica un polipéptido similar a OsMADS18 o un homólogo del mismo, preferiblemente una variante alélica de un ácido nucleico representado por la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 , SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Preferiblemente además, el polipéptido codificado por la variante alélica comprende al menos las características (i) y (ii) de la siguiente manera, preferiblemente junto con la característica (iii) y/o la característica (iv), siendo las características (i) a (iv): (i) un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado SQUAMOSA, y (ii) que tiene actividad de enlazamiento de ADN y proteína de unión; y (iii) que comprende el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) localizado en los últimos 15 aminoácidos de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo, pero no en las posiciones segunda y cuarta del motivo, que son respectivamente, una prolina y un triptófano; y (iv) que tiene al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2. Las variantes alélicas existen en la naturaleza, y abarcado dentro de los métodos de la presente invención está el uso de estos alelos naturales. Las variantes alélicas abarcan polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP), así como polimorfismos de inserción pequeña /supresión (INDEL). El tamaño de los INDEL es usualmente menor a 100 pb. Los SNP y los INDEL forman el conjunto más grande de variantes de secuencia en las cadenas polimórficas de origen natural de la mayoría de los organismos.

De acuerdo con un aspecto preferido de la presente invención, está prevista una expresión mejorada o aumentada del ácido nucleico similar a OsMADS18 o una variante del mismo. Los métodos para obtener una expresión mejorada o aumentada de los genes o de los productos génicos están bien documentados en la técnica e incluyen, por ejemplo, sobreexpresión dirigida por promotores apropiados, el uso de reforzadores de la transcripción o reforzadores de la traducción. Los ácidos nucleicos aislados que sirven como elementos promotores o reforzadores pueden ser introducidos en una posición apropiada (típicamente secuencia arriba) de una forma no heteróloga de un polinucleótido con el fin de aumentar la expresión de un ácido nucleico similar a OsMADS18 o una variante del mismo. Por ejemplo, se pueden alterar los promotores endógenos *in vivo* por mutación, supresión o sustitución (véase, Kmiec, patente de los Estados Unidos No 5.565.350; Zarling et al., PCT/US93/03868), o se pueden introducir promotores aislados en una célula vegetal en la orientación apropiada y distancia de un gen de la presente invención con el fin de controlar la expresión del gen.

Si se desea la expresión del polipéptido, generalmente es deseable incluir una región de poliadenilación en el extremo 3’ de una región de codificación del polinucleótido. La región de poliadenilación se puede derivar del gen natural, de una variedad de otros genes de plantas, o de T-ADN. La secuencia del extremo 3’ que se añade puede derivarse, por ejemplo, de la nopalina sintasa o de genes de octopina sintasa, o alternativamente de otro gen de la planta, o menos preferiblemente de cualquier otro gen eucariota.

También se puede añadir una secuencia de intrón a la región no traducida 5’ o a la secuencia de codificación de la secuencia parcial de codificación para incrementar la cantidad del mensaje de madurez que se acumula en el citosol. La inclusión de un intrón que puede ser empalmado tanto en los constructos de expresión de la planta como del animal, se ha demostrado que aumenta la expresión génica tanto en los niveles de ARNm como en los niveles de proteína hasta 1000 veces, Buchman y Berg, Mol. Cell Biol. 8: 4395 - 4405 (1988);. Callis et al., Genes Dev. 1: 1183 - 1200 (1987). Tal mejora del intrón de la expresión génica es típicamente mayor cuando se coloca cerca del extremo 5’ de la unidad de transcripción. El uso de los intrones de maíz, intrón 1, 2 y 6 de Adh1-S, el intrón de Bronce-1, son conocidos en la técnica. Véase, en general, The Maize Handbook, Capítulo 116, Freeling y Walbot, Eds., Springer, Nueva York (1994).

La invención también proporciona constructos genéticos y vectores para facilitar la introducción y/o expresión de las secuencias de nucleótidos útiles en los métodos de acuerdo con la invención, con el fin de producir plantas que tienen mayor rendimiento con relación a las correspondientes plantas de tipo silvestre.

Por lo tanto, se proporciona una construcción génica que comprende:

(i) Un ácido nucleico similar a OsMADS18 o una variante del mismo,

(ii) Una o más secuencias de control capaces de dirigir la expresión de la secuencia de ácido nucleico de (i); y opcionalmente

(iii) Una secuencia de terminación de la transcripción.

Los constructos útiles en los métodos de acuerdo con la presente invención puede ser construidos usando tecnología de ADN recombinante bien conocida para las personas expertas en la técnica. Los constructos génicos se pueden insertar en vectores, que pueden estar comercialmente disponibles, adecuados para transformarse en plantas y adecuados para la expresión del gen de interés en las células transformadas.

Las plantas se transforman con un vector que comprende la secuencia de interés (es decir, un ácido nucleico similar a OsMADS18 o una variante del mismo). La secuencia de interés está operativamente enlazada a una o más secuencias de control (al menos a un promotor). Los términos "elementos reguladores", "secuencia de control" y "promotor" son todos utilizados aquí en forma intercambiable y se deben tomar en un contexto amplio para referirse a secuencias reguladoras de ácido nucleico capaces de efectuar la expresión de las secuencias a las que están ligadas. Abarcadas por los términos anteriormente mencionados están las secuencias reguladoras transcripcionales derivadas de un gen genómico eucariota clásico (incluida la caja TATA que se requiere para la iniciación exacta de la transcripción, con o sin una secuencia de caja CCAAT) y elementos reguladores adicionales (es decir, secuencias que se activan secuencia arriba, reforzadores y silenciadores) que alteran la expresión génica en respuesta a estímulos externos y/o de desarrollo, o de una forma específica de tejido. También se incluye dentro del término una secuencia reguladora de la transcripción de un gen procariota clásico, en cuyo caso puede incluir una secuencia de caja -35 y/o secuencias reguladoras transcripcionales de caja -10. El término "elemento regulador" también abarca una molécula sintética de fusión o un derivado que confiere, activa o refuerza la expresión de una molécula de ácido nucleico en una célula, tejido u órgano. El término "operativamente enlazado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un enlace funcional entre la secuencia promotora y el gen de interés, de tal manera que la secuencia promotora es capaz de iniciar la transcripción del gen de interés.

El ácido nucleico similar a OsMADS18 o una variante del mismo están preferiblemente operativamente enlazados a un promotor de meristemo apical de un brote temprano. Un "promotor de meristemo apical de un brote temprano" tal como se define en la presente memoria es un promotor que es transcripcionalmente activo en el meristemo apical del brote de la etapa globular embrionaria hasta la etapa de plántula joven; estas etapas son bien conocidas para las personas expertas en la técnica. Preferiblemente, el promotor del meristemo apical del brote temprano es un promotor de OSH1 (de arroz; SEQ ID NO: 22 (Matsuoka et al., (1993) Plant Cell 5: 1039 - 1048; Sato et al., (1996) Proc Natl Acad Sci, EE.UU. 93 (15): 8117 - 22). Debe quedar claro que la aplicabilidad de la presente invención no se limita al ácido nucleico similar a OsMADS18 representado por la SEQ ID NO: 1, ni la aplicabilidad de la invención está limitada a la expresión de un ácido nucleico similar a OsMADS18 cuando es dirigido por un promotor de OSH1. Ejemplos de otros promotores de meristema apical de brote temprano se muestran en la Tabla 4 a continuación. Estos son miembros del homeobox de la familia KNOX clase 1, de genes parálogos u ortólogos. Debe entenderse que la lista siguiente no es exhaustiva.

Tabla 4: Ejemplos de promotores de meristemo apical temprano

Fuente del gen	Familia del gen	Fuente vegetal	Referencia
OSH1	Homeobox de la familia KNOX clase 1	*Oryza sativa*	-Matsuoka et al., (1993) Plant Cell 5: 1039 - 1048 -Sato et al., (1996) PNAS 93: 8117 - 8122
Knotted 1	Homeobox de la familia KNOX clase 1	*Zea mays*	Hake et al., (1989) EMBO Journal 8: 15 - 22
KNAT1	Homeobox de la familia KNOX clase 1	*Arabidopsis thaliana*	Lincoln et al., (1994) Plant Cell 6: 1859 - 1876
Oskn2	Homeobox de la familia KNOX clase 1	*Oryza sativa*	Postma-Haarsma et al., (1999) Plant Mol Biol 39(2): 257 - 71
Oskn3	Homeobox de la familia KNOX clase 1	*Oryza sativa*	Postma-Haarsma et al., (1999) Plant Mol Biol 39(2): 257 - 71

Opcionalmente, una o más secuencias terminadoras también se pueden usar en el constructo introducido en una planta. El término "terminador" abarca una secuencia de control que es una secuencia de ADN al final de una unidad transcripcional que señala el procesamiento 3' y la poliadenilación de un transcripto primario y la terminación de la transcripción. Elementos reguladores adicionales pueden incluir reforzadores transcripcionales así como de traducción. Los expertos en la técnica serán conscientes de secuencias terminadoras y reforzadoras que pueden ser adecuadas para su uso en la realización de la invención. Tales secuencias serían conocidas o pueden ser fácilmente obtenidas por una persona experta en la técnica.

Los constructos genéticos de la invención pueden incluir además un origen de una secuencia de replicación que se requiere para el mantenimiento y/o replicación en un tipo específico de célula. Un ejemplo es cuando se requiere mantener un constructo genético en una célula bacteriana como un elemento genético episomal (por ejemplo

molécula de plásmido o de cósmido). Los orígenes preferidos de replicación incluyen, pero no se limitan a, el f1-ori y colE1.

El constructo genético puede comprender opcionalmente un gen marcador seleccionable. Tal como se utiliza aquí, el término "gen marcador seleccionable" incluye cualquier gen que confiere un fenotipo sobre una célula en la que se expresa para facilitar la identificación y/o selección de células que son transfectadas o transformadas con un constructo de ácido nucleico de la invención. Los marcadores adecuados se pueden seleccionar a partir de marcadores que confieren resistencia antibiótica o herbicida, que introducen un nuevo rasgo metabólico o que permiten selección visual. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen genes que confieren resistencia a los antibióticos (tales como nptII que fosforila neomicina y kanamicina, o hpt, que fosforila higromicina), a herbicidas (por ejemplo bar que proporciona resistencia a Basta; aroA o gox que proporcionan resistencia contra el glifosato), o genes que proporcionan un rasgo metabólico (tal como manA que permite a las plantas utilizar manosa como única fuente de carbono). Los genes marcadores visuales resultan en la formación de color (por ejemplo, β-glucuronidasa, GUS), luminiscencia (tal como luciferasa) o fluorescencia (Proteína Fluorescente Verde, GFP, y derivados de la misma).

La presente invención también abarca plantas que pueden obtenerse por medio de los métodos de acuerdo con la presente invención. La presente invención proporciona por lo tanto plantas que pueden obtenerse por los métodos de acuerdo con la presente invención, en donde las plantas han introducido en ellas un ácido nucleico similar a OsMADS18 o una variante del mismo incluido en un constructo como se definió anteriormente.

La invención también proporciona un método para la producción de plantas transgénicas que tienen mayor rendimiento con relación a las correspondientes plantas de tipo silvestre, que comprende la introducción y expresión en una planta de un ácido nucleico similar a OsMADS18 o una variante del mismo.

Más específicamente, la presente invención proporciona un método para la producción de plantas transgénicas que tienen mayor rendimiento con relación a las correspondientes plantas de tipo silvestre, cuyo método comprende:

(i) introducir y expresar en una célula de planta, parte de una planta o célula de una planta un ácido nucleico similar a OsMADS18 o una variante del mismo, y

(ii) cultivar la célula de la planta bajo condiciones que promuevan el crecimiento y desarrollo de la planta.

El ácido nucleico puede introducirse directamente en una célula de la planta o en la propia planta (incluida la introducción en un tejido, órgano o cualquier otra parte de una planta). De acuerdo con una característica preferida de la presente invención, el ácido nucleico se introduce preferiblemente en una planta por medio de transformación.

El término "transformación" como se denomina aquí abarca la transferencia de un polinucleótido exógeno en una célula huésped, independientemente del método utilizado para la transferencia. El tejido de la planta capaz de propagación clonal posterior, ya sea por organogénesis o por embriogénesis, puede ser transformado con un constructo genético de la presente invención y una planta entera regenerada a partir del mismo. El tejido particular escogido variará dependiendo de los sistemas de propagación clonal disponibles, y más adecuados para, la especie particular que se está transformado. Los ejemplos de objetivos de tejidos incluyen discos de hojas, polen, embriones, cotiledones, hipocotilos, megagametofitos, tejido de callo, tejido meristemático existente (por ejemplo, meristemo apical, yemas axilares, y meristemos de raíz), y tejido de meristemo inducido (por ejemplo, meristemo de cotiledón y meristemo del hipocotilo). El polinucleótido puede ser introducido en forma transitoria o en forma estable en una célula huésped y puede ser mantenido de manera no integrada, por ejemplo, como un plásmido. Alternativamente, puede ser integrado en el genoma del huésped. La célula vegetal transformada resultante se puede usar entonces para regenerar una planta transformada de una manera conocida para las personas expertas en la técnica.

La transformación de especies de plantas es actualmente una técnica bastante rutinaria. Ventajosamente, se puede utilizar cualquiera de los diferentes métodos de transformación para introducir el gen de interés en una célula adecuada de un ancestro. Los métodos de transformación incluyen el uso de liposomas, electroporación, productos químicos que aumentan la captación de ADN libre, inyección del ADN directamente en la planta, bombardeo de partículas, transformación utilizando virus o polen y microproyección. Los métodos pueden ser seleccionados a partir del método de calcio/polietilenglicol para protoplastos (Krens, F. A. et al., (1982) Nature 296, 72 - 74;. Negrutiu I et al. (1987) Plant Mol Biol 8: 363 - 373); electroporación de protoplastos (Shillito R. D. et al., 1985 Bio/Technol 3, 1099 - 1102); microinyección en material vegetal (Crossway A. et al, (1986.). Mol. Gen Genet 202: 179 - 185); bombardeo con partículas recubiertas de ADN o ARN (Klein T. M. et al., (1987) Nature 327: 70); infección con virus (no integradores) y similares. Plantas de arroz transgénicas que expresan un ácido nucleico/gen similar a OsMADS18 preferiblemente producido a través de transformación mediada por Agrobacterium utilizando cualquiera de los métodos bien conocidos para transformación de arroz, tal como se describe en cualquiera de los siguientes: solicitud de patente europea publicada EP 1198985 A1; Aldemita y Hodges (Planta 199: 612 - 617, 1996), Chan et al. (Plant

Mol Biol. 22 (3): 491 - 506, 1993); Hiei et al. (Plant J 6 (2): 271 - 282, 1994), cuyas descripciones se incorporan aquí por referencia como si se expusieran en su totalidad. En el caso de la transformación del maíz, el método preferido es como se describe ya sea en Ishida et al. (Nat. Biotechnol 14 (6): 745 - 50, 1996) o en Frame et al. (Plant Physiol 129 (1): 13 - 22, 2002), cuyas divulgaciones se incorporan por referencia en la presente memoria como si se expusieran en su totalidad.

Generalmente después de la transformación, se seleccionan células vegetales o agrupaciones de células por la presencia de uno o más marcadores que son codificados por genes expresables por la planta co-transferidos con el gen de interés, después de lo cual se regenera el material transformado en una planta completa.

Después de la transferencia y regeneración del ADN, se pueden evaluar las plantas putativamente transformadas, por ejemplo utilizando análisis tipo Southern, por la presencia del gen de interés, el número de copia y/o organización genómica. Alternativa o adicionalmente, los niveles de expresión del ADN recientemente introducido se puede controlar mediante análisis tipo Northern y/o tipo Western, siendo ambas técnicas bien conocidas por las personas ordinariamente capacitadas en la técnica.

Las plantas transformadas generadas se puede propagar mediante una variedad de medios, tales como por medio de propagación clonal o de técnicas clásicas de fitomejoramiento. Por ejemplo, una primera generación (o T1) de plantas transformadas pueden ser autofecundadas para producir transformantes homocigotos de segunda generación (o T2), y las plantas T2 se propagan adicionalmente a través de técnicas clásicas de fitomejoramiento.

Los organismos transformados generados pueden tomar una variedad de formas. Por ejemplo, pueden ser quimeras de células transformadas y de células no transformadas; transformantes clonales (por ejemplo, todas las células transformadas para contener el casete de expresión); injertos de tejidos transformados y no transformados (por ejemplo, en plantas, un rizoma transformado injertado en un vástago no transformado).

La presente invención se extiende claramente a cualquier célula vegetal o planta producida por cualquiera de los métodos descritos aquí, y a todas las partes de la planta y propágulos de las mismas. La presente invención se extiende además para abarcar la progenie de una célula, tejido, órgano o planta entera primaria transformada o transfectada que ha sido producida por cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, siendo el único requisito que la progenie exhiba la(s) misma(s) característica(s) genotípica(s) y/o fenotípicas(s) que aquellas producidas por los progenitores en los métodos de acuerdo con la invención. La invención también incluye células huésped que contienen un ácido nucleico aislado similar a OsMADS18 o una variante del mismo. Las células huésped preferidas de acuerdo con la invención son células vegetales. La invención también se extiende a las partes cosechables de una planta tales como, pero sin limitarse a, semillas, hojas, frutos, flores, cultivos de tallo, rizomas, tubérculos y bulbos. Se describen productos derivados de una parte cosechable de tal planta, tales como gránulos o polvos secos, aceite, grasa y ácidos grasos, almidón o proteínas.

La presente invención también abarca el uso de ácidos nucleicos similares a OsMADS18 o variantes de los mismos y el uso de polipéptidos similares a OsMADS18 o homólogos de los mismos.

Uno de estos usos se refiere a la mejora del rendimiento de una planta en relación con las correspondientes plantas de tipo silvestre, en particular en el mejoramiento del rendimiento de semilla. El aumento en el rendimiento es como se definió aquí anteriormente.

Los ácidos nucleicos similares a OsMADS18 o variantes de los mismos, o polipéptidos similares a OsMADS18 u homólogos de los mismos pueden encontrar uso en programas de fitomejoramiento en los cuales se identifica un marcador de ADN que puede estar genéticamente enlazado a un gen similar a OsMADS18 o una variante del mismo. Los ácidos nucleicos / genes similares a OsMADS18 o variantes de los mismos, o polipéptidos similares a OsMADS18 u homólogos de los mismos pueden ser utilizados para definir un marcador molecular. Este ADN o marcador de proteína puede entonces ser utilizado en programas de fitomejoramiento para seleccionar plantas que tienen mayor rendimiento. El gen similar a OsMADS18 o una variante del mismo pueden, por ejemplo, ser un ácido nucleico como el representado por una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14, y SEQ ID NO: 16.

Las variantes alélicas de un ácido nucleico/gen similar a OsMADS18 también pueden encontrar uso en programas de fitomejoramiento asistidos por marcadores. Tales programas de fitomejoramiento algunas veces requieren la introducción de variación alélica mediante tratamiento mutagénico de las plantas, utilizando por ejemplo mutagénesis EMS; alternativamente, el programa puede iniciar con una colección de variantes alélicas del así llamado origen "natural" causado en forma no intencional. La identificación de variantes alélicas tiene lugar entonces, por ejemplo, por PCR. Esto es seguido por una etapa para la selección de variantes alélicas superiores de la secuencia en cuestión y que producen un mayor rendimiento. La selección se lleva a cabo típicamente por medio del control del desempeño del rendimiento de las plantas que contienen diferentes variantes alélicas de la secuencia en cuestión, por ejemplo, diferentes variantes alélicas de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:

5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 16. El desempeño del rendimiento puede ser controlado en un invernadero o en el campo. Otras etapas opcionales incluyen cruzamiento de plantas, en el que se identificó la variante alélica superior, con otra planta. Esto podría ser utilizado, por ejemplo, para hacer una combinación de rasgos fenotípicos interesantes.

Un ácido nucleico similar a OsMADS18 o una variante del mismo también se pueden usar como sondas para mapear genética y físicamente los genes que son una parte de, y como marcadores para los rasgos ligados a esos genes. Dicha información puede ser útil en fitomejoramiento de plantas con el fin de desarrollar líneas con fenotipos deseados. Tal uso de ácidos nucleicos similares a OsMADS18 o de variantes de los mismos requiere sólo una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos similares a OsMADS18 o variantes de los mismos pueden ser utilizados como marcadores de polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Las transferencias tipo Southern (Sambrook J, Fritsch E. F. y Maniatis T (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual) de ADN genómico de la planta digerido por restricción puede ser sondeado con los ácidos nucleicos similares a OsMADS18 o variantes de los mismos. Los patrones de bandas resultantes pueden someterse entonces a análisis genéticos utilizando programas de ordenador tales como MapMaker (Lander et al. (1987) Genómica 1: 174 - 181) con el fin de construir un mapa genético. Además, se pueden utilizar los ácidos nucleicos para sondear transferencias tipo Southern que contienen los ADN genómicos tratados con endonucleasa de restricción de un conjunto de individuos que representan a los progenitores y a la progenie de un cruce genético definido. La segregación de los polimorfismos de ADN se anota y se utiliza para calcular la posición del ácido nucleico similar a OsMADS18 o una variante del mismo en el mapa genético previamente obtenido utilizando esta población (Botstein et al. (1980) Soy. J. Hum. Genet. 32: 314 - 331).

La producción y el uso de sondas derivadas de genes de las plantas para uso en mapeo genético se describe en Bematzky y Tanksley (1986) Plant Mol. Biol. Reporter 4: 37 - 41. Numerosas publicaciones describen el mapeo genético de clones específicos de ADNc utilizando la metodología esbozada anteriormente o variaciones de la misma. Por ejemplo, las poblaciones de entrecruzamiento de F2, poblaciones de retrocruzamiento, poblaciones apareadas al azar, líneas isogénicas cercanas, y otros conjuntos de individuos pueden ser utilizados para el mapeo. Estas metodologías son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Las sondas de ácido nucleico también pueden ser utilizadas para el mapeo físico (es decir, colocación de secuencias sobre mapas físicos; véase Hoheisel et al. En: Non-mammalian Genomic Analysis: A Practical Guide, Academic Press, 1996, páginas 319 - 346, y las referencias allí citadas).

En otra realización, se pueden utilizar las sondas de ácido nucleico en mapeo de hibridación *in situ* por fluorescencia directa (FISH) (Trask (1991) Trends Genet. 7: 149 - 154). Aunque los métodos actuales de mapeo por FISH favorecen el uso de clones grandes (desde varios kb hasta varios cientos de kb; véase Laan et al. (1995) Genome Res. 5: 13 - 20), las mejoras en la sensibilidad pueden permitir la realización de mapeo por FISH utilizando sondas más cortas.

Una variedad de métodos basados en amplificación de ácido nucleico para el mapeo genético y físico se puede llevar a cabo utilizando los ácidos nucleicos. Los ejemplos incluyen amplificación específica de alelos (Kazazian (1989) J. Lab. Clin. Med 11: 95 - 96), polimorfismo de fragmentos amplificados por PCR (CAPS; Sheffield et al. (1993) Genomics 16: 325 - 332), ligación específica de alelos (Landegren et al. (1988) Science 241: 1077 - 1080), reacciones de extensión de nucleótidos (Sokolov (1990) Nucleic Acid Res. 18: 3671), Mapeo de híbridos de radiación (Walter et al. (1997) Nat. Genet. 7: 22 - 28) y Mapeo feliz (Dear y Cook (1989) Nucleic Acid. 17: 6795 - 6807). Para estos métodos, se usa la secuencia de un ácido nucleico para diseñar y producir pares de cebadores para su uso en la reacción de amplificación o en reacciones de extensión del cebador. El diseño de tales cebadores es bien conocido para los expertos en la técnica. En los métodos que emplean mapeo genético con base en PCR, puede ser necesario identificar las diferencias en la secuencia de ADN entre los progenitores del mapeo cruzado en la región correspondiente a la presente secuencia de ácido nucleico. Esto, sin embargo, no es generalmente necesario para métodos de mapeo.

Los métodos de acuerdo con la presente invención resultan en plantas que tienen mayor rendimiento, como se describió aquí anteriormente. El rasgo de mayor rendimiento también se puede combinar con otros rasgos económicamente ventajosos, tales como otros rasgos que aumentan el rendimiento, la tolerancia a diferentes estreses, rasgos que modifican diferentes características arquitectónicas y/o características bioquímicas y/o fisiológicas.

Descripción de las figuras

La presente invención será descrita ahora con referencia a las siguientes figuras en las que:

La Figura 1 muestra la estructura típica de dominio de los factores de transcripción de la caja MADS MIKC. El dominio de MADS se encuentra en el extremo del terminal amino de la proteína y codifica un enlazamiento de ADN y

la función de dimerización. El dominio conservado de K está involucrado en la dimerización de la proteína. Los dominios I y de C están menos bien conservados. El dominio C pueden estar involucrado en la activación transcripcional o en la formación de multímeros de MADS de orden superior (de Jack (2001) Plant Molec Biol. 46: 515 - 520).

La Figura 2 muestra un alineamiento múltiple de diferentes factores de transcripción del dominio de MADS del clado SQUAMOSA, utilizando el programa de alineación múltiple VNTI AlignX, basado en un algoritmo ClustalW modificado (InforMax, Bethesda, MD, http://www.informaxinc.com), con ajustes predeterminados para penalización por apertura de huecos de 10 y por extensión de huecos de 0,05). Los residuos específicos de SQUAMOSA del dominio de MADS están en cajones a través de la alineación que incluye la secuencia consenso de MADS. Los dos subclados de dicotiledóneas dentro del clado SQUAMOSA se indican como el clado AP1 de dicotiledóneas y el clado FUL de dicotiledóneas. Las secuencias de monocotiledóneas se subdividen además con respecto a sus motivos conservados en el extremo del terminal C de la proteína, LPPWMLRT LPPWMLSH que están entre cajones en negrita.

La Figura 3 representa un árbol filogenético de unión de vecinos, derivado de un alineamiento de secuencia usando ClustalW 1,83 con valores predeterminados. Los dos grupos principales, que comprenden proteínas de monocotiledóneas y de dicotiledóneas, cada uno puede ser dividido adicionalmente en los subclados AP1 y FUL para las dicotiledóneas, y los motivos que comprenden al terminal C LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) y LPPWMLSH (SEQ ID NO: 19) para las monocotiledóneas. La fuente, descripción y número de acceso de las secuencias del polipéptido utilizadas se presentan en la tabla a continuación.

Fuente	Descripción	Número de acceso del NCBI
Akebia trifoliata	Proteína similar a FRUITFULL; Aketr_AktFL-1	AAT46099
Antirrhinum majus	DEFH28; Antma_DEFH28	AAK72467
Antirrhinum majus	SQUA; Antma_SQUA	CAA45228
Arabidopsis thaliana	Proteína de la caja MADS AGL79; Arath_AGL79	AAN52802
Arabidopsis thaliana	APETALA1/AGL7; Arath_AP1/AGL7	P35631
Arabidopsis thaliana	CAL/AGL 10; Arath_CAL/AGL10	Q39081
Arabidopsis thaliana	FUL/AGL8; Arath_FUL/AGL8	Q38876
Betula pendula	MADS5; Betpe_MADS5	CAA67969
Chrysanthemum x morifolium	CDM8; Chrmo_CDM8	AAO22981
Hordeum vulgare	Proteína 3 de la caja MADS; Horvu_m3	CAB97351
Hordeum vulgare	Proteína 5 de la caja MADS; Horvu_m5	CAB97352
Lolium perenne	MADS3; Lolpe_MADS3	AAO45875
Lycopersicum esculentum	RIN; Lyces_RIN	AAM15775
Malus X *domestica*	MADS2; Maldo_MADS2	AAC83170
Oryza sativa	OsMADS14; Orysa_OsMADS14	AAF19047
Oryza sativa	OsMADS15; Orysa_OsMADS15	AAF19048
Oryza sativa	OsMADS18; Orysa_OsMADS18	AAF04972

(continuación)

Fuente	Descripción	Número de acceso del NCBI
Oryza sativa	OsMADS20; Orysa_OsMADS20	AAO92341
Petunia hybrida	PFG; Pethy_PFG	AAQ72509
Saccharum officinarum	Tipo ZMM28; tipo Sacof_ZMM28	SEQ ID NO: 15, 17
Sinapis alba	MADS B; Sinal_MADSB	Q41274
Solanum commersonii	Homólogo de AGL8; Solco_AGL8	022328
Solanum tuberosum	POTM1-1; Soltu_POTM1-1	Q42429
Triticum aestivum	WAP1; Triae_WAP1	BAA33457
Zea mays	MADS3; Zeama_MADS3	AAG43200
Zea mays	ZAP1; Zeama_ZAP1	AAB00081
Zea mays	ZMM15; Zeama_ZMM15	CAD23408
Zea mays	ZMM28; Zeama_ZMM28	CAD23441
Zea mays	ZMM4; Zeama_ZMM4	CAD23417

La Figura 4 muestra un vector binario p0643, para la expresión en *Oryza sativa* de un tipo OsMADS18 de *Oryza sativa* (referencia interna CDS2787) bajo el control de un promotor OSH1 (referencia interna PRO0200).

La Figura 5 detalles ejemplos de secuencias útiles en la realización de los métodos de acuerdo con la presente invención.

Ejemplos

La presente invención será descrita ahora con referencia a los siguientes ejemplos, que son a modo de ilustración solamente.

Manipulación del ADN: a menos que se indique lo contrario, las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo de acuerdo a protocolos estándar descritos en (Sambrook (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, Nueva York) o en los Volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994), Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols. Los materiales estándar y métodos para trabajo molecular en plantas se describen en Plant Molecular Biology Labfase (1993) por R. D. D. Croy, publicado por BIOS Scientific Publications Ltd (RU) y Blackwell Scientific Publications (RU).

Ejemplo 1: Clonación Génica

El gen similar a OsMADS18 de Oryza sativa (CDS2787) se amplificó por medio de PCR usando como molde una biblioteca de ADNc de plántulas de *Oryza sativa* (Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Después de la transcripción inversa del ARN extraído de las plántulas, se clonaron los ADNc en pCMV Sport 6,0. El tamaño promedio del inserto del banco era de 1,6 kb y el número original de clones era del orden de 1,67 x 10^7 cfu. El título original se determinó que era de 3,34 x 10^6 cfu/ml después de la primera amplificación de 6 x 10^{10} cfu/ml. Después de la extracción del plásmido, se usaron 200 ng del molde en una mezcla de PCR de 50 µl. Se utilizaron los cebadores prmO5821 (SEQ ID NO: 20; sentido, codón de inicio en negrilla, sitio AttB1 en itálicas: 5'-*GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG*CTTCACA**ATG**GGGAGAGGGCC-3') y prmO5822 (SEQ ID NO: 21; inverso, complementario, sitio de AttB2 en cursiva: 5' *GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT* GAGTGGAGTGACGTTTGAGA3'), que incluye los sitios AttB para recombinación Gateway, para la amplificación por

PCR. La PCR se realizó utilizando Hifi Taq ADN polimerasa en condiciones estándar. Un fragmento de PCR de 849 pb (incluyendo sitios attB) se amplificó y se purificó utilizando también métodos estándar. La primera etapa del procedimiento Gateway, la reacción BP, se realizó luego, durante el cual los fragmentos de PCR se recombinan *in vivo* con el plásmido pDONR201 para producir, de acuerdo con la terminología Gateway, un "clon de entrada", p05838. El plásmido PDONR201 fue adquirido de Invitrogen, como parte de la tecnología Gateway®.

Ejemplo 2: Construcción del vector

El clon de entrada p05838 fue utilizado posteriormente en una reacción LR con p05294, un vector de destinación utilizado para transformación de *Oryza sativa*. Este vector contiene como elementos funcionales dentro de los bordes del T-ADN: un marcador seleccionable de planta; un casete de expresión de un marcador detectable; y un casete Gateway destinado a recombinación *in vivo* de LR con la secuencia de interés ya clonada en el clon de entrada. Un promotor OSH1 de arroz (SEQ ID NO: 22) para la expresión temprana del meristemo apical (PRO0200) se localizaba secuencia arriba de este casete Gateway (Matsuoka et al., Plant Cell 5 1993, 1039 - 1048).

Después de la etapa de recombinación de LR, el vector de expresión resultante p0643 (Figura 4) se transformó en la cepa de *Agrobacterium* LBA4044 y posteriormente en plantas de *Oryza sativa*. Plantas de arroz transformadas se dejaron crecer y fueron luego examinadas por los parámetros descritos en el Ejemplo 3.

Ejemplo 3: Evaluación y Resultados de OsMADS18 bajo el control del promotor OSH1 de arroz

Se generaron aproximadamente de 15 a 20 transformantes independientes de arroz **T0**. Los transformantes primarios se transfirieron desde una cámara de cultivo de tejidos a un invernadero para el cultivo y cosecha de semillas T1. Se retuvieron 5 eventos, de los cuales la progenie T1 segregó 3:1 por la presencia/ausencia del transgén. Para cada uno de estos eventos, se seleccionaron aproximadamente 10 plántulas T1 que contenían el transgén (hetero y homocigotos) y aproximadamente 10 plántulas T1 que carecían del transgén (nulicigotos) por medio del control visual de la expresión del marcador. Se evaluaron adicionalmente 4 eventos T1 en la generación T2 siguiendo el mismo procedimiento de evaluación que para la generación de T1 pero con más individuos por evento.

Análisis estadístico: prueba F

Se utilizó un ANOVA de dos factores (análisis de variantes) como modelo estadístico para la evaluación total de las características fenotípicas de la planta. Se llevó a cabo una prueba F sobre todos los parámetros medidos de todas las plantas de todos los eventos transformados con el gen de la presente invención. Se llevó a cabo la prueba F para detectar un efecto del gen sobre todos los eventos de transformación y para un efecto total del gen, también conocido como un efecto génico global. El umbral de significación para un efecto génico global real se estableció en un nivel de probabilidad del 5% para la prueba F. Un valor significativo de la prueba F señala a un efecto génico, lo que significa que no es solamente la presencia o la posición del gen lo que causa las diferencias en el fenotipo.

Mediciones de parámetros relacionados con la semilla

Se cosecharon las panículas primarias maduras, se las colocó en bolsas, se las etiquetó con un código de barras y luego se las secó durante tres días en un horno a 37ºC. Se trillaron luego las panículas, y se recogieron y contaron todas las semillas. Se separaron las vainas llenas de las vacías utilizando un dispositivo de soplado de aire. Las vainas vacías se desecharon y se contó de nuevo la fracción restante. Las vainas llenas se pesaron en una balanza analítica. El número de semillas llenas se determinó contando el número de vainas llenas que quedó después de la etapa de separación. El rendimiento total de semilla se midió pesando todas las vainas llenas cosechadas de una planta. El número total de semillas por planta se midió contando el número de vainas cosechadas de una planta. El peso de mil granos (PMG) se extrapoló a partir del número de semillas llenas contadas y su peso total. Los parámetros individuales de las semillas (incluyendo el ancho, la longitud, el área, el peso) se midieron usando un dispositivo hecho a la medida que consta de dos componentes principales, un dispositivo de pesaje y otro de formación de imágenes, acoplado a un software de análisis de imágenes.

Las tablas de resultados (Tablas 5 y 6) a continuación muestran los valores de p de la prueba F para las generaciones T1 y T2. La diferencia porcentual entre los transgénicos y los correspondientes nulicigotos también se muestra.

El TKW es significativamente mayor tanto en la generación T1 como en la T2 (Tablas 5 y 6). En forma paralela, se observa un aumento en el área individual de las semillas, lo que contribuye al aumento observado de TKW. Este aumento en el área de las semillas es debido a un aumento significativo de la longitud de las semillas individuales (Tablas 5 y 6), mientras que el ancho de las semillas individuales no cambió significativamente (datos no mostrados).

Tabla 6: Resultados de la generación T1

	Numero de líneas que muestran un aumento	Diferencia en %	Valor P de la prueba F
Peso de mil granos	5 de 5	4	0,0123
Área promedio de la semilla	4 de 5	3	0,0007
Longitud promedio de la semilla	3 de 5	2	0,0001

Tabla 7: Resultados de la generación T2

	Número de líneas que muestran una diferencia positiva	Diferencia en %	Valor P
Peso de mil granos	2 de 4	2	0,0109
Área promedio de la semilla	de 4	3	0,0001
Longitud promedio de la semilla	2 de 4	3	<0,0001

Listado de Secuencias

<110> CropDesign N.V.

<120> Plantas que tienen mayor rendimiento y un método para su elaboración

<130> CD-122-PCT

<150> EP 04106065.8

<151> 2004-11-25

<150> US 60/632.273

<151> 2004-12-01

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 750

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<220>

<221> característica nueva

<223> OsMADS18 (AF091458)

<400>1

```
atggggagag ggccggtgca gctgcggcgg atcgagaaca agataaacag gcaggtgacc     60
ttctccaagc ggaggaacgg gctgctgaag aaggcgcacg agatctccgt gctctgtgac    120
gccgacgtcg cgctcatcgt cttctccacc aagggcaagc tctacgagtt ctccagccac    180
tccagtatgg aagggatcct tgaacgctac cagcgttact cgtttgatga aagagccgta    240
ctggagccaa atactgagga ccaggaaaac tggggtgatg aatatggaat tttgaagtcc    300
aaactggatg cacttcagaa gagccaaagg caactcttag gtgaacaatt ggacacacta    360
acaataaaag aactccagca attggaacat caactggaat attctctgaa gcatataaga    420
tcaaaaaaga atcagcttct gtttgaatca atttctgagc ttcagaagaa ggaaaagtca    480
cttaaaaacc agaataatgt tctgcaaaag ctcatggaga cagaaaagga gaaaaacaat    540
gctataataa acactaaccg ggaggagcaa aatggagcaa caccaagcac atcatcacca    600
acaccagtga cggctccaga tcccatcccg acaacaaata acagtcaaag ccaaccaaga    660
ggatcagggg agtcagaagc tcaaccgtct ccggcacaag caggcaacag caagcttccg    720
ccatggatgc tccggacaag tcacacatga                                     750
```

<210> 2

<211> 249

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

```
Met Gly Arg Gly Pro Val Gln Leu Arg Arg Ile Glu Asn Lys Ile Asn
1               5                   10                  15
Arg Gln Val Thr Phe Ser Lys Arg Arg Asn Gly Leu Leu Lys Lys Ala
            20                  25                  30
His Glu Ile Ser Val Leu Cys Asp Ala Asp Val Ala Leu Ile Val Phe
        35                  40                  45
```

Ser Thr Lys Gly Lys Leu Tyr Glu Phe Ser Ser His Ser Ser Met Glu
50 55 60
Gly Ile Leu Glu Arg Tyr Gln Arg Tyr Ser Phe Asp Glu Arg Ala Val
65 70 75 80
Leu Glu Pro Asn Thr Glu Asp Gln Glu Asn Trp Gly Asp Glu Tyr Gly
85 90 95
Ile Leu Lys Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Lys Ser Gln Arg Gln Leu
100 105 110
Leu Gly Glu Gln Leu Asp Thr Leu Thr Ile Lys Glu Leu Gln Gln Leu
115 120 125
Glu His Gln Leu Glu Tyr Ser Leu Lys His Ile Arg Ser Lys Lys Asn
130 135 140
Gln Leu Leu Phe Glu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Lys Lys Glu Lys Ser
145 150 155 160
Leu Lys Asn Gln Asn Asn Val Leu Gln Lys Leu Met Glu Thr Glu Lys
165 170 175
Glu Lys Asn Asn Ala Ile Ile Asn Thr Asn Arg Glu Glu Gln Asn Gly
180 185 190
Ala Thr Pro Ser Thr Ser Ser Pro Thr Pro Val Thr Ala Pro Asp Pro
195 200 205
Ile Pro Thr Thr Asn Asn Ser Gln Ser Gln Pro Arg Gly Ser Gly Glu
210 215 220
Ser Glu Ala Gln Pro Ser Pro Ala Gln Ala Gly Asn Ser Lys Leu Pro
225 230 235 240
Pro Trp Met Leu Arg Thr Ser His Thr
245

<210> 3

<211> 756

<212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> característica nueva

<223> ZMM28 (o m28) (AJ430695)

<400> 3

```
atggggcggg ggccggtgca gctgcgccgg atcgagaaca agatcaaccg ccaggtgacc     60
ttctccaagc gccggaacgg gctgctgaag aaggcccacg agatctccgt gctctgcgac    120
gcagaggtcg cgctcatcgt cttctccact aaggggaagc tctacgagta ctctagccat    180
tccagcatgg aaggcattct tgagcgttac cagcgttact catttgaaga aagggcagta    240
cttaacccaa gtattgaaga ccaggcaaat tggggagatg aatatgtccg gttaaaatcc    300
aaacttgatg cacttcagaa gagtcaaagg cagctgttag gagaacaatt gagttcactg    360
accataaaag aactccagca actggagcaa caactggaca gttctttgaa gcatattagg    420
tcaagaaaga atcagctcat gttcgattca atttccgcgc ttcagaaaaa ggagaaagca    480
cttacagatc aaaacggtgt cctgcaaaag ttcatggagg cagagaagga gaaaaacaag    540
gctttgatga acgcgcagct ccgggagcag caaaatggag catcaacaag ctccccatca    600
ctttcaccac caatagttcc agattccatg ccaactctaa atatagggcc atgtcaacat    660
agaggggcag cagaatctga gtctgaaccg tctcctgctc ctgcacaagc aaacaggggc    720
aacctgccac catggatgct ccgcactgtc aagtaa                              756
```

<210> 4

<211> 251

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 4

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

<210> 5

<211> 840

<212> ADN

<213> Lolium perenne

<220>

<221> característica nueva

<223> MADS3 (AY198328)

<400> 5

```
atggggcgcg ggccggtgca gctgcggcgg atcgagaaca agataaaccg ccaggtcacc     60
ttctccaagc gccggagcgg gctgctcaag aaggcgcacg agatctccgt gctctgcgac    120
gctgaggtcg cgctcatcgt attctccacc aagggaaagc tctacgagta ctccagccag    180
gacagtaaca tggatgtcat tcttgaacgt taccagcgtt actcattcga agaaagagct    240
atagtggatc aaaatattgg aggccaggca aattggggag atgaatttgg aagtttgaaa    300
attaaactcg atgcactcca gaagagtcaa aggcaactct taggtgaaca attggaccca    360
ctgaccacaa aagaacttca acaattggaa cagcagctag atagttcttt gaagcacata    420
aggtcaagaa agaatcagct tctgtttgag tcaatatctg agcttcagaa gaaggagaag    480

tcacttaaag atcagaatgg cgtcctgcag aagcacctcg tggagacaga aaaggagaaa    540
agtaacgttt tatcgaatat tcatcaccga gagcagacga atggagcagc aaatattcat    600
cgccgggagc agatgaatga aacaacacat attcataacc aggagcagct caatggagca    660
acaacaagct caccgtcacc tacaccagtg gcggtcctag attccgtggc aactctaaat    720
attgggtcat ctcaatctag agaagcagca ggagaggagc cagaatctca gccgtccccg    780
gcacaagcaa acagcggcaa gctaccacca tggatgctcc gcaccatcag taacagatga    840
```

<210> 6

<211> 279

<212> PRT

<213> Lolium perenne

<400> 6

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

<210> 7

<211> 798

<212> ADN

<213> Hordeum vulgare

<220>

<221> característica nueva

<223> m3 (AJ249143)

<400> 7

```
atggggcgcg ggccggtgca gctgcggcgg atcgagaaca agataaaccg gcaggtgacc     60
ttctccaagc ggcgcagcgg gctgcttaag aaggcgcacg agatctccgt gctctgcgac    120
gccgaggtcg cgctcatcgt cttctccacc aagggcaagc tatacgagta ctccagccag    180
gacagtagca tggatgtgat tcttgaacgt taccaacgtt actcatttga agaaagagct    240
gtactggatc caagtactgg agaccaggca aattggggag acgaatatgg aagtttgaag    300
ataaaactcg atgcactcca gaagagtcaa aggcaactct taggtgaaca attggaccca    360
ctcaccacaa aagaacttca acagttggaa caacagcttg atagttcttt gaagcacata    420
aggtcaagaa agaatcaact tctctttgag tcaatatctg agcttcaaaa gaaggagaaa    480
tcattaaaag atcagaatgg cgtcctgcag aagcacctcg tagagacaga aaaggagaaa    540
aataacgttt tgtcaaatat tcatcaccgg gagcagttga atgaagcaac aaatattcat    600
caccaggagc agctgagtgg agcaacaaca agctcaccgt cacctacacc accgacggcc    660
caagattcca tggcacctcc aaatattggg ccatatcaat ctagaggagg aggggatcca    720
gaacctcagc cgtcaccagc acaagcaaac aacagcaatc tgccaccgtg gatgctccgc    780
accatcggca acagatga                                                  798
```

<210> 8

<211> 264

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 8

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

    210                 215                 220
Ala Pro Pro Asn Ile Gly Pro Tyr Gln Ser Arg Gly Gly Gly Asp Pro
225                 230                 235                 240
Glu Pro Gln Pro Ser Pro Ala Gln Ala Asn Asn Ser Asn Leu Pro Pro
                245                 250                 255
Trp Met Leu Arg Thr Ile Gly Asn
            260
```

<210> 9

<211> 727

<212> ADN

<213> Saccharum officinarum

<220>

<221> característica nueva

<223> ADN parcial similar a ZMM28 (EST CA285442)

<220>

<221> característica nueva

<222> (620)..(620)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica nueva

<222> (662)..(662)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica nueva

<222> (689)..(689)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 9

```
cgcaccactc gagtcgagag acgagagcca cctgatccat ccttccccgt cttcctcttc     60
ccacacgtcc ccatcgccat tgctgcgccg agagtgagcg ggagagggta ggtgtcgagg    120
cggcggagat ggggagcggg ccggtgcagc tgcgccggat cgagaacaag atcaaccgcc    180
aggtgacctt ctccaagcgc cggaacgggc tgctgaagaa ggcccacgag atctccgtgc    240
tctgcgatgc agaggtcgcg ctcatcgtct tctccactaa ggggaagctc tacgagtact    300
ctagccattc cagcatggaa ggcattcttg agcgttacca gcggtactca tttgaagaaa    360
gagcagtact tgacccaagt attgaagacc aggcagattg gggagatgaa tatgtccggt    420
taaaatccaa acttgatgca cttcagaaga gtcaaaggca tctgctagga gaacaattgg    480
attcactgac cataaaagaa ctccagcaac tggagcaaca attggacagt tctttgaagc    540
atattaggtc aagaaagaat cagctcatgt tcgattcaat ttctgagctt cagaaaaagg    600
agaaagcact tacagatcan aatggtgtcc tgcaaaagct catggaggca gagaaagaga    660
anaacaatgc tttaatgaac gcacacctnc gggagcagca aaatggagca tcaacaggct    720
ccccata                                                              727
```

<210> 10

<211> 680

<212> ADN

<213> Saccharum officinarum

<220>

<221> característica nueva

<223> ADN parcial similar a ZMM28 (EST CA200888)

<400> 10

```
ttcttgagcg ttaccagcgg tactcatttg aagaaagagc agtacttgac ccaagtattg     60
aagaccaggc agattgggga gatgaatatg tccagttaaa atccaaactt gatgcacttc    120
agaagagtca aagacatctg ttaggagaac aattggattc actgaccata aaagaactcc    180
agcaactgga gcaacaattg gacagttctt tgaagcatat taggtcaaga aagaatcagc    240
tcatgttcga ttcaatttcc gagcttcaga aaaaggagaa agcacttaca gatcaaaatg    300
gtgtcctgca aaagctcatg gaggcagaga aggagaaaaa caatgcttta atgaacgcac    360
acctccggga gcagcaaaat gtagcatcaa caagctcccc atcactgtca ccaccaatgg    420
ttccagattc catgccaact ctaaatattg ggtcatgtca acctagaggg ccaggagaat    480
ctgagcctga accgtctcct gctcctgtac aagcaaacag cggcaacctg ccaccatgga    540
tgctccgcac tgtcagtaac agatgagctc ttcccaatgc agttttgcgg ctgaacacga    600
cagcaacaca cctgccaccg acacgccacg gtgacccagg catcaaccga tgcatgatcc    660
ctctcgatcc tgtgatccaa                                                680
```

<210> 11

<211> 483

<212> ADN

<213> Saccharum officinarum

<220

<221> característica nueva

<223> ADN parcial similar a ZMM28 (EST CA247266)

<400> 11

```
cttattttgc agcatggaag gcattcttga gcgttaccag cggtactcat ttgaagaaag     60
agcagtactt gacccaagta ttgaagacca ggcagattgg ggagatgaat atgtccagtt    120
aaaatccaaa cttgatgcac ttcagaagag tcaaagacat ctgttaggag aacaattgga    180
ttcactgacc ataaaagaac tccagcaact ggagcaacaa ttggacagtt ctttgaagca    240
tattaggtca agaaagaatc agctcatgtt cgattcaatt tccgagcttc agaaaaagga    300
gaaagcactt acagatcaaa atggtgtcct gcaaaagctc atggaggcag agaaggagaa    360
aaacaatgct ttaatgaacg cacacctccg ggagcagcaa aatgtagcat caacaagctc    420
cccatcactg tcaccaccaa tggttccaga ttccatgcca actctaaata ttgggatgtc    480
aac                                                                  483
```

<210> 12

<211> 714

<212> ADN

<213> Saccharum officinarum

<220>

<221> característica nueva

<223> ADN parcial similar a ZMM28 (EST CA282968)

<400> 12

```
cagtacttga cccaagtatt aaagaccagg cagattgggg agatgaatat gtccggttaa     60
aatccaaact tgatgcactt cagaagagtc aaaggcatct gttaggagaa caattggatt    120
cactgaccat aaaagaactc cagcaactgg agcaacaatt ggacagttct ttgaagcata    180
ttaggtcaag aaagaatcag ctcatgttcg attcaatttc cgagcttcag aaaaaggaga    240
aagcacttac agatcaaaat ggtgtcctgc aaaagctcat ggaggcagag aaggagaaaa    300
acaatgcttt aatgaacgca cacctccggg agcagcaaaa tgtagcatca acaagctccc    360
catcactgtc accaccaatg gttccagatt ccatgccaac tctaaatatt gggtcatgtc    420
aacctagagg gccaggagaa tctgagcctg aaccgtctcc tgctcctgta caagcaaaca    480

gcggcaacct gccaccatgg atgctccgca ctgtcagtaa cagatgagct cttcccaatg    540
cagttttgcg gctgaacacg acagcaacac acctgccacc gacacgccac ggtgaaccag    600
gcatcaaccg atgcatgatc cctctcgatc ctgtgatcca ataccgggcc gtagtactac    660
taattaaagt ccaggccccg ctcaaattgc tttacatggt tgattgaaag ttct          714
```

<210> 13

<211> 650

<212> ADN

<213> Saccharum officinarum

<220>

<221> característica nueva

<223> ADN parcial similar a ZMM28 (EST CA299090)

<220>

<221> característica nueva

<222> (626)..(626)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 13

```
gaagctctac gagtactcta gccattccag catggaaggc attcttgagc gttaccagcg     60
gtgctcattt gaagaaagag cagtacttga cccaagtatt gaagaccagg cagattgggg    120
agatgaatat gtccggttaa aatccaaact tgatgcactt cagaagagtc aaaggcatct    180
gttaggagaa caattggatt cactgaccat aaaagaactc cagcaactgg agcaacaatt    240
ggacagttct ttgaagcata ttaggtcaag aaagaatcag ctcatgttcg attcaatttc    300
cgagcttcag aaaaaggaga aagcacttac agatcaaaat ggtgtcctgc aaaagctcat    360
ggaggcagag aaggagaaaa acaatgcttt aatgaacgca cacctccggg agcagcaaaa    420
tggagcatca acaagctccc catcactgtc accaccaatg gttccagatt ccatgccaac    480
tctaaatatt gggtcatgtc aacctagagg gccaggagaa tctgagcctg aaccgtctcc    540
tgctcctgta caagcaaaca gcgggaacct gccaccatgg atactccgca ctgtcagtaa    600
cagatgagct ctttccaatg cagttntgcg gctgaactcg acagcaacac               650
```

<210> 14

<211> 762

<212> ADN

<213> Saccharum officinarum

<220>

<221> característica nueva

<223> ADN reconstituido versión 1 similar a ZMM28

<400> 14

```
atggggagcg ggccggtgca gctgcgccgg atcgagaaca agatcaaccg ccaggtgacc     60
ttctccaagc gccggaacgg gctgctgaag aaggcccacg agatctccgt gctctgcgat    120
gcagaggtcg cgctcatcgt cttctccact aaggggaagc tctacgagta ctctagccat    180
tccagcatgg aaggcattct tgagcgttac cagcggtact catttgaaga aagagcagta    240
cttgacccaa gtattgaaga ccaggcagat tggggagatg aatatgtccg gttaaaatcc    300
aaacttgatg cacttcagaa gagtcaaagg catctgttag gagaacaatt ggattcactg    360
accataaaag aactccagca actggagcaa caattggaca gttctttgaa gcatattagg    420
tcaagaaaga atcagctcat gttcgattca atttccgagc ttcagaaaaa ggagaaagca    480
cttacagatc aaaatggtgt cctgcaaaag ctcatggagg cagagaagga gaaaaacaat    540
gctttaatga acgcacacct ccgggagcag caaaatggag catcaacaag ctccccatca    600
ctgtcaccac caatggttcc agattccatg ccaactctaa atattgggtc atgtcaacct    660
agagggccag gagaatctga gcctgaaccg tctcctgctc ctgtacaagc aaacagcggc    720

aacctgccac catggatgct ccgcactgtc agtaacagat ga                       762
```

<210> 15

<211> 253

<212> PRT

<213> Saccharum officinarum

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<223> Proteína reconstituida versión 1 similar a ZMM28

<400> 15

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

<210> 16

<211> 762

<212> ADN

<213> Saccharum officinarum

<220>

<221> característica nueva

<223> ADN reconstituido versión 2 similar a ZMM28

<400> 16

```
atggggagcg ggccggtgca gctgcgccgg atcgagaaca agatcaaccg ccaggtgacc     60
ttctccaagc gccggaacgg gctgctgaag aaggcccacg agatctccgt gctctgcgat    120
gcagaggtcg cgctcatcgt cttctccact aaggggaagc tctacgagta ctctagccat    180
tccagcatgg aaggcattct tgagcgttac cagcggtact catttgaaga aagagcagta    240
cttgacccaa gtattgaaga ccaggcagat tggggagatg aatatgtccg gttaaaatcc    300
aaacttgatg cacttcagaa gagtcaaagg catctgttag gagaacaatt ggattcactg    360
accataaaag aactccagca actggagcaa caattggaca gttctttgaa gcatattagg    420
tcaagaaaga atcagctcat gttcgattca atttccgagc ttcagaaaaa ggagaaagca    480
cttacagatc aaaatggtgt cctgcaaaag ctcatggagg cagagaagga gaaaaacaat    540
gctttaatga acgcacacct ccgggagcag caaaatgtag catcaacaag ctccccatca    600
ctgtcaccac caatggttcc agattccatg ccaactctaa atattgggtc atgtcaacct    660
agagggccag gagaatctga gcctgaaccg tctcctgctc ctgtacaagc aaacagcggc    720
aacctgccac catggatgct ccgcactgtc agtaacagat ga                       762
```

<210> 17

<211> 253

<212> PRT

<213> Saccharum officinarum

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<223> Proteína reconstituida versión 2 similar a ZMM28

<400> 17

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

225                 230                 235                 240
Asn Leu Pro Pro Trp Met Leu Arg Thr Val Ser Asn Arg
                245                 250
```

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de consenso de aminoácidos del motivo del terminal C de monocotiledóneas RT

<400> 18

```
Leu Pro Pro Trp Met Leu Arg Thr
1               5
```

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de consenso de aminoácidos del motivo del terminal C de monocotiledóneas SH

<400> 19

Leu Pro Pro Trp Met Leu Ser His
1 5

<210> 20

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador prm05821

<400> 20

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt aaacaatggg gagagggccg 50

<210> 21

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador prm05822

<400> 21

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt gagtggagtg acgtttgaga 50

<210> 22

<211> 1042

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<220>

<221> característica nueva

<223> Promotor OSH1

<400> 22

```
ggggagttag gaaccttgac atacaaccaa tgataccatt ttttttcaag cagctagagg     60
tacagaggtt catatttttt agatggctca ttagtgatat tttagtcaaa aatttcagaa    120
gtacggccac gggtgatggc ctgaactaat attttattcg aggtgccgct acatcatcgt    180
ctaaagtaca cgcaagattc aacggaaaaa agaaaccgat cgatcgagat cagttagtta    240
atgaaataac tagatcaact catgtcgtca aaaacaaaag atgctcatct atggacaaca    300
cacgctgatg attcgatcat caaacaaagg tggtagtagt agtaaagcgt atcgtgtttc    360
tcatcagaaa gaagaattaa agaaaaaact aatcccgtct cgcgagccag agaaaattcc    420
ctacaaaagc cactcctttg atttgacatg caaaagcaag gctccactcc tctactaccc    480
tacaactaca caacactgtc tctctatctc caaaggcagt agctgtattg gcttccagct    540
tttcctctct acctctaatg atagcttgga gcaagttcaa tagtatagct aactactagc    600
tctaattcat ctataatcaa tctaatagct tattcataca atagttatat actacattat    660
taatatctgg tcccatctat catacacact gagtctgtgc tatagctgac tacaaatctg    720
tagcccgctg ctcttctctc ttcatttatc ttcttaaaat atatttgcag ctggcttatg    780
gcttatagct tgatattgag agggagagga gtgagagcta gctcagctca gctcaaggta    840
aacaacaagg cacactcttc ctacctcttc tccggttctt ccttttttcct ctttctcttc   900
gtccaagaac ttcacctcaa tagctcgagc tacggcctaa cttttgcgtt gcgcaggaga    960
gctcgatcgc tgcaccaata cttcactgga gatcgcctag ctgcagctag ctagcttatc   1020
ctgcgtgtct tgagcttctc tc                                            1042
```

REIVINDICACIONES

1. Un método para incrementar el rendimiento de semillas con relación a las correspondientes plantas de tipo silvestre, que comprende la introducción a través de la transformación de la planta y la sobreexpresión en una planta de un ácido nucleico, que codifica un polipéptido similar a OsMADS18, en donde el polipéptido similar a OsMADS18:

(i) es un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado SQUAMOSA; y

(ii) tiene actividad de enlazamiento de ADN y de proteína; y

(iii) comprende el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) en los últimos 15 aminoácidos del terminal C de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo pero no en la segunda y en la cuarta posiciones; y

(iv) tiene al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho ácido nucleico es una porción de un ácido nucleico similar a OsMADS18 de al menos 747 nucleótidos, cuya porción codifica un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado SQUAMOSA de al menos 249 aminoácidos, que tiene actividad de enlazamiento de ADN y de proteína y que comprende:

(i) el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) en los últimos 15 aminoácidos del terminal C de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo pero no en la segunda y en la cuarta posiciones; y/o

(ii) tener al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho ácido nucleico es una secuencia capaz de hibridar de forma rigurosa con un ácido nucleico similar a OsMADS18, cuya secuencia de hibridación o complemento de la misma codifica un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado SQUAMOSA que tiene actividad de enlazamiento de ADN y de proteína y que comprende:

(i) el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) en los últimos 15 aminoácidos del terminal C de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo pero no en la segunda y en la cuarta posiciones; y/o

(ii) tener al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2.

4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho ácido nucleico aislado similar a OsMADS18 es de una planta monocotiledónea.

5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho ácido nucleico codifica un ortólogo o un parálogo de una proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2, comprendiendo dicho ortólogo o dicho parálogo las siguientes características:

(i) es un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado SQUAMOSA; y

(ii) tiene actividad de enlazamiento de ADN y de proteína; y

(iii) comprende el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) en los últimos 15 aminoácidos de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo pero no en la segunda y en la cuarta posiciones; y

(iv) tiene al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2.

6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho ácido nucleico similar a OsMADS18 está operativamente enlazado a un promotor del meristemo apical del vástago temprano.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho promotor del meristemo apical del vástago temprano es un promotor OSH1.

8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho mayor rendimiento de semilla se selecciona de uno cualquiera o más de: (i) mayor peso de mil granos (TKW); (ii) mayor tamaño de la semilla; (iii)

mayor volumen de la semilla; (iv) mayor área de la semilla; (v) mayor longitud de la semilla; y (vi) mayor biomasa de la semilla.

9. Constructo que comprende:

(a) un ácido nucleico que codifica un polipéptido similar a OsMADS18, cuyo polipéptido similar a OsMADS18:

(i) es un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado SQUAMOSA; y

(ii) tiene actividad de enlazamiento de ADN y de proteína; y

(iii) comprende el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) en los últimos 15 aminoácidos del terminal C de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo pero no en la segunda y en la cuarta posiciones; y

(iv) tiene al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2; y

(b) una o más secuencias de control capaces de dirigir la expresión de la secuencia de ácido nucleico de (a), en donde dicha secuencia de control es un promotor del meristemo apical del vástago temprano.

10. Constructo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho promotor del meristemo apical del vástago temprano es un promotor OSH1.

11. Constructo de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho promotor OSH1 es como el representado por la SEQ D NO: 22.

12. Constructo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para uso en un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

13. Plantas que comprenden un constructo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12.

14. Un método para la producción de una planta transgénica que tiene mayor rendimiento de semillas con relación a las correspondientes plantas de tipo silvestre, cuyo método comprende:

(a) introducir a través de la transformación de la planta y expresión en una planta, parte de una planta o célula de una planta de un ácido nucleico que codifica un polipéptido similar a OsMADS18 operativamente enlazado a un promotor del meristemo apical del vástago temprano, cuyo polipéptido similar a OsMADS18:

(i) es un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado SQUAMOSA; y

(ii) tiene actividad de enlazamiento de ADN y de proteína; y

(iii) comprende el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) en los últimos 15 aminoácidos del terminal C de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo pero no en la segunda y en la cuarta posiciones; y

(iv) tiene al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2; y

(b) cultivar la célula de la planta bajo condiciones que promuevan el crecimiento y desarrollo de la planta.

15. Una planta transgénica que tiene mayor rendimiento de semillas con respecto a las correspondientes plantas de tipo silvestre, resultante de la transformación de una planta con un ácido nucleico operativamente enlazado a un promotor del meristemo apical del vástago temprano, cuyo ácido nucleico codifica un polipéptido similar a OsMADS18 que:

(i) es un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado SQUAMOSA; y

(ii) tiene actividad de enlazamiento de ADN y de proteína; y

(iii) comprende el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) en los últimos 15 aminoácidos del terminal C de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo pero no en la segunda y en la cuarta posiciones; y

(iv) tiene al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2.

16. Una planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 13 o 15, en donde dicha planta es una planta monocotiledónea.

17. Partes cosechables de una planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13, 15 o 16, que comprenden un ácido nucleico similar a OsMADS18 que codifica un polipéptido similar a OsMADS18 que comprende las siguientes características:

(i) es un factor de transcripción de la caja MADS tipo II de monocotiledónea del clado SQUAMOSA; y

(ii) tiene actividad de enlazamiento de ADN y de proteína; y

(iii) comprende el motivo LPPWMLRT (SEQ ID NO: 18) en los últimos 15 aminoácidos de la proteína, lo que permite una sustitución de aminoácidos en cualquier parte del motivo pero no en la segunda y en la cuarta posiciones; y

(iv) tiene al menos 65% de identidad de secuencia con la proteína OsMADS18 de la SEQ ID NO: 2, en donde dicho ácido nucleico similar a OsMADS18 está operativamente enlazado al promotor del meristemo apical del vástago temprano.

18. Partes cosechables de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dichas partes cosechables son semillas.

19. El uso de un ácido nucleico/gen similar a OsMADS18 en el aumento del rendimiento de semillas, dicho ácido nucleico/gen codificando un polipéptido similar a OsMADS18 de acuerdo con la reivindicación 1 (i) hasta (iv), o el uso de un polipéptido similar a OsMADS18 de acuerdo con la reivindicación 1 (i) hasta (iv), en el aumento del rendimiento de semillas.

20. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicho rendimiento de semillas incluye uno o más de lo siguiente: mayor TKW, mayor tamaño de la semilla, mayor volumen de la semilla, mayor área de la semilla, mayor longitud de la semilla y mayor biomasa de la semilla.

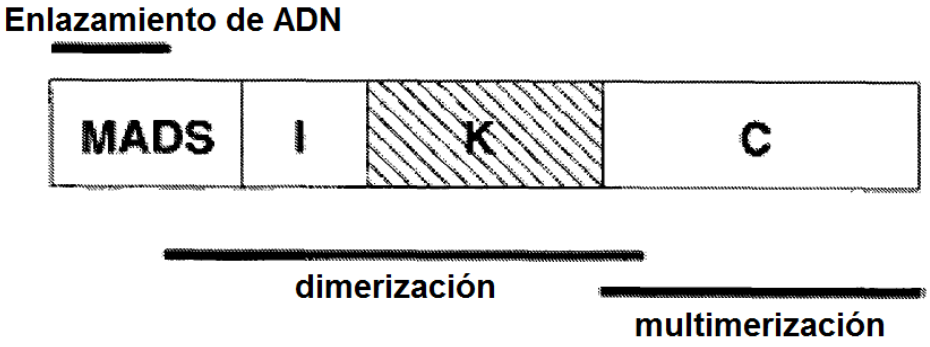
Enlazamiento de ADN
MADS
I
K
C
dimerización
multimerización

FIGURA 1

FIGURA 2

```
1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
Arath_AP1/AGL7 (1)    MGRGKVQLKRIENKINRQVTFSKRRAGLLKKAHEISVLCDAEVALVVFSHKGKLFEYSTDSC-MEKILERYERYSYAER-
Arath_CAL/AGL10 (1)   MGRGKVELKRIENKINRQVTFSKRRTGLLKKAQEISVLCDAEVSLIVFSHKGKLFEYSSESC-MEKVLERYERYSYAER-
Antma_SQUA (1)        MGRGKVQLKRIENKINRQVTFSKRRGGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSNKGKLFEYSTDSC-MDRILEKYERYSFAER-
Lyces_RIN (1)         MGRGKVELRKIENKINRQVTFSKRRGGLVKKAHEISVLCDAEVALIVFSQKGKLFEYSSDSC-MEQILERYERYSYAERR
Horvu_m3 (1)          MGRGRVQLRRIENKINRQVTFSKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLYEYSSQDSSMDVILERYQRYSFEER-
Lolpe_MADS3 (1)       MGRGRVQLRRIENKINRQVTFSKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLYEYSSQDSNMDVILERYQRYSFEER-
Zeama_ZMM28 (1)       MGRGRVQLRRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLYEYSSHSS-MEGILERYQRYSFEER-
Sacof_ZMM28 like (1)  MGSGRVQLRRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLYEYSSHSS-MEGILERYQRYSFEER-
Orysa_OsMADS18 (1)    MGRGRVQLRRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAHEISVLCDADVALIVFSTKGKLYEFSSHSS-MEGILERYQRYSFDER-
Orysa_OSMADS14 (1)    MGRGKVQLKRIENKINRQVTFSKRRSKLLKKANEISVLCDAEVALIIFSTKGKLYEYATDSC-MDKILERYERYSYAEK-
Zeama_ZMM15 (1)       MGRGKVQLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVALIIFSTKGKLYEYSTDSC-MDKILDRYERYSYAEK-
Zeama_ZMM4 (1)        MGRGKVQLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVALIIFSTKGKLYEYSTDSC-MDKILERYERYSYAEK-
Horvu_m5 (1)          MGRRKVQLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKKAHEISVLYDAEVGLIIFSTKGKLYEFSTESC-MDKILERYERYSYAEK-
Triae_WAP1 (1)        MGRGKVQLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGKLYEFSTESC-MDKILERYERYSYAEK-
Orysa_OSMADS15 (1)    MGRGKVQLKRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAHEISVLCDAEVAAIVFSPKGKLYEYATDSR-MDKILERYERYSYAEK-
Zeama_MADS3 (1)       MGRGKVQLKRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAHEISVLCDAEVAVIVFSPKGKLYEYASDSR-MDKILERYERYSYAEK-
Zeama_ZAP1 (1)        MGRGKVQLKRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAHEISVLCDAEVAVIVFSPKGKLYEYATDSR-MDKILERYERYSYAEK-
Orysa_OSMADS20 (1)    MGRGKVQVRRIENEVSRQVTFSKRRPGLLKKAHEIAVLCDVEVAAIVFSAKGNLFHYASSHTTMERILEKYDRHELLSEG
Arath_AGL79 (1)       MGRGRVQLRRIENKIRRQVTFSKRRTGLVKKAQEISVLCDAEVALIVFSPKGKLFEYSAGSS-MERILDRYERSAYAGQ-
Pethy_PFG (1)         MGRGRVQMKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVGLIVFSTKGKLFEYATDSC-MERILERYERYSYAER-
Soltu_POTM1 (1)       MGRGRVQLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVGLIVFSTKGKLFEYANDSC-MERILERYERYSFAER-
Betpe_PFG like (1)    MGRGRVQLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLFEYSTDSC-MERILERYERYSYADR-
Antma_DEFH28 (1)      MGRGRVQLKRIENKLSRQVTFSKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLFEYSTESS-MERILERYERYSYAEK-
Sinal_AGL8 (1)        MGRGRVQLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVALVIFSSKGKLFEYSTDSC-MEKILERYDRYLYSDK-
Arath_FUL/AGL8 (1)    MGRGRVQLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSSKGKLFEYSTDSC-MERILERYDRYLYSDK-
  Consenso (1) MGRGKVQLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLYEYSTDSC MEKILERYERYSY      AER

MADS Consenso  * (1) MGRGKIEIKRIENKINRQVTFSKRRMGLLKKAYEISVLCDASVALIVFSSRGKLYEYASP
```

* como se define en Thiessen et al., 1996

```
81                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
Arath_AP1/A  GL7 (79)  -QLIAPESDVNTNWSMEYNRLKAKIELLERNQRHYLGEDLQAMSPKELQNLEQQLDTALKHIRTRKNQLMYESINELQKK
Arath_CAL/AGL10 (79)   -QLIAPDSHVNTNWSMEYSRLKAKIELLERNQRHYLGEELEPMSLKDLQNLEQQLETALKHIRSRKNQLMNESLNHLQKK
Antma_SQUA (79)        -QLVSNEPQSPANWTLEYSKLKARIELLQRNHRHYMGEDLDSMSLKELQSLEQQLDTALKNIRTRKNQLLYDSISELQHK
Lyces_RIN (80)         LLANNSESPVQENWSLEYTKLKARIDLLQRNHKHYMGEDLDSMSLKDLQNLEQQLDSALKLIRSRKNQLMHESISELQKK
Horvu_m3 (80)          -AVLDPSTGDQANWGDEYGSLKIKLDALQKSQRQLLGEQLDPLTTKELQQLEQQLDSSLKHIRSRKNQLLFESISELQKK
Lolpe      _MADS3 (80) -AIVDQNIGGQANWGDEFGSLKIKLDALQKSQRQLLGEQLDPLTTKELQQLEQQLDSSLKHIRSRKNQLLFESISELQKK
Zeama_ZMM28 (79)       -AVLNPSIEDQANWGDEYVRLKSKLDALQKSQRQLLGEQLSSLTIKELQQLEQQLDSSLKHIRSRKNQLMFDSISALQKK
tipo Sacof_ZMM28     (79) -AVLDPSIEDQADWGDEYVRLKSKLDALQKSQRHLLGEQLDSLTIKELQQLEQQLDSSLKHIRSRKNQLMFDSISELQKK
Orysa_OsMADS18 (79)    -AVLEPNTEDQENWGDEYGILKSKLDALQKSQRQLLGEQLDTLTTKELQQLEHQLEYSLKHIRSKKNQLLFESISELQKK
Orysa_OSMADS14 (79)    -VLISAESDTQGNWCHEYRKLKAKVETIQKCQKHLMGEDLESLNLKELQQLEQQLENSLKHIRSRKSQLMLESINELQKK
Ze     ama_ZMM15 (79)  -VLISAESETQGNWCHEYRKLKAKVETIQKCQKHLMGEDLETLNLKELQQLEQQLESSLKHIRTRKNQLMLESISELQKK
Zeama_ZMM4 (79)        -VLISAEYETQGNWCHEYRKLKAKVETIQKCQKHLMGEDLETLNLKELQQLEQQLESSLKHIRTRKSQLMVESISALQKK
Horvu_m5 (79)          -VLVSSESEIQGNWCHEYRKLKAKVETIQKCQKHLMGEDLESLNLKELQQLEQQLESSLKHIRARKNQLMHESISELQKK
Triae_WAP1 (79)        -VLVSSESEIQGNWCHEYRKLKAKVETIQKCQKHLMGEDLESLNLKELQQLEQQLESSLKHIRSRKNQLMHESISELQKK
Orysa_OSMADS15 (79)    -ALISAESESEGNWCHEYRKLKAKIETIQKCHKHLMGEDHESLNLKELQQLEQQLESSLKHIISRKSHLMLESISELQKK
    Zeama_MADS3 (79)   -ALISAESESEGNWCHEYRKLKAKIETIQRCHKHLMGEDLESLNPKELQQLEQQLESSLKHIRSRKSHLMAESISELQKK
Zeama_ZAP1 (79)        -ALISAESESEGNWCHEYRKLKAKIETIQKCHKHLMGEDLESLNPKELQQLEQQLDSSLKHIRSRKSHLMAESISELQKK
Orysa_OSMADS20 (81)    NNVIEEFPELEGSMSYDHIKLRGRIEALKKSQRNLMGQELDSLTLQDIQQLENQIDTSLNNIRSRKNNLLLKSIAELRQK
Arath_AGL79 (79)       -DIPTPNLDSQGECSTECSKLLRMIDVLQRSLRHLRGEEVDGLSIRDLQGVEMQLDTALKKTRSRKNQLMVESIAQLQKK
Pethy_PFG (79)         -QLVSTDHSSPGSWNLEHAKLKARIEVVQRNQRHYMGEDLDSLSMKDLQNLEQQLDSSLKHIRSRKNQLMHESISELQKK
 Soltu_POTM1 (79)      -QLVPTDHTSPGSWTLEHAKLKARLEVLQRNQKHYVGEDLESLNMKELQNLEHQLDSALKHIRSRKNQLMHESISVLQKQ
tipo Betpe_PFG     (79) -QLLANDLEQNGSWTLEHAKLKARIEVLQRNQKHFVGEDLDSLSLKELQNLEQQLDSALKHIRSRKNQLMYESISELQKK
Antma_DEFH28 (79)      -KLTSDSHEPEENWCLEYPKLVARIELLERNIRNYVGEDLDHLSMRELQSLEQQLDTALKRTRTRKNQLMHESISQLQKK
Sinal_AGL8 (79)        -QLVGRDISQSENWVLEHAKLKARVEVLEKNKRNFMGEDLDSLSLKELQSLEHQLHAAIKSIRSRKNQAMFESISALQKK
Arath_FUL/AGL8 (79)    -QLVGRDVSQSENWVLEHAKLKARVEVLEKNKRNFMGEDLDSLSLKELQSLEHQLDAAIKSIRSRKNQAMFESISALQKK
  Consenso (81)   LIS E E QGNW  EY KLKAKIE LQK QRHLMGEDLDSLSLKELQQLEQQLDSSLKHIRSRKNQLM ESISELQKK
```

FIGURA 2 (continuación)

```
161                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
Arath_AP1/AGL  7 (158) EKAIQEQNSMLSKQIKEREK--------------ILRAQQEQWDQ------------------------QNQGHNMPPPL
Arath_CAL/AGL10 (158)  EKEIQEENSMLTKQIKEREN--------------ILRTKQTQCEQ------------------------LNRSVDDVP--
Antma_SQUA (158)       EKAIQEQNTMLAKKIKEKEKE-------------IAQQPQWEHHR------------------------HHINASIMP--
Lyces_RIN (160)        ERAILEENNMLTKKIKEKDKI------------VEQQGEWHQQTN----------------------------QVSISST--
Horvu_m3 (159)         EKSLKDQNGVLQKHLVETEKEKNN---------VLSNIHHREQLN------------EATNIHHQEQLSGATTSSPSP--
Lo     lpe_MADS3 (159) EKSLKDQNGVLQKHLVETEKEKSN---------VLSNIHHREQTNGAANIHRREQMNETTHIHNQEQLNGATTSSPSP--
Zeama_ZMM28 (158)      EKALTDQNGVLQK-FMEAEKEKNK---------ALMMAQLREQQN------------------------GASTSSPSL--
Tipo Sacof_ZMM28    (158) EKALTDQNGVLQK-LMEAEKEKNN---------ALMMAHLREQQN------------------------GASTSSPSL--
Orysa_OsMADS18 (158)   EKSLKNQNNVLQK-LMETEKEKNN---------AIINTN-REEQN------------------------GATPSTSSP--
Orysa_OSMADS14 (158)   EKSLQEENKVLQKELVEKQK-------------VQKQQVQWDQTQP------------------------QTSSSSSSFMM
Zeama_ZMM15 (158)      EKSLQEENKVLQKELAEKQK-------------AQRKQVQWGQTQQ------------------------QTSSSSSCFVI
Zeama_ZMM4 (158)       EKSLQEENKVLQKELAEKQK-------------DQRQQVQRDQTQQ------------------------QTSSSSTSFML
Horvu_m5 (158)         EKSLQEENKVLQKELVEKQK---------------AQAAQQDQTQP------------------------QTSSSSSSFMM
Triae_WAP1 (158)       EKSLQEENKVLQKELVEKQK---------------AQAAQQDQTQP------------------------QTSSSSSSFMM
Orysa_OSMADS15 (158)   EKSLQEENKALQKELVEKQKNVRGQQQVGQWDQTQVQAQAQAQPQA------------------------QTSSSSSS-ML
Zeama_MADS3 (158)      EKSLQEENKILQKELSEKQKAVASRQ---QQQQQ-VQWDQQTQVQV------------------------QTSSSSSSFMM
Zeama_ZAP1 (158)       EKSLQEENKALQKELAEKQKAVASRQ---QQQQQQVQWDQQTHAQA------------------------QTSSSSSSFMM
Orysa_OSMADS20 (161)   EKLLMEKNTILEKKITELET-------------------------------------------------LHICIRASPTK
Arath_AGL79 (158)      EKELKELKKQLTKKAGERE---------------DFQTQNLSHD-------------------------LASLATPPFES
Pethy_PFG (158)        DKSLQEQNNLLSKKVKEREKE-------------LAQQTQWEQQNN----------------------HHEINSSSSFVL
Soltu_POTM1 (158)      DKALQEQNNQLSKKVKEREKE-------------VAQQNQWDQQN------------------------HEIN-SSIFVL
Tipo Betpe_PFG    (158) DKALQEQNNVLAKKVKEKEKE-------------LAQQAQWEQQS-------------------------HILDSVPSLL
Antma_DEFH28 (158)     EKSLQDQNNILAKKIKDNEKQ-------------QNEKQQDVHEGF----------------------AQSSSINMLL
Si     nal_AGL8 (158)  DKVLQDHNNALLKKIKEREK---------------NTVHQEVQLIQ------------------------CSNNSS--LL
Arath_FUL/AGL8 (158)   DKALQDHNNSLLKKIKEREK---------------KTGQQEGQLVQ------------------------CSNSSS----
Consenso   (161) EKSLQE N VLQK L EREK                    Q  Q  Q Q                          SSSSSS ML
```

FIGURA 2 (continuación)

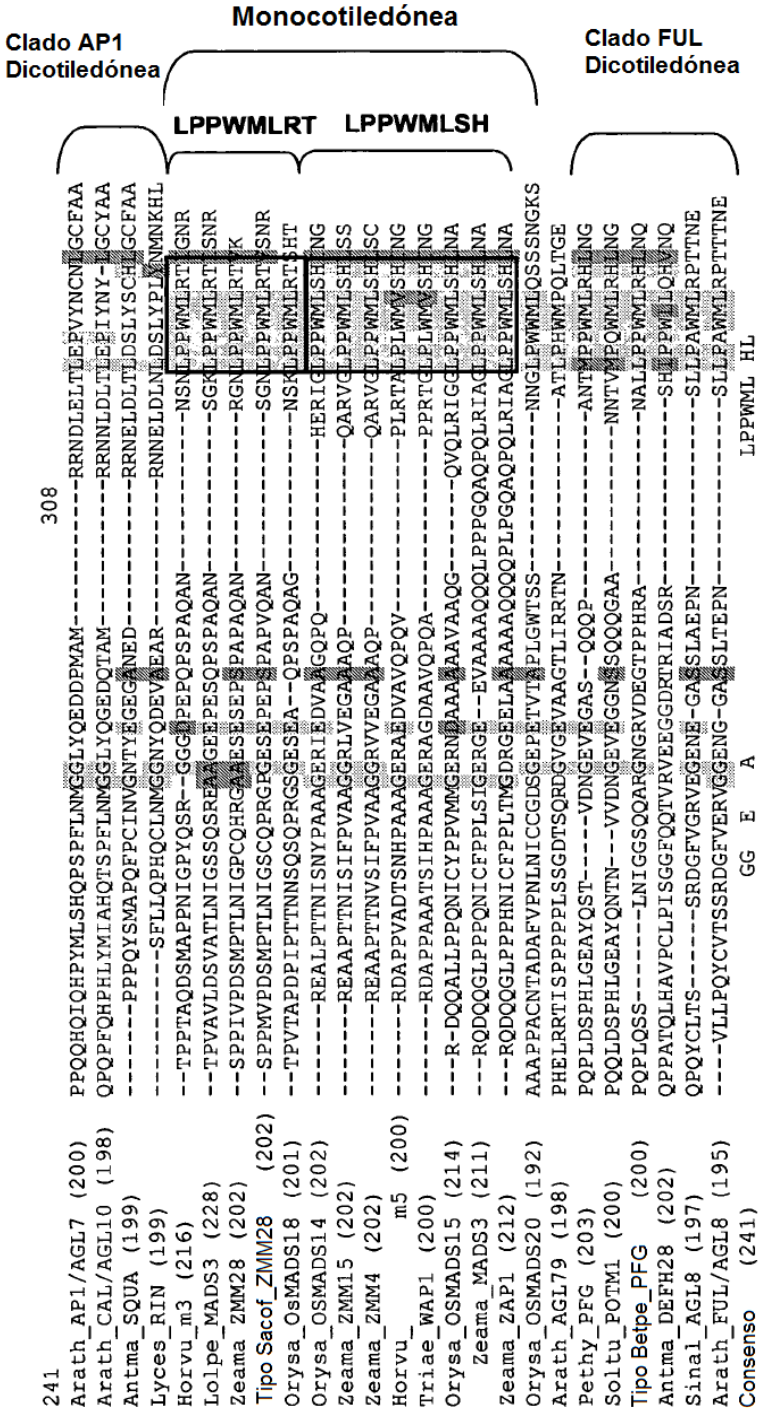

FIGURA 2 (continuación)

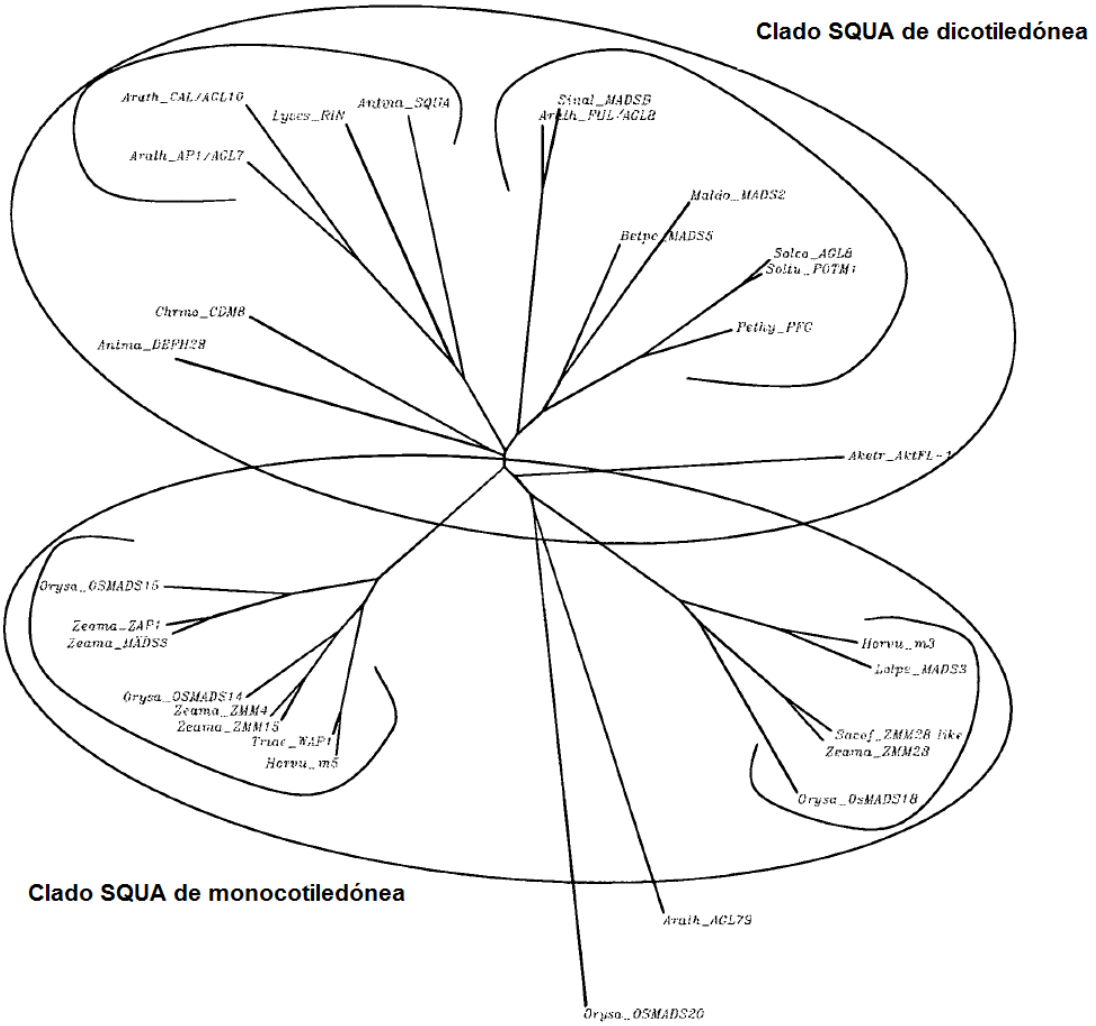
Clado SQUA de dicotiledónea
Arath_CAL/AGL10
Lycoe_RIN
Antma_SQUA
Sinal_MADS8
Arath_FUL/AGL8
Arath_AP1/AGL7
Maldo_MADS2
Betpe_MADS5
Solco_AGL8
Soltu_POTM1
Chrmo_CDM8
PetHy_PFG
Antma_DEFH28
Akotr_AktFL-1
Orysa_OSMADS15
Zeama_ZAP1
Zeama_MADS5
Horvu_m3
Lolpe_MADS3
Orysa_OSMADS14
Zeama_ZMM4
Zeama_ZMM15
Triae_WAP1
Horvu_m5
Sacof_ZMM28 like
Zeama_ZMM28
Orysa_OsMADS18
Clado SQUA de monocotiledónea
Arath_AGL79
Orysa_OSMADS26

FIGURA 3

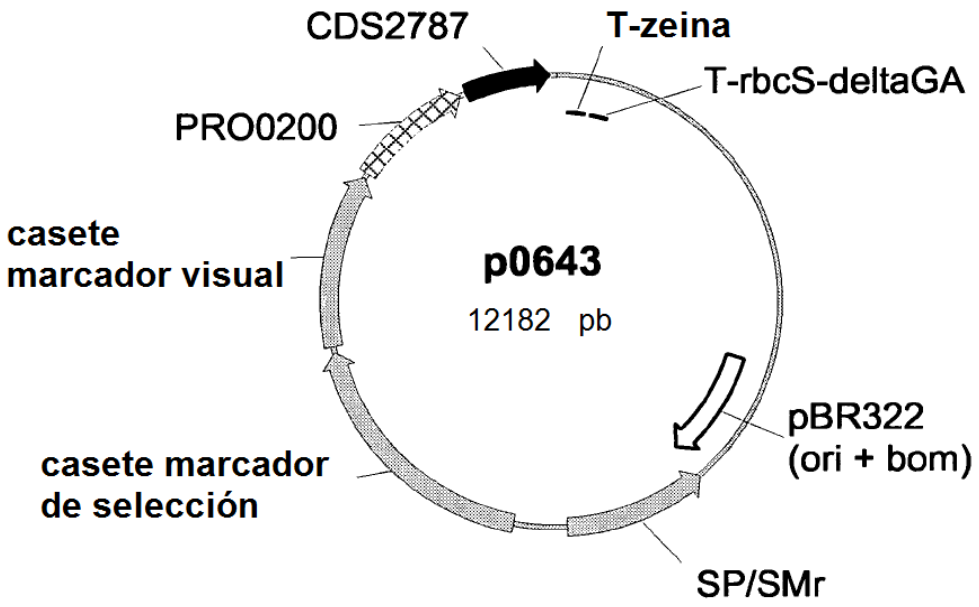
CDS2787
T-zeina
T-rbcS-deltaGA
PRO0200
casete
marcador visual
p0643
12182 pb
pBR322
(ori + bom)
casete marcador
de selección
SP/SMr

FIGURA 4

seq id no. 01: ADN de OsMADS18 de *Oryza sativa* (091458)

ATGGGGAGAGGGCCGGTGCAGCTGCGGCGGATCGAGAACAAGATAAACAGGCAGGTGACCTT
CTCCAAGCGGAGGAACGGGCTGCTGAAGAAGGCGCACGAGATCTCCGTGCTCTGTGACGCCG
ACGTCGCGCTCATCGTCTTCTCCACCAAGGGCAAGCTCTACGAGTTCTCCAGCCACTCCAGT
ATGGAAGGGATCCTTGAACGCTACCAGCGTTACTCGTTTGATGAAAGAGCCGTACTGGAGCC
AAATACTGAGGACCAGGAAAACTGGGGTGATGAATATGGAATTTTGAAGTCCAAACTGGATG
CACTTCAGAAGAGCCAAAGGCAACTCTTAGGTGAACAATTGGACACACTAACAATAAAAGAA
CTCCAGCAATTGGAACATCAACTGGAATATTCTCTGAAGCATATAAGATCAAAAAAGAATCA
GCTTCTGTTTGAATCAATTTCTGAGCTTCAGAAGAAGGAAAAGTCACTTAAAAACCAGAATA
ATGTTCTGCAAAAGCTCATGGAGACAGAAAAGGAGAAAAACAATGCTATAATAAACACTAAC
CGGGAGGAGCAAAATGGAGCAACACCAAGCACATCATCACCAACACCAGTGACGGCTCCAGA
TCCCATCCCGACAACAAATAACAGTCAAAGCCAACCAAGAGGATCAGGGGAGTCAGAAGCTC
AACCGTCTCCGGCACAAGCAGGCAACAGCAAGCTTCCGCCATGGATGCTCCGGACAAGTCAC
ACATGA

seq id no 02: proteína OsMADS18 de Oryza sativa

MGRGPVQLRRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAHEISVLCDADVALIVFSTKGKLYEFSSHSS
MEGILERYQRYSFDERAVLEPNTEDQENWGDEYGILKSKLDALQKSQRQLLGEQLDTLTIKE
LQQLEHQLEYSLKHIRSKKNQLLFESISELQKKEKSLKNQNNVLQKLMETEKEKNNAIINTN
REEQNGATPSTSSPTPVTAPDPIPTTNNSQSQPRGSGESEAQPSPAQAGNSKLPPWMLRTSH
T

seq id no 03: ADN de ZMM28 (o m28) de *Zea mays* (AJ430695)

ATGGGGCGGGGGCCGGTGCAGCTGCGCCGGATCGAGAACAAGATCAACCGCCAGGTGACCTT
CTCCAAGCGCCGGAACGGGCTGCTGAAGAAGGCCCACGAGATCTCCGTGCTCTGCGACGCAG
AGGTCGCGCTCATCGTCTTCTCCACTAAGGGGAAGCTCTACGAGTACTCTAGCCATTCCAGC
ATGGAAGGCATTCTTGAGCGTTACCAGCGTTACTCATTTGAAGAAAGGGCAGTACTTAACCC
AAGTATTGAAGACCAGGCAAATTGGGGAGATGAATATGTCCGGTTAAAATCCAAACTTGATG
CACTTCAGAAGAGTCAAAGGCAGCTGTTAGGAGAACAATTGAGTTCACTGACCATAAAAGAA
CTCCAGCAACTGGAGCAACAACTGGACAGTTCTTTGAAGCATATTAGGTCAAGAAAGAATCA
GCTCATGTTCGATTCAATTTCCGCGCTTCAGAAAAAGGAGAAAGCACTTACAGATCAAAACG
GTGTCCTGCAAAAGTTCATGGAGGCAGAGAAGGAGAAAAACAAGGCTTTGATGAACGCGCAG
CTCCGGGAGCAGCAAAATGGAGCATCAACAAGCTCCCCATCACTTTCACCACCAATAGTTCC
AGATTCCATGCCAACTCTAAATATAGGGCCATGTCAACATAGAGGGGCAGCAGAATCTGAGT
CTGAACCGTCTCCTGCTCCTGCACAAGCAAACAGGGGCAACCTGCCACCATGGATGCTCCGC
ACTGTCAAGTAA

FIGURA 5

seq id no 04: Proteína ZMM28 de Zea mays

MGRGPVQLRRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLYEYSSHSS
MEGILERYQRYSFEERAVLNPSIEDQANWGDEYVRLKSKLDALQKSQRQLLGEQLSSLTIKE
LQQLEQQLDSSLKHIRSRKNQLMFDSISALQKKEKALTDQNGVLQKFMEAEKEKNKALMNAQ
LREQQNGASTSSPSLSPPIVPDSMPTLNIGPCQHRGAAESESEPSPAPAQANRGNLPPWMLR
TVK

seq id no 05: ADN de MADS3 de Lolium perenne (AY198328)

ATGGGGCGCGGGCCGGTGCAGCTGCGGCGGATCGAGAACAAGATAAACCGCCAGGTCACCTT
CTCCAAGCGCCGGAGCGGGCTGCTCAAGAAGGCGCACGAGATCTCCGTGCTCTGCGACGCTG
AGGTCGCGCTCATCGTATTCTCCACCAAGGGAAAGCTCTACGAGTACTCCAGCCAGGACAGT
AACATGGATGTCATTCTTGAACGTTACCAGCGTTACTCATTCGAAGAAAGAGCTATAGTGGA
TCAAAATATTGGAGGCCAGGCAAATTGGGGAGATGAATTTGGAAGTTTGAAAATTAAACTCG
ATGCACTCCAGAAGAGTCAAAGGCAACTCTTAGGTGAACAATTGGACCCACTGACCACAAAA
GAACTTCAACAATTGGAACAGCAGCTAGATAGTTCTTTGAAGCACATAAGGTCAAGAAAGAA
TCAGCTTCTGTTTGAGTCAATATCTGAGCTTCAGAAGAAGGAGAAGTCACTTAAAGATCAGA
ATGGCGTCCTGCAGAAGCACCTCGTGGAGACAGAAAAGGAGAAAAGTAACGTTTTATCGAAT
ATTCATCACCGAGAGCAGACGAATGGAGCAGCAAATATTCATCGCCGGGAGCAGATGAATGA
AACAACACATATTCATAACCAGGAGCAGCTCAATGGAGCAACAACAAGCTCACCGTCACCTA
CACCAGTGGCGGTCCTAGATTCCGTGGCAACTCTAAATATTGGGTCATCTCAATCTAGAGAA
GCAGCAGGAGAGGAGCCAGAATCTCAGCCGTCCCCGGCACAAGCAAACAGCGGCAAGCTACC
ACCATGGATGCTCCGCACCATCAGTAACAGATGA

seq id no 06: Proteína MADS3 de Lolium perenne

MGRGPVQLRRIENKINRQVTFSKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLYEYSSQDS
NMDVILERYQRYSFEERAIVDQNIGGQANWGDEFGSLKIKLDALQKSQRQLLGEQLDPLTTK
ELQQLEQQLDSSLKHIRSRKNQLLFESISELQKKEKSLKDQNGVLQKHLVETEKEKSNVLSN
IHHREQTNGAANIHRREQMNETTHIHNQEQLNGATTSSPSPTPVAVLDSVATLNIGSSQSRE
AAGEEPESQPSPAQANSGKLPPWMLRTISNR

FIGURA 5 (continuación)

seq id no 07: ADN de m3 de Hordeum vulgare (AJ249143)

ATGGGGCGCGGGCCGGTGCAGCTGCGGCGGATCGAGAACAAGATAAACCGGCAGGTGACCTT
CTCCAAGCGGCGCAGCGGGCTGCTTAAGAAGGCGCACGAGATCTCCGTGCTCTGCGACGCCG
AGGTCGCGCTCATCGTCTTCTCCACCAAGGGCAAGCTATACGAGTACTCCAGCCAGGACAGT
AGCATGGATGTGATTCTTGAACGTTACCAACGTTACTCATTTGAAGAAAGAGCTGTACTGGA
TCCAAGTACTGGAGACCAGGCAAATTGGGGAGACGAATATGGAAGTTTGAAGATAAAACTCG
ATGCACTCCAGAAGAGTCAAAGGCAACTCTTAGGTGAACAATTGGACCCACTCACCACAAAA
GAACTTCAACAGTTGGAACAACAGCTTGATAGTTCTTTGAAGCACATAAGGTCAAGAAAGAA
TCAACTTCTCTTTGAGTCAATATCTGAGCTTCAAAAGAAGGAGAAATCATTAAAAGATCAGA
ATGGCGTCCTGCAGAAGCACCTCGTAGAGACAGAAAAGGAGAAAAATAACGTTTTGTCAAAT
ATTCATCACCGGGAGCAGTTGAATGAAGCAACAAATATTCATCACCAGGAGCAGCTGAGTGG
AGCAACAACAAGCTCACCGTCACCTACACCACCGACGGCCCAAGATTCCATGGCACCTCCAA
ATATTGGGCCATATCAATCTAGAGGAGGAGGGGATCCAGAACCTCAGCCGTCACCAGCACAA
GCAAACAACAGCAATCTGCCACCGTGGATGCTCCGCACCATCGGCAACAGATGA

seq id no 08: Proteína m3 de Hordeum vulgare

MGRGPVQLRRIENKINRQVTFSKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLYEYSSQDS
SMDVILERYQRYSFEERAVLDPSTGDQANWGDEYGSLKIKLDALQKSQRQLLGEQLDPLTTK
ELQQLEQQLDSSLKHIRSRKNQLLFESISELQKKEKSLKDQNGVLQKHLVETEKEKNNVLSN
IHHREQLNEATNIHHQEQLSGATTSSPSPTPPTAQDSMAPPNIGPYQSRGGGDPEPQPSPAQ
ANNSNLPPWMLRTIGN

seq id no 09: ADN parcial similar a ZMM28 de Saccharum officinarum (EST CA285442)

CGCACCACTCGAGTCGAGAGACGAGAGCCACCTGATCCATCCTTCCCCGTCTTCCTCTTCCC
ACACGTCCCCATCGCCATTGCTGCGCCGAGAGTGAGCGGGAGAGGGTAGGTGTCGAGGCGGC
GGAGATGGGGAGCGGGCCGGTGCAGCTGCGCCGGATCGAGAACAAGATCAACCGCCAGGTGA
CCTTCTCCAAGCGCCGGAACGGGCTGCTGAAGAAGGCCCACGAGATCTCCGTGCTCTGCGAT
GCAGAGGTCGCGCTCATCGTCTTCTCCACTAAGGGGAAGCTCTACGAGTACTCTAGCCATTC
CAGCATGGAAGGCATTCTTGAGCGTTACCAGCGGTACTCATTTGAAGAAAGAGCAGTACTTG
ACCCAAGTATTGAAGACCAGGCAGATTGGGGAGATGAATATGTCCGGTTAAAATCCAAACTT
GATGCACTTCAGAAGAGTCAAAGGCATCTGCTAGGAGAACAATTGGATTCACTGACCATAAA
AGAACTCCAGCAACTGGAGCAACAATTGGACAGTTCTTTGAAGCATATTAGGTCAAGAAAGA
ATCAGCTCATGTTCGATTCAATTTCTGAGCTTCAGAAAAAGGAGAAAGCACTTACAGATCAN
AATGGTGTCCTGCAAAAGCTCATGGAGGCAGAGAAAGAGAANAACAATGCTTTAATGAACGC
ACACCTNCGGGAGCAGCAAAATGGAGCATCAACAGGCTCCCCATA

FIGURA 5 (continuación)

seq id no 10: ADN parcial similar a ZMM28 de Saccharum officinarum (EST CA200888)

TTCTTGAGCGTTACCAGCGGTACTCATTTGAAGAAAGAGCAGTACTTGACCCAAGTATTGAA
GACCAGGCAGATTGGGGAGATGAATATGTCCAGTTAAAATCCAAACTTGATGCACTTCAGAA
GAGTCAAAGACATCTGTTAGGAGAACAATTGGATTCACTGACCATAAAAGAACTCCAGCAAC
TGGAGCAACAATTGGACAGTTCTTTGAAGCATATTAGGTCAAGAAAGAATCAGCTCATGTTC
GATTCAATTTCCGAGCTTCAGAAAAAGGAGAAAGCACTTACAGATCAAAATGGTGTCCTGCA
AAAGCTCATGGAGGCAGAGAAGGAGAAAAACAATGCTTTAATGAACGCACACCTCCGGGAGC
AGCAAAATGTAGCATCAACAAGCTCCCCATCACTGTCACCACCAATGGTTCCAGATTCCATG
CCAACTCTAAATATTGGGTCATGTCAACCTAGAGGGCCAGGAGAATCTGAGCCTGAACCGTC
TCCTGCTCCTGTACAAGCAAACAGCGGCAACCTGCCACCATGGATGCTCCGCACTGTCAGTA
ACAGATGAGCTCTTCCCAATGCAGTTTTGCGGCTGAACACGACAGCAACACACCTGCCACCG
ACACGCCACGGTGACCCAGGCATCAACCGATGCATGATCCCTCTCGATCCTGTGATCCAA

seq id no 11: ADN parcial similar a ZMM28 de Saccharum officinarum (EST CA247266)

CTTATTTTGCAGCATGGAAGGCATTCTTGAGCGTTACCAGCGGTACTCATTTGAAGAAAGAG
CAGTACTTGACCCAAGTATTGAAGACCAGGCAGATTGGGGAGATGAATATGTCCAGTTAAAA
TCCAAACTTGATGCACTTCAGAAGAGTCAAAGACATCTGTTAGGAGAACAATTGGATTCACT
GACCATAAAAGAACTCCAGCAACTGGAGCAACAATTGGACAGTTCTTTGAAGCATATTAGGT
CAAGAAAGAATCAGCTCATGTTCGATTCAATTTCCGAGCTTCAGAAAAAGGAGAAAGCACTT
ACAGATCAAAATGGTGTCCTGCAAAAGCTCATGGAGGCAGAGAAGGAGAAAAACAATGCTTT
AATGAACGCACACCTCCGGGAGCAGCAAAATGTAGCATCAACAAGCTCCCCATCACTGTCAC
CACCAATGGTTCCAGATTCCATGCCAACTCTAAATATTGGGATGTCAAC

seq id no 12: ADN parcial similar a ZMM28 de Saccharum officinarum (EST CA282968)

CAGTACTTGACCCAAGTATTAAAGACCAGGCAGATTGGGGAGATGAATATGTCCGGTTAAAA
TCCAAACTTGATGCACTTCAGAAGAGTCAAAGGCATCTGTTAGGAGAACAATTGGATTCACT
GACCATAAAAGAACTCCAGCAACTGGAGCAACAATTGGACAGTTCTTTGAAGCATATTAGGT
CAAGAAAGAATCAGCTCATGTTCGATTCAATTTCCGAGCTTCAGAAAAAGGAGAAAGCACTT
ACAGATCAAAATGGTGTCCTGCAAAAGCTCATGGAGGCAGAGAAGGAGAAAAACAATGCTTT
AATGAACGCACACCTCCGGGAGCAGCAAAATGTAGCATCAACAAGCTCCCCATCACTGTCAC
CACCAATGGTTCCAGATTCCATGCCAACTCTAAATATTGGGTCATGTCAACCTAGAGGGCCA
GGAGAATCTGAGCCTGAACCGTCTCCTGCTCCTGTACAAGCAAACAGCGGCAACCTGCCACC
ATGGATGCTCCGCACTGTCAGTAACAGATGAGCTCTTCCCAATGCAGTTTTGCGGCTGAACA
CGACAGCAACACACCTGCCACCGACACGCCACGGTGAACCAGGCATCAACCGATGCATGATC
CCTCTCGATCCTGTGATCCAATACCGGGCCGTAGTACTACTAATTAAAGTCCAGGCCCCGCT
CAAATTGCTTTACATGGTTGATTGAAAGTTCT

FIGURA 5 (continuación)

seq id no 13: ADN parcial similar a ZMM28 de Saccharum officinarum (EST CA299090)

GAAGCTCTACGAGTACTCTAGCCATTCCAGCATGGAAGGCATTCTTGAGCGTTACCAGCGGT
GCTCATTTGAAGAAAGAGCAGTACTTGACCCAAGTATTGAAGACCAGGCAGATTGGGGAGAT
GAATATGTCCGGTTAAAATCCAAACTTGATGCACTTCAGAAGAGTCAAAGGCATCTGTTAGG
AGAACAATTGGATTCACTGACCATAAAAGAACTCCAGCAACTGGAGCAACAATTGGACAGTT
CTTTGAAGCATATTAGGTCAAGAAAGAATCAGCTCATGTTCGATTCAATTTCCGAGCTTCAG
AAAAAGGAGAAAGCACTTACAGATCAAAATGGTGTCCTGCAAAAGCTCATGGAGGCAGAGAA
GGAGAAAAACAATGCTTTAATGAACGCACACCTCCGGGAGCAGCAAAATGGAGCATCAACAA
GCTCCCCATCACTGTCACCACCAATGGTTCCAGATTCCATGCCAACTCTAAATATTGGGTCA
TGTCAACCTAGAGGGCCAGGAGAATCTGAGCCTGAACCGTCTCCTGCTCCTGTACAAGCAAA
CAGCGGGAACCTGCCACCATGGATACTCCGCACTGTCAGTAACAGATGAGCTCTTTCCAATG
CAGTTNTGCGGCTGAACTCGACAGCAACAC

seq id no 14: ADN reconstituido similar a ZMM28 de Saccharum officinarum, versión 1 (cambia con la seq id no 16 en negrita)

ATGGGGAGCGGGCCGGTGCAGCTGCGCCGGATCGAGAACAAGATCAACCGCCAGGTGACCTT
CTCCAAGCGCCGGAACGGGCTGCTGAAGAAGGCCCACGAGATCTCCGTGCTCTGCGATGCAG
AGGTCGCGCTCATCGTCTTCTCCACTAAGGGGAAGCTCTACGAGTACTCTAGCCATTCCAGC
ATGGAAGGCATTCTTGAGCGTTACCAGCGGTACTCATTTGAAGAAAGAGCAGTACTTGACCC
AAGTATTGAAGACCAGGCAGATTGGGGAGATGAATATGTCCGGTTAAAATCCAAACTTGATG
CACTTCAGAAGAGTCAAAGGCATCTGTTAGGAGAACAATTGGATTCACTGACCATAAAAGAA
CTCCAGCAACTGGAGCAACAATTGGACAGTTCTTTGAAGCATATTAGGTCAAGAAAGAATCA
GCTCATGTTCGATTCAATTTCCGAGCTTCAGAAAAAGGAGAAAGCACTTACAGATCAAAATG
GTGTCCTGCAAAAGCTCATGGAGGCAGAGAAGGAGAAAAACAATGCTTTAATGAACGCACAC
CTCCGGGAGCAGCAAAATG**G**AGCATCAACAAGCTCCCCATCACTGTCACCACCAATGGTTCC
AGATTCCATGCCAACTCTAAATATTGGGTCATGTCAACCTAGAGGGCCAGGAGAATCTGAGC
CTGAACCGTCTCCTGCTCCTGTACAAGCAAACAGCGGCAACCTGCCACCATGGATGCTCCGC
ACTGTCAGTAACAGATGA

seq id no 15: ADN reconstituido similar a ZMM28 de Saccharum officinarum, versión 1 (cambia con la seq id no 17 en negrita)

MGSGPVQLRRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLYEYSSHSS
MEGILERYQRYSFEERAVLDPSIEDQADWGDEYVRLKSKLDALQKSQRHLLGEQLDSLTIKE
LQQLEQQLDSSLKHIRSRKNQLMFDSISELQKKEKALTDQNGVLQKLMEAEKEKNNALMNAH
LREQQN**G**ASTSSPSLSPPMVPDSMPTLNIGSCQPRGPGESEPEPSPAPVQANSGNLPPWMLR
TVSNR

FIGURA 5 (continuación)

seq id no 16: ADN reconstituido similar a ZMM28 de Saccharum officinarum, versión 2 (cambia con la seq id no 14 en negrita)

ATGGGGAGCGGGCCGGTGCAGCTGCGCCGGATCGAGAACAAGATCAACCGCCAGGTGACCTT
CTCCAAGCGCCGGAACGGGCTGCTGAAGAAGGCCCACGAGATCTCCGTGCTCTGCGATGCAG
AGGTCGCGCTCATCGTCTTCTCCACTAAGGGGAAGCTCTACGAGTACTCTAGCCATTCCAGC
ATGGAAGGCATTCTTGAGCGTTACCAGCGGTACTCATTTGAAGAAAGAGCAGTACTTGACCC
AAGTATTGAAGACCAGGCAGATTGGGGAGATGAATATGTCCGGTTAAAATCCAAACTTGATG
CACTTCAGAAGAGTCAAAGGCATCTGTTAGGAGAACAATTGGATTCACTGACCATAAAAGAA
CTCCAGCAACTGGAGCAACAATTGGACAGTTCTTTGAAGCATATTAGGTCAAGAAAGAATCA
GCTCATGTTCGATTCAATTTCCGAGCTTCAGAAAAAGGAGAAAGCACTTACAGATCAAAATG
GTGTCCTGCAAAAGCTCATGGAGGCAGAGAAGGAGAAAAACAATGCTTTAATGAACGCACAC
CTCCGGGAGCAGCAAAATG**T**AGCATCAACAAGCTCCCCATCACTGTCACCACCAATGGTTCC
AGATTCCATGCCAACTCTAAATATTGGGTCATGTCAACCTAGAGGGCCAGGAGAATCTGAGC
CTGAACCGTCTCCTGCTCCTGTACAAGCAAACAGCGGCAACCTGCCACCATGGATGCTCCGC
ACTGTCAGTAACAGATGA

seq id no 17: ADN reconstituido similar a ZMM28 de Saccharum officinarum, versión 2 (cambia con la seq id no 15 en negrita)

MGSGPVQLRRIENKINRQVTFSKRRNGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLYEYSSHSS
MEGILERYQRYSFEERAVLDPSIEDQADWGDEYVRLKSKLDALQKSQRHLLGEQLDSLTIKE
LQQLEQQLDSSLKHIRSRKNQLMFDSISELQKKEKALTDQNGVLQKLMEAEKEKNNALMNAH
LREQQN**V**ASTSSPSLSPPMVPDSMPTLNIGSCQPRGPGESEPEPSPAPVQANSGNLPPWMLR
TVSNR

seq id no 18: Consenso de aminoácidos del motivo del terminal C de monocotiledóneas RT

LPPWMLRT

seq id no 19: Consenso de aminoácidos del motivo del terminal C de monocotiledóneas SH

LPPWMLSH

seq id no 20: secuencia de nucleótidos del cebador prm05821

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAAACAATGGGGAGAGGGCCG

seq id no 21: secuencia de nucleótidos del cebador prm05822

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGAGTGGAGTGACGTTTGAGA

FIGURA 5 (continuación)

seq id no 22: secuencia del nucleótido del promotor OSH1

GGGGAGTTAGGAACCTTGACATACAACCAATGATACCATTTTTTTTCAAGCAGCTAGAGGTA
CAGAGGTTCATATTTTTTAGATGGCTCATTAGTGATATTTTAGTCAAAAATTTCAGAAGTAC
GGCCACGGGTGATGGCCTGAACTAATATTTTATTCGAGGTGCCGCTACATCATCGTCTAAAG
TACACGCAAGATTCAACGGAAAAAAGAAACCGATCGATCGAGATCAGTTAGTTAATGAAATA
ACTAGATCAACTCATGTCGTCAAAAACAAAAGATGCTCATCTATGGACAACACACGCTGATG
ATTCGATCATCAAACAAAGGTGGTAGTAGTAGTAAAGCGTATCGTGTTTCTCATCAGAAAGA
AGAATTAAAGAAAAAACTAATCCCGTCTCGCGAGCCAGAGAAAATTCCCTACAAAAGCCACT
CCTTTGATTTGACATGCAAAAGCAAGGCTCCACTCCTCTACTACCCTACAACTACACAACAC
TGTCTCTCTATCTCCAAAGGCAGTAGCTGTATTGGCTTCCAGCTTTTCCTCTCTACCTCTAA
TGATAGCTTGGAGCAAGTTCAATAGTATAGCTAACTACTAGCTCTAATTCATCTATAATCAA
TCTAATAGCTTATTCATACAATAGTTATATACTACATTATTAATATCTGGTCCCATCTATCA
TACACACTGAGTCTGTGCTATAGCTGACTACAAATCTGTAGCCCGCTGCTCTTCTCTCTTCA
TTTATCTTCTTAAAATATATTTGCAGCTGGCTTATGGCTTATAGCTTGATATTGAGAGGGAG
AGGAGTGAGAGCTAGCTCAGCTCAGCTCAAGGTAAACAACAAGGCACACTCTTCCTACCTCT
TCTCCGGTTCTTCCTTTTTCCTCTTTCTCTTCGTCCAAGAACTTCACCTCAATAGCTCGAGC
TACGGCCTAACTTTTGCGTTGCGCAGGAGAGCTCGATCGCTGCACCAATACTTCACTGGAGA
TCGCCTAGCTGCAGCTAGCTAGCTTATCCTGCGTGTCTTGAGCTTCTCTC

FIGURA 5 (continuación)