

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 014**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.12.2010 PCT/JP2010/073288**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11078308**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2010 E 10839538 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2518148**

54 Título: **Gen Dro1 que controla características de enraizamiento profundo de planta y utilización del mismo**

30 Prioridad:

24.12.2009 JP 2009292524

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

07.11.2017

73 Titular/es:

**NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD
RESEARCH ORGANIZATION (100.0%)
3-1-1 Kannondai
Tsukuba-shi, Ibaraki, JP**

72 Inventor/es:

UGA, YUSAKU

74 Agente/Representante:

SERRAT VIÑAS, Sara

ES 2 641 014 T3

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

DESCRIPCIÓN

Gen Dro1 que controla características de enraizamiento profundo de planta y utilización del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un gen que controla la morfología de las raíces de plantas y a métodos para controlar la morfología de las raíces de plantas usando el gen. Más específicamente, la presente invención se refiere a un gen relacionado con el enraizamiento profundo de plantas y métodos para controlar el enraizamiento profundo de plantas usando el gen.

Antecedentes de la técnica

15 Actualmente, la población mundial continúa aumentando principalmente en los países en desarrollo, y es esencial aumentar la producción de alimentos para alimentar a la población. Sin embargo, ha sido difícil que los terrenos agrícolas tuvieran precipitaciones estables debido a los cambios climáticos en los últimos años tales como el calentamiento global y la desertización. Como resultado, las sequías debidas a la reducción de las precipitaciones han provocado graves daños en la producción de cultivos en todo el mundo. En particular, los granos tales como arroz, trigo y maíz, que se cultivan en su mayor parte solamente mediante agua de lluvia, son los dañados más gravemente por las sequías. Por tanto, un objetivo importante en la mejora genética de granos es conferir resistencia a la sequía a plantas de cultivo.

25 Para plantas de cultivo, la raíz es un fenotipo esencial, y está implicada en el rendimiento que depende de la absorción de nutrientes y agua o similares, así como la resistencia al encamado de la planta por encima del suelo y en evitar la sequía. La planta de arroz es una monocotiledónea, y forma un sistema radicular con varias raíces de la corona que se extienden desde entrenudos después del desarrollo de raíces seminales. La distribución del sistema radicular del arroz está determinada según la longitud de raíz de la corona y su dirección de crecimiento (Shigenori Morita, Ne no Dezain (Root design), págs. 107, 2003 (documento no de patentes 1)). De las dos, la dirección de crecimiento de las raíces de la corona es particularmente importante en la distribución del sistema radicular. Específicamente, el crecimiento lateral de raíces de la corona da como resultado un enraizamiento poco profundo, mientras que el crecimiento vertical da como resultado un enraizamiento profundo. En comparación con plantas con enraizamiento poco profundo, las plantas con enraizamiento profundo tienen más raíces distribuidas en capas más profundas del suelo. Por tanto, cuando se exponen las plantas a condiciones de sequedad, las plantas pueden evitar la sequía absorbiendo agua de las capas más profundas del suelo. Por consiguiente, el enraizamiento profundo es un rasgo importante (Yoshida y Hasegawa, Drought resistance in crops with emphasis on rice, págs. 97-114. 1982 (documento no de patentes 2); Shigenori Morita, Ne no Hatsukugaku (Study on root development) págs. 132, 2000 (documento no de patentes 3)). Por tanto, se espera que pueda conferirse resistencia a la sequía a plantas alterando plantas de cultivo con enraizamiento poco profundo para dar un tipo con enraizamiento profundo para mejorar la evitación de la sequía.

40 Existen tres tipos de resistencia a la sequía en plantas de cultivo: escape a la sequía, tolerancia a la sequía y evitación de la sequía. En general, las plantas de cultivo son más vulnerables a la desecación entre las fases de formación de panículas y espigación. El tipo de escape a la sequía se obtiene alterando plantas de cultivo para dar un tipo de maduración temprana de modo que el periodo de bajas precipitaciones no se solape con el periodo de la fase de formación de panículas a la fase de espigación. Este es el método más habitual para desarrollar cultivos resistentes a la sequía. Existen varios genes aislados que pueden usarse para controlar el momento de la espigación (documento WO 01/032881 (documento de patente 1); publicación denominada Kokai de solicitud de patente japonesa n.º (JP-A) 2002-153283 (solicitud de patente japonesa publicada, no examinada) (documento de patente 2); solicitud de patente japonesa JP-A (Kokai) 2003-339382 (documento de patente 3); solicitud de patente japonesa JP-A (Kokai) 2004-089036 (documento de patente 4); solicitud de patente japonesa JP-A (Kokai) 2004-290190 (documento de patente 5); solicitud de patente japonesa JP-A (Kokai) 2005-110579 (documento de patente 6)). Sin embargo, la fase de espigación está determinada por cada cultivar, y sería eficaz si el cambio en las precipitaciones durante el periodo de cultivo fuese constante cada año. El problema es que las plantas se verán afectadas por la sequía si el cambio climático desencadena una sequía entre las fases de formación de panículas y espigación. Cuando se expone a la sequía, el tipo tolerante a la sequía tiene la naturaleza de tolerar la sequía controlando la presión osmótica celular o similares. La tolerancia a la sequía puede evaluarse simplemente no regando las plantas. Por tanto, se han aislado varios genes relacionados con el tipo tolerante a la sequía mediante experimentos de biología molecular (solicitud de patente japonesa JP-A (Kokai) 2007-222129 (documento de patente 7); para una revisión, Tran *et al.*, Methods in Enzymology 428: 109-28. 2007 (documento no de patentes 4)). Sin embargo, examinar el tipo tolerante a la sequía en condiciones de campo no es sencillo porque es difícil controlar condiciones ambientales tales como el contenido en agua del suelo. Por tanto, la mejora genética de cultivos del tipo tolerante a la sequía está menos avanzada. Además, aunque el tipo tolerante a la sequía tiene la capacidad para tolerar la sequía, se suprime el crecimiento de la planta y la planta muere eventualmente cuando el periodo de sequía es prolongado puesto que la planta no puede absorber agua y nutrientes del suelo. Esto se convierte en un problema en la producción de cultivos, en la que el producto final son los granos y es importante

maximizar el rendimiento del cultivo más que preservar las plantas. El tipo de evitación de la sequía tiene la naturaleza de adquirir resistencia a la sequía evitando el estrés por sequía. El enraizamiento profundo descrito anteriormente es de tal naturaleza. En el campo, la sequía avanza generalmente desde la superficie del terreno hasta capas más profundas del suelo. En terrenos agrícolas habituales, las capas más profundas del suelo contienen agua. Por tanto, las plantas con enraizamiento profundo pueden eludir la desecación en condiciones de sequía usando agua en las capas más profundas del suelo. En Japón, se han desarrollado cultivos con enraizamiento profundo en el cultivo de arroz de monte para evitar el daño por sequía como resultado de bajas precipitaciones/insolación tras el fin de la temporada de lluvias. Se desarrolló "Yumenohatamochi", un cultivar con enraizamiento profundo, como variedad de arroz de monte altamente resistente a la sequía con excelente sabor (Hideo Hirasawa *et al.*, *Breeding Science* 48: 415-419. 1998 (documento no de patentes 5)). Sin embargo, no se ha notificado un aislamiento de genes que tenga como objetivo mejorar el enraizamiento profundo.

Una variedad de genes relacionados con tropismo, que es un importante factor que controla la dirección de crecimiento de las raíces, se han aislado mediante técnicas de biología molecular usando mutantes y similares. Tropismo se refiere al crecimiento de las raíces con extensión curva en respuesta a estímulos ambientales intrínsecos. Tropismo incluye gravitropismo, fototropismo, hidrotropismo, haptotropismo, galvanotropismo, magnetotropismo y quimiotropismo. Los genes de *Arabidopsis* identificados incluyen varios genes de gravitropismo (para una revisión, Morita y Tasaka *Current Opinion in Plant Biology* 7(6): 712-718. 2004 (documento no de patentes 6)), así como los genes de hidrotropismo MIZ1 (Kobayashi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(11): 4724-4729. 2007 (documento no de patentes 8)) y MIZ2 (Miyazawa *et al.*, *Plant Physiology* 149(2): 835-840. 2009 (documento no de patentes 9)). Con respecto a la planta de arroz, existe sólo un pequeño número de informes publicados sobre genes relacionados con tropismo de las raíces. Se ha notificado que el gen de fototropismo CPT1 (Haga *et al.*, *Plant Cell* 17(1): 103-115. 2005 (documento no de patentes 7)) y el gen de formación de raíces de la corona Crl1 (Inukai *et al.*, *Plant Cell* 17(5): 1387-1396. 2005 (documento no de patentes 10)) están relacionados con gravitropismo. Muchos de los genes se aislaron usando mutantes de pérdida de función o similares. No hay ningún informe que describa que puede conferirse enraizamiento profundo una plantas de cultivo alterando estos genes.

Ha habido informes de estudios genéticos sobre el enraizamiento profundo de planta de maíz y arroz con el objetivo de evitar la sequía. Con respecto al maíz, Tuberosa *et al.* y Trachsel *et al.* han descubierto un locus de rasgo cuantitativo (QTL) relacionado con la longitud de raíz (Tuberosa *et al.*, *Plant Molecular Biology* 48: 697-712. 2002 (documento no de patentes 11); Trachsel *et al.*, *Theoretical and Applied Genetics* DOI 10.1007/s00122-009-1144-9. 2009 (documento no de patentes 12)). Entre los cultivos de planta de arroz, existe una amplia gama de mutaciones espontáneas en cuanto a rasgos tales como el enraizamiento profundo, la longitud de raíz o el grosor de raíz (Uga Trachsel *et al.*, *Breeding Science* 59: 87-93. 2009 (documento no de patentes 13)). Se han identificado diversos loci de rasgo cuantitativo (QTL) correlacionados con mutaciones morfológicas de raíz observadas entre los cultivos mediante análisis genético usando marcadores moleculares (para una revisión, Parroz *et al.*, *Journal of Experimental Botany* 53: 989-1004. 2002 (documento no de patentes 14)). El enraizamiento profundo está determinado por dos rasgos: la longitud de raíz y la dirección (ángulo) de crecimiento de las raíces. La mayoría de informes sobre QTL implicados en el enraizamiento profundo están relacionados con la longitud de raíz (para una revisión, Parroz *et al.*, *Journal of Experimental Botany* 53: 989-1004. 2002 (documento no de patentes 14); Courtois *et al.*, *Euphytica* 134: 335-345. 2003 (documento no de patentes 15); Zheng *et al.*, *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1505-1515. 2003 (documento no de patentes 16); Li *et al.*, *Theoretical and Applied Genetics* 110: 1244-1252. 2005 (documento no de patentes 17)). Se ha notificado que sólo un QTL individual en maíz está implicado en el ángulo de crecimiento de las raíces; sin embargo, se predijo simplemente mediante un procedimiento estadístico, y el gen no se ha identificado/aislado aún (Omori F. y Mano Y. *Plant Root* 1: 57-65. 2007 (documento no de patentes 18)). Tal como se describió anteriormente, no hay ningún informe sobre la identificación/el aislamiento satisfactorios de genes para los QTL relacionados con las raíces basándose en mutaciones espontáneas. Una explicación plausible es que a diferencia de los rasgos de la parte aérea, es difícil evaluar de manera exacta y reproducible el fenotipo de la morfología del sistema radicular. Además, otro problema es que estudios experimentales en condiciones de campo requieren grandes esfuerzos (Yadav *et al.*, *Theoretical and Applied Genetics* 95: 619-632. 1997 (documento no de patentes 19)).

Los métodos conocidos para evaluar el enraizamiento profundo de plantas incluyen el método de zanja, el método de monolito y el método de toma de muestras con cilindro. Estos métodos son adecuados para evaluar el enraizamiento profundo en el campo (Nemoto *et al.*, *Breeding Science* 48: 321-324. 1998 (documento no de patentes 20); Masakata Hirayama *et al.*, *Nihon Sakumotsu Gakkai Kiji* (Japanese Journal of Crop Science) 76: 245-252. 2007 (documento no de patentes 21)). El método de zanja es un método que determina el grosor y número de raíces a cada profundidad, después del cultivo de la planta y luego la retirada de tierra del campo. Sin embargo, el método de zanja requiere esfuerzos considerables para retirar tierra, y por tanto no es adecuado para evaluar un gran número de plantas. En el método de monolito, se introducen dos amazonas de hierro en la tierra al pie de la planta cultivada. El monolito cuadrado resultante (por ejemplo, con una anchura de 30 cm x un grosor de 5 cm x una profundidad de 30 cm) se excava, y se extrae un trozo de tierra para evaluar la longitud y el número de raíces a cada profundidad. En el método de toma de muestras con cilindro, se introducen tubos cilíndricos de metal con un diámetro de 5 a 8 cm y una longitud de 30 a 50 cm en la tierra al pie de la planta o entre plantas; y se dejan al descubierto las raíces mediante lavado de las muestras de tierra resultantes para evaluar la longitud y el número de

raíces. La toma de muestras es más sencilla en ambos métodos que en el método de zanja; sin embargo, estos métodos no pueden evaluar con exactitud el estado de las raíces en la tierra porque existen errores de toma de muestras dependiendo del emplazamiento. Como método para evaluar un gran número de plantas en un entorno artificial tal como en un invernadero, se ha desarrollado un método para evaluar el enraizamiento profundo en condiciones de estrés por sequía en el que se plantan y se cultivan plantas en un recipiente de cultivo cilíndrico (con un diámetro de 5 a 10 cm) lleno de un medio de cultivo (documento WO 2006/123392 (documento de patente 8)). Este método ha revelado que el grado de senescencia foliar era menor en cultivos que tenían enraizamiento profundo que en cultivos con enraizamiento poco profundo cuando se expusieron plantas a estrés por sequía disminuyendo el nivel de agua de manera gradual durante el período de cultivo. Tal como se observa a partir del resultado descrito anteriormente, este método evalúa el enraizamiento profundo no directamente sino basándose en la senescencia de la parte aérea. Una ventaja del método es una evaluación sencilla del enraizamiento profundo sin la etapa de lavado de las raíces para retirar la tierra. Sin embargo, en el caso de cultivos cuyas raíces son largas pero se extienden horizontalmente, los cultivos pueden evaluarse erróneamente como que tienen enraizamiento profundo porque sus raíces se extienden hacia abajo junto con el cilindro después de alcanzarlo. Por tanto, aunque este método puede usarse para evaluar la longitud de raíz que es una de las propiedades que constituyen el enraizamiento profundo, es difícil usar este método para evaluar la dirección de crecimiento de las raíces.

Se desarrolló el método de cesta para evaluar trigo (Oyanagi *et al.*, Nihon Sakumotsu Gakkai Kiji (Japanese Journal of Crop Science) 62: 565-570. 1993 (documento no de patentes 22)), como método cuantitativo sencillo para evaluar la dirección de crecimiento de las raíces solo. Además, un informe previo describe que se usó el método de cesta para evaluar plantas de arroz para determinar el enraizamiento profundo (Kato *et al.*, Plant Soil 287: 117-129. 2006 (documento no de patentes 23)). En este método, se llena de tierra una cesta de malla, y se coloca en un campo o una maceta. Después de un determinado período de cultivo, se evalúa el enraizamiento profundo midiendo el ángulo de crecimiento de una raíz que se extiende a través de la cesta con relación a la superficie del terreno. Este método permite una evaluación sencilla del ángulo de crecimiento; sin embargo, requiere más espacio y un extenso control de agua cuando se evalúa un gran número de muestras de una vez con el fin del aislamiento de genes.

En las circunstancias descritas anteriormente, es esencial aislar genes que estén relacionados con el enraizamiento profundo usando variantes naturales y elucidar el efecto de evitación de la sequía de los genes para un desarrollo eficaz de cultivos con una capacidad mejorada de evitación de la sequía.

Dro1 (*Deeper Rooting 1*, enraizamiento más profundo 1) es un QTL relacionado con el enraizamiento profundo, que se predijo estadísticamente que estaba ubicado en el brazo largo del cromosoma 9 mediante análisis de QTL con la línea de progenie (BC₂F₂) resultante del retrocruzamiento del cultivar de arroz de monte de *Japonica* tropical, Kinandang Patong, usando un cultivar de arroz con cáscara *indica* IR64 como planta parental recurrente (Uga *et al.*, The 2nd International Conference on Plant Molecular Breeding. 2007 (documento no de patentes 24); Uga *et al.*, Nihon Ikusyu Gakkai Dai 112 Kai Kouenkai Youshisyu (112nd Meeting of The Japanese Society of Breeding, Program and Abstracts) págs. 188, 2007 (documento no de patentes 25); Uga *et al.*, Dai 27 Kai Ne Kenkyu Syukai (27th Research Meeting of The Japanese Society for Root Research), 2007 (documento no de patentes 26); Uga *et al.* The 5th International Crop Science Congress Abstracts 243 pág. 2008 (documento no de patentes 27)). IR64 es un cultivar difícil para la introducción de genes mediante el método de transformación por *Agrobacterium*. Actualmente, el método de transformación por *Agrobacterium*, en el que se usan tejidos en cultivo desdiferenciados (por ejemplo, callos) como muestra vegetal, se usa habitualmente para plantas de arroz (patente japonesa n.º 2649287 (documento de patente 9)). Con respecto a IR64, sin embargo, el método que usa callos sólo proporciona una eficacia de transformación muy baja. Por tanto, el método de transformación por *Agrobacterium* basado en callos no se ha establecido aún para IR64 (Hiei y Komari, Nature Protocols 3: 824-834. 2008 (documento no de patentes 28)). Hiei y Komari han notificado un método que usa embriones inmaduros en vez de callos como muestra vegetal para lograr la transformación de IR64. Sin embargo, puesto que el método con embriones inmaduros requiere embriones inmaduros después de la antesis, es necesario preparar la planta siempre en un arrozal o en un invernadero de modo que pueda disponerse de embriones inmaduros inmediatamente cuando se necesite. Por ejemplo, pueden plantarse semillas cada dos semanas de modo que se disponga siempre de embriones inmaduros; por tanto, son esenciales un área de cultivo amplia y una mano de obra significativa para mantener las plantas. Por tanto, el establecimiento de la transferencia génica en IR64 basándose en el método de transformación por *Agrobacterium* basado en callos es muy importante para lograr el uso práctico de la mejora genética molecular.

[Documentos de la técnica anterior]

[Documento de patente]

[Documento de patente 1] Documento WO 01/032881 (Plant photosensitive gene Hd1 and use thereof)

[Documento de patente 2] Solicitud de patente japonesa JP-A (Kokai) 2002-153283 (Plant anthesis-inducing gene Hd3a and use thereof)

[Documento de patente 3] Solicitud de patente japonesa JP-A (Kokai) 2003-339382 (Plant anthesis-enhancing gene

Ehd1 and use thereof)

[Documento de patente 4] Solicitud de patente japonesa JP-A (Kokai) 2004-089036 (Plant anthesis-enhancing gene RFT1 and methods for predicting the time de bloom)

[Documento de patente 5] Solicitud de patente japonesa JP-A (Kokai) 2004-290190 (Plant anthesis-controlling gene Lhd4 and use thereof)

[Documento de patente 6] Solicitud de patente japonesa JP-A (Kokai) 2005-110579 (Plant photosensitive gene Hd5 and use thereof)

[Documento de patente 7] Solicitud de patente japonesa JP-A (Kokai) 2007-222129 (Methods for producing plants resistant to environmental stress)

[Documento de patente 8] Documento WO 2006/123392 (Methods for assessing deep rooting of plants)

[Documento de patente 9] Patente japonesa n.º 2649287

[Documento de patente 10] Documento US 2007/039076

[Documento de patente 11] Documento US 2004/123343

[Documento de patente 12] Documento US 2006/123505

[Documento de patente 13] Documento US 2006/253938

[Documento de patente 14] Documento EP 1 886 552

[Documentos no de patentes]

[Documento no de patentes 1] Morita S., (2003) Ne no Dezain (Root design), pág. 107, Yokendo.

[Documento no de patentes 2] Yoshida S. y Hasegawa S. (1982) The rice root system: its development and function. In "Drought resistance in crops with emphasis on rice" International Rice Research Institute, Los Banos, Laguna, Philippines. págs. 97-114.

[Documento no de patentes 3] Morita S., (2000) Ne no Hatsuikugaku (Study on root development) pág. 132, University of Tokyo Press.

[Documento no de patentes 4] Tran L. S., Nakashima K., Shinozaki K., y Yamaguchi-Shinozaki K. (2007) Plant gene networks in osmotic stress response: from genes to regulatory networks. *Methods in Enzymology* 428: 109-28.

[Documento no de patentes 5] Hideo Hirasawa, Hiroshi Nemoto, Tatsuo Suga, Masatoshi Ishihara, Masakata Hirayama, Kazuyuki Okamoto, y Masaru Miyamoto, (1998) Development of "Yumenohatamochi", a highly drought resistant upland rice variety with excellent eating quality, *Breeding Science* 48: 415-419.

[Documento no de patentes 6] Morita M. T., Tasaka M. (2004) Gravity sensing and signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 7(6): 712-718.

[Documento no de patentes 7] Haga K., Takano M., Neumann R., Iino M. (2005) The Rice COLEOPTILE PHOTOTROPISM1 gene encoding an ortholog of Arabidopsis NPH3 is required for phototropism of coleoptiles and lateral translocation of auxin. *Plant Cell* 17(1): 103-115.

[Documento no de patentes 8] Kobayashi A., Takahashi A., Kakimoto Y., Miyazawa Y., Fujii N., Higashitani A., Takahashi H. (2007) A gene essential for hydrotropism in roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(11): 4724-4729.

[Documento no de patentes 9] Miyazawa Y., Takahashi A., Kobayashi A., Kaneyasu T., Fujii N., Takahashi H. (2009) GNOM-mediated vesicular trafficking plays an essential role in hydrotropism of Arabidopsis roots. *Plant Physiology* 149(2): 835-840.

[Documento no de patentes 10] Inukai Y., Sakamoto T., Ueguchi-Tanaka M., Shibata Y., Gomi K., Umemura I., Hasegawa Y., Ashikari M., Kitano H., Matsuoka M. (2005) Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *Plant Cell* 17(5): 1387-1396.

[Documento no de patentes 11] Tuberosa R., Sanguineti M. C., Landi P., Giuliani M. M., Salvi S., Conti S. (2002)

Identification of QTLs for root characteristics in maize grown in hydroponics and analysis of their overlap with QTLs for grain yield in the field at two water regimes. *Plant Molecular Biology* 48: 697-712.

5 [Documento no de patentes 12] Trachsel S., Messmer R., Stamp P., Hund A. (2009) Mapping of QTLs for lateral and axile root growth of tropical maize. *Theoretical and Applied Genetics* DOI 10.1007/s00122-009-1144-9.

10 [Documento no de patentes 13] Uga Y., Ebana K., Abe J., Morita S., Okuno K., Yano M. (2009) Variation in root morphology and anatomy among accessions of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) with different genetic backgrounds. *Breeding Science* 59: 87-93.

[Documento no de patentes 14] Price A. H., Cairns J. E., Horton P., Jones H. G., Griffiths H. (2002) Linking droughtresistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. *Journal of Experimental Botany* 53: 989-1004.

15 [Documento no de patentes 15] Courtois B., Shen L., Petalcorin W., Carandang S., Mauleon R. Li Z. (2003) Locating QTLs controlling constitutive root traits in the rice population IAC 165 x Co39. *Euphytica* 134: 335-345.

20 [Documento no de patentes 16] Zheng B. S., Yang L., Zhang W. P., Mao C. Z., Wu Y. R., Yi K. K., Liu F. Y., Wu P. (2003) Mapping QTLs and candidate genes for rice root traits under different water-supply conditions and comparative analysis across three populations. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1505-1515.

25 [Documento no de patentes 17] Li Z., MuP. , Li C., Zhang H., Li Z., Gao Y., Wang X. (2005) QTL mapping of root traits in a doubled haploid population from a cross between upland and lowland japonica rice in three environments. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 1244-1252.

[Documento no de patentes 18] Omori F., Mano Y. (2007) QTL mapping of root angle in F2 populations from maize 'B73' x teosinte 'Zea luxurians'. *Plant Root* 1: 57-65.

30 [Documento no de patentes 19] Yadav R., Courtois B., Huang N., McLaren G. (1997) Mapping genes controlling root morphology and root distribution in a doubled-haploid population of rice. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 619-632.

35 [Documento no de patentes 20] Nemoto, H., Suga, R., Ishihara M., Okutsu Y. (1998) Deep rooted rice varieties detected through the observation of root characteristics using the trench method. *Breeding Science* 48: 321-324.

40 [Documento no de patentes 21] Masakata Hirayama, Hiroshi Nemoto y Hideo Hirasawa (2007) Hojosaibaisita Nakate Okute Jukuki Nippon Rikutou Hinshu no Konkei Hattatsu Teido to Taikansei tono Kankei (Relation between the degree of root system development and drought resistance in field-cultivated medium maturing and late maturing Japanese upland rice varieties), *Nihon Sakumotsu Gakkai Kiji* (Japanese Journal of Crop Science) 76: 245-252.

[Documento no de patentes 22] Oyanagi A., Nakamoto T., Wada M. (1993) Relationship between root growth angle of seedlings and vertical distribution of roots in the field in wheat cultivars. *Nihon Sakumotsu Gakkai Kiji* (Japanese Journal of Crop Science) 62: 565-570.

45 [Documento no de patentes 23] Kato Y., Abe J., Kamoshita A., Yamagishi J. (2006) Genotypic variation in root growth angle in rice (*Oryza sativa* L.) and its association with deep root development in upland fields with different water regimes. *Plant Soil* 287: 117-129.

50 [Documento no de patentes 24] Uga Y., K. Okuno y M. Yano (2007) Relationship between QTLs for vascular system and vertical distribution of roots on chromosome 9 of rice. *The 2nd International Conference on Plant Molecular Breeding*.

55 [Documento no de patentes 25] Yusaku Uga, Kazutoshi Okuno y Masahiro Yano, (2007) Ine Dai 9 Sensyokutai jyouni Miidasareta Shinkonsei nikansuru QTL (QTL involved in the deep rooting, found on rice chromosome 9), *Nihon Ikusyu Gakkai Dai 112 Kai Kouenkai Youshisyu* (112nd Meeting of The Japanese Society of Breeding, Program and Abstracts) 188 p.

60 [Documento no de patentes 26] Yusaku Uga, Kazutoshi Okuno y Masahiro Yano, (2007) Ine Shinkonsei kanren Idenshiza Dro2 no Fain Mappingu (Fine mapping of rice deep rooting-related locus Dro1), *Dai 27 Kai Ne Kenkyu Syukai* (27th Research Meeting of The Japanese Society for Root Research).

[Documento no de patentes 27] Uga Y., K. Okuno y M. Yano (2008) Fine mapping of a deeper-rooting QTL, Dro1, on chromosome 9 in rice. *The 5th International Crop Science Congress Abstracts* 243 p.

65 [Documento no de patentes 28] Hiei Y., Komari T (2008) Agrobacterium-mediated transformation of rice using

immature embryos or calli induced from mature seed. Nature Protocols 3: 824-834.

[Documento no de patentes 29] Yano M., 2nd International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources (Italy), 24 de abril de 2010

[Documento no de patentes 30] Yano M., Gatersleben Lecture (Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (Germany), 29 de abril de 2010

[Documento no de patentes 31] Yano M., Third International Conference of Plant Molecular Breeding, 7 de septiembre de 2010

[Documento no de patentes 32] Yusaku Uga, Nihon Ikusyu Gakkai Dai 118 Kai Kouenkai (118th Meeting of The Japanese Society of Breeding), Sept. 24, 2010; Ikusyugaku Kenkyu Dai 12 Gou Bessatsu 2 Gou (Breeding Research No. 12, suplemento n.º 2), pág. 21

[Documento no de patentes 33] Yusaku Uga, CIAT (International Center of Tropical Agriculture, Colombia) niokeru Teiki Semina (Regular Meeting of CIAT), 29 de octubre de 2010

[Documento no de patentes 34] BASE DE DATOS Geneseq, GSN: AQD24617

[Documento no de patentes 35] BASE DE DATOS UNIPROT: Q69P88

[Documento no de patentes 36] BASE DE DATOS UNIPROT: C5XDP7

[Documento no de patentes 37] BASE DE DATOS EMBL, EM_STD: EU969762

Sumario de la invención

[Problemas que van de resolverse mediante la invención]

La presente invención se logró en vista de las circunstancias anteriores. Un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para alterar la morfología de las raíces de plantas para conferir resistencia a la sequía a plantas mejorando la capacidad de evitación de la sequía. Más específicamente, un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para conferir un rasgo de enraizamiento profundo a plantas, plantas transformadas que tienen un rasgo de enraizamiento profundo, métodos para producir tales plantas, y métodos para evaluar si una planta tiene o no un rasgo de enraizamiento profundo.

[Medios para resolver los problemas]

Una región candidata para Dro1 está ubicada dentro de una región cromosómica de 1.443 kpb entre los marcadores de inserción-delección (InDel) ID07_14 y ID07_17 (basándose en la secuencia de nucleótidos en Nipponbare). Se ha predicho que la región contiene 166 genes de RAP-DB. No se ha probado que estos genes incluyan ningún gen notificado previamente que está relacionado con el enraizamiento profundo de planta de arroz u otras plantas, u homólogos de las mismas. Por tanto, sería imposible predecir candidatos a gen basándose en las funciones de los supuestos genes. Además, puesto que no se habían determinado las secuencias de nucleótidos de los dos cultivos, IR64 y Kinandang Patong, era difícil predecir genes basándose en las diferencias en las secuencias de nucleótidos de estos genes. En las circunstancias descritas anteriormente, los presentes inventores tenían como objetivo identificar y aislar el gen Dro1. En primer lugar, usando una población de segregación a gran escala de aproximadamente 4.500 plantas, los presentes inventores realizaron un análisis de ligamiento de alta resolución para el locus (locus Dro1) responsable de la determinación del enraizamiento profundo detectado en plantas del cruzamiento de IR64, un cultivar de arroz con enraizamiento poco profundo, con Kinandang Patong, un cultivar de arroz con enraizamiento profundo. Se mejoró un método de cesta convencional para someter a prueba varios cientos de plantas de una vez para determinar su razón de enraizamiento profundo (porcentaje de raíces que penetraron en el área inferior de la cesta con relación al número total de raíces que penetraron en la cesta). Esto permitió el examen de 500 plantas de una vez. Sin embargo, fue imposible examinar de una vez un mayor número de plantas que el anterior. Se seleccionaron varias líneas de un grupo de líneas híbridas seleccionadas de la población a gran escala, y se estrechó la región candidata poco a poco usando los datos de fenotipo/genotipo para 40 plantas por línea. Tras el estrechamiento de la región candidata de la región de 1.443 kpb a aproximadamente 100 kpb, los inventores construyeron y examinaron bibliotecas de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) de IR64 y Kinandang Patong que cubrían la región candidata de 100 kpb. Se analizaron los dos BAC para los cultivos para identificar sus secuencias de nucleótidos. Para considerar si es posible limitar los genes candidatos mediante comparación de secuencias de nucleótidos, se compararon las secuencias de nucleótidos de genes predichos por RAP-DB para los dos cultivos. Sin embargo, muchos genes tienen mutaciones en sus secuencias de nucleótidos de exón, y por tanto fue imposible limitar los genes candidatos. Luego, los presentes inventores realizaron análisis

de ligamiento para un total de cinco veces, mientras se producían marcadores de ADN basándose en mutaciones en la secuencia de nucleótidos de la región candidata. Como resultado, se limitó la región del gen *Dro1* a una región de 6,0 kpb entre el marcador de inserción-delección (InDel) *Dro1-INDEL09* (cebador 5'-GCAGACGCTCGTAACACGTA-3' ((SEQ ID NO: 4) y cebador 5'-GTGGCAGCTCCATCAACTCT-3' (SEQ ID NO: 5)) y el marcador de secuencias polimórficas amplificadas escindidas (CAPS) *Dro1-CAPS05* (cebador 5'-GCACAAGATGGGAGGAGAGT-3' (SEQ ID NO: 6) y cebador 5'-CATGGGTGAGAATCGTGTG-3' (SEQ ID NO: 7); se trató el ADN amplificado con la enzima de restricción *HinfI*). Esta región sólo contiene un único supuesto gen predicho en RAP-DB. Se dedujo que el supuesto gen codificaba para una proteína con función desconocida. Puesto que es muy difícil transformar IR64, antes de realizar una prueba de complementación usando el método de transformación, se evaluó si el gen predicho está realmente relacionado con el enraizamiento profundo. En primer lugar, para evaluar si el gen tiene una función relacionada con el enraizamiento profundo, se predijo su función basándose en la secuencia de aminoácidos del supuesto gen en los siguientes y diversos sitios web para búsqueda funcional:

“base de datos SALAD”: Base de datos para la comparación de genoma completo de secuencias de proteínas de plantas (salad.dna.affrc.go.jp/salad/)

“Pfam”: base de datos de dominios de proteínas (pfam.janelia.org/)

“PSORT”: Sitio para predecir la localización e hidrofobicidad de proteínas (www.psорт.org/)

“InterPro”: Base de datos para familias de proteínas, dominios, sitios funcionales (www.ebi.ac.uk/interpro/) Sin embargo, no pudo hallarse ni un dominio conservado usando cualquiera de estos sitios. Entonces, se examinó el gen para revelar si sus exones tienen variaciones de secuencia de nucleótidos entre IR64 y Kinandang Patong. El resultado mostró que IR64 tenía una delección de 1 b en el exón 4 mientras que Kinandang Patong tenía una adenina en la misma posición. Esta delección de 1 b provoca un desplazamiento del marco, dando como resultado un codón de terminación prematuro. Los presentes inventores sospechaban que la delección reducía el nivel de expresión del gen candidato en IR64. Por tanto, se evaluó el nivel de expresión usando limbos foliares y una parte superior de la vaina foliar, una parte basal de la vaina foliar, y raíces de la corona de IR64 y Kinandang Patong en los días 6 y 12 después de la germinación. Se extrajo el ARN total de los tres tipos de tejidos, y se determinó el nivel de expresión génica mediante PCR en tiempo real. El resultado mostró que en estos dos cultivos, el gen se expresó en la parte basal de la vaina foliar pero apenas se expresó tanto en la raíz de la corona como en el limbo foliar/parte superior de la vaina foliar. Se compararon los niveles de expresión entre IR64 y Kinandang Patong. Las muestras demostraron que la diferencia entre los dos cultivos fue sólo menor que el doble en los días 6 y 12. No pudo considerarse si el gen predicho era el verdadero gen *Dro1* a partir del resultado sobre el nivel de expresión. No obstante, el gen siguió siendo un candidato, porque la parte basal de la vaina foliar contenía el primordio de raíz de la corona, que es el rudimento de raíz de la corona, o alternativamente porque la función del gen era potencialmente diferente entre los dos cultivos a nivel de aminoácidos.

A continuación, se evaluó si el gen está relacionado con enraizamiento profundo basándose en la correlación entre la razón de enraizamiento profundo y la delección de 1 b en el exón 4. Se analizaron sesenta y cuatro cultivos incluyendo IR64 y Kinandang Patong, 22 líneas de cultivar IR desarrolladas por the International Rice Research Institute (Los Baños, Filipinas; IR64 es también una variedad desarrollada por este Instituto), y 20 líneas de tipo natural (siete líneas de *Oryza nivara*, doce líneas de *O. rufipogon* y una línea de *O. meridionalis*) para determinar sus secuencias de nucleótidos alrededor del sitio de la delección de 1 b. La comparación de secuencias de nucleótidos reveló que IR64 solo contenía la delección de 1 b del exón 4. Por tanto, no pudo considerarse si el gen predicho era el verdadero gen *Dro1* basándose en la correlación entre la delección de 1 b y la razón de enraizamiento profundo.

La secuencia de nucleótidos de ADN complementario a *Dro1* (ADNc) se analizó por completo para 14 variedades de *japonica* incluyendo Kinandang Patong. La secuencia de nucleótidos era idéntica entre todas las variedades. Mientras tanto, la razón de enraizamiento profundo determinada mediante el método de cesta varió enormemente entre el 15,9% (como mínimo por Tupa729) y el 83,1% (como máximo por Kinandang Patong). Esto podría explicarse por la presencia de otros QTL responsables del enraizamiento profundo. Alternativamente, algunas diferencias en la secuencia de nucleótidos de la región promotora podrían afectar a la regulación de la expresión génica. Por tanto, se comparó la secuencia de nucleótidos de hasta aproximadamente 2,2 kb en el sentido de 5' (hasta el extremo 5' de la región candidata) entre Kinandang Patong y Nipponbare. Se hallaron mutaciones en dos sitios. Uno está ubicado 1.250 pb en el sentido de 5' de la región no traducida en 5'; el nucleótido en esta posición es timina en la secuencia de nucleótidos de Nipponbare, y se sustituye por guanina en Kinandang Patong. Se analizó la secuencia adyacente a la mutación en PLACE (una base de datos de elementos de ADN reguladores de acción en *cis* de plantas; www.dna.affrc.go.jp/PLACE/), un sitio web para la búsqueda de regiones promotoras para elementos en *cis*. Este análisis reveló que se sustituyó timina por guanina en un motivo denominado “caja GATA”. La otra mutación era una delección de 30 pb desde 1.189 pb hasta 1.218 pb en el sentido de 5' de la región no traducida en 5' en Kinandang Patong. Estas mutaciones en la secuencia de nucleótidos eran una causa potencial de la mutación de enraizamiento profundo entre los cultivos.

Se ha depositado un ADNc de longitud completa para el gen de Nipponbare predicho en la región de 6,0 kpb como

AK068870. Por tanto, se realizó una búsqueda en el sistema de captura FOX (sistema de captura de genes que sobreexpresan ADNc de longitud completa) para detectar el gen de Nipponbare. Como resultado, la búsqueda reveló dos líneas de generación T1 y dos líneas de generación T2. Entonces, se determinó la razón de enraizamiento profundo para las cuatro líneas usando cinco plantas por línea. Se demostró que varias plantas tenían
 5 tienen una razón de enraizamiento profundo significativamente mayor que la de Nipponbare (tipo natural) como control. Este resultado aumenta la probabilidad de que el gen predicho sea el verdadero gen Dro1. Para verificar que el gen predicho es absolutamente el verdadero gen Dro1, los presentes inventores produjeron transformantes mediante la introducción en callos de IR64 de un vector que porta el gen predicho (gen Dro1 de tipo Kinandang Patong). La eficacia de transformación fue de 1/10 o menor que la de un cultivar transformado convenientemente tal
 10 como Nipponbare. Por tanto, los presentes inventores llevaron a cabo la transferencia de genes después de la preparación de más de diez veces el número de callos para la transformación. Se evaluaron los transformantes de plantas resultantes para determinar su razón de enraizamiento profundo. Se demostró que las plantas transformadas con el gen predicho tenían una mayor razón de enraizamiento profundo.

15 Estos dos experimentos descritos anteriormente mostraron que el gen predicho en la región candidata de 6,0 kpb era el verdadero Dro1. Por tanto, los presentes inventores identificaron y aislaron satisfactoriamente por primera vez el gen de enraizamiento profundo Dro1.

20 Además, usando IR64 y una línea casi isogénica (Dro1-NIL) que tiene el mismo contexto genético que IR64 excepto la región adyacente a Dro1 que se reemplazó por la de Kinandang Patong, los presentes inventores evaluaron si el enraizamiento profundo debido a Dro 1 está relacionado con la mejora de la resistencia a la sequía. El resultado demostró que Dro 1-NIL se volvía resistente a la sequía como resultado del enraizamiento profundo, lo que condujo a un aumento significativo del rendimiento con relación a IR64.

25 La presente invención proporciona el contenido definido en las reivindicaciones.

Basándose en los hallazgos descritos anteriormente, la presente invención o descripción proporciona, respectivamente:

30 [1] un ADN de uno cualquiera de (a) a (e) a continuación:

(a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;

35 (b) un ADN que comprende una región codificante de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 y 17;

(c) un ADN que codifica para una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15;

40 (d) un ADN que hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 y 17, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta; o

45 (e) un ADN que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta;

50 [2] el ADN de [1], en el que la planta es una monocotiledónea;

[3] el ADN de [2], en el que la monocotiledónea es una planta gramínea;

55 [4] el ADN de [3], en el que la planta gramínea se selecciona del grupo que consiste en arroz, variedad de trigo (trigo, cebada, centeno, avena, y lágrimas de Job (*hatomugi*)), maíz, mijo, mijo menor, mijo japonés, sorgo, mijo africano, mijo perla, tef, caña de azúcar, fleo de los prados, poa de los prados, dátilo ramoso, ballico italiano, ballico perenne, festuca cañosa y grama dulce;

[5] el ADN de [3], en el que la planta gramínea se selecciona del grupo que consiste en arroz, sorgo y maíz;

60 [6] un vector que comprende el ADN de uno cualquiera de [1] a [5];

[7] una célula transformada que alberga el ADN de uno cualquiera de [1] a [5] de manera expresable;

65 [8] una planta transformada con el ADN de uno cualquiera de [1] a [5], que tiene un fenotipo de enraizamiento profundo;

- [9] una planta transformada producida mediante la introducción en una célula vegetal del ADN de uno cualquiera de [1] a [5] o el vector de [6], que tiene un fenotipo de enraizamiento profundo;
- 5 [10] una planta transformada que se obtiene mediante las etapas de (a) a (d) a continuación:
- (a) introducir en una célula vegetal el ADN de uno cualquiera de [1] a [5] o el vector de [6];
- (b) determinar el número de copias del ADN de uno cualquiera de [1] a [5] en la célula vegetal de la etapa (a);
- 10 (c) seleccionar una célula vegetal transformada que contiene el ADN o vector introducido en una única copia; y
- (d) regenerar una planta a partir de la célula vegetal transformada seleccionada en la etapa (c), y que tiene un fenotipo de enraizamiento profundo;
- 15 [11] la planta de uno cualquiera de [8] a [10], en el que la planta es una monocotiledónea;
- [12] la planta de [11], en el que la monocotiledónea es una planta gramínea;
- 20 [13] la planta de [12], en el que la planta gramínea se selecciona del grupo que consiste en arroz, variedad de trigo (trigo, cebada, centeno, avena, lágrimas de Job (*hatomugi*)), maíz, mijo, mijo menor, mijo japonés, sorgo, mijo africano, mijo perla, tef, caña de azúcar, fleo de los prados, poa de los prados, dáctilo ramoso, ballico italiano, ballico perenne, festuca cañosa y grama dulce;
- 25 [14] la planta de [12], en el que la planta gramínea se selecciona del grupo que consiste en arroz, sorgo y maíz;
- [15] una planta transformada que es una progenie o un clon de la planta transformada de uno cualquiera de [8] a [14];
- 30 [16] una célula aislada de la planta transformada de uno cualquiera de [8] a [15];
- [17] un material de propagación de la planta transformada de uno cualquiera de [8] a [15];
- [18] un órgano aislado de la planta transformada de uno cualquiera de [8] a [15];
- 35 [19] un alimento procesado preparado a partir de al menos uno de la célula de [16], el material de propagación de [17] y el órgano de [18];
- [20] un método para producir la planta transformada de uno cualquiera de [8], y [11] a [13], que comprende las etapas de introducir en una célula vegetal el ADN de uno cualquiera de [1] a [5] o el vector de [6], y regenerar una planta a partir de la célula vegetal;
- 40 [21] el método de [20], que comprende además la etapa de seleccionar una célula vegetal transformada o planta transformada, que tiene el ADN de uno cualquiera de [1] a [5] en una única copia;
- 45 [22] un método para evaluar si una planta tiene un fenotipo de enraizamiento profundo, en el que se considera que una planta de prueba tiene un fenotipo de enraizamiento profundo cuando el peso molecular o la secuencia de nucleótidos es idéntico/idéntica, y que comprende las etapas de (a) a (c) a continuación:
- 50 (a) preparar una muestra de ADN a partir de una planta de prueba;
- (b) amplificar a partir de la muestra de ADN una región que comprende el ADN de uno cualquiera de [1] a [5]; y
- (c) comparar el peso molecular o la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN amplificado con el del
- 55 ADN de uno cualquiera de [1] a [5];
- [23] un método para evaluar si una planta tiene un fenotipo de enraizamiento profundo, en el que se considera que una planta de prueba tiene un fenotipo de enraizamiento profundo cuando se obtiene un producto amplificado, que comprende la etapa de llevar a cabo PCR con un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9 usando un ADN genómico preparado a partir de la planta de prueba como molde;
- 60 [24] un método para evaluar si una planta tiene un fenotipo de enraizamiento profundo, en el que se considera que una planta de prueba no tiene un fenotipo de enraizamiento profundo cuando se obtiene un producto amplificado, que comprende la etapa de llevar a cabo PCR con un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ
- 65

ID NO: 10 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 usando un ADN genómico preparado a partir de la planta de prueba como molde;

5 [25] un método para seleccionar una planta que tiene un fenotipo de enraizamiento profundo, que comprende las etapas de (a) y (b) a continuación:

(a) producir un cultivar mediante cruzamiento de una planta arbitraria con una planta que tiene un fenotipo de enraizamiento profundo; y

10 (b) evaluar mediante el método de uno cualquiera de [22] a [24] si una planta obtenida en la etapa (a) tiene un fenotipo de enraizamiento profundo;

[26] una proteína codificada por el ADN de uno cualquiera de [1] a [5];

15 [27] un anticuerpo que se une a la proteína de [26];

[28] un ADN que comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos complementarios al ADN de uno cualquiera de [1] a [5] o una secuencia complementaria de los mismos; y

20 [29] un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 4 a 11.

[Efectos de la invención]

25 Se usaron el gen Dro1, que controla el enraizamiento profundo de plantas tales como plantas de arroz, y plantas transformadas con el gen en la presente invención. El gen en relación con la presente invención puede usarse para manipular la morfología del sistema radicular de la planta de un enraizamiento poco profundo a un enraizamiento profundo o de un enraizamiento profundo a un enraizamiento poco profundo. Específicamente, puede conferirse resistencia a la sequía mejorando la capacidad de evitación de la sequía, por ejemplo, manipulando el gen Dro1 para convertir una planta con enraizamiento poco profundo en una planta con enraizamiento profundo. Las sequías han provocado graves reducciones en el rendimiento de los cultivos mundiales. Las principales empresas extranjeras se han centrado en el desarrollo de plantas de cultivo tolerantes a la sequía. Por otro lado, puede conferirse resistencia a la humedad a través de la conversión de una planta con enraizamiento profundo en una con enraizamiento poco profundo manipulando el gen Dro1. En Japón, el cambio en la política agrícola recomienda el cultivo de monte en campos de arroz con barbecho. Sin embargo, puesto que los arrozales tienen escasa eficacia de drenaje, el daño por humedad ha sido problemático para la soja y el maíz sin resistencia a la humedad. Por tanto, se ha estudiado la conversión de plantas de cultivo en un tipo con enraizamiento poco profundo con el objetivo de mejorar la resistencia a la humedad. En estas circunstancias internacionales y nacionales, es muy importante desarrollar variedades de plantas de cultivo que sean resistentes a la sequía o al daño por humedad usando genes que controlan la morfología de las raíces de plantas.

40 **Breve descripción de los dibujos**

45 La figura 1 presenta una fotografía que muestra la evaluación de cada linaje para el enraizamiento profundo usando un método de cesta mejorado. Se une un anillo a una cesta de acero inoxidable. Se dispone el anillo en una posición de modo que se considera que las raíces son raíces profundas cuando se alargan en un ángulo de 50 grados o más profundo con respecto a la superficie del terreno. En cada leyenda, las abreviaturas primera y segunda se refieren al nombre del linaje y la generación, respectivamente.

50 La figura 2 presenta un gráfico que muestra la distribución de la razón de enraizamiento profundo en la generación T0 de los transformantes de IR64 a los que se les introdujo un vector que porta Dro1 o el vector solo.

55 La figura 3 presenta gráficos que muestran la relación entre la razón de enraizamiento profundo y la intensidad de señal (PCR en tiempo real) según el número de copias del vector de transformación en la generación T1 de los transformantes de IR64 a los que se les introdujo un vector que porta Dro1 o el vector solo. Una única copia y múltiples copias se refieren a un linaje al que se le introdujo sólo una única copia de Dro 1 y un linaje al que se le introdujeron múltiples copias de Dro1 en la generación T0, respectivamente. En la generación T1, el linaje de una única copia se separa en el tipo nulo (0 copias), heterocigoto (una copia) y homocigoto (dos copias), y las intensidades de señal se agrupan en tres tipos según el número de copias. Sin embargo, a diferencia del análisis de tipo Southern, la PCR en tiempo real, en principio, no siempre proporciona la misma intensidad de señal aunque el número de copias sea igual entre las plantas. La abreviatura en cada gráfico muestra el número de linaje para el clon respectivo.

60 La figura 4 presenta un gráfico que muestra las distribuciones de la razón de enraizamiento profundo en el linaje Fox y Nipponbare.

65

La figura 5 presenta un diagrama que muestra el resultado de analizar los ortólogos de sorgo y maíz. Dro1, arroz (Kinandang Patong); SbDro1L1, ortólogo de sorgo de Dro1; ZmDro1L1, ortólogo de maíz de Dro1.

5 La figura 6 presenta fotografías que muestran la comparación del enraizamiento profundo de Dro1-NIL con el de IR64 y Kinandang Patong en un campo. La numeración en blanco muestra la profundidad del suelo por debajo de la superficie del terreno. La línea discontinua blanca indica un esquema del área de distribución del sistema radicular.

10 La figura 7 presenta un gráfico que muestra el transcurso temporal del potencial hídrico del suelo en el campo experimental para una prueba de resistencia a la sequía. "Irrigado" y "sequía" indican el área de irrigación y el área de estrés por sequía, respectivamente. Se muestran entre paréntesis las profundidades del suelo en las que se monitorizó el potencial hídrico. A una profundidad del suelo de 25 cm en el área de estrés por sequía, se observa un rápido avance de la desecación del suelo aproximadamente 70 días después de la siembra.

15 La figura 8 presenta fotografías que muestran la diferencia dependiente del tiempo en la resistencia al enrollamiento de las hojas entre IR64 y Dro1-NIL en condiciones de estrés por sequía. Las fotografías de plantas son vistas tomadas directamente desde arriba. Los números de días mostrados en la parte superior de la figura son los días de tratamiento con estrés después de terminarse la irrigación en el área de estrés por sequía.

20 La figura 9 presenta gráficos y fotografías que muestran diferencias en la temperatura de las hojas, conductancia estomática y tasa de fotosíntesis entre IR64 y Dro1-NIL en condiciones de estrés por sequía. A muestra una imagen visible de plantas de arroz 35 días después de la terminación de la irrigación. Las líneas primera y segunda de la derecha son IR64; la tercera y cuarta son Dro1-NIL. B muestra una imagen que muestra la distribución de temperatura de las plantas de arroz 35 días después de la terminación de la irrigación (una imagen de termografía por infrarrojos tomada para las mismas plantas mostradas en A). Las líneas primera y segunda de la derecha son IR64; la tercera y cuarta son Dro1-NIL. La diferencia de color implica lo siguiente: a medida que el color es más cálido, la temperatura es mayor; a medida que el color es más frío, la temperatura es menor. Esta fotografía sugiere que la temperatura de las hojas es diferente entre IR64 y Dro1-NIL (la temperatura de las hojas de Dro1-NIL es en promedio 0,7°C menor que la de IR64). Los colores fríos se distribuyen más ampliamente en Dro1-NIL, lo que sugiere que la temperatura de las hojas de Dro1-NIL es menor que la de IR64. C muestra cambios en la temperatura de las hojas de Dro1-NIL después de la terminación de la irrigación en el área de estrés por sequía. Los valores son con relación a la temperatura de las hojas de IR64 y se determinaron restando la temperatura media de las hojas de IR64 de la de Dro1-NIL. Se encontró que la temperatura de las hojas de Dro1-NIL era menor que la de IR64 en cada fecha de medición. D muestra la diferencia en la conductancia estomática entre IR64 y Dro1-NIL después de la terminación de la irrigación en el área de estrés por sequía. * indica que la conductancia estomática de Dro1-NIL es significativamente mayor que la de IR64 a un nivel del 5%. E muestra la diferencia en la tasa de fotosíntesis entre IR64 y Dro1-NIL después de la terminación de la irrigación en el área de estrés por sequía. * indica que la tasa de fotosíntesis de Dro1-NIL es significativamente mayor que la de IR64 a un nivel del 5%.

40 La figura 10 presenta diagramas y fotografías que muestran resultados de la determinación del rendimiento para IR64 y Dro1-NIL cultivados en condiciones de estrés por sequía. A muestra diversas diferencias fenotípicas entre IR64 y Dro1-NIL cosechados, que se hicieron crecer en el área de estrés por sequía. La barra vertical indica la desviación estándar. *, ** o *** indica que Dro1-NIL es significativamente más grande que IR64 a un nivel del 5%, el 1% o el 0,1%, respectivamente. B presenta fotografías que muestran las panículas promedio de IR64 y Dro1-NIL cosechadas en el área de estrés por sequía.

45 La figura 11 presenta fotografías que muestran una vista lateral del campo experimental diseccionado para someter a prueba la resistencia a la sequía, que muestra diferencias en la distribución del sistema radicular entre IR64 y Dro1-NIL en un área de estrés por sequía. El panel superior para cada linaje muestra una vista en sección del campo experimental, y el panel inferior muestra una imagen ampliada obtenida mediante la retirada por lavado de la capa superficial adicional para observar si las raíces penetraron en el estrato de grava. Las puntas de flecha indican raíces de Dro1-NIL que han penetrado en el estrato de grava. Se muestra que en IR64, no había ninguna raíz que penetrase en el estrato de grava y alcanzase la capa más profunda, pero en Dro1-NIL, muchas raíces penetraron en el estrato de grava y alcanzaron la capa más profunda.

55 La figura 12 presenta un gráfico que muestra el transcurso temporal del potencial hídrico en el suelo del campo.

La figura 13 presenta fotografías que muestran la aparición de plantas 120 días después de la siembra en áreas del campo con o sin fertilización. Los paneles superiores muestran la vista global que incluye las áreas respectivas. Los paneles inferiores son fotografías tomadas desde arriba como imágenes ampliadas de las áreas respectivas. En IR64, se observa enrollamiento de las hojas tanto en las áreas con fertilización como sin ella. Mientras tanto, Dro1-NIL no muestra enrollamiento de las hojas.

60 La figura 14 presenta una fotografía que muestra resultados de marcadores de PCR para evaluar la delección del gen Dro1. A cada temperatura de apareamiento, los carriles izquierdo y derecho muestran los resultados para IR64 y Kinandang Patong, respectivamente.

65

[Modo para llevar a cabo la invención]

Se proporciona un ADN de uno cualquiera de (a) a (e) a continuación:

(a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;

(b) un ADN que comprende la región codificante de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 y 17;

(c) un ADN que codifica para una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15;

(d) un ADN que hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 y 17, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta; o

(e) un ADN que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta.

A continuación en el presente documento, ocasionalmente, los ADN descritos anteriormente también se denominan "ADN en el contexto de la presente invención" o "gen Dro1". Mientras tanto, una proteína codificada por un ADN en el contexto de la presente invención se denomina a veces "proteína en el contexto de la presente invención" o "proteína Dro1".

En el presente documento, "comprender" también se refiere tanto a "comprender" como a "consistir en".

Mientras tanto, el ADN de (e) anterior también puede denominarse:

(e) un ADN que codifica para una proteína que tiene al menos una mutación seleccionada de una o más sustituciones, deleciones, adiciones e inserciones de aminoácido en el aminoácido de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15, y que tiene la actividad de conferir un rasgo de enraizamiento profundo a una planta.

Además, un ADN en el contexto de la presente invención puede denominarse "ADN aislado".

La secuencia de nucleótidos de ADN genómico para el gen Dro1 del cultivar de arroz Kinandang Patong se muestra en SEQ ID NO: 1; la secuencia de nucleótidos del ADNc se muestra en SEQ ID NO: 2; y la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por las regiones codificantes de las secuencias de nucleótidos (proteína Dro1) se muestra en SEQ ID NO: 3.

La región que codifica para una proteína en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 consiste en los nucleótidos en las posiciones 264 a 2.685.

Mientras tanto, la región que codifica para una proteína en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 consiste en los nucleótidos en las posiciones 264 a 1019.

Además, la secuencia de nucleótidos del gen Dro1 y en el sentido de 5' incluyendo la región promotora de Kinandang Patong se muestra en SEQ ID NO: 17. En comparación con la secuencia de la región equivalente en Nipponbare (SEQ ID NO: 18), la secuencia en Kinandang Patong (SEQ ID NO: 17) contiene una sustitución de un solo nucleótido y una deleción de 30 nucleótidos aproximadamente 1,2 kb en sentido de 5' del gen Dro1. Específicamente, "T" del motivo "GATA" (el nucleótido en la posición 6 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 18) en Nipponbare se sustituye por "G" en Kinandang Patong (el nucleótido en la posición 6 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17). Además, los 30 nucleótidos en las posiciones 7 a 36 en SEQ ID NO: 18 están delecionados en la región correspondiente de Kinandang Patong.

La secuencia de nucleótidos de la secuencia codificante (CDS) en el gen Dro1 derivado de sorgo se muestra en SEQ ID NO: 12, mientras que la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la región codificante de la secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ ID NO: 13.

La región codificante de proteína de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 12 (secuencia CDS) consiste en los nucleótidos en las posiciones 1 a 789.

La secuencia de nucleótidos de CDS en el gen Dro1 derivado de maíz se muestra en SEQ ID NO: 14, mientras que

la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la región codificante de la secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ ID NO: 15.

5 La región codificante de proteína de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14 (secuencia CDS) consiste en los nucleótidos en las posiciones 1 a 768.

10 El gen Dro1 en relación con la presente invención tiene la actividad de conferir un rasgo de enraizamiento profundo a una planta. En el presente documento, el “rasgo de enraizamiento profundo” se refiere a la naturaleza de que la raíz, un órgano bajo tierra de la planta, se extiende en el suelo con un ángulo profundo con relación a la superficie del terreno. En el presente documento, “un ángulo profundo” significa que el ángulo de una raíz con respecto a la superficie del terreno es de al menos 50°, preferiblemente 60°, más preferiblemente 70°, y aún más preferiblemente 80° o más.

15 Puede confirmarse si un ADN tiene la actividad de conferir un rasgo de enraizamiento profundo a una planta mediante la preparación de una planta transformada con el gen Dro1 y la determinación del ángulo de la planta con relación a la superficie del terreno. Pueden evaluarse plantas para determinar el ángulo con relación a la superficie del terreno, por ejemplo, mediante el método de cesta y un método de cesta mejorado descrito en los ejemplos en el presente documento así como mediante el método de zanja, el método de monolito y el método de toma de muestras con cilindro; sin embargo, tales métodos no se limitan a los mismos.

20 Los ADN que codifican para una proteína Dro1 en el contexto de la presente invención incluyen ADN genómicos, ADNc y ADN sintetizados químicamente. Tales ADN genómicos y ADNc pueden prepararse mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los ADN genómicos pueden prepararse, por ejemplo, de la siguiente manera. Se extrae ADN genómico de plantas de un cultivar de arroz (por ejemplo, Kinandang Patong), sorgo o maíz que tienen un enraizamiento profundo para preparar una biblioteca genómica (pueden usarse vectores tales como plásmidos, fagos, cósmidos, BAC y cromosomas artificiales de P1 (PAC), pero no se limitan a los mismos); y se amplifica la biblioteca, y se examina mediante hibridación de colonias o placas de lisis usando una sonda preparada a partir de un ADN que codifica para proteína Dro1 (por ejemplo, ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 y 17). Alternativamente, tales ADN genómicos pueden prepararse mediante PCR usando cebadores preparados para ser específicos para un ADN que codifica para proteína Dro1 (por ejemplo, ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 y 17). Mientras tanto, los ADNc pueden prepararse, por ejemplo, de la siguiente manera. Se sintetiza ADNc usando ARNm extraído de plantas de un cultivar de arroz (por ejemplo, Kinandang Patong) que tienen un enraizamiento profundo, y se inserta en un vector tal como λ ZAP para construir una biblioteca de ADNc; y se amplifica la biblioteca, y se examina mediante hibridación de colonias o placas de lisis. Alternativamente, los ADNc pueden prepararse mediante PCR de la misma manera descrita anteriormente.

35 Por otro lado, los ADN sintetizados químicamente pueden prepararse, por ejemplo, usando sintetizadores de oligonucleótidos disponibles en el mercado.

40 Alternativamente, los ADN que codifican para una proteína Dro1 en el contexto de la presente invención pueden prepararse mediante la extracción de ADN genómico o ARNm de sorgo (por ejemplo, limbo y vaina foliar) o maíz (por ejemplo, limbo y vaina foliar) que tiene un enraizamiento profundo.

45 La presente invención implica ADN que codifican para una proteína funcionalmente equivalente a la proteína Dro1 de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15. En el presente documento, “funcionalmente equivalente a proteína Dro1” significa que la proteína de interés tiene una función de conferir un rasgo de enraizamiento profundo a una planta. Los ADN preferidos son los derivados de monocotiledóneas, más preferiblemente los derivados de la familia *Gramineae*, la familia *Liliaceae*, la familia *Bromeliaceae*, la familia *Palmae*, la familia *Araceae*, la familia *Zingiberaceae* y la familia *Orchidaceae*, todavía más preferiblemente los derivados de arroz, variedades de trigo (trigo, cebada, centeno, avena y lágrimas de Job (*hatomugi*)), maíz, mijo, mijo menor, mijo japonés, sorgo, mijo africano, mijo perla, tef, caña de azúcar, fleo de los prados, poa de los prados, dátilo ramoso, ballico italiano, ballico perenne, festuca cañosa y grama dulce, y de manera particularmente preferible los derivados de arroz, sorgo y maíz.

55 Tales ADN incluyen, por ejemplo, mutantes, derivados, alelos, variantes y homólogos que codifican para una proteína que tiene la función de conferir un rasgo de enraizamiento profundo a una planta y que comprende una secuencia de aminoácidos con una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ó 100 residuos) sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15.

60 Los ejemplos de métodos bien conocidos en la técnica para preparar los ADN que codifican para una proteína con secuencia de aminoácidos alterada incluyen métodos de mutagénesis dirigida al sitio (Kramer, W. y Fritz, H.-J. (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutagenesis via gapped duplex DNA. *Methods in Enzymology*, 154: 350-367). En la naturaleza, mutaciones en secuencias de nucleótidos también pueden conducir a mutaciones en las secuencias de aminoácidos de proteínas codificadas por las mismas. Tal como se describió anteriormente, los ADN

65

que codifican para una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido en la secuencia de aminoácidos que codifica para la proteína Dro1 que se produce de manera natural están incluidos en los ADN en el contexto de la presente invención, siempre que codifiquen para una proteína que tiene la función equivalente a la proteína Dro1 que se produce de manera natural (secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15). Tales ADN incluyen, por ejemplo, los ADN que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16. Los ADN que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16 tienen una secuencia de nucleótidos con una adición de 1 pb en cada uno de los extremos 5' y 3' en un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2. Los ADN también tienen una sustitución de G por A en la posición de pb 373 desde el extremo 5' (en la posición de pb 372 desde el extremo 5' en SEQ ID NO: 2). Debido a esta sustitución de nucleótido, la secuencia de aminoácidos codificada por un ADN de este tipo que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16 tiene una sustitución de aminoácido no sinónima de ácido glutámico por lisina en la posición 37 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. También se proporcionan tales proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos con una sustitución de ácido glutámico por lisina en la posición 37 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. También se proporcionan los ADN que codifican para una proteína de este tipo (por ejemplo, los ADN que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16).

Aunque la secuencia de nucleótidos tiene una mutación, en algunos casos, la mutación puede no dar como resultado ninguna mutación en la secuencia de aminoácidos de la proteína (degeneración de mutación). Tales mutantes (mutantes degenerados) también están incluidos en los ADN en el contexto de la presente invención.

Otros métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para preparar un ADN que codifica para una proteína funcionalmente equivalente a la proteína Dro1 de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15 incluyen métodos que usan técnicas de hibridación (Southern, E. M. (1975) *Journal of Molecular Biology*, 98, 503) o técnicas de PCR (Saiki, R. K. *et al.*, (1985) *Science*, 230, 1350-1354; Saiki, R. K. *et al.*, (1988) *Science*, 239, 487-491). Específicamente, los expertos en la técnica pueden aislar fácilmente los ADN con alta homología con el gen Dro1 de arroz u otras plantas usando como sonda la secuencia de nucleótidos del gen Dro1 (la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 y 17) o una parte de la misma, o usando como cebadores oligonucleótidos que hibridan específicamente con el gen Dro1 (la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 y 17). Los ADN en el contexto de la presente invención también comprenden tales ADN que codifican para una proteína que es funcionalmente equivalente a la proteína Dro1, que puede aislarse usando técnicas de hibridación o PCR.

Para aislar tales ADN, se lleva a cabo preferiblemente una reacción de hibridación en condiciones rigurosas. Los expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente condiciones de hibridación rigurosas seleccionadas. Por ejemplo, se lleva a cabo hibridación previa en una disolución de hibridación que contiene formamida al 25% o formamida al 50% en condiciones más rigurosas, y SSC 4x, Hepes 50 mM (pH 7,0), disolución de Denhardt 10x y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 20 µg/ml a 42°C durante la noche; luego se añaden sondas marcadas, y se lleva a cabo hibridación mediante incubación a 42°C durante la noche. Puede llevarse a cabo lavado tras la hibridación con las siguientes condiciones para la temperatura y disolución de lavado: por ejemplo, "SSC 2x, SDS al 0,1%, 50°C", "SSC 2x, SDS al 0,1%, 42°C", "SSC 1x, SDS al 0,1%, 37°C", más o menos; "SSC 2x, SDS al 0,1%, 65°C", "SSC 0,5x, SDS al 0,1%, 42°C", más o menos para condiciones más rigurosas; y "SSC 0,2x, SDS al 0,1%, 65°C" más o menos para condiciones incluso más rigurosas. A medida que aumenta la rigurosidad de la hibridación, se espera el aislamiento de los ADN con alta homología con la secuencia de sonda. Sin embargo, las combinaciones descritas anteriormente de condiciones de SSC, SDS y temperatura son meros ejemplos, y los expertos en la técnica pueden lograr rigurosidades similares a las descritas anteriormente combinando apropiadamente los anteriores u otros elementos (tales como concentración de sonda, longitud de sonda o tiempo de reacción de hibridación) que determinan la rigurosidad de hibridación.

Por tanto, se espera que la proteína codificada por un ADN aislado de este tipo tenga alta homología con la secuencia de aminoácidos de la proteína Dro1 (SEQ ID NO: 3, 13, o 15) a nivel de aminoácidos. Además, se espera que el ADN tenga alta homología con la secuencia de nucleótidos de un ADN que codifica para la proteína Dro1 (SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 ó 17) a nivel de la secuencia de nucleótidos. La alta homología se refiere a una identidad de secuencia de al menos el 50% o más, preferiblemente el 70% o más, más preferiblemente el 90% o más (por ejemplo, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o más) con respecto a toda la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos. Tal identidad de secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos puede determinarse usando el algoritmo BLAST de Karin y Altschul (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264-2268, 1990; *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5873, 1993). Se han desarrollado los programas llamados BLASTN y BLASTX basándose en el algoritmo BLAST (Altschul SF, *et al.*, *J Mol Biol* 215: 403, 1990). Cuando se analizan secuencias de nucleótidos usando BLASTN, pueden establecerse los parámetros en: puntuación = 100 y longitud de palabra = 12, por ejemplo. Alternativamente, cuando se analizan secuencias de aminoácidos usando BLASTX, pueden establecerse los parámetros en: puntuación = 50 y longitud de palabra = 3, por ejemplo. Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, es posible usar parámetros por defecto para cada programa. Se conocen procedimientos específicos para estos métodos analíticos.

Los ADN en el contexto de la presente invención pueden usarse, por ejemplo, en la preparación de proteínas recombinantes y la producción de transformantes de plantas que tienen un rasgo de enraizamiento profundo.

5 Las proteínas recombinantes se preparan normalmente insertando los ADN que codifican para proteínas en el contexto de la presente invención en vectores de expresión apropiados, introduciendo los vectores en células apropiadas, cultivando las células transformadas, y purificando las proteínas expresadas. Pueden expresarse proteínas recombinantes como proteínas de fusión con otras proteínas para facilitar la purificación, por ejemplo, como proteínas de fusión con proteína de unión a maltosa usando *Escherichia coli* como huésped (New England Biolabs, USA, serie de vector pMAL), como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST) (Amersham Pharmacia Biotech, serie de vector pGEX), o etiquetadas con histidina (Novagen, serie de pET). Las células huésped no están particularmente limitadas, siempre que la célula sea adecuada para expresar las proteínas recombinantes. Es posible usar, por ejemplo, células de levadura, de diversas de plantas o de animales, células de insecto o similares además de *E. coli* descrito anteriormente. Pueden introducirse vectores en células huésped mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse métodos de introducción que usan iones de calcio para la introducción en *E. coli* (Mandel, M. & Higa, A. (1970) *Journal of Molecular Biology*, 53, 158-162; Hanahan, D. (1983) *Journal of Molecular Biology*, 166, 557-580). Las proteínas recombinantes expresadas en las células huésped pueden purificarse y recuperarse de las células huésped o un sobrenadante de cultivo de las mismas mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las proteínas recombinantes pueden purificarse fácilmente por afinidad cuando se expresan como proteínas de fusión con la proteína de unión a maltosa descrita anteriormente o similares. Alternativamente, pueden producirse transformantes de plantas a los que se les introdujo un ADN en el contexto de la presente invención mediante las técnicas descritas a continuación en el presente documento. Las proteínas en el contexto de la presente invención pueden prepararse a partir de tales plantas. Por consiguiente, los transformantes de plantas de la presente invención incluyen plantas a las que se les introdujo un ADN en el contexto de la presente invención para preparar una proteína en el contexto de la presente invención así como plantas a las que se les introdujo un ADN en el contexto de la presente invención para conferir un rasgo de enraizamiento profundo a plantas, que se describen a continuación en el presente documento.

30 La proteína recombinante resultante puede usarse para preparar anticuerpos que se unen a la proteína. Pueden prepararse anticuerpos policlonales, por ejemplo, de la siguiente manera. Se inmunizan animales para inmunización tales como conejos con una proteína purificada en el contexto de la presente invención o un péptido parcial de la misma; y después de un determinado periodo, se extrae su sangre, y se retira la sangre coagulada. Mientras tanto, pueden prepararse anticuerpos monoclonales de la siguiente manera. Se fusionan células de mieloma con células productoras de anticuerpos de animales inmunizados con una proteína o un péptido descrito anteriormente; se aíslan células de clones individuales (hibridomas) que producen el anticuerpo de interés; y se obtiene el anticuerpo de las células. El anticuerpo resultante puede usarse para purificar o detectar proteínas en el contexto de la presente invención. La presente invención prevé anticuerpos que se unen a una proteína en el contexto de la presente invención. Tales anticuerpos pueden usarse para detectar sitios de expresión de la proteína Dro1 en plantas o para evaluar si una especie de planta expresa la proteína Dro1. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 227 a 251 de la proteína Dro1 de tipo Kinandang Patong es una secuencia característica de cultivos que tienen un rasgo de enraizamiento profundo. Por tanto, pueden usarse anticuerpos que reconocen específicamente toda la secuencia de aminoácidos o una parte de la misma para evaluar si una especie de planta expresa la proteína Dro1 de tipo Kinandang Patong (si tiene un rasgo de enraizamiento profundo).

45 También se proporcionan vectores y células transformadas que comprenden el gen Dro1.

Con respecto a los vectores en el contexto de la presente invención, por ejemplo, cuando el huésped es *E. coli*, siempre que el vector tenga un "ori" para amplificación en *E. coli*, de tal manera que se amplifiquen los vectores y se preparen en grandes cantidades en *E. coli* (por ejemplo, JM109, DH5 α , HB101 y XL1Blue) o similares, y tenga además un gen de selección para transformada *E. coli* (por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos que permite la discriminación usando un fármaco (ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol, o similares)), los vectores no están limitados. Tales vectores incluyen, por ejemplo, vectores M13, vectores pUC, pBR322, pBluescript y pCR-Script. Además de los vectores anteriores, por ejemplo también pueden usarse pGEM-T, pDIRECT y pT7 para la subclonación y escisión de los ADNc. Cuando se usan vectores para producir la proteína Dro1, los vectores de expresión son particularmente útiles. Cuando se expresa un vector de expresión en *E. coli*, por ejemplo, debe tener las características anteriores para amplificarse en *E. coli*. Adicionalmente, cuando se usan *E. coli* tales como JM109, DH5 α , HB101 o XL1-Blue como huésped, el vector debe tener un promotor que permita la expresión eficaz en *E. coli*, por ejemplo, un promotor lacZ (Ward *et al.* *Nature* 341: 544-546, 1989; FASEB J. 6: 2422-2427, 1992), promotor araB (Better *et al.* *Science* 240:1041-1043, 1988) o promotor T7. Otros ejemplos de los vectores incluyen pGEX-5X-1 (Pharmacia), "sistema QIAexpress" (QIAGEN), pEGFP y pET.

Además, el vector puede comprender una secuencia señal para la secreción de polipéptido. Cuando se producen polipéptidos en el periplasma de *E. coli*, la secuencia señal pelB (Lei, S. P. *et al.* *J. Bacteriol.* 169: 4379 (1987)) puede usarse como secuencia señal para la secreción de polipéptido. Por ejemplo, pueden usarse métodos con cloruro de calcio o métodos de electroporación para introducir el vector en una célula huésped. Los vectores para

expresión en el cuerpo de la planta inducen pMH1, pMH2, pCAMBIA, y similares.

Además de *E. coli*, vectores de expresión derivados de mamíferos (por ejemplo, pcDNA3 (Invitrogen), pEGF-BOS (Nucleic Acids Res. 18(17): 5322 (1990)), pEF y pCDM8), células de insecto (por ejemplo, "sistema de expresión en baculovirus Bac-to-BAC" (GIBCO-BRL) y pBacPAK8), plantas (por ejemplo, pMH1 y pMH2), virus de animales (por ejemplo, pHSV, pMV y pAdexLcw), retrovirus (por ejemplo, pZIPneo), levaduras (por ejemplo, "kit de expresión en *Pichia*" (Invitrogen), pNV11 y SP-Q01), y *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pPL608 y pKTH50) también pueden usarse como vectores para producir la proteína Dro1.

Para la expresión en células animales tales como células CHO, COS y NIH3T3, el vector debe tener un promotor necesario para la expresión en tales células, por ejemplo, un promotor SV40 (Mulligan *et al.* Nature 277: 108 (1979)), promotor MMLV-LTR, promotor EF1 α (Mizushima *et al.* Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990)) o promotor de CMV. Se prefiere incluso más que el vector comprenda un gen para seleccionar transformantes (por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos que permite la discriminación mediante un fármaco (tal como neomicina y G418)). Los ejemplos de vectores con tales características incluyen pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13.

Las células transformadas en el contexto de la presente invención pueden usarse, por ejemplo, como sistema de producción para expresar o producir proteínas en el contexto de la presente invención. Tales sistemas de producción de proteínas incluyen sistemas *in vitro* e *in vivo*.

Cuando se usan células eucariotas, por ejemplo, se usan células animales, células vegetales o células fúngicas como células huésped. Las células animales conocidas incluyen células de mamífero (por ejemplo, células tales como 3T3, células de mieloma, BHK (de riñón de hámster recién nacido), HeLa y Vero, además de células CHO, células COS y células NIH3T3 descritas anteriormente), células de anfibio (por ejemplo, ovocitos de *Xenopus laevis* (Valle, *et al.*, Nature (1981) 291, 358-340)), y células de insecto (por ejemplo, células tales como sf9, sf21 y Tn5). Entre las células CHO, puede usarse preferiblemente dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220), que son células CHO deficientes en DHFR, y CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) en la presente invención. Las células CHO se prefieren particularmente para su uso en la expresión a gran escala.

Las células vegetales incluyen, por ejemplo, células derivadas de plantas descritas a continuación así como células derivadas de *Nicotiana tabacum* conocidas como sistema de producción de proteínas. Es posible cultivar callos a partir de células.

Mientras tanto, las células fúngicas inducen células de levadura, por ejemplo, células del género *Saccharomyces*, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*; células de hongos filamentosos, por ejemplo, el género *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus niger*, pero no se limitan a las mismas.

También se proporcionan las células descritas anteriormente a las que se les introdujo un ADN o vector en el contexto de la presente invención.

Además, la presente invención se refiere a plantas transformadas con el gen Dro1, que tienen un rasgo de enraizamiento profundo.

Si una planta tiene un rasgo de enraizamiento profundo también puede evaluarse comparándola con un control. En el presente documento, siempre que la raíz del transformante de planta se extienda en el suelo formando un ángulo más profundo con respecto a la superficie del terreno en comparación con un control, aunque la diferencia de ángulo sea muy pequeña, se considera que el transformante "tiene un rasgo de enraizamiento profundo". Si una raíz de un transformante de planta se extiende en el suelo formando un ángulo más profundo con respecto a la superficie del terreno puede evaluarse mediante los métodos descritos anteriormente.

En el presente documento, "control" se refiere a una planta que es del mismo tipo que un transformante de planta de la presente invención, pero sin la introducción artificial de un ADN en el contexto de la presente invención o que no tiene ningún ADN en el contexto de la presente invención. En el presente documento, el control no está limitado particularmente, siempre que sea una planta que es del mismo tipo que un transformante de planta de la presente invención, pero sin la introducción artificial de un ADN en el contexto de la presente invención o que no tiene ningún ADN en el contexto de la presente invención. Por consiguiente, el "control" en el contexto de la presente invención también comprende plantas a las que se les introdujeron artificialmente los ADN distintos de los ADN en el contexto de la presente invención. Tales plantas inducen, pero no se limitan a, por ejemplo, plantas del mismo tipo que un transformante de planta de la presente invención, que se transforman con un ADN distinto de los ADN en el contexto de la presente invención, un ADN en el contexto de la presente invención al que se le introdujo una mutación que provoca pérdida de función en el ADN, un ADN en el contexto de la presente invención convertido en un tipo que suprime la función, o un fragmento de ADN que contiene sólo una parte de un ADN en el contexto de la presente invención que es insuficiente para ejercer la función del ADN.

Las plantas transformadas con un ADN en el contexto de la presente invención no están particularmente limitadas

siempre que tengan un rasgo de enraizamiento profundo, y pueden contener modificaciones en cualquier otra parte. Tales modificaciones en cualquier otra parte incluyen, por ejemplo, cambios morfológicos de panículas, pero no se limitan a los mismos.

- 5 Puede prepararse un transformante de planta usando un ADN en el contexto de la presente invención mediante el siguiente procedimiento. El ADN o un vector al que se le insertó el ADN se introduce en células vegetales. Luego, se regeneran plantas a partir de las células vegetales transformadas resultantes.

10 En la presente invención, vectores preferidos son los que pueden expresar genes insertados en células vegetales, e incluyen los vectores descritos anteriormente (por ejemplo, vectores tales como pMH1, pMH2 y vector pCAMBIA); sin embargo, los vectores no están particularmente limitados. Los vectores en el contexto de la presente invención pueden comprender, por ejemplo, un promotor (por ejemplo, promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor) para la expresión génica constitutiva en células vegetales. Cuando se usa un promotor de este tipo, se diseña un ADN de modo que un ADN en el contexto de la presente invención esté operativamente unido en el sentido de 3' del promotor. Luego, se introduce un vector diseñado que comprende el ADN en células vegetales. Pueden obtenerse transformantes de plantas que expresan el ADN en el contexto de la presente invención regenerando las células vegetales transformadas resultantes. Por tanto, también se proporcionan los ADN a los que está operativamente unido un ADN en el contexto de la presente invención en el sentido de 3' de un promotor. En el presente documento, "operativamente unido" significa que una secuencia promotora se une a un ADN en el contexto de la presente invención de modo que se induce la expresión del ADN tras la unión de factores transcripcionales a la secuencia promotora.

20 Es posible usar, además de los anteriores, vectores con un promotor que se activa tras la estimulación extrínseca de manera inducible.

25 Las especies de plantas en las que se introducen los ADN o vectores mencionados anteriormente no están particularmente limitadas e incluyen, por ejemplo, monocotiledóneas. Las monocotiledóneas incluyen, pero no se limitan a, plantas pertenecientes a la familia *Gramineae*, la familia *Liliaceae*, la familia *Bromeliaceae*, la familia *Palmae*, la familia *Araceae*, la familia *Zingiberaceae* y la familia *Orchidaceae*. Las plantas pertenecientes a la familia *Gramineae* incluyen, pero no se limitan a, arroz, variedades de trigo (trigo, cebada, centeno, avena y lágrimas de Job (*hatomugi*)), maíz, mijo, mijo menor, mijo japonés, sorgo, mijo africano, mijo perla, tef, caña de azúcar, fleo de los prados, poa de los prados, dátilo ramoso, ballico italiano, ballico perenne, festuca cañosa, y grama dulce.

35 Las células vegetales en las que se introducen los ADN o vectores mencionados anteriormente no están particularmente limitadas y pueden estar en cualquier forma siempre que puedan usarse para regenerar plantas. Por ejemplo, pueden usarse células en cultivo en suspensión, protoplastos, secciones foliares, callos y semillas geminadas.

40 La introducción de los ADN o vectores mencionados anteriormente en células vegetales puede realizarse usando métodos conocidos por un experto en la técnica, tales como métodos con polietilenglicol, electroporación, métodos mediados por *Agrobacterium* y métodos de pistola genética. En los métodos mediados por *Agrobacterium*, por ejemplo, según el método de Nagel *et al.* (Nagel, R. *et al.* FEMS Microbiol. Lett. 67, 1990, 325-328), un ADN puede introducirse en células vegetales mediante la introducción en *Agrobacteria* de un vector de expresión al que se le inserta el ADN, y la infección de células vegetales con la *Agrobacteria* mediante infección directa o mediante el método de disco foliar. El vector mencionado anteriormente comprende un promotor de la expresión de modo que, por ejemplo, el ADN en el contexto de la presente invención se expresa en una planta después de la introducción en la planta. Generalmente, el ADN en el contexto de la presente invención está ubicado en el sentido de 3' del promotor, y está ubicado un terminador más en sentido de 3' de un ADN de este tipo. El vector recombinante usado para este fin se selecciona de manera adecuada por un experto en la técnica, dependiendo del tipo de planta o método de introducción.

Los promotores mencionados anteriormente incluyen, por ejemplo, el CaMV35S derivado del virus del mosaico de la coliflor y el promotor de ubiquitina del maíz (solicitud de patente japonesa JP-A (Kokai) H02-79983).

55 Los ejemplos del terminador mencionado anteriormente pueden ser un terminador derivado del virus del mosaico de la coliflor y el terminador del gen de la nopalina sintasa; sin embargo, el promotor y el terminador no se limitan a los mismos, siempre que funcionen en una planta.

60 La regeneración de una planta a partir de una célula vegetal puede llevarse a cabo según el tipo de planta mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen los siguientes métodos, pero no se limitan a los mismos:

para arroz, el método de Fujimura *et al.* (Fujimura. *et al.* Tissue Culture Lett. 2, 1995, 74);

65 para trigo, el método de Harris *et al.* (Harris, R. *et al.* Plant Cell Reports. 7, 1988, 337-340) y el método de Ozgen *et*

al. (Ozgen, M. *et al.* Plant Cell Reports. 18, 1998, 331-335);

para cebada, el método de Kihara y Funatsuki (Kihara, M. y Funatsuki, H. Breeding Sci. 44, 1994, 157-160) y el método de Lurs y Lorz (Lurs, R. y Lorz, H. Theor. Appl. Genet. 75, 1987, 16-25);

para maíz, el método de Shillito *et al.* (Shillito, R.D., *et al.* Bio/Technology, 7, 1989, 581-587) y el método de Gordon-Kamm *et al.* (Gordon-Kamm, W.J. *et al.* Plant Cell. 2(7), 1990, 603-618);

para sorgo, el método de Wen *et al.* (Wen, F.S., *et al.* Euphytica. 52, 1991, 177-181) y el método de Hagio (Hagio, T. Breeding Sci. 44, 1994, 121-126);

para centeno, el método de Castillo *et al.* (Castillo A. M., Vasil V., Vasil I. K. (1994) Nature Biotechnology 12: 1366-1371.);

para avena, el método de Cho *et al.* (Cho M. J., WEN J., LEMAUX P. G., (1999) Plant Science 148: 9-17.);

para mijo perla, el método de O'Kennedy *et al.* (O'Kennedy M. M., Burger J. T., Botha F. C. (2004) Plant Cell Reports 22: 684-690.);

para poa de los prados, el método de Ha *et al.* (Ha C. D., Lemaux P. G., Cho M. J. (2001) *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant 37: 6-11.);

para dátilo ramoso, el método de CHO *et al.* (CHO M.J., CHOI H. W., LEMAUX P. G. (2001) Plant cell reports 20: 318-324.);

para ballico italiano, el método de Ye *et al.* (Ye X, Wang Z. Y., Wu X., Potrykus I., Spangenberg G. (1997) Plant Cell Reports 16: 379-384.);

para ballico perenne, el método de Spangenberg *et al.* (Spangenberg G., Wang Z. Y., Wu X., Nagel J., Potrykus I. (1995) Plant Science 108: 209-217.);

para festuca cañosa, el método de Wang *et al.* (Wang Z. Y., Takamizo T., Iglesias V. A., Osusky M., Nagel J., Potrykus I., Spangenberg G. (1992) Nature Biotechnology 10: 691-696.); y

para grama dulce, el método de Smith *et al.* (Smith R. L., Grando M. F., Li Y. Y., Seib J. C., Shatters R. G (2002) Plant Cell Reports 20: 1017-1021.).

Las plantas en las que se introduce el ADN en el contexto de la presente invención pueden ser explantes, o el ADN puede introducirse en las células en cultivo preparadas a partir de estas plantas. "Células vegetales" en el contexto de la presente invención incluyen, por ejemplo, células vegetales de una hoja, raíz, tallo, flor, escutelo en una semilla e embrión inmaduro; callos; células en cultivo en suspensión; y semillas geminadas, pero no se limitan a los mismos.

Para seleccionar eficazmente las células transformadas introduciendo el ADN en el contexto de la presente invención, el vector recombinante se introduce en las células vegetales, preferiblemente junto con un gen de marcador de selección adecuado o un vector de plásmido que comprende un gen de marcador de selección. Los genes de marcador de selección usados para este fin incluyen, por ejemplo, el gen de higromicina fosfotransferasa resistente al antibiótico higromicina, el gen de neomicina fosfotransferasa resistente a kanamicina o gentamicina, y el gen de acetiltransferasa resistente al herbicida fosfinotricina.

Las células en las que se ha introducido el vector recombinante se ponen en un medio de selección conocido que contiene un agente de selección adecuado dependiendo del tipo de gen de marcador de selección introducido, y luego se cultiva. De este modo, pueden obtenerse células en cultivo de planta transformada.

A continuación, se cultivan cuerpos de plantas regenerados a partir de las células transformadas en un medio de aclimatación. Las plantas regeneradas, adimatadas se hacen crecer luego en condiciones de cultivo habituales para obtener plantas que tienen un rasgo de enraizamiento profundo, a partir de las que pueden obtenerse semillas una vez que maduran y dan frutos. Específicamente, la presente invención proporciona métodos para producir plantas transformadas, que comprenden las etapas (a) y (b) a continuación. La presente invención también proporciona métodos para conferir un rasgo de enraizamiento profundo a plantas, que comprenden las etapas (a) y (b) a continuación:

(a) introducir en una célula vegetal un ADN en el contexto de la presente invención (gen Dro1) o un vector que porta el ADN (gen Dro1); y

(b) regenerar una planta a partir de la célula vegetal a la que se le introdujo el ADN o vector en la etapa (a).

Los métodos descritos anteriormente para producir plantas transformadas pueden comprender adicionalmente la etapa de:

5

(c) seleccionar una planta a la que se le confiere el rasgo de enraizamiento profundo.

Puede confirmarse la presencia de los ADN foráneos introducidos en las plantas transformadas que se regeneran y se hacen crecer de esta manera mediante el método de PCR o método de hibridación de tipo Southern conocido, o analizando las secuencias de nucleótidos de los ADN en cuerpos de plantas. En este caso, la extracción de los ADN de las plantas transformadas puede llevarse a cabo según el método conocido de J. Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, la 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Cuando se analizan los genes foráneos que están presentes en los cuerpos de plantas regenerados e incluyen los ADN en el contexto de la presente invención, usando el método de PCR, se lleva a cabo una reacción de amplificación usando como molde los ADN extraídos de los cuerpos de plantas regenerados tal como se mencionó anteriormente. También puede realizarse una reacción de amplificación en una mezcla de reacción que contiene como cebadores oligonucleótidos sintetizados que comprenden secuencias de nucleótidos seleccionadas de manera adecuada según las secuencias de nucleótidos de los ADN en el contexto de la presente invención. En la reacción de amplificación, las reacciones de desnaturalización, apareamiento y extensión de los ADN pueden repetirse varias decenas de veces para obtener productos amplificados de fragmentos de ADN que comprenden las secuencias de ADN en el contexto de la presente invención. Sometiendo la mezcla de reacción que comprende los productos amplificados, por ejemplo, a electroforesis en agarosa, las diversas clases de fragmentos de ADN amplificados se fraccionan, permitiendo de ese modo la confirmación de si un determinado fragmento de ADN corresponde a un ADN en el contexto de la presente invención.

25

La presente invención también se refiere a plantas transformadas, que se producen introduciendo el gen Dro1 o un vector que porta el gen Dro1 en células vegetales, y que tienen un rasgo de enraizamiento profundo. La presente invención también se refiere a métodos para producir plantas transformadas, que comprenden la etapa de introducir el gen Dro1 o un vector que porta el gen Dro1 en una célula vegetal.

30

Además, en una realización preferida de la presente invención, las plantas transformadas incluyen las que se producen mediante las etapas (a) a (d) a continuación, y que tienen un rasgo de enraizamiento profundo. En otra realización preferida de la presente invención, los métodos para producir plantas transformadas incluyen los que comprenden las etapas de:

35

(a) introducir el gen Dro1 o un vector que porta el gen Dro1 en una célula vegetal;

40

(b) determinar el número de copias del gen Dro1 introducido artificialmente o vector que porta el gen Dro1 en la célula vegetal de la etapa (a);

45

(c) seleccionar una célula vegetal transformada cuyo número de copias del gen Dro1 introducido artificialmente o vector que porta el gen Dro1 es uno (que contiene en una única copia del gen o vector); y

50

(d) regenerar una planta a partir de la célula vegetal transformada seleccionada en la etapa (c).

55

En los métodos descritos anteriormente, los números de copias del gen Dro1 introducido artificialmente o vector que porta el gen Dro1 en las plantas pueden determinarse para seleccionar plantas en las que el número de copias es 1 después de regenerarse una planta a partir de la célula vegetal transformada que comprende el gen Dro1. Por tanto, la presente invención se refiere a plantas transformadas que se producen mediante las etapas (a) a (c) a continuación, y que tienen un rasgo de enraizamiento profundo. La presente invención también se refiere a métodos para producir plantas transformadas, que comprenden las etapas de:

60

(a) introducir el gen Dro1 o un vector que porta el gen Dro1 en una célula vegetal y regenerar una planta a partir de la célula vegetal;

65

(b) determinar el número de copias del gen Dro1 introducido artificialmente o vector que porta el gen Dro1 en la planta de la etapa (a); y

70

(c) seleccionar una planta transformada cuyo número de copias del gen Dro1 introducido artificialmente o vector que porta el gen Dro1 es uno.

75

La introducción del gen Dro1 o un vector que porta el gen Dro1 en células vegetales y la regeneración de plantas a partir de las células transformadas vegetales pueden lograrse mediante los métodos descritos anteriormente. Mientras tanto, el número de copias del gen Dro1 o vector que porta el gen Dro1 en células transformadas vegetales o plantas transformadas puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis de transferencia de tipo Southern,

80

método de PCR en tiempo real, análisis de la secuencia de nucleótidos, o similares. Sin embargo, tales métodos no se limitan a estos ejemplos.

5 En el presente documento, “número de copias” se refiere al número de genes Dro1 o vectores que portan el gen introducidos en plantas mediante transformación. Específicamente, en el presente documento, “número de copias” no incluye el número de genes Dro1 endógenos en las plantas (genes endógenos).

10 Tal como se describe en los ejemplos en el presente documento, los presentes inventores produjeron plantas de la generación T1 a partir de plantas transformadas (generación T0) en las que el número de copias del gen Dro1 introducido artificialmente es 1, y comprobaron la relación entre la razón de enraizamiento profundo y el número de copias estimado del gen Dro1 en la generación T1. El resultado demostró que en la generación T1, la razón de enraizamiento profundo de las plantas homocigotas (número de copias del gen Dro1 introducido artificialmente: 2) fue mayor que el de las plantas de tipo nulo (número de copias del gen Dro1 introducido artificialmente: 0) y plantas heterocigotas (número de copias del gen Dro1 introducido artificialmente: 1). Por tanto, las plantas particularmente preferidas de la presente invención incluyen plantas transformadas de la generación T1 en las que el número de copias del gen Dro1 introducido artificialmente es 2 (homocigotas), que se producen a partir de plantas transformadas de la generación T0 en las que el número de copias del gen Dro1 introducido artificialmente es 1.

20 Específicamente, en una realización particularmente preferida, la presente invención incluye plantas transformadas producidas mediante métodos que comprenden las etapas descritas a continuación, además de las etapas (a) a (d) o (a) a (c) descritas anteriormente. En otra realización particularmente preferida, la presente invención incluye métodos para producir plantas transformadas, que comprende, además de las etapas (a) a (d) o (a) a (c) descritas anteriormente, las etapas de:

- 25 - producir una planta mediante cruzamiento de los transformantes de plantas obtenidos en la etapa (d) o (c); y
- seleccionar una planta homocigota para el gen Dro1 a partir de las plantas obtenidas en la etapa anterior.

30 Los expertos en la técnica conocen métodos para producir plantas de la generación T1 a partir de las de la generación T0 mediante cruzamiento. El número de copias del gen Dro1 (tipo nulo, heterocigoto y homocigoto) en una planta producida mediante cruzamiento puede determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como análisis de transferencia de tipo Southern y método de PCR en tiempo real.

35 Una vez que se genera una planta transformada que tiene un ADN en el contexto de la presente invención introducido en su cromosoma, puede obtenerse su progenie mediante reproducción sexual o asexual a partir de la planta. Alternativamente, la planta puede producirse a gran escala a partir de células, órganos o materiales de propagación (por ejemplo, semillas, frutos, panículas cortadas, tubérculos, raíces tuberosas, portainjertos, callos y protoplastos) aislados a partir de las plantas, sus progenies o clones. La presente invención o descripción, incluye respectivamente, células vegetales a las que se les introdujo artificialmente un ADN en el contexto de la presente invención; plantas que comprenden las células; órganos (por ejemplo, flor, hoja, raíz, tallo, etc.) de las plantas; progenies y clones de las plantas; y materiales de propagación de las plantas y sus progenies y clones. Tales células vegetales, plantas que comprende las células, órganos de las plantas, progenies y clones de las plantas, y materiales de propagación de las plantas y sus progenies y clones pueden usarse para conferir un rasgo de enraizamiento profundo a plantas.

45 Mientras tanto, las plantas transformadas de la presente invención incluyen, por ejemplo, monocotiledóneas. Las monocotiledóneas incluyen, pero no se limitan a, plantas pertenecientes a la familia *Gramineae*, la familia *Liliaceae*, la familia *Bromeliaceae*, la familia *Palmae*, la familia *Araceae*, la familia *Zingiberaceae* y la familia *Orchidaceae*. Las plantas pertenecientes a la familia *Gramineae* incluyen, pero no se limitan a, arroz y variedades de trigo (trigo, cebada, centeno, avena y lágrimas de Job (*hatomugi*)), maíz, mijo, mijo menor, mijo japonés, sorgo, mijo africano, mijo perla, tef, caña de azúcar, fleo de los prados, poa de los prados, dátilo ramoso, ballico italiano, ballico perenne, festuca caños a y grama dulce.

55 Además, la presente invención prevé alimentos procesados obtenidos a partir de al menos uno cualquiera de: células, materiales de propagación y órganos en el contexto de la presente invención. En el presente documento, alimento procesado se refiere a un producto en forma comestible para seres humanos, que se produce procesando artificialmente plantas tales como arroz, variedades de trigo (trigo, cebada, centeno, avena y lágrimas de Job (*hatomugi*)), maíz, mijo, mijo menor, mijo japonés, sorgo, mijo africano, mijo perla, tef, caña de azúcar y fleo de los prados, o partes de los mismos (células, materiales de propagación, órganos, etc.). En la presente invención, procesamiento incluye tratamientos tales como hervir, cocer a fuego lento, rehogar, cocer al vapor, freír y pulverizar, pero no se limita a los mismos. “Pulverizar” incluye desgranar y pulir el arroz. Los alimentos procesados en relación con la presente invención incluyen los resultantes de al menos uno de los tratamientos descritos anteriormente. Un ejemplo de alimentos procesados preferidos en relación con la presente invención es: alimentos procesados resultantes de desgranar y pulir semillas de arroz, seguido por calentamiento. Específicamente, los alimentos procesados en relación con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, productos de arroz cocidos

obtenidos hirviendo arroz (incluyendo arroz cocido congelado y arroz cocido esterilizado), arroz en polvo, tortita de arroz, fideo de arroz, galletas saladas de arroz cúbicas, galletas saladas de arroz japonesas, galleta, miso (pasta de soja fermentada), salsa de soja, tofu (cuajada de soja fermentada), pan, soba (fideo de trigo sarraceno), fideo de trigo, pasta, fideo tal como fideo chino (fideo crudo, fideo rehidratable, fideo hervido, etc.), copos de maíz y cereales.

La configuración de alimentos procesados en relación con la presente invención como producto comercial no está limitada particularmente. Los ejemplos incluyen la configuración en la que se vende el producto y se distribuye a una temperatura ambiental o baja y el momento de consumirse/beberse se calienta hasta la temperatura ambiente o alta temperatura usando una cocina tal como un horno microondas. Específicamente, tal configuración como producto comercial incluye, pero no se limita a, comidas envasadas, bolas de arroz y fideos cocidos, que se venden en tiendas de barrio, supermercados, tiendas gourmet, y similares.

Los alimentos procesados en relación con la presente invención pueden estar en forma envasada en un recipiente. Por ejemplo, los alimentos pueden envasarse en un recipiente de plástico moldeado o en una bolsa flexible esterilizable o similar y esterilizarse después del sellado.

“Alimento procesado obtenido a partir de al menos uno de células, materiales de propagación u órganos” en el contexto de la presente invención también puede denominarse “alimento procesado producido a partir de al menos uno de células, materiales de propagación u órganos”, “alimento procesado que comprende al menos uno de células, materiales de propagación u órganos”, o “alimento procesado obtenido procesando al menos uno de células, materiales de propagación u órganos”.

Además, la presente invención proporciona métodos para evaluar si una planta tiene un rasgo de enraizamiento profundo, que comprenden las etapas (a) a (c) descritas a continuación, en los que se considera que una planta de prueba tiene un rasgo de enraizamiento profundo o posiblemente tiene un rasgo de enraizamiento profundo cuando el peso molecular o la secuencia de nucleótidos es idéntico/idéntica:

(a) preparar una muestra de ADN a partir de la planta de prueba;

(b) amplificar a partir de la muestra de ADN una región que comprende la totalidad o una parte de un ADN en el contexto de la presente invención (gen Dro1); y

(c) comparar el peso molecular o la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN amplificado con el del ADN en el contexto de la presente invención (gen Dro1).

Tal parte preferida del gen Dro1 incluyen el exón 4 del gen Dro1, más preferiblemente regiones que comprenden una secuencia que comprende el nucleótido en la posición de pb 116 desde el extremo 5' del exón 4 del gen Dro1 (el nucleótido en la posición 943 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2) (por ejemplo, regiones que consiste en al menos 100, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 nucleótido, que comprenden el nucleótido en la posición 943 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2), pero no se limita a los mismos. Los presentes inventores revelaron que en Kinandang Patong el nucleótido en la posición de pb 116 desde el extremo 5' del exón 4 del gen Dro1 (el nucleótido en la posición 943 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2) es adenina mientras que el nucleótido está deleciónado en IR64. Por tanto, puede evaluarse si una planta de prueba tiene un rasgo de enraizamiento profundo examinando la presencia o ausencia de este nucleótido. Específicamente, la presente invención proporciona métodos para evaluar si una planta tiene un rasgo de enraizamiento profundo, que comprenden la etapa de detectar la presencia o ausencia del nucleótido en la posición 943 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, en el que se considera que una planta de prueba no tiene un rasgo de enraizamiento profundo cuando se detecta el nucleótido deleción. Puede detectarse la deleción de un solo nucleótido comparando la secuencia de nucleótidos o el peso molecular de una región que comprende la totalidad o una parte del gen Dro1.

Además, la presente invención se refiere a métodos para evaluar si una planta tiene un rasgo de enraizamiento profundo, que comprenden la etapa de realizar PCR con cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 y 9, usando como molde un ADN genómico preparado a partir de una planta de prueba. En estos métodos, se considera que una planta de prueba tiene un rasgo de enraizamiento profundo cuando se obtiene el producto amplificado.

Además, la presente invención se refiere a métodos para evaluar si una planta tiene un rasgo de enraizamiento profundo, que comprenden la etapa de realizar PCR con cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 10 y 11, usando como molde un ADN genómico preparado a partir de una planta de prueba. En estos métodos, se considera que una planta de prueba no tiene un rasgo de enraizamiento profundo cuando se obtiene el producto amplificado.

Además, se proporcionan cebadores para su uso en la evaluación de si una planta tiene un rasgo de enraizamiento profundo. Tales cebadores incluyen, pero no se limitan a, los ADN que comprenden las secuencias de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 8 a 11.

En el presente documento, "evaluar si una planta tiene un rasgo de enraizamiento profundo" no sólo significa evaluar si un cultivar que se ha cultivado hasta ahora tiene un rasgo de enraizamiento profundo pero también significa evaluar si un cultivar recientemente desarrollado mediante cruzamiento o usando técnicas de ingeniería genética tiene un rasgo de enraizamiento profundo.

En los métodos de la presente invención para evaluar si una planta tiene un rasgo de enraizamiento profundo, se evalúan plantas sometiendo a prueba si tienen un ADN que codifica para una proteína Dro1 de tipo Kinandang Patong funcional. Puede evaluarse si una planta tiene un ADN que codifica para una proteína Dro1 funcional (de tipo Kinandang Patong) examinando ADN genómicos en cuanto a la diferencia en el peso molecular o la secuencia de nucleótidos de la región correspondiente a Dro1.

En los métodos de evaluación de la presente invención, en primer lugar, se prepara (se extrae) una muestra de ADN, y luego se amplifica una región de ADN correspondiente al gen Dro1 a partir de la muestra de ADN. A continuación, se compara el peso molecular del fragmento de ADN amplificado a partir de una región de ADN para el gen Dro1 en un cultivar que tienen un rasgo de enraizamiento profundo, con el del fragmento de ADN amplificado a partir de una muestra de ADN de una planta de prueba. Se considera que la planta de prueba tiene un rasgo de enraizamiento profundo cuando los pesos moleculares son iguales. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN amplificado a partir de una región de ADN para el gen Dro1 en un cultivar que tiene un rasgo de enraizamiento profundo se compara con la del fragmento de ADN amplificado a partir de una muestra de ADN de una planta de prueba. Se considera que la planta de prueba tiene un rasgo de enraizamiento profundo cuando las secuencias de nucleótidos son idénticas.

Pueden prepararse (extraerse) muestras de ADN mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos de preparación preferidos incluyen, por ejemplo, métodos para extraer ADN mediante un método con CTAB.

Las muestras de ADN que van a evaluarse mediante los métodos de evaluación de la presente invención no están particularmente limitadas. En general, se usan ADN genómicos extraídos de plantas de prueba como muestras de ADN. Además, las fuentes de ADN genómicos que van a recogerse no están particularmente limitadas, y pueden extraerse de cualquier tejido vegetal, por ejemplo, panículas, hojas, raíces, tallos, semillas, endospermo, salvado o gérmenes. Sin embargo, las fuentes no se limitan a estos ejemplos.

En los métodos de evaluación de la presente invención, una región de ADN del gen Dro1 en relación con la presente invención se amplifica entonces mediante PCR o similares. La "región de ADN del gen Dro1" en el contexto de la presente invención se refiere a una parte correspondiente a la región de ADN genómico para el gen Dro1 (por ejemplo, la región de ADN de SEQ ID NO: 1). La región que va a amplificarse puede ser la totalidad del ADN genómico o una parte del ADN genómico (por ejemplo, una región ORF que codifica para la proteína o una parte de la misma). Los expertos en la técnica pueden llevar a cabo PCR seleccionando de manera apropiada las condiciones de reacción y similares. Los productos de ADN amplificados pueden marcarse usando cebadores marcados con isótopos tales como ^{32}P , colorantes fluorescentes, biotina, o similares cuando se lleva a cabo PCR. Alternativamente, los fragmentos de ADN amplificados pueden marcarse añadiendo sustratos de nucleótidos marcados con isótopos tales como ^{32}P , colorantes fluorescentes, biotina, o similares a mezclas para PCR, y llevando a cabo PCR. Además, los fragmentos de ADN amplificados también pueden marcarse después de la PCR uniendo sustratos de nucleótidos marcados con isótopos tales como ^{32}P , colorantes fluorescentes, biotina, o similares, usando una enzima de Klenow o similares.

Los fragmentos de ADN marcados obtenidos de este modo se desnaturalizan mediante calentamiento o similares, y se someten a electroforesis en un gel de poliacrilamida que contiene un agente desnaturalizante tal como urea o SDS. SDS-PAGE, que usa SDS como agente desnaturalizante, es una técnica de fraccionamiento ventajosa en la presente invención. SDS-PAGE puede llevarse a cabo según el método de Laemmli (Laemmli (1970) Nature 227, 680-685). Después de la electroforesis, se detecta la movilidad de los fragmentos de ADN y se analiza mediante autorradiografía usando películas de rayos X, dispositivos de exploración que detectan fluorescencia, o similares. Cuando no se usan los ADN marcados, los fragmentos de ADN pueden detectarse tiñendo el gel después de la electroforesis con bromuro de etidio, tinción de plata, o similares. Por ejemplo, se amplifican fragmentos de ADN a partir de un cultivar que tiene un rasgo de enraizamiento profundo (por ejemplo, Kinandang Patong) y una planta de prueba usando cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 y 9. Puede evaluarse si la planta de prueba tiene un rasgo de enraizamiento profundo comparando sus pesos moleculares. Se considera que la planta de prueba tiene un rasgo de enraizamiento profundo cuando los pesos moleculares son idénticos.

Alternativamente, puede evaluarse si una planta tiene un rasgo de enraizamiento profundo determinando directamente la secuencia de nucleótidos de la región de ADN de una planta de prueba correspondiente al ADN en el contexto de la presente invención y comparando la secuencia con la de un cultivar que tiene un rasgo de enraizamiento profundo. Se considera que la planta de prueba tiene un rasgo de enraizamiento profundo cuando las secuencias de nucleótidos son idénticas.

En el presente documento, "idéntico/idéntica" significa que para ambos alelos, el peso molecular del gen o su secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos es idéntico/idéntica al de/a la de una planta que tiene un rasgo de enraizamiento profundo. Por consiguiente, "idéntico/idéntica" no incluye el caso en el que el peso molecular, la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos para uno de los alelos es igual que el de/la de una planta que tiene un rasgo de enraizamiento profundo pero el otro es diferente del de/de la planta que tiene un rasgo de enraizamiento profundo.

El análisis por electroforesis mencionado anteriormente puede llevarse a cabo según un método convencional. Por ejemplo, se lleva a cabo electroforesis aplicando tensión en un gel de agarosa o poliacrilamida, y se analiza el patrón de ADN separado.

Mientras tanto, pueden determinarse las secuencias de nucleótidos, por ejemplo, usando secuenciadores de ADN disponibles en el mercado.

Además, pueden seleccionarse plantas que van a identificarse que tienen un rasgo de enraizamiento profundo en una fase temprana usando los métodos de evaluación de la presente invención.

Específicamente, la presente invención proporciona métodos para seleccionar una planta que tiene un rasgo de enraizamiento profundo, que comprenden las etapas de (a) y (b) descritas a continuación:

(a) producir un cultivar mediante cruzamiento de una planta arbitraria con una planta que tiene un rasgo de enraizamiento profundo; y

(b) evaluar si una planta producida en la etapa (a) tiene un rasgo de enraizamiento profundo mediante un método descrito en el presente documento para evaluar si una planta de prueba tiene un rasgo de enraizamiento profundo.

Los métodos de selección de la presente invención pueden comprender adicionalmente la etapa de:

(c) seleccionar una planta que se considera que tiene un rasgo de enraizamiento profundo en la etapa (b).

Una planta que tiene un rasgo de enraizamiento profundo puede cruzarse con una planta arbitraria mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Pueden seleccionarse plantas que se considera que tienen un rasgo de enraizamiento profundo en una fase temprana usando los métodos de selección de la presente invención. La presente invención también proporciona tales métodos para seleccionar una planta que se considera que tiene un rasgo de enraizamiento profundo en una fase temprana. En el presente documento, "fase temprana" se refiere a, por ejemplo, el estado antes de la granazón, preferiblemente el estado inmediatamente después de la germinación. Usando los métodos de selección de la presente invención, puede lograrse la mejora genética de variedades de planta que tienen un rasgo de enraizamiento profundo en un periodo de tiempo más corto que nunca antes.

Las plantas que van a usarse en los métodos de evaluación o selección de la presente invención incluyen, por ejemplo, monocotiledóneas, pero no se limitan a las mismas. Las monocotiledóneas incluyen, pero no se limitan a, plantas pertenecientes a la familia *Gramineae*, la familia *Liliaceae*, la familia *Bromeliaceae*, la familia *Palmae*, la familia *Araceae*, la familia *Zingiberaceae* y la familia *Orchidaceae*. Las plantas pertenecientes a la familia *Gramineae* incluyen, pero no se limitan a, arroz, variedades de trigo (trigo, cebada, centeno, avena y lágrimas de Job (*hatomugi*)), maíz, mijo, mijo menor, mijo japonés, sorgo, mijo africano, mijo perla, tef, caña de azúcar, fleo de los prados, poa de los prados, dátilo ramoso, ballico italiano, ballico perenne, festuca cañosa y grama dulce.

También se proporcionan ADN (oligonucleótidos) que comprenden al menos 15 (por ejemplo, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25) nucleótidos consecutivos complementarios a la secuencia de nucleótidos del gen *Dro1* en relación con la presente invención o una secuencia complementaria de los mismos. En el presente documento, "secuencia complementaria" se refiere a la secuencia de una hebra opuesta con respecto a la secuencia de una hebra de un ADN bicatenario que consiste en los pares de bases [A:T] y [G:C]. Además, "complementaria" significa no sólo una secuencia de nucleótidos completamente complementaria a una secuencia de nucleótidos continua con al menos 15 nucleótidos sino también a una identidad de al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente el 90%, y todavía más preferiblemente el 95% o más (el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99%) a nivel de la secuencia de nucleótidos. Tales ADN pueden usarse como sonda para detectar o aislar un ADN en el contexto de la presente invención, o como cebador para amplificar el ADN.

Tales cebadores incluyen, pero no se limitan a, los conjuntos de cebadores descritos a continuación:

un conjunto de cebadores que consiste en cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 y 5, que se usan para amplificar *Dro1*-INDEL09, un marcador InDel para el polimorfismo entre IR64 y

Kinandang Patong;

un conjunto de cebadores que consiste en cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6 y 7, que se usan para amplificar Dro1-CAPS05, un marcador CAPS para el polimorfismo entre IR64 y Kinandang Patong;

un conjunto de cebadores que consiste en cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 y 9, que se usan para amplificar SNP02-KP, un marcador específico de ADN genómico de tipo Kinandang Patong; y un conjunto de cebadores que consiste en cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 10 y 11, que se usan para amplificar SNP02-IR64, un marcador específico de ADN genómico derivado de IR64.

Además, la presente invención prevé de 20 a 100 nucleótidos consecutivos del gen Dro1, que comprenden la totalidad o una parte de un fragmento de ADN amplificado con un conjunto de cebadores descrito anteriormente usando como molde un ADN genómico derivado de una planta (por ejemplo, planta de arroz). Tales ADN pueden usarse para evaluar si una planta de prueba tiene un enraizamiento profundo o poco profundo.

Cuando se usan oligonucleótidos en el contexto de la presente invención como sondas, se usan preferiblemente después del marcado apropiado. Los métodos de marcado incluyen, por ejemplo, aquellos en los que el extremo 5' de un oligonucleótido se fosforila con ³²P usando una T4 polinucleótido cinasa, y métodos en los que se incorporan nucleótidos de sustrato marcados con isótopos tales como ³²P, colorantes fluorescentes, biotina, o similares en el oligonucleótido mediante una ADN polimerasa tal como enzima de Klenow, usando como cebadores oligonucleótidos de hexámeros al azar o similares (métodos de cebado al azar y similares).

Los oligonucleótidos en el contexto de la presente invención pueden producirse, por ejemplo, con un sintetizador de oligonucleótidos disponible comercialmente. Las sondas también pueden producirse como fragmentos de ADN bicatenario obtenidos mediante tratamiento con enzimas de restricción o similar.

Además, la presente invención prevé agentes farmacéuticos que confieren un rasgo de enraizamiento profundo a plantas que comprenden el gen Dro1 o un vector que porta el gen de manera expresable. El tipo de los ADN usados en los agentes farmacéuticos previstos en la presente invención no está limitado particularmente, y los ADN pueden ser ADNc o ADN genómicos. Además, es posible usar no sólo ADN que codifican para una proteína Dro1 derivada de planta de arroz sino también ADN que codifican para una proteína estructuralmente similar a la proteína (por ejemplo, mutantes, derivados, alelos, variantes y homólogos), siempre que puedan conferir un rasgo de enraizamiento profundo a una planta cuando se introducen en la planta.

Los ADN incluidos en los agentes farmacéuticos previstos en la presente invención pueden insertarse en vectores. Los vectores no están particularmente limitados, siempre que permitan que se expresen en células vegetales los genes introducidos. Por ejemplo, es posible usar vectores que contienen promotores para expresiones de genes homeostáticos en células vegetales (por ejemplo, el promotor del gen de SK2 quitinasa de la patata, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, etc.), o vectores que contienen promotores que se activan de manera inducible mediante estimulación externa.

Los agentes farmacéuticos previstos en la presente invención pueden ser los ADN descritos anteriormente o vectores a los que se les ha insertado un ADN descrito anteriormente, y pueden mezclarse con otros componentes para la introducción en células vegetales. Por ejemplo, los ADN descritos anteriormente, vectores los que se les ha insertado un ADN descrito anteriormente, *Agrobacteria* a las que se les introdujo un ADN descrito anteriormente, y reactivos bioquímicos y disoluciones que los comprenden también están incluidos en los agentes farmacéuticos previstos en la presente invención.

Además, la presente invención se refiere a plantas que se transforman con un ADN en el contexto de la presente invención, y que son resistentes a la sequía.

La presente invención o descripción también se refiere respectivamente, a células, materiales de propagación y órganos aislados a partir de las plantas descritas anteriormente.

Además, la presente invención prevé alimentos procesados obtenidos a partir de al menos uno de células, materiales de propagación y órganos descritos anteriormente.

Además, la presente invención se refiere a métodos para producir plantas transformadas resistentes a la sequía, que comprenden las etapas de introducir un ADN o vector en el contexto de la presente invención en células vegetales y regenerar plantas a partir de las células vegetales.

La presente invención también se refiere a métodos para evaluar si una planta es resistente a la sequía, que comprenden las etapas (a) a (c) descritas a continuación, en los que se considera que una planta de prueba es

resistente a la sequía cuando el peso molecular o la secuencia de nucleótidos es idéntico/idéntica.

(a) preparar una muestra de ADN a partir de una planta de prueba;

5 (b) amplificar una región que comprende un ADN en el contexto de la presente invención a partir de la muestra de ADN; y

(c) comparar el peso molecular o la secuencia de nucleótidos del ADN en el contexto de la presente invención con el del fragmento de ADN amplificado.

10 La presente invención también se refiere a métodos para evaluar si una planta es resistente a la sequía, que comprenden la etapa de llevar a cabo PCR con cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 y 9 usando como molde un ADN genómico preparado a partir de una planta de prueba, en los que se considera que la planta de prueba es resistente a la sequía cuando la PCR proporciona un producto de
15 amplificación.

Además, la presente invención se refiere a métodos para evaluar si una planta es resistente a la sequía, que comprenden la etapa de llevar a cabo PCR con cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 10 y 11 usando como molde un ADN genómico preparado a partir de una planta de prueba, en los que se
20 considera que la planta de prueba no es resistente a la sequía cuando la PCR proporciona un producto de amplificación.

Además, la presente invención se refiere a métodos para seleccionar plantas resistentes a la sequía, que comprenden las etapas de:

25 (a) producir un cultivar mediante cruzamiento de una planta arbitraria con una planta resistente a la sequía; y

(b) evaluar si una planta producida en la etapa (a) es resistente a la sequía mediante el método descrito anteriormente para evaluar si una planta es resistente a la sequía.

30 La producción de plantas transformadas que son resistentes a la sequía, la evaluación plantas para determinar resistencia a la sequía y la selección de plantas resistentes a la sequía pueden lograrse según la descripción en el presente documento.

35 Puede evaluarse si una planta es resistente a la sequía midiendo la temperatura de las hojas.

En el presente documento, siempre que la temperatura de las hojas de un transformante de planta disminuya en una condición de estrés por sequía artificial (en un entorno seco) en comparación con un control, aunque la disminución de temperatura sea muy pequeña, se considera que la planta es "resistente a la sequía".

40 En el presente documento, temperatura de las hojas se refiere a la temperatura de la superficie de la hoja de una planta. Las plantas absorben dióxido de carbono a través de estomas para la fotosíntesis. Al mismo tiempo, el agua intracelular se evapora a través de estomas a la atmósfera. Esto da como resultado una pérdida de agua. El fenómeno se denomina transpiración. Con respecto a estas conexiones, Takai *et al.*, han notificado que la temperatura de las hojas tiene una correlación negativa con la tasa de fotosíntesis y el grado de dilatación de estomas (conductancia estomática) (Takai *et al.*, Field Crops Research doi:10.1016/j.fcr.2009.10.019, 2009). Cuanto más se abren los estomas, más activa se vuelve la transpiración. La transpiración extrae calor de la superficie de la hoja, dando como resultado una reducción de la temperatura de las hojas. Cuando una planta está fotosintetizando de manera activa, abre los estomas, y la transpiración se vuelve activa. Esto da como resultado una disminución de temperatura en la superficie de la hoja. Mientras tanto, con el estrés por sequía, la planta suprime la transpiración cerrando los estomas para mantener el potencial hídrico celular. Esto altera la fotosíntesis y aumenta la temperatura de la superficie de la hoja. Las plantas resistentes a la sequía, que pueden abrir los estomas y fotosintetizar incluso en condiciones de sequía, tienen una temperatura inferior de las hojas en comparación con plantas sensibles a la sequía. Hirayama *et al.* han notificado que la selección de líneas de plantas de arroz resistentes a la sequía usando la temperatura de las hojas como indicador es eficaz en el desarrollo de cultivos de arroz resistentes a la sequía (Hirayama *et al.*, Breeding Science 56: 47-54. 2006). Tal como se describe en los ejemplos en el presente documento, puede evaluarse de manera sencilla si una planta tiene una baja temperatura de las hojas sometiéndola a prueba con estrés por sequía usando un dispositivo tal como termografía por infrarrojos. Mientras tanto, la fotosíntesis y el grado de dilatación de estomas pueden evaluarse mediante pruebas sencillas con estrés por sequía usando un dispositivo tal como el sistema de medición de fotosíntesis/transpiración, tal como se describe en los ejemplos en el presente documento.

60 Además, se conoce que en general las plantas muestran rizadura de las hojas cuando se exponen a estrés por sequía. En particular, se sabe que las hojas de planta de arroz se enrollan para dar una forma de tipo aguja. Sin embargo, las plantas transformadas de la presente invención difícilmente muestran rizadura de las hojas ni siquiera
65

con estrés por sequía.

Específicamente, la presente invención se refiere a plantas que se transforman con un ADN en el contexto de la presente invención, y que son resistentes a rizado de las hojas con estrés por sequía.

La presente invención también se refiere a células, a materiales de propagación y a órganos aislados a partir de las plantas descritas anteriormente.

La presente invención también se refiere a alimentos procesados obtenidos a partir de al menos uno de las células, los materiales de propagación y los órganos descritos anteriormente.

Además, la presente invención se refiere a métodos para producir plantas transformadas resistentes a rizado de las hojas con estrés por sequía, que comprenden las etapas de introducir un ADN o vector en el contexto de la presente invención en células vegetales y regenerar plantas a partir de las células vegetales.

La presente invención también se refiere a métodos para evaluar si una planta es resistente a rizado de las hojas con estrés por sequía, que comprenden las etapas (a) a (c) descritas a continuación, en los que se considera que una planta de prueba es resistente a rizado de las hojas con estrés por sequía cuando el peso molecular o la secuencia de nucleótidos es idéntico/idéntica:

(a) preparar una muestra de ADN a partir de una planta de prueba;

(b) amplificar una región que comprende un ADN en el contexto de la presente invención a partir de la muestra de ADN; y

(c) comparar el peso molecular o la secuencia de nucleótidos del ADN en el contexto de la presente invención con el/la del fragmento de ADN amplificado.

La presente invención también se refiere a métodos para evaluar si una planta es resistente a rizado de las hojas con estrés por sequía, que comprenden la etapa de llevar a cabo PCR con cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 y 9 usando como molde un ADN genómico preparado a partir de una planta de prueba, en los que se considera que la planta de prueba es resistente a rizado de las hojas con estrés por sequía cuando la PCR proporciona un producto de amplificación.

Además, la presente invención se refiere a métodos para evaluar si una planta es resistente a rizado de las hojas con estrés por sequía, que comprenden la etapa de llevar a cabo PCR con cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 10 y 11 usando como molde un ADN genómico preparado a partir de una planta de prueba, en los que se considera que la planta de prueba no es resistente a rizado de las hojas con estrés por sequía cuando la PCR proporciona un producto de amplificación.

Además, la presente invención se refiere a métodos para seleccionar plantas que son resistentes a rizado de las hojas con estrés por sequía, que comprenden las etapas de:

(a) producir un cultivar mediante cruzamiento de una planta arbitraria con una planta que es resistente a rizado de las hojas con estrés por sequía; y

(b) evaluar si una planta producida en la etapa (a) es resistente a rizado de las hojas con estrés por sequía mediante el método descrito anteriormente para evaluar si una planta es resistente a rizado de las hojas con estrés por sequía.

La producción de plantas transformadas que son resistentes a rizado de las hojas con estrés por sequía, la evaluación de si una planta es resistente a rizado de las hojas con estrés por sequía y la selección de plantas que son resistentes a rizado de las hojas con estrés por sequía pueden lograrse según la descripción en el presente documento.

En el presente documento, la resistencia a rizado de las hojas se refiere a la resistencia a la rizado de las hojas provocada por estrés por sequía. Cuando las hojas de planta de arroz se deshidratan, la presión de turgencia de células motoras epicuticulares se reduce dentro de las hojas y como resultado se rizan de modo que el lado epicuticular se vuelve cóncavo. Puede evaluarse de manera sencilla si una planta es resistente a rizado de las hojas mediante pruebas para determinar si sus hojas se rizan con estrés por sequía.

En el presente documento, siempre que el grado de rizado de las hojas en un transformante de planta sea menor en comparación con un control, aunque la diferencia en el grado sea muy pequeña, se considera que la planta es "resistente a rizado de las hojas".

Además, en condiciones de estrés por sequía, con frecuencia las plantas de cultivo son en general muy estériles, dando como resultado una reducción del número de granos madurados y peso de grano madurado. Esto conduce a una reducción del rendimiento del cultivo final. Sin embargo, incluso con estrés por sequía, las plantas transformadas de la presente invención producen un mayor número de granos madurados o granos madurados más pesados (se ha suprimido la reducción del número de granos madurados o peso de grano madurado) en comparación con plantas que no tienen un ADN en el contexto de la presente invención (control).

Específicamente, la presente invención se refiere a plantas transformadas con un ADN en el contexto de la presente invención, que producen un mayor número de granos madurados o granos madurados más pesados en comparación con un control con estrés por sequía. Una planta de este tipo también puede denominarse planta que se ha mejorado para reducir una pérdida en el número de granos madurados o peso de grano madurado con estrés por sequía. Alternativamente, la planta puede denominarse planta que se ha mejorado para tener un número de granos madurados aumentado o peso de grano madurado aumentado con estrés por sequía en comparación con un control.

Además, la presente invención se refiere a células, materiales de propagación y órganos aislados a partir de las plantas descritas anteriormente.

La presente invención también se refiere a alimentos procesados producidos a partir de al menos uno de las células, los materiales de propagación y los órganos descritos anteriormente.

Además, la presente invención se refiere a métodos para producir una planta transformada que produce un mayor número de granos madurados o granos madurados más pesados con estrés por sequía en comparación con un control, que comprenden las etapas de introducir un ADN o vector en el contexto de la presente invención en células vegetales y regenerar plantas a partir de las células vegetales.

Además, la presente invención se refiere a métodos para evaluar si una planta produce un mayor número de granos madurados o granos madurados más pesados con estrés por sequía en comparación con un control, que comprenden las etapas (a) a (c) a continuación, en los que se considera que una planta de prueba produce un mayor número de granos madurados o granos madurados más pesados con estrés por sequía en comparación con un control cuando el peso molecular o la secuencia de nucleótidos es idéntico/idéntica:

- (a) preparar una muestra de ADN a partir de una planta de prueba;
- (b) amplificar una región que comprende un ADN en el contexto de la presente invención a partir de la muestra de ADN; y
- (c) comparar el peso molecular o la secuencia de nucleótidos del ADN en el contexto de la presente invención con el/la del fragmento de ADN amplificado.

La presente invención también se refiere a métodos para evaluar si una planta produce un mayor número de granos madurados o granos madurados más pesados con estrés por sequía en comparación con un control, que comprenden la etapa de llevar a cabo PCR con cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 y 9 usando como molde un ADN genómico preparado a partir de una planta de prueba, en los que se considera que la planta de prueba produce un mayor número de granos madurados o granos madurados más pesados con estrés por sequía en comparación con un control cuando la PCR proporciona un producto de amplificación.

Además, la presente invención se refiere a métodos para evaluar si una planta produce un mayor número de granos madurados o granos madurados más pesados con estrés por sequía en comparación con un control, que comprenden la etapa de llevar a cabo PCR con cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 10 y 11 usando como molde un ADN genómico preparado a partir de una planta de prueba, en los que se considera que la planta de prueba produce un mayor número de granos madurados o granos madurados más pesados con estrés por sequía en comparación con un control cuando la PCR proporciona un producto de amplificación.

Además, la presente divulgación se refiere a métodos para seleccionar plantas que producen un mayor número de granos madurados o granos madurados más pesados con estrés por sequía en comparación con un control, que comprenden las etapas de:

- (a) producir un cultivar mediante cruzamiento de una planta arbitraria con una planta que produce un mayor número de granos madurados o granos madurados más pesados con estrés por sequía en comparación con un control; y
- (b) evaluar si una planta creada en la etapa (a) produce un mayor número de granos madurados o granos madurados más pesados con estrés por sequía en comparación con un control mediante el método descrito

anteriormente para evaluar si una planta produce un mayor número de granos madurados o granos madurados más pesados con estrés por sequía en comparación con un control.

5 La producción, la evaluación y la selección de las plantas descritas anteriormente pueden lograrse según la descripción en el presente documento.

10 En el presente documento, “producir un mayor número de granos madurados o granos madurados más pesados” significa que el número de granos madurados con estrés por sequía es mayor o que el peso de grano madurado con estrés por sequía es más pesado en comparación con un control que no tiene un ADN en el contexto de la presente invención. En el presente documento, siempre que el número de granos madurados sea mayor o el peso de grano madurado sea más pesado en comparación con el control, aunque la diferencia sea muy pequeña, se considera que la planta “produce un mayor número de granos madurados o granos madurados más pesados”.

15 El número de granos madurados de una planta puede determinarse fácilmente, por ejemplo, contando los granos madurados en panículas cosechadas excluyendo panículas estériles. Sin embargo, el método de determinación no se limita a este ejemplo. Mientras tanto, el peso de grano madurado de una planta puede determinarse fácilmente, por ejemplo, pesando granos madurados en panículas cosechadas excluyendo panículas estériles. Sin embargo, el método de determinación no se limita a este ejemplo.

20 A continuación se indican las SEQ ID NO correspondientes a secuencias respectivas:

SEQ ID NO: 1, la secuencia de nucleótidos de ADN genómico para el gen Dro1 de Kinandang Patong;

25 SEQ ID NO: 2, la secuencia de nucleótidos de ADNc para el gen Dro1 de Kinandang Patong;

SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la proteína Dro1 de Kinandang Patong;

30 SEQ ID NO: 4 y 5, un conjunto de cebadores usado para amplificar Dro1-INDEL09, un marcador de InDel para el polimorfismo entre IR64 y Kinandang Patong;

SEQ ID NO: 6 y 7, un conjunto de cebadores usado para amplificar Dro1-CAPS05, un marcador de CAPS para el polimorfismo entre IR64 y Kinandang Patong;

35 SEQ ID NO: 8 y 9, un conjunto de cebadores usado para amplificar SNP02-KP, un marcador específico de ADN genómico de Kinandang Patong;

SEQ ID NO: 10 y 11, un conjunto de cebadores usado para amplificar SNP02-IR64, un marcador específico de ADN genómico de IR64;

40 SEQ ID NO: 12, la secuencia CDS de nucleótidos del gen Dro1 de sorgo;

SEQ ID NO: 13, la secuencia de aminoácidos de la proteína Dro1 de sorgo;

45 SEQ ID NO: 14, la secuencia CDS de nucleótidos del gen Dro1 de maíz;

SEQ ID NO: 15, la secuencia de aminoácidos de la proteína Dro1 de maíz;

50 SEQ ID NO: 16, la secuencia de nucleótidos de ADNc de Nipponbare usada en el sistema de captura FOX [esta secuencia tiene una adición de 1 pb en cada uno de los extremos 5' y 3' en comparación con la secuencia de ADNc (la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2) determinada basándose en la secuencia de nucleótidos de ADN genómico. Además, este ADNc tenía una sustitución de nucleótido de G por A en la posición de pb 373 desde el extremo 5' en su secuencia de nucleótidos (en la posición de pb 372 desde el extremo 5' en SEQ ID NO: 2)];

55 SEQ ID NO: 17, la secuencia de nucleótidos del gen Dro1 de Kinandang Patong y su secuencia en el sentido de 5' que incluye la región promotora; y

SEQ ID NO: 18, la secuencia de nucleótidos de una región en Nipponbare que corresponde a SEQ ID NO: 17.

60 Ejemplos

En la presente invención, se mejoró un método de cesta para permitir la evaluación sencilla, reproducible del enraizamiento profundo de un modo con ahorro de espacio. Además, se mejoró un método de transformación de *Agrobacterium* basado en callo para introducir secuencias de nucleótidos candidatas en IR64, y el gen se introdujo en IR64. Se aisló y se identificó la secuencia de nucleótidos de Dro1, que es el gen de enraizamiento profundo, mediante un método de clonación basado en mapa. Por tanto, los presentes inventores desarrollaron técnicas para

conferir la capacidad de evitación de la sequía a plantas de arroz modificando fácilmente el enraizamiento profundo usando el gen.

5 A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá específicamente con referencia a los ejemplos, pero no debe interpretarse que se limita a los mismos.

[Ejemplo 1] Identificación del locus génico de Dro1

10 Se distribuyeron dos cultivos de arroz: Kinandang Patong (una variedad de arroz de tierras altas de Filipinas) y IR64 (un cultivar de arroz de arrozal desarrollado por el International Rice Research Institute) por el International Rice Research Institute. Se cruzaron los dos cultivos entre sí para obtener materiales para el aislamiento de genes. Entre la población de BC₂F₂ que resulta del cruce de los dos cultivos, una población se segregó en el cromosoma 9 pero se fijó para IR64 homocigoto lo más posible en las otras regiones cromosómicas segregadas en plantas con enraizamiento poco profundo y plantas con enraizamiento profundo. IR64 y Kinandang Patong muestran el tipo de enraizamiento poco profundo y el tipo de enraizamiento profundo, respectivamente. Por tanto, se supuso que el gen responsable del enraizamiento profundo de Kinandang Patong estaba implicado en la segregación. Desde la perspectiva descrita anteriormente, los inventores evaluaron minuciosamente la población y dividieron las plantas en los tipos de enraizamiento poco profundo y enraizamiento profundo para investigar los genotipos. El resultado mostró que el locus de rasgo cuantitativo (QTL) relacionado con el enraizamiento profundo estaba ubicado en el cromosoma 9 (Uga *et al.*, The 2nd International Conference on Plant Molecular Breeding, 2007). Se llevó a cabo un análisis genético detallado usando el método de cesta que permite la evaluación cuantitativa del enraizamiento profundo. Específicamente, se llenaron cestas de plástico con un diámetro de 15 cm con tierra y se introdujeron en macetas. Tras la siembra, se cultivaron plantas de arroz hasta que alcanzaron aproximadamente la edad de hoja 8. Se evaluó el enraizamiento profundo basándose en la razón de enraizamiento profundo, que se definió como el porcentaje de raíces que penetran en el fondo de la cesta con respecto al número total de raíces que penetran en cada cesta. Las cestas tienen fondos planos. Cuando se extienden hacia abajo más de 53° con respecto a la superficie del terreno, la raíz penetra en el fondo de la cesta. La razón de enraizamiento profundo media fue del 1,6% para IR64, mientras que la razón media de Kinandang Patong fue del 72,6%. Para mapear el QTL relacionado con el enraizamiento profundo como un locus individual, se seleccionaron ocho plantas que tenían recombinaciones en una región cerca del QTL de la población BC₂F₂. Entonces, se seleccionaron líneas fijadas endogámicas (BC₂F₄) de las progenies autofecundadas (BC₂F₃). De cada línea fijada, se cultivaron de 20 a 23 plantas en una maceta. Se dedujeron los genotipos de la razón de enraizamiento profundo determinada mediante el método de cesta. A partir de la línea BC₂F₄, las variedades cuya región alrededor de QTL se fijaron en el tipo IR64 mostraron una razón de enraizamiento profundo media del 2,6%, que fue casi comparable con la de IR64. Mientras, las variedades cuyas regiones alrededor de QTL se fijaron en el tipo Kinandang Patong mostraron una razón de enraizamiento profundo media del 40,4%. A partir de estos resultados se determinaron claramente sus genotipos de QTL. Se mapeó el QTL como un locus individual ubicado entre los marcadores de InDel: ID07_14 y ID07_17. Por tanto, el QTL se denominó locus relacionado con enraizamiento profundo "Dro1" (enraizamiento más profundo 1) (Uga *et al.*, Nihon Ikusyu Gakkai Dai 112 Kai Kouenkai Youshisyu (112nd Meeting of The Japanese Society of Breeding, Program and Abstracts) págs. 188, 2007; Uga *et al.*, Dai 27 Kai Ne Kenkyu Syukai (27th Research Meeting of The Japanese Society for Root Research), 2007; Uga *et al.*, The 5th International Crop Science Congress Abstracts 243p. 2008). Además, se evaluaron todos los marcadores de SSR ubicados en la región entre los dos marcadores de InDel mediante análisis de polimorfismo basado en información pública sobre marcadores de repetición de secuencia única (SSR) (International Rice Genome Sequencing Project 2005). La región candidata para Dro1 se limitó a 608 kpb ubicadas entre los marcadores de SSR: RM24393 y RM7424.

[Ejemplo 2] Análisis de ligamiento de alta resolución

50 Para aislar el gen Dro1 mediante un método de clonación basado en mapa, se seleccionaron 359 plantas que tenían recombinaciones dentro de la región candidata de la población BC₃F₂ que consistía en 4.560 plantas. Tuvo que evaluarse un gran número de plantas de una vez para determinar su razón de enraizamiento profundo con el fin de limitar la región candidata usando progenies de las plantas seleccionadas. Entonces, los presentes inventores desarrollaron un método de evaluación que permite el cultivo hidropónico sin introducir las cestas en macetas. En el método de cesta mejorado desarrollado por los presentes inventores, se colocaron cestas de acero inoxidable hechas a medida con un diámetro de 7,5 cm llenas de tierra en un medio hidropónico, en lugar de introducirse en macetas. Por tanto, el método permite evaluar plantas de arroz para determinar la razón de enraizamiento profundo en la cuarta parte del espacio requerido en el método original. En el método de cesta mejorado, se definió la raíz profunda como la que se extiende hacia abajo más de 50° con respecto a la superficie del terreno (figura 1). Usando el método de cesta mejorado, se determinó la razón de enraizamiento profundo evaluando aproximadamente 40 plantas por línea. Se predijo el genotipo del gen Dro1 en cada línea basándose en la distribución de frecuencia de la razón de enraizamiento profundo. Para limitar la región del gen, se seleccionaron marcadores de ADN mediante examen. La información sobre los SNP ubicados cerca de Dro1 en Azucena, un cultivar estrechamente relacionado con IR64 y Kinandang Patong, se extrajo de la página web de OryzaSNP Consortium (http://irfgc.irri.org/index.php?opcion=com_content&task=vista&id=14&Itemid=106) para el diseño de marcadores de CAPS. Se sometieron a prueba los marcadores de CAPS para determinar polimorfismos. Como resultado, seis

marcadores detectaron polimorfismos entre IR64 y Kinandang Patong, y se usaron los seis marcadores de polimorfismo en el mapeo. Además, se construyeron bibliotecas de BAC de IR64 y Kinandang Patong y se examinaron para determinar clones que comprendieran la región candidata. Los clones seleccionados se analizaron mediante secuenciación de nucleótidos. La información de secuencia resultante se usó para preparar 11 tipos de marcadores de InDel y marcadores de CAPS para determinar polimorfismo entre IR64 y Kinandang Patong. Se seleccionaron líneas recombinantes de 359 líneas usando estos marcadores. Mediante el análisis de ligamiento, la región del gen *Dro1* se limitó a una región de 6,0 kpb entre el marcador de InDel *Dro1*-INDEL09 (cebadores: 5'-GCAGACGCTCGTAACACGTA-3' ((SEQ ID NO: 4) y 5'-GTGGCAGCTCCATCAACTCT-3' (SEQ ID NO: 5)) y un marcador de CAPS *Dro1*-CAPS05 (cebadores: 5'-GCACAAGATGGGAGGAGAGT-3' (SEQ ID NO: 6) y 5'-CATGGGTGAGAATCGTGTG-3' (SEQ ID NO: 7); el ADN amplificado se digiere con enzima de restricción *Hinf*I. Un análisis de RAP-DB de la secuencia de nucleótidos genómica que comprende la región candidata reveló la presencia de un gen predicho. Se encontró que el gen predicho tenía una delección de 1 pb en el exón 4 de la secuencia IR64 que produce un cambio de marco, dando como resultado un codón de terminación.

15 [Ejemplo 3] Prueba de complementación para la identificación del gen *Dro1* y la evaluación de la razón de enraizamiento profundo en plantas que sobreexpresan el gen *Dro1*

3.1 Prueba de complementación para la identificación del gen *Dro1*

20 Se supuso que el gen predicho mediante RAP-DB era *Dro1*. Se insertó un fragmento *Kpn*I-*Not*I de 8,7 kpb derivado de Kinandang Patong que cubre la región candidata de 6,0 kpb para *Dro1* y sus regiones en el sentido de 5' y en el sentido de 3' en pZP2H-lac (Fuse *et al.*, Plant Biotechnology 18: 219-222, 2001), y se introdujo en callos de IR64 a través de *Agrobacterium* EHA101. Específicamente, se llevó a cabo la transformación de IR64 tal como sigue.

25 (Inducción de callos para infección por *Agrobacterium*)

Se colocaron semillas de IR64 esterilizadas en un medio de inducción de callo que contenía 2,4-D y se cultivaron a de 30 a 33°C durante una semana bajo luz continua. Entonces se dividieron los callos y se transfirieron a un medio de inducción de callo recién preparado. Se repitió este procedimiento tres veces para la formación del callo. El medio de inducción de callo usado se modificó a partir de NBPRCH40 (Hiei y Komari Nature Protocols 3: 824-834. 2008), que se había usado en Hiei y Komari para precultivar callos para la rediferenciación de transformantes de plantas tras la selección de callos transformados mediante el método del embrión inmaduro. El medio de inducción de callo tiene la composición siguiente:

35 100 ml de sales principales de N6 10x, 10 ml de Fe-EDTA 100x, 1 ml de sales minoritarias de B5 1.000x, 1 ml de vitaminas B5 1.000x, maltosa 30 g/l, casaminoácidos 0,5 g/l, prolina 0,5 g/l, 2,4-D 2 mg/l y Gelrite 5 g/l (pH 5,8).

(Infección por *Agrobacterium*)

40 Antes de la infección, se transfieren los callos a un medio recién preparado. Tras tres días de precultivo, se sumergieron los callos en una suspensión de *Agrobacterium*. Entonces, se transfirieron los callos a medio 2N6-AS (Hiei y Komari, Nature Protocols 3: 824-834. 2008) y se cocultivaron a 23°C en la oscuridad.

(Retirada de bacteria y selección de callos transformados)

45 Se retiró *Agrobacterium* tras el cocultivo. Entonces, con el fin de seleccionar células transformadas, se colocaron los callos transformados en un medio de inducción (selección) de callo que contenía fármacos (higromicina 25 mg/l y carbenicilina 400 mg/l). Tras una semana de cultivo a de 30 a 33°C bajo luz continua, se dividieron los callos y se transfirieron en un medio de selección recién preparado. Este procedimiento se repitió tres veces para seleccionar las células transformadas.

(Rediferenciación de transformantes)

55 Se transfirieron los callos crecidos en el medio de selección a un medio de rediferenciación. Tras de una semana a 10 días de cultivo a 28°C bajo luz continua, se transfirieron los callos que estaban brotando a un medio de rediferenciación recién preparado. Este procedimiento se repitió dos veces para seleccionar plantas transformadas. La composición del medio de rediferenciación es tal como sigue: 100 ml de sales principales de N6 10x, 10 ml de Fe-EDTA 100x, 1 ml de sales minoritarias de B5 1.000x, 1 ml de vitaminas B5 1.000x, maltosa 30 g/l, sorbitol 30 g/l, casaminoácidos 2 g/l, prolina 0,5 g/l, NAA 0,02 mg/l, 5 g/l, cinetina 2 mg/l y Gelrite 5 g/l (pH 5,8). La higromicina y la carbenicilina se añadieron a 25 mg/l y 300 mg/l al medio preparado, respectivamente.

(Naturalización)

65 Se transfirieron los transformantes rediferenciados y se cultivaron en un medio de enraizamiento (medio MS (Gelrite 4 g/l (pH 5,8) complementado con higromicina 25 mg/l y carbenicilina 200 mg/l)) a 28°C bajo luz continua. Las

plantas transformadas se naturalizaron tras la confirmación de crecimiento de las raíces.

Se sometieron a prueba los 17 clones transformantes derivados de callos independientes obtenidos a través de la selección con higromicina para determinar su razón de enraizamiento profundo en la primera generación (T0) mediante el método de cesta mejorado. Entre las líneas en las que se introdujo el fragmento de 8,7 kpb derivado de Kinandang Patong varias líneas mostraron una razón de enraizamiento profundo alta, mientras que la razón de enraizamiento profundo en el control con vector fue la misma que la de IR64 (figuras 1 y 2). Se determinó el número de copias del vector de transformación introducido en cada planta de la generación T0 mediante el uso combinado de análisis de tipo Southern y un sistema de PCR en tiempo real que permite la detección de la secuencia del gen resistente a higromicina en el vector de transformación. Se seleccionaron plantas que portaban el gen en una única copia y se produjeron semillas T1. Se dedujo el tipo nulo (0 copias), heterocigoto (1 copia) y homocigoto (2 copias) de plantas T1 de cuatro líneas con T0 de una sola copia basándose en las intensidades de señal obtenidas mediante el sistema de PCR en tiempo real y se evaluó la correlación con la razón de enraizamiento profundo. En las cuatro líneas, las plantas con intensidad de señal cero mostraron la misma razón de enraizamiento profundo que las plantas con el vector de control (figura 3). Mientras, las líneas con una intensidad fuerte mostraron una razón de enraizamiento profundo alta. Por ejemplo, se especuló que dos líneas de D27-c eran de tipo nulo, porque sus intensidades de señal eran cero y sus razones de enraizamiento profundo eran bajas. Mientras, cuatro líneas con una intensidad de señal de aproximadamente 10 a 20 mostraron una razón de enraizamiento profundo media y por tanto se supuso que eran de tipo heterocigoto; y las cuatro líneas con una intensidad de señal de aproximadamente 40 a 70 mostraron una razón de enraizamiento profundo alta, y por tanto se consideró que eran de tipo homocigoto. Tal como se describió anteriormente, en las líneas T1 con una única copia de Dro1, se encontró una correlación positiva entre la razón de enraizamiento profundo y la segregación de genotipo para el gen Dro1 introducido.

3.2 Evaluación de plantas que sobreexpresan el gen Dro1 para determinar su razón de enraizamiento profundo

Se ha registrado un ADNc de longitud completa (AK068870) para el supuesto gen en RAP-DB. Dos líneas Nipponbare para cada una de las generaciones T1 y T2 están disponibles en el sistema de captura FOX (sistema de captura de genes que sobreexpresan ADNc de longitud completa). La secuencia de ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 16) usada para las líneas FOX tiene una adición de 1 pb en cada uno de los extremos 5' y 3' en comparación con la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 2) determinada a partir de la secuencia de nucleótidos genómica. Además, este ADNc tenía una nucleótido sustitución de G por A en la posición de pb 373 desde el extremo 5' en su secuencia de nucleótidos (en la posición de pb 372 desde el extremo 5' en SEQ ID NO: 2). La sustitución de nucleótido dio como resultado una sustitución de aminoácido no sinónima de ácido glutámico por lisina en la posición 37 en la SEQ ID NO: 3. Se evaluaron cinco plantas de cada una de las cuatro líneas para determinar su razón de enraizamiento profundo mediante el método de cesta mejorado. El resultado mostró que en las líneas FOX la razón de enraizamiento profundo osciló entre el 8,1 y el 50,0% mientras que la razón fue de entre el 12,2 y el 23,5% para diez Nipponbare de tipo natural (control). Por tanto, plantas de las líneas FOX incluyen las que presentan un razón de enraizamiento profundo significativamente mayor que Nipponbare (figura 4).

El resultado demostró que gen predicho en la región candidata de 6,0 kpb era el Dro1 auténtico. Mientras, el resultado de la prueba de complementación sugirió que Dro1 de tipo Kinandang Patong era la forma funcional responsable del enraizamiento profundo, mientras que Dro1 de tipo IR64 había perdido la función o que su función había resultado afectada, dando como resultado un enraizamiento poco profundo.

Se evaluaron dos líneas (T1) que tenían Dro1 en múltiples copias para determinar la relación entre la intensidad de señal y la razón de enraizamiento profundo. En D130-c, se encontró una correlación positiva entre la intensidad de señal y la razón de enraizamiento profundo (figura 3). Mientras, con respecto a D91-e, se observó una correlación positiva entre la intensidad de señal y la razón de enraizamiento profundo en cuatro plantas que dieron una intensidad de señal comparable a la del homocigoto con una única copia del gen (de 10 a 350); sin embargo, seis líneas con una alta intensidad de señal (de 500 a 2.000) tuvieron el mismo enraizamiento poco profundo que la del control con vector. Se supuso que la introducción de Dro1 en múltiples copias producía el silenciamiento del gen en las plantas. Esto sugiere que es necesario ajustar el nivel de expresión del gen Dro1, por ejemplo, mediante la selección de plantas que tienen una única copia del gen en el momento de introducción.

[Ejemplo 4] Homología de secuencia de aminoácidos entre Dro1 de arroz, sorgo y maíz

Usando la secuencia de aminoácidos de Dro1 como consulta, se buscaron genes homólogos a Dro1 mediante blastn en la página web de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La búsqueda identificó genes altamente homólogos; uno fue un gen de sorgo y el otro fue un gen de maíz. Tanto en el sorgo como en el maíz, el ORF con la mayor homología con Dro1 no tenía nombre de gen. Por tanto, los presentes inventores nombraron los genes de sorgo y maíz "SbDro1L1" y "ZmDro1L1", respectivamente. La secuencia de aminoácidos para el gen de sorgo estaba disponible en la página web de NCBI. Mientras, la secuencia de aminoácidos para el gen de maíz se obtuvo de MaizeGDB (<http://www.maizegdb.org/>) a través de la búsqueda basada en la secuencia de ARNm extraída en NCBI. La secuencia de nucleótidos de CDS de SbDro1L1 se muestra en SEQ ID NO: 12, y la secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 13. Por otro lado, la secuencia de nucleótidos de CDS de ZmDro1L1 se

muestra en SEQ ID NO: 14, y la secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 15. SbDro1L1 y ZmDro1L1 mostraron una homología del 64% y el 62% con Dro1, respectivamente (figura 5).

[Ejemplo 5] Efecto de Dro1 en el enraizamiento profundo en condiciones de campo

5 Los presentes inventores evaluaron si Dro1 era responsable del enraizamiento profundo en condiciones de campo. Las líneas casi isogénicas (Dro1-NIL) usadas como material experimental en la prueba de campo se desarrollaron mediante el método siguiente. Se retrocruzaron F₁ de IR64/Kinandang con IR64 cuatro veces, seguido por una autofecundación. A partir de las líneas BC₄F₂ resultantes, se seleccionaron plantas homocigotas sólo para la región
10 de 16,6 a 19,5 mbp en el cromosoma 9, y se usaron semillas autofecundadas de las líneas como líneas casi isogénicas. Se plantaron semillas de IR64, Kinandang Patong y Dro1-NIL en un campo de tierras altas y se hicieron crecer con la gestión de fertilización usada comúnmente para plantas de arroz de tierras altas. Se hicieron crecer las durante 105 días en condiciones de secano. Se retiró la tierra cerca de la planta hasta una profundidad de aproximadamente 1 m con una pala de carga. Entonces, se lavó minuciosamente la superficie expuesta con agua
15 rociada hasta aproximadamente 5 cm desde la planta con el fin de observar la profundidad de raíz máxima. El resultado mostró que la profundidad de raíz de IR64, Kinandang Patong y Dro1-NIL en tierra fue de aproximadamente 20, 80 y 40 cm, respectivamente (figura 6). La longitud de raíz de Dro1-NIL fue la misma que la de IR64. Sin embargo, la profundidad de crecimiento de las raíces de Dro1-NIL fue aproximadamente el doble que la de IR64. Por tanto, aumentó el ángulo de crecimiento de las raíces debido al efecto de Dro1, y como resultado las raíces de Dro1-NIL se extendieron de manera más profunda hasta la misma profundidad (aproximadamente 40 cm)
20 que la longitud de la raíz de IR64.

[Ejemplo 6] Efecto de Dro1 sobre la resistencia a la sequía en el campo experimental para someter a prueba la resistencia a la sequía

25 Los presentes inventores sometieron a prueba si el enraizamiento profundo debido a Dro1 mejoró la resistencia a la sequía. Se usaron IR64 y Dro1-NIL como material experimental en la prueba de resistencia a la sequía. Se dispuso la misma instalación de prueba de resistencia a la sequía usada en el Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center (Hirayama y Suga, Nougyo Kenkyu Senta Kenkyu Shiryo Dai 30 Gou, Ine Ikusyu Manyuaru (Agricultural Research Center Research Data NO. 30; Rice plant breeding manual) 152-155. 1995) en un invernadero de plástico en el instituto de los inventores para llevar a cabo la prueba de resistencia a la sequía. La instalación incluye un área de irrigación y un área de estrés por sequía. En el área de irrigación, se colocaron 30 cm de capa de superficie adicional dentro de un amazón de madera sobre la tierra del suelo. En el área de irrigación, se regaron plantas de arroz de manera intermitente para evitar el estrés por sequía durante el periodo entre la siembra y la cosecha. Durante el periodo de cultivo, se monitorizó el potencial hídrico del suelo mediante un tensiómetro colocado en el suelo a una profundidad de 25 cm, y se aplicó irrigación cuando el potencial estaba por debajo de aproximadamente -0,015 MPa (figura 7). En general, las plantas no sufren estrés por sequía a este nivel. Mientras, en el área de estrés por sequía, se colocaron estratos de grava de 10 mm (5 cm de grosor) sobre el suelo de lecho del campo experimental y se colocó una capa superficial adicional de 25 cm para bloquear el agua por capilaridad del suelo. En esta disposición, el contenido de agua del suelo en el estrato de capa de superficie adicional se reduce gradualmente y se exponen las plantas al estrés por sequía cuando se termina la irrigación. En el área de estrés por sequía, la irrigación se terminó aproximadamente dos meses tras la siembra y las plantas no se regaron hasta la aparición la primera panícula. Se redujo el potencial hídrico del suelo a una profundidad de 25 cm hasta -0,07 MPa 10 días tras terminarse la irrigación. Como resultado, se logró la condición de estrés por sequía en el área de estrés por sequía (figura 7). Por otro lado, a una profundidad del suelo de 40 cm, el potencial hídrico era estable a aproximadamente -0,03 MPa durante todo el periodo de tratamiento de estrés. Por tanto, la condición de estrés por sequía no se logró a esta profundidad. En el área de estrés por sequía, se observó enrollamiento de las hojas en IR64 en el día 35 tras la terminación de la irrigación, lo que sugiere el efecto del estrés por sequía. En contraposición, no se detectó enrollamiento de las hojas en IR64 que tenían Dro1 de tipo Kinandang Patong (Dro1-NIL) (figura 8). Entonces, el grado de enrollamiento de las hojas en IR64 aumentó en el área de estrés y en el día 49 se reveló que el crecimiento de las plantas estaba gravemente suprimido. Mientras, en Dro1-NIL, el grado de enrollamiento de las hojas permaneció bajo incluso en el día 49, y el crecimiento de la planta fue vigoroso en comparación con IR64. La temperatura de las hojas media de Dro1-NIL fue de 0,7°C menor que la de IR64 en el día 35 tras la terminación de la irrigación en el área de estrés por sequía (figura 9). Se reveló que la temperatura de las hojas de Dro1-NIL era menor que la de IR64 en cada día de medición. Además, dos veces en los días 34 y 41, también se midieron IR64 y Dro1-NIL para determinar la conductancia estomática y la tasa de fotosíntesis. El resultado mostró que ambos valores de Dro1-NIL fueron significativamente mayores que los de IR64 (figura 9). Tras la primera aparición de panícula en el área de estrés por sequía, las plantas se regaron de nuevo para la maduración de los granos de arroz. Cada planta se cosechó independientemente y se evaluó para determinar la longitud de sus raicillas, la longitud de panícula, el número de panículas, el peso de panícula, el número de granos llenos y el peso de materia seca de su parte aérea. No se observó ninguna diferencia significativa las longitudes de raicillas y de panícula entre IR64 y Dro1-NIL. Mientras, el peso de material seca de su parte aérea, el número de panículas, el peso de panícula y el número de granos llenos fueron significativamente diferentes entre IR64 y Dro1-NIL (figura 10). En particular, el número de granos llenos en Dro1-NIL fue aproximadamente 3,8 veces mayor que el de IR64. Para determinar si el enraizamiento profundo de Dro1-NIL era el responsable de este resultado, se
60
65

5 diseccionó el campo experimental para observar si las raíces penetraban en la capa de grava. El resultado reveló que las raíces de Dro1-NIL penetraban a través de la capa de grava en la capa de suelo más profunda mientras que las raíces de IR64 no podían penetrar a través de la capa de grava (figura 11). Los hallazgos descritos anteriormente demostraron que las plantas de arroz adquirieron resistencia a la sequía a partir del enraizamiento profundo conferido mediante Dro1, dando como resultado aumentos en la capacidad y el rendimiento de fotosíntesis.

10 Mientras, se midió la temperatura de las hojas usando un dispositivo para representar imágenes de distribución de temperatura mediante la detección de la energía de infrarrojos emitida por el sujeto y convirtiéndola en una temperatura aparente (temografía por infrarrojos). Específicamente, se midió la temperatura de superficie de las hojas de plantas de arroz en condiciones de estrés por sequía mediante temografía por infrarrojos desde una distancia fija. Entonces, se exportaron las imágenes con software exclusivo para determinar las temperaturas de las hojas medias de las plantas en las imágenes. Se estimó la tasa de fotosíntesis colocando las hojas en una cámara ventilada con aire que contenía una concentración constante de dióxido de carbono y midiendo la disminución de la concentración de dióxido de carbono en el aire de salida de la cámara. Mientras, se estimó la conductancia estomática midiendo el aumento de contenido de vapor de agua del aire de salida de la cámara que contenía las hojas. Específicamente, los valores se determinaron tal como sigue. Se mantuvieron pinzadas hojas completamente expandidas de plantas de arroz en condiciones de estrés por sequía durante un periodo de tiempo fijo en la cámara del sistema de medición de transpiración por fotosíntesis. Se midieron las mismas hojas expandidas por triplicado para determinar el valor medio.

20 [Ejemplo 7] Efecto resistente a la sequía de Dro1 en un campo de tierras altas bajo sequía grave

25 En el ejemplo 6, se demostró que Dro1 era responsable de la resistencia a la sequía en el campo experimental para someter a prueba la resistencia a la sequía. Entonces, los presentes inventores evaluaron si Dro1 da como resultado resistencia a la sequía incluso bajo un estrés por sequía mayor en el entorno natural de un campo de cultivo. El experimento se llevó a cabo usando IR64 y Dro1-NIL en un campo de tierras altas por triplicado para áreas con (N:P:K = 12:12:9 kg/10 a) y sin fertilizante. En cada área (3 m x 3 m), se plantaron 200 plantas con una separación de 30 cm entre las filas y 15 cm entre las plantas. Las 200 plantas consistieron en 100 plantas cada uno de IR64 y Dro1-NIL. Las plantas no se regaron durante el cultivo. Por tanto, la condición de estrés por sequía fue grave, y el potencial hídrico del suelo medio fue de -0,08 MPa por debajo de una profundidad del suelo de 40 cm (figura 12), porque no hubo precipitaciones durante un mes desde 90 días tras la siembra. En la condición de estrés por sequía, el enrollamiento de las hojas apenas fue detectable en Dro1-NIL mientras que se observó enrollamiento de las hojas grave para IR64 en ambas áreas (figura 13). Particularmente, en el área sin fertilizante, apenas se detectó enrollamiento de las hojas en Dro1-NIL, mientras que IR64 mostró enrollamiento de las hojas y la fecha de granazón se retrasó significativamente en comparación con la de Dro1-NIL. Los rendimientos se estimaron mediante el método cuadrático en la temporada de cosecha. De los cinco parámetros investigados, cuatro parámetros concretamente, el número de panículas, el peso de materia seca de la parte aérea, el peso de grano total y el peso de grano lleno, tuvieron valores mayores en Dro1-NIL que en IR64 (tabla 1).

[Tabla 1] RASGOS DE RENDIMIENTO DE PLANTAS DE ARROZ CRECIDAS EN UN CAMPO DE TIERRAS ALTAS BAJO SEQUÍA GRAVE]

| TRATAMIENTO | LINEA | NUMERO DE PANICULAS | DE | PESO DE MATERIA SECA DE AEREA (g) | DE | MATERIA PARTE | PESO DE MATERIA SECA DE HOJAS DEL TALLO (g) | DE | MATERIA | PESO DE GRANO TOTAL (g) | DE | GRANO LLENO (g) | |
|-------------------|------------------|---------------------|---------|-----------------------------------|----------|---------------|---------------------------------------------|---------|---------|-------------------------|---------|-----------------|------|
| | | Media | D.E. | Media | D.E. | Media | D.E. | Media | D.E. | Media | D.E. | Media | D.E. |
| SIN FERTILIZACION | IR64 | 347,3 ± | 5,0 a | 1391,5 ± | 124,1 a | 1288,6 ± | 112,6 a | 102,9 ± | 13,3 a | 219 ± | 21,8 a | | |
| | Dro1-NIL | 394,3 ± | 12,2 bc | 1511,7 ± | 36,4 b | 1256,1 ± | 79,5 b | 255,6 ± | 60,4 b | 107,3 ± | 50,6 ab | | |
| | Dro1-NIL/IR64(%) | 113,5 | | 108,6 | | 97,5 | | 248,4 | | 491,1 | | | |
| FERTILIZACION | IR64 | 419,3 ± | 39,4 ab | 1710,7 ± | 194,2 ab | 1612,3 ± | 198,3 a | 98,4 ± | 9,5 a | 8,9 ± | 7,9 a | | |
| | Dro1-NIL | 457,0 ± | 28,2 c | 1733,8 ± | 106,6 b | 1541,9 ± | 118,1 b | 192,0 ± | 54,5 b | 69,9 ± | 48,0 b | | |
| | Dro1-NIL/IR64(%) | 109,0 | | 101,4 | | 95,6 | | 195,0 | | 783,4 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | |

Media: VALOR MEDIO PARA UN TOTAL DE 24 PLANTAS POR AREA POR TRIPLICADO. D.E.: DESVIACION ESTANDAR. LAS DIFERENTES LETRAS DEL ALFABETO INDICAN UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DEL 5% EN UNA COMPARACION POR EMPAREJAMIENTO MEDIANTE LA PRUEBA DE LA t DE STUDENT

40 En particular, el peso de grano lleno, que es el principal factor para el rendimiento, aumentó enormemente hasta 4,9 veces en el área sin fertilizante y hasta 7,8 veces en el área con fertilizante. Este hallazgo demuestra que Dro1 dio como resultado la resistencia a la sequía en el entorno de cultivo natural de un campo de cultivo en condiciones de sequía.

45 [Ejemplo 8] Marcadores para examinar la presencia de delección de un solo nucleótido en el gen Dro1

50 Puesto que la secuencia del gen Dro1 de IR64 tiene la delección de 1 base en su exón 4, se diseñaron marcadores de PCR para someter a prueba la presencia de la delección. Los dos tipos de marcadores diseñados fueron: SNP02-KP (cebadores: 5'-GTCTAGATCACGCAGTGAAT-3' (SEQ ID NO: 8) y 5'-TCGCATGATGATGACCAAGT-3' (SEQ ID NO: 9)), que se amplifica sólo en presencia del ADN de tipo Kinandang Patong y SNP02-IR64 (cebadores: 5'-ATCGTCTAGATCACGCAGTGAAC-3' (SEQ ID NO: 10) y 5'-AGGGTGGCTTTACCTCCGTA-3'(SEQ ID NO: 11)), que se amplifica sólo en presencia del ADN de tipo IR64.

La mezcla de PCR contenía cebadores 0,2 mM, 0,6 U de Tag, dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 2 mM y 20 ng de ADN por reacción (15 µl). Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: (1) 95°C durante 2 minutos; (2) 94°C durante 30 segundos; (3) temperatura de apareamiento que oscilaba entre 51,8 y 62,2°C durante 30 segundos; (4) 72°C durante 1 minuto; y (5) durante 7 minutos; 25 ciclos de las reacciones (2) a (4) para SNP02-KP; 30 ciclos de las reacciones (2) a (4) para SNP02-IR64. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis. El resultado mostró que SNP02-KP se amplificó sólo usando ADN de Kinandang Patong, mientras que SNP02-IR64 se amplificó sólo usando ADN de IR64 (figura 9).

10 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención se refiere al gen Dro1, que controla el enraizamiento profundo de plantas tales como plantas de arroz, y plantas transformadas con el gen. Se espera que se produzcan plantas con una capacidad mejorada de evitación de la sequía mediante la manipulación del gen Dro1 para convertir una planta con enraizamiento poco profundo en una planta con enraizamiento profundo. Alternativamente, puede conferirse resistencia a la humedad a las plantas mediante la manipulación del gen Dro1 de modo que una planta con enraizamiento profundo se convierte en una planta con enraizamiento poco profundo.

Las sequías han provocado una grave reducción en el rendimiento de los cultivos mundial. Mientras, en Japón, puesto que los arrozales tienen escasa eficacia de drenaje, el daño por humedad ha sido problemático para la soja y el maíz sin resistencia a la humedad. La presente invención es útil para resolver tales problemas nacionales e internacionales.

25 **Lista de secuencias**

<110> NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES

<120> Gen DRO1 que controla enraizamiento profundo de planta y utilización del mismo

30 <130> MOA-A0904P

<150> JP 2009-292524

<151> 24-12-2009

35 <160> 18

<170> PatentIn versión 3,4

<210> 1

40 <211> 3058

<212> ADN

<213> *Oryza sativa*

45 <400> 1

ES 2 641 014 T3

agatgaagta tagcaagcta tcctacagcc agccacgctg caccgaaccc tccaatcctt 60
 ggaacttgaa ccccttcaaa tcacaccag taggctacta gtagtacttc tctgcaccaa 120
 ttccatcgcc aatagcagcc actacaagtc ttacatctct cctttcctcc tctctctgcc 180
 attgctagga gcttgcattt cttggtagct tcatcagcta gctgctttct ccctcccaa 240
 tctctcattc ttcaggccag gatatgaagg taaaggctca aaccatcggg gtgattaatc 300
 atttcagaga ggttaataga tttgaagtgt tggtagtgtt gatccatttc ttgatggcat 360
 catgaggctt gggttttctc tgcagatttt cagctgggta gccaacaaga tcagtgggaa 420
 gcaagaagca aatcggtttc ccgcaaattc ttctgcgcct taccgtgagt gtacctgaac 480
 tttcagtttc cttgtaaatt ctttcagaac taagggtgatt gttgttcacc aggcttcatg 540
 ctgttcttat gaaatgtttc cctgttcctt gaggggagag ggagagtacg gacagtaatt 600
 tggaagccgt ttcctaattt gatattttct ttctgtcatt ctgctgcagt tataatgtct 660
 ttacctctta gcagtttctg cttaggcctc atttgcctta ttcatttctg gatacgatga 720
 tactttattg ctttgtccta atttaactct ttctctgtgt cattctgctc catttatggt 780
 gtctttacct cttagcagtt tccgcttagg catcatttgc catgttcatt tctgaatatg 840
 ctgatatact ttgttgtctt ggtagccata tacaagagtg aacgatttaa aggtttctcc 900
 taattgctag taacagaacg cttttcgctc tgcgattttc tggattacca tcccctgatt 960
 cctgagtaac ctatcacaac gccaatgtga tggagcaaac attgatgtat tatgacaatg 1020
 ttgtttctga tcctttgaga aaattttctt atatgcactt ggggtgttgtt tggaacgcag 1080
 gaatttcact ggaaacagtt caattatcgc acttccggaa aaaaaattcc tgcattttaa 1140
 acggcgcttt aagttcagta ggagttttca attttatttt cctcttcctt agcacgaaaa 1200
 gtgagagatt tttgtgcata tgttataccc ccaaaggact atttcatggc ctgatgcccg 1260
 ccacgccaat atctctgtaa agcactgctt ccaactagtc agtatgggtc aaagtcttga 1320

ES 2 641 014 T3

ctaagtgcaa ccctgcaagc aagtgtttcc aactagtcag tatggcttca attatthtagt 1380
 tgatttataa ccccaaccct ccacttgtga ccaagaagaa tttgatttga gcagacaata 1440
 tcctgacctc ggatggtttc gtaaactcga ctaaggaatc agatctgagc cactagtcca 1500
 gctggactac agtacattat ttatctctca agattacata aaaagactac tattgtacag 1560
 agaatgcatt gtttaagtgg taacaactgc tgtgataagt tattcctggg atacagaaaa 1620
 atggcaggtg aaaacatcag ggagtggagt aagcatgggc agacattgta cttaaagagt 1680
 gataggccaa tgagaatcac tgggtgttta aggattaaaa atttgtggtc catgctctag 1740
 acatccaatt tatgctaata tgaacttagg accatatatt tatgtttggt tactgatctt 1800
 gcggcttaat cgagttctaa tgcgcaggtg ctaacgtgtc agattgtcga aaggatgaat 1860
 tcagtgattg gcccfaatca ttgcttgcta ttgggacatt tggaaataag cagattgagg 1920
 aggtagctca ggtggagaat tcatccgaca atgtgcagtc agtgcaagat accgtcaaat 1980
 ttacagagga agaagtagac aagatacggg aagaattcga aacgctacta gcaatcaaag 2040
 atcaagcaga agctcaacgc tcgcatgatg atgaccaagt aggtttacaa aagcgtgccg 2100
 atggggaaga caatgagaag catattagac agttgatcaa caaaaggatc attgtaagta 2160
 aatcaaagaa ttcgtagga aagaaaggaa atacactcaa gccgagatca gtcgcttcgt 2220
 tgctcaagtt attcatgtgt aagggtggct ttacctccgt agttccagaa ccaaggaaca 2280
 catttctca atcaagaatg gagaaggtac acagtgaaat tctttttttc ttatgtaaca 2340
 tgataagttt tacatacttt ctgctcctct tattatctta tatgatgttc attgcagttg 2400
 ctcaaggcaa tattgcagaa gaaaatacac ccgcaaaatt cttccacgct agttgctaag 2460
 aggcatttgg actggaagcc agatgagaca gaaatcaatg agtgcctgga ggatgcactg 2520
 cgtgatctag acgatgatgg tgcaaaatgg gtcaaaactg attcagagtg taagtagcat 2580
 acttgcctat catgaattga accttttctt ttgccacttt tgtcaatgga gcaactgact 2640
 gaatatgaac ttttcttggt tccagatatt gtgcttgaaa tgtaaagttg ggtgaatatg 2700
 ttagttcggt catgccaggt atataccttt ctttgatccc caaatthtca actcaactca 2760
 aatgtgaatt atccttgatc tagcatgtct ctctgttttg atctgattag tgtgattcca 2820
 atctgcaggt tccaaaggtc ctggcaagct tggggtttat ggtgttacta cgtaatgata 2880
 taaatatggg atatagttag caatgaagct ctatgatcat gtaatgctcc tccattatth 2940
 ctgacatgaa ccatctgtaa tttgaatcat gataaggagg ttctgggaca aaggcctatt 3000
 ccatgtgtct actctcttct gccctgaaac tgtaaagaac gcattcaatt tthtcaac 3058

ES 2 641 014 T3

<210> 2
 <211> 1282
 <212> ADN
 5 <213> *Oryza sativa*
 <400> 2
 agatgaagta tagcaagcta tcctacagcc agccaagctg caccgaaccc tccaatcctt 60
 ggaacttgaa ccccttcaaa tcacaccag taggctacta gtagtacttc tctgcaccaa 120
 ttccatcgcc aatagcagcc actacaagtc ttacatctct cctttcctcc tctctctgcc 180
 attgctagga gcttgcattt cttggtagct tcatcagcta gctgctttct ccctcccaaa 240
 tctctcattc ttcaggccag gatatgaaga ttttcagctg ggtagccaac aagatcagtg 300
 ggaagcaaga agcaaatcgg tttcccgcaa attcttctgc gccttaccgt gctaacgtgt 360
 cagattgtcg aaaggatgaa ttcagtgatt ggccccaatc attgcttgct attgggacat 420
 ttgaaataa gcagattgag gaggtagctc aggtggagaa ttcacccgac aatgtgcagt 480
 cagtgaaga taccgtcaaa tttacagagg aagaagtaga caagatacgg aaagaattcg 540
 aaacgctact agcaatcaaa gatcaagcag aagctcaacg ctcgcatgat gatgaccaag 600
 taggtttaca aaagcgtgcc gatggggaag acaatgagaa gcatattaga cagttgatca 660
 acaaaaggat cattgtaagt aaatcaaaga attcgttagg aaagaaagga aatacactca 720
 agccgagatc agtcgcttcg ttgctcaagt tattcatgtg taaggggtggc tttacctccg 780
 tagttccaga accaaggaac acatttcctc aatcaagaat ggagaagttg ctcaaggcaa 840
 tattgcagaa gaaaatacac ccgcaaaatt cttccacgct agttgctaag aggcatttgg 900
 actggaagcc agatgagaca gaaatcaatg agtgcctgga ggatgcactg cgtgatctag 960
 acgatgatgg tgcaaaatgg gtcaaaactg attcagagta tattgtgctt gaaatgtaaa 1020
 gttgggtgaa tatgtagttt cgttcatgcc aggttccaaa ggtcctggca agcttgggggt 1080
 ttatggtggt actacgtaat gatataaata tgggatatag ttagcaatga agctctatga 1140
 tcatgtaatg ctctccatt atttctgaca tgaaccatct gtaatttgaa tcatgataag 1200
 gaggttctgg gacaaaggcc tattccatgt gtctactctc ttctgcctg aaactgtaaa 1260
 gaacgcattc aattttttca ac 1282

10 <210> 3
 <211> 251
 <212> PRT
 15 <213> *Oryza sativa*
 <400> 3

ES 2 641 014 T3

Met Lys Ile Phe Ser Trp Val Ala Asn Lys Ile Ser Gly Lys Gln Glu
 1 5 10 15

Ala Asn Arg Phe Pro Ala Asn Ser Ser Ala Pro Tyr Arg Ala Asn Val
 20 25 30

Ser Asp Cys Arg Lys Asp Glu Phe Ser Asp Trp Pro Gln Ser Leu Leu
 35 40 45

Ala Ile Gly Thr Phe Gly Asn Lys Gln Ile Glu Glu Val Ala Gln Val
 50 55 60

Glu Asn Ser Ser Asp Asn Val Gln Ser Val Gln Asp Thr Val Lys Phe
 65 70 75 80

Thr Glu Glu Glu Val Asp Lys Ile Arg Lys Glu Phe Glu Thr Leu Leu
 85 90 95

Ala Ile Lys Asp Gln Ala Glu Ala Gln Arg Ser His Asp Asp Asp Gln
 100 105 110

Val Gly Leu Gln Lys Arg Ala Asp Gly Glu Asp Asn Glu Lys His Ile
 115 120 125

Arg Gln Leu Ile Asn Lys Arg Ile Ile Val Ser Lys Ser Lys Asn Ser
 130 135 140

Leu Gly Lys Lys Gly Asn Thr Leu Lys Pro Arg Ser Val Ala Ser Leu
 145 150 155 160

Leu Lys Leu Phe Met Cys Lys Gly Gly Phe Thr Ser Val Val Pro Glu
 165 170 175

Pro Arg Asn Thr Phe Pro Gln Ser Arg Met Glu Lys Leu Leu Lys Ala
 180 185 190

Ile Leu Gln Lys Lys Ile His Pro Gln Asn Ser Ser Thr Leu Val Ala
 195 200 205

Lys Arg His Leu Asp Trp Lys Pro Asp Glu Thr Glu Ile Asn Glu Cys
 210 215 220

Leu Glu Asp Ala Leu Arg Asp Leu Asp Asp Asp Gly Ala Lys Trp Val
 225 230 235 240

Lys Thr Asp Ser Glu Tyr Ile Val Leu Glu Met
 245 250

- 5 <210> 4
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>

<223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

 <400> 4
 gcagaogctc gtaacacgta 20
 5
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

 <400> 5
 15 gtggcagctc catcaactct 20

 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

 <400> 6
 25 gcacaagatg ggaggagagt 20

 <210> 7
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial
 35
 <400> 7
 catgggtgag aatcgtgtg 20

 <210> 8
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

 <400> 8
 gtctagatca cgcagtgaat 20

 <210> 9
 50 <211> 20
 <212> ADN

 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

 <400> 9
 60 tcgcatgatg atgaccaagt 20

 <210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

ES 2 641 014 T3

<220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

5 <400> 10
atcgctctaga tcacgcagtg aac 23

<210> 11
<211> 20
10 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

15 <400> 11
agggtggcct tacctccgta 20

<210> 12
<211> 789
20 <212> ADN
<213> *Sorghum bicolor*

<220>
25 <221> CDS
<222> (1)..(789)

<400> 12

ES 2 641 014 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ctg | cag | att | ttc | agt | tgg | gta | gcc | aac | aag | atc | ggc | ggg | aag | caa | gaa | 48 |
| Leu | Gln | Ile | Phe | Ser | Trp | Val | Ala | Asn | Lys | Ile | Gly | Gly | Lys | Gln | Glu | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| cca | aag | cga | tct | cct | gca | cct | tat | cgt | aag | cct | act | tgt | ggc | aat | gta | 96 |
| Pro | Lys | Arg | Ser | Pro | Ala | Pro | Tyr | Arg | Lys | Pro | Thr | Cys | Gly | Asn | Val | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| tca | gaa | tgt | cgc | aac | gac | gag | ttc | agt | gat | tgg | ccc | caa | tca | ttg | ctt | 144 |
| Ser | Glu | Cys | Arg | Asn | Asp | Glu | Phe | Ser | Asp | Trp | Pro | Gln | Ser | Leu | Leu | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| gca | att | ggg | aca | ttt | gga | aac | aag | cag | ctc | gag | gaa | gaa | gta | gca | tca | 192 |
| Ala | Ile | Gly | Thr | Phe | Gly | Asn | Lys | Gln | Leu | Glu | Glu | Glu | Val | Ala | Ser | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| gag | agt | tct | tct | gcg | aat | gct | cag | acc | acg | caa | gat | ccc | gcc | aag | ttt | 240 |
| Glu | Ser | Ser | Ser | Ala | Asn | Ala | Gln | Thr | Thr | Gln | Asp | Pro | Ala | Lys | Phe | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| aca | gag | gag | gaa | gta | gac | aac | ata | cga | aga | gaa | ttc | gag | gtg | ctg | ctg | 288 |
| Thr | Glu | Glu | Glu | Val | Asp | Asn | Ile | Arg | Arg | Glu | Phe | Glu | Val | Leu | Leu | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| caa | ggc | aat | gct | caa | gca | gaa | gct | cag | ggc | tcc | tgt | gaa | gat | gaa | cag | 336 |
| Gln | Gly | Asn | Ala | Gln | Ala | Glu | Ala | Gln | Gly | Ser | Cys | Glu | Asp | Glu | Gln | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| gta | gca | gct | tcg | aaa | gaa | cat | gac | ggt | gaa | gac | aac | aac | gag | aag | cag | 384 |
| Val | Ala | Ala | Ser | Lys | Glu | His | Asp | Gly | Glu | Asp | Asn | Asn | Glu | Lys | Gln | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| cgc | agg | gag | caa | ttg | atg | aac | agg | gag | atg | atc | ata | agc | aaa | gcg | aga | 432 |
| Arg | Arg | Glu | Gln | Leu | Met | Asn | Arg | Glu | Met | Ile | Ile | Ser | Lys | Ala | Arg | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |

ES 2 641 014 T3

| | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| gaa cta gta ggg aag aaa aag agt gct aag ctc aag cca aga tcg atg | 480 |
| Glu Leu Val Gly Lys Lys Lys Ser Ala Lys Leu Lys Pro Arg Ser Met | |
| 145 150 155 160 | |
| gtt tcg ctc ctt aga tta ctc gcg tgc aag ggc ggt ttt acc acc ccg | 528 |
| Val Ser Leu Leu Arg Leu Leu Ala Cys Lys Gly Gly Phe Thr Thr Pro | |
| 165 170 175 | |
| gtt ctg gaa cca agg aac gct ttc ccc caa tca aga atg gag aag ctg | 576 |
| Val Leu Glu Pro Arg Asn Ala Phe Pro Gln Ser Arg Met Glu Lys Leu | |
| 180 185 190 | |
| ctc aag gca ata cta cag aag aaa ata cac cca cag aat tcc aac acg | 624 |
| Leu Lys Ala Ile Leu Gln Lys Lys Ile His Pro Gln Asn Ser Asn Thr | |
| 195 200 205 | |
| gta gca acc agg agg cac ttg gac tgg aag cta gac gag aaa gag atc | 672 |
| Val Ala Thr Arg Arg His Leu Asp Trp Lys Leu Asp Glu Lys Glu Ile | |
| 210 215 220 | |
| aac gaa tgt ctt gag gat gcg ctg cgt gat ctt gat gac gat gat gat | 720 |
| Asn Glu Cys Leu Glu Asp Ala Leu Arg Asp Leu Asp Asp Asp Asp Asp | |
| 225 230 235 240 | |
| ggc gca aag tgg gtc aaa act gat tca gac tgt tcc gaa ggt ctt ggt | 768 |
| Gly Ala Lys Trp Val Lys Thr Asp Ser Asp Cys Ser Glu Gly Leu Gly | |
| 245 250 255 | |
| ggg ctt ggt aca ttc acg gtg | 789 |
| Gly Leu Gly Thr Phe Thr Val | |
| 260 | |

<210> 13

<211> 263

5 <212> PRT

<213> *Sorghum bicolor*

<400> 13

ES 2 641 014 T3

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

ES 2 641 014 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| | 100 | | 105 | | 110 | | | | | | | | | | | | |
| Val | Ala | Ala | Ser | Lys | Glu | His | Asp | Gly | Glu | Asp | Asn | Asn | Glu | Lys | Gln | | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | |
| Arg | Arg | Glu | Gln | Leu | Met | Asn | Arg | Glu | Met | Ile | Ile | Ser | Lys | Ala | Arg | | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | | 140 | | | | | |
| Glu | Leu | Val | Gly | Lys | Lys | Lys | Ser | Ala | Lys | Leu | Lys | Pro | Arg | Ser | Met | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | |
| Val | Ser | Leu | Leu | Arg | Leu | Leu | Ala | Cys | Lys | Gly | Gly | Phe | Thr | Thr | Pro | | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | | 175 | | |
| Val | Leu | Glu | Pro | Arg | Asn | Ala | Phe | Pro | Gln | Ser | Arg | Met | Glu | Lys | Leu | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | |
| Leu | Lys | Ala | Ile | Leu | Gln | Lys | Lys | Ile | His | Pro | Gln | Asn | Ser | Asn | Thr | | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | |
| Val | Ala | Thr | Arg | Arg | His | Leu | Asp | Trp | Lys | Leu | Asp | Glu | Lys | Glu | Ile | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | |
| Asn | Glu | Cys | Leu | Glu | Asp | Ala | Leu | Arg | Asp | Leu | Asp | Asp | Asp | Asp | Asp | | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | |
| Gly | Ala | Lys | Trp | Val | Lys | Thr | Asp | Ser | Asp | Cys | Ser | Glu | Gly | Leu | Gly | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | |
| Gly | Leu | Gly | Thr | Phe | Thr | Val | | | | | | | | | | | |
| | | | 260 | | | | | | | | | | | | | | |

5 <210> 14
 <211> 768
 <212> ADN
 <213> *Zea mays*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(768)

<400> 14

ES 2 641 014 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| atg | aag | att | ttc | agt | tgg | gta | gcc | aac | aag | atc | ggc | ggg | aag | caa | gaa | 48 |
| Met | Lys | Ile | Phe | Ser | Trp | Val | Ala | Asn | Lys | Ile | Gly | Gly | Lys | Gln | Glu | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ccg | aag | cga | tct | gcc | gcg | cat | tat | cgt | ggc | aac | gta | tca | gaa | tgt | cgc | 96 |
| Pro | Lys | Arg | Ser | Ala | Ala | His | Tyr | Arg | Gly | Asn | Val | Ser | Glu | Cys | Arg | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| aac | gac | gag | ttc | agt | gat | tgg | ccc | caa | tca | ttg | ctg | gca | atc | ggg | acg | 144 |
| Asn | Asp | Glu | Phe | Ser | Asp | Trp | Pro | Gln | Ser | Leu | Leu | Ala | Ile | Gly | Thr | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |

ES 2 641 014 T3

| | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| ttt ggg aac agg cag ctg gag gaa ggg gtg gtg gag acg tct tct ggg | 192 |
| Phe Gly Asn Arg Gln Leu Glu Glu Gly Val Val Glu Thr Ser Ser Gly | |
| 50 55 60 | |
| aac gtc cag gcc gcg caa gac ccc gcc aag ttc aca gag gaa gaa gag | 240 |
| Asn Val Gln Ala Ala Gln Asp Pro Ala Lys Phe Thr Glu Glu Glu Glu | |
| 65 70 75 80 | |
| gcg gac agc ata cgg aga gaa ctc gag gtg ctg ctg ctg caa ggc aat | 288 |
| Ala Asp Ser Ile Arg Arg Glu Leu Glu Val Leu Leu Leu Gln Gly Asn | |
| 85 90 95 | |
| aat aat aat ggc ggc caa gca gag gcg cag ggc tct cgt gga gac gaa | 336 |
| Asn Asn Asn Gly Gly Gln Ala Glu Ala Gln Gly Ser Arg Gly Asp Glu | |
| 100 105 110 | |
| cga cga cag gta gct tgg aaa gag cat gac ggt gaa tgt agc aag gag | 384 |
| Arg Arg Gln Val Ala Trp Lys Glu His Asp Gly Glu Cys Ser Lys Glu | |
| 115 120 125 | |
| aag cag ccg acg agc ggg gag atg gtc acg agc aag gcg aga gcg aga | 432 |
| Lys Gln Pro Thr Ser Gly Glu Met Val Thr Ser Lys Ala Arg Ala Arg | |
| 130 135 140 | |
| gaa atg gta gca ggg aag aaa agg agc acg ctg aag cca agg tcg gtg | 480 |
| Glu Met Val Ala Gly Lys Lys Arg Ser Thr Leu Lys Pro Arg Ser Val | |
| 145 150 155 160 | |
| gcc tcg ctc ctt aga ctg ctc gcg tgc aag ggc ggc ttt gcc acc ccg | 528 |
| Ala Ser Leu Leu Arg Leu Leu Ala Cys Lys Gly Gly Phe Ala Thr Pro | |
| 165 170 175 | |
| gtt ctg gaa ccg agg agc cct ttc ccc cag tcg aga atg gag aag ctg | 576 |
| Val Leu Glu Pro Arg Ser Pro Phe Pro Gln Ser Arg Met Glu Lys Leu | |
| 180 185 190 | |
| ctc aag gcg ata ctg gag aag aag ata cac ccg cag aac ccc agc acg | 624 |
| Leu Lys Ala Ile Leu Glu Lys Lys Ile His Pro Gln Asn Pro Ser Thr | |
| 195 200 205 | |
| gct gca gcg agg ccg cac cag ctg gac tgg aag cta gac gag aaa gag | 672 |
| Ala Ala Ala Arg Arg His Gln Leu Asp Trp Lys Leu Asp Glu Lys Glu | |
| 210 215 220 | |
| atc gac gag tgc ctt gac gac gcg ctg cgt gac ctc gac gac gac ggc | 720 |
| Ile Asp Glu Cys Leu Asp Asp Ala Leu Arg Asp Leu Asp Asp Asp Gly | |
| 225 230 235 240 | |
| gcc aag tgg gtc aaa act gac tcg gac ttt att gtg ctc gaa atg taa | 768 |
| Ala Lys Trp Val Lys Thr Asp Ser Asp Phe Ile Val Leu Glu Met | |
| 245 250 255 | |

<210> 15
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> *Zea mays*

5

<400> 15

ES 2 641 014 T3

Met Lys Ile Phe Ser Trp Val Ala Asn Lys Ile Gly Gly Lys Gln Glu
1 5 10 15

Pro Lys Arg Ser Ala Ala His Tyr Arg Gly Asn Val Ser Glu Cys Arg
20 25 30

Asn Asp Glu Phe Ser Asp Trp Pro Gln Ser Leu Leu Ala Ile Gly Thr
35 40 45

Phe Gly Asn Arg Gln Leu Glu Glu Gly Val Val Glu Thr Ser Ser Gly
50 55 60

Asn Val Gln Ala Ala Gln Asp Pro Ala Lys Phe Thr Glu Glu Glu Glu
65 70 75 80

Ala Asp Ser Ile Arg Arg Glu Leu Glu Val Leu Leu Leu Gln Gly Asn
85 90 95

Asn Asn Asn Gly Gly Gln Ala Glu Ala Gln Gly Ser Arg Gly Asp Glu
100 105 110

Arg Arg Gln Val Ala Trp Lys Glu His Asp Gly Glu Cys Ser Lys Glu
115 120 125

Lys Gln Pro Thr Ser Gly Glu Met Val Thr Ser Lys Ala Arg Ala Arg
130 135 140

Glu Met Val Ala Gly Lys Lys Arg Ser Thr Leu Lys Pro Arg Ser Val
145 150 155 160

Ala Ser Leu Leu Arg Leu Leu Ala Cys Lys Gly Gly Phe Ala Thr Pro
165 170 175

Val Leu Glu Pro Arg Ser Pro Phe Pro Gln Ser Arg Met Glu Lys Leu
180 185 190

Leu Lys Ala Ile Leu Glu Lys Lys Ile His Pro Gln Asn Pro Ser Thr
195 200 205

Ala Ala Ala Arg Arg His Gln Leu Asp Trp Lys Leu Asp Glu Lys Glu
210 215 220

Ile Asp Glu Cys Leu Asp Asp Ala Leu Arg Asp Leu Asp Asp Asp Gly
225 230 235 240

Ala Lys Trp Val Lys Thr Asp Ser Asp Phe Ile Val Leu Glu Met
245 250 255

ES 2 641 014 T3

<210> 16
 <211> 1284
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

5 <400> 16

| | |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| gagatgaagt atagcaagct atcctacagc cagccacgct gcaccgaacc ctccaatcct | 60 |
| tggaacttga accccttcaa atcacacca gtaggctact agtagtactt ctctgcacca | 120 |
| attccatcgc caatagcagc cactacaagt cttacatctc tcctttcctc ctctctctgc | 180 |
| cattgctagg agcttgctt tcttggtagc ttcacagct agctgctttc tccctccca | 240 |
| atctctcatt cttcaggcca ggatatgaag attttcagct gggtagccaa caagatcagt | 300 |
| gggaagcaag aagcaaactg gtttcccgca aattcttctg cgccttaccg tgctaactg | 360 |
| tcagattgtc gagaggatga attcagtgat tggccccaat cattgcttgc tattgggaca | 420 |
| tttgaaata agcagattga ggaggtagct caggtggaga attcatccga caatgtgcag | 480 |
| tcagtgcaag ataccgtcaa atttacagag gaagaagtag acaagatacg gaaagaattc | 540 |
| gaaacgctac tagcaatcaa agatcaagca gaagctcaac gctcgcatac tgatgaccaa | 600 |
| gtaggtttac aaaagcgtgc cgatggggaa gacaatgaga agcatattag acagttgatc | 660 |
| aacaaaagga tcattgtaag taaatcaaag aattcgttag gaaagaaagg aaatacactc | 720 |
| aagccgagat cagtcgcttc gttgctcaag ttattcatgt gtaagggtgg ctttacctcc | 780 |
| gtagttccag aaccaaggaa cacatctcct caatcaagaa tggagaagtt gctcaaggca | 840 |
| atattgcaga agaaaataca cccgcaaaat tcttccacgc tagttgctaa gaggcatttg | 900 |
| gactggaagc cagatgagac agaaatcaat gagtgcctgg aggatgcact gcgtgatcta | 960 |
| gacgatgatg gtgcaaaatg ggtcaaaact gattcagagt atattgtgct tgaaatgtaa | 1020 |
| agttgggtga atatgttagt tcgttcatgc caggttccaa aggtcctggc aagcttgggg | 1080 |
| tttatggtgt tactacgtaa tgatataaat atgggatata gttagcaatg aagctctatg | 1140 |
| atcatgtaat gtcctccat tatttctgac atgaaccatc tgtaatttga atcatgataa | 1200 |
| ggaggttctg ggacaaaggc ctattccatg tgtctactct cttctgccct gaaactgtaa | 1260 |
| agaacgcatt caattttttc aacg | 1284 |

10 <210> 17
 <211> 4283
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

15 <400> 17

ES 2 641 014 T3

gcagagatat atatatatat atatatatat atatatagca ctatcatgtc atgttagctt 60
gttgggccag gtgcatccac ggtctagtac cattattgcg tagttaatgg acggaatagc 120
tgctagtgga gatgggggtg tacttcagca gttaaccccc agaaacgtga ttagcatcgg 180
tgcaggcgcc cctcgtgctg gttaaccaag gcggggcgccc cgtacttacc cgcgctaatg 240
ccgggtttaa ggaagttaac acgtgattct ggcacacgcg tcgggcccga ccaagtgcga 300
tgggatccgt tgcggcgcgg tcgtgacact tggtgcccca acttgccgtc gatctcgccg 360
cgctgtactt tatcttagct aataactctt cttctcccc tggaaaaaaa aattaacaac 420

ES 2 641 014 T3

cgggtttctt cctttgaggc attgattttt ggatactctc tcgctggctg cagtgcgaagc 480
 gaaccagtgc acggatttca aacagtctgc aatacctggg taaatctgag tcctttgatt 540
 ttgatctggc gaacataata tgactgttta aaactacagt caccctactt attgcagctg 600
 aaccgtcaaa ttatagcttc ttctagggat ggattgggaa ttttcttaca tgttgagttt 660
 ttgaacacct gactagacga tctcacgata tactaccttc gtcctaaaat atagtaattt 720
 ttagctatga atttggacac acaaaaattg ctatatattt ggacagagag agtagtcaga 780
 tagttttatc attcttaaga aggtatatcg agatgatggg tttttatcgt aaaacttaat 840
 atctctagta ggtgtctcga aatatcgtac aagtcctgca tgtactttct taagtacat 900
 aaacttctct acaatttaag tagggtagaa gcacccccgt tgaggtgtag ctaccacaat 960
 tttgggttcc tcaaaagtgt gaggtcgatc acaagtttac actatctata tctagaaaca 1020
 tcaattcaat atttacaatc cgtatggcgc atatgggcgt acggtagctg gagttgcaaa 1080
 taccgaattt tctcttccga agaaagtgca aattccattg tttatatata tagctgtgtc 1140
 ctgttatcat tccatggctc acctgttgag ctggtaacct ggtttggagt catctataaa 1200
 aggaaggtaa aggaagtgac atgccagatg aagtatagca agctatccta cagccagcca 1260
 cgctgcaccg aaccctcaa tccttggaac ttgaaccctc tcaaatcaca cccagtaggc 1320
 tactagtagt acttctctgc accaattcca tcgccaatag cagccactac aagtcttaca 1380
 tctctccttt cctcctctct ctgccattgc taggagcttg catttcttgg tagcttcctc 1440
 agctagctgc tttctcctc cccaatctct cattcttcag gccaggatat gaaggtaaag 1500
 gctcaaacca tcgggtgatg taatcatttc agagaggtta atagatttga agtgttggta 1560
 gtgttgatcc atttcttgat ggcacatga ggcttgggtt ttctctgcag attttcagct 1620
 gggtagccaa caagatcagt ggggaagcaag aagcaaatcg gtttcccgca aattcttctg 1680
 cgcttaccg tgagtgtacc tgaactttca gtttcttctg aaattctttc agaactaagg 1740
 tgattgttgt tcaccaggct tcatgctgtt cttatgaaat gtttccctgt tccttgaggg 1800
 gagagggaga gtacggacag taatttggaa gccgtttcct aatttgatat tttctttctg 1860
 tcattctgct gcagttataa tgtctttacc tcttagcagt ttctgottag gcatcatttg 1920
 ccttattcat ttctggatac gatgatactt tattgctttg tcctaattta atcttttct 1980
 gctgtcattc tgctccattt atgggtgtct tacctcttag cagtttccgc ttaggcatca 2040
 tttgccatgt tcatttctga atatgctgat atactttgtt gtcttggttag ccatatacaa 2100
 gagtgaacga tttaaagggt tctcctaatt gctagtaaca gaacgctttt cgctctgcga 2160
 ttttctggat taccatcccc tgattcctga gtaacctatc acaacgcca tgtgatggag 2220
 caaacattga tgtattatga caatgttgtt tctgatcctt tgagaaaatt ttcttatatg 2280
 cacttgggtg ttgtttggaa cgcaggaatt tcactggaaa cagttcaatt atcgcacttc 2340

ES 2 641 014 T3

cggaaaaaaa attcctgcat tttaaacggc gctttaagtt cagtaggagt tttcaatttt 2400
 attttctctc tccttagcac gaaaagtgag agatttttgt gcatatgtta taccocccaaa 2460
 ggactatttc atggcctgat gcccgccacg ccaatatctc tgtaaagcac tgcttccaac 2520
 tagtcagtat ggggtcaaagt cttgactaag tgcaaccctg caagcaagtg tttccaacta 2580
 gtcagtatgg cttcaattat ttagttgatt tataacccca accctccact tgtgaccaag 2640
 aagaatttga tttgagcaga caatatcctg acctcggatg gtttcgtaaa tcgtactaag 2700
 gaatcagatc tgagccacta gtccagctgg actacagtac attatttata tctcaagatt 2760
 acataaaaag actactattg tacagagaat gcattgttta agtggttaaca actgctgtga 2820
 taagttattc ctggtataca gaaaaatggc aggtgaaaac atcagggagt ggagtaagca 2880
 tgggcagaca ttgtacttaa agagtgatag gccaatgaga atcactgggt gtttaaggat 2940
 taaaaatttg tgggtccatgc tctagacatc caatttatgc taatatgaac ttaggacat 3000
 atatttatgt ttgtttactg atcttgccgc ttaatcgagt tctaatacgc aggtgctaac 3060
 gtgtcagatt gtcgaaagga tgaattcagt gattggcccc aatcattgct tgctattggg 3120
 acatttgga ataaagcagat tgaggaggta gctcaggtgg agaattcctc cgacaatgtg 3180
 cagtcagtgc aagataccgt caaatttaca gaggaagaag tagacaagat acggaaagaa 3240
 ttcgaaacgc tactagcaat caaagatcaa gcagaagctc aacgctcgca tgatgatgac 3300
 caagtagggt tacaaaagcg tgccgatggg gaagacaatg agaagcatat tagacagttg 3360
 atcaacaaaa ggatcattgt aagtaaataca aagaattcgt taggaaagaa aggaaataca 3420
 ctcaagccga gatcagtcgc ttogttgctc aagttattca tgtgtaaggg tggctttacc 3480
 tccgtagttc cagaaccaag gaacacattt cctcaatcaa gaatggagaa ggtacacagt 3540
 gaaattcttt ttttcttatg taacatgata agttttacat actttctcgt cctcttatta 3600
 tcttatatga tgttcattgc agttgctcaa ggcaatattg cagaagaaaa tacacccgca 3660
 aaattcttcc acgctagttg ctaagaggca tttggactgg aagccagatg agacagaaat 3720
 caatgagtgc ctggaggatg cactgcgtga tctagacgat gatggtgcaa aatgggtcaa 3780
 aactgattca gagtgtaagt agcatacttg cctatcatga attgaacctt ttcttttgcc 3840
 acttttgca atggagcaac tgactgaata tgaacttttc ttgtttccag atattgtgct 3900
 tgaaatgtaa agttgggtga atatgttagt tcgttcatgc caggtatata ctttctttg 3960
 atccccaat tttcaactca actcaaagt gaattatcct tgatctagca tgtctctctg 4020
 ttttgatctg attagtgtga ttccaatctg caggttccaa aggtcctggc aagcttgggg 4080
 tttatgggtg tactacgtaa tgatataaat atgggatata gttagcaatg aagctctatg 4140
 atcatgtaat gctcctccat tatttctgac atgaaccatc tgtaatttga atcatgataa 4200
 ggaggttctg ggacaaaggc ctattccatg tgtctactct cttctgccct gaaactgtaa 4260
 agaacgcatt caattttttc aac 4283

<210> 18
<211> 4313
<212> ADN
<213> *Oryza sativa*

5

<400> 18

ES 2 641 014 T3

gcagatatat atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat 60
 atatatagca ctatcatgtc atggttagctt gttgggtccag gtgcatccac ggtctagtac 120
 cattattgcg tagttaatgg acggaatagc tgctagtgga gatggggggtg tacttcagca 180
 gttaaccccc agaaacgtga ttagcatcgg tgcaggcgcc cctcgtgctg gttaaccaag 240
 gcgggcgccc cgtacttacc cgcgctaatg ccgggtttaa ggaagttaac acgtgattct 300
 ggcacacgcy tcgggcccga ccaagtgcga tgggatccgt tgcggcgcyg tcgtgacact 360
 tggtgcccca acttgccgct gatctcgccg cgctgtactt tatcttagct aataactctt 420
 cttctcccc tggaaaaaa aattaacaac cgggtttctt cctttgaggc attgattttt 480
 ggatactctc tcgctggctg cagtgcgaagc gaaccagtgc acggtattca aacagtctgc 540
 aatacctggg taaatctgag tcctttgatt ttgatctggc gaacataata tgactgttta 600
 aaactacagt caccctactt attgcagctg aaccgtcaa ttatagcttc ttctagggat 660
 ggattgggaa ttttcttaca tgttgagttt ttgaacacct gactagacga tctcacgata 720
 tactaccttc gtcctaaaat atagtaattt ttagctatga atttggacac acaaaaattg 780
 ctatattttg ggacagagag agtagtcaga tagttttatc attcttaaga aggtatatcg 840
 agatgatggg tttttatcgt aaaacttaat atctctagta ggtgtctcga aatatcgtac 900
 aagtctgca tgtactttct taagtacat aaacttctct acaatttaag tagggtagaa 960
 gcacccccgt tgaggtgtag ctaccacaat tttgggttcc tcaaaagtgt gaggtcgatc 1020
 acaagtttac actatctata tctagaaaca tcaattcaat atttacaatc cgtatggcgc 1080
 atatgggcgt acggtagctg gagttgcaa taccgaattt tctcttccga agaaagtgca 1140
 aattccattg tttatatata tagctgtgct ctggtatcat tccatggctc acctggtgag 1200
 ctggtaacc cgtttggagt catctataaa aggaaggtaa aggaagtgac atgccagatg 1260
 aagtatagca agctatccta cagccagcca cgctgcaccg aaccctcaa tccttggaac 1320
 ttgaaccct tcaaatcaca cccagtaggc tactagtagt acttctctgc accaattcca 1380
 tcgccaatag cagccactac aagtcttaca tctctccttt cctcctctct ctgccattgc 1440
 taggagcttg catttcttg tagcttcac agctagctgc tttctccctc cccaatctct 1500
 cattcttcag gccaggatat gaaggtaaag gctcaaacca tcgggtgtgat taatcatttc 1560
 agagaggtta atagatttga agtggtggta gtggtgatcc atttcttgat ggcatcatga 1620
 ggcttgggtt ttctctgcag attttcagct gggtagccaa caagatcagt ggggaagcaag 1680
 aagcaaatcg gtttcccga aattcttctg cgccttaccg tgagtgtacc tgaactttca 1740

ES 2 641 014 T3

gtttccttgt aaattcttcc agaactaagg tgattggtgt tcaccaggct tcatgctggt 1800
 cttatgaaat gtttccttgt tccttgaggg gagagggaga gtacggacag taatttgtaa 1860
 gccgtttcct aatttgatat tttctttctg tcattctgct gcagttataa tgtctttacc 1920
 tcttagcagt ttctgcttag gcatcatttg ccttattcat ttctggatac gatgatactt 1980
 tattgctttg tcctaattta atcttttctt gctgtcattc tgctccattt atgggtgtctt 2040
 tacctcttag cagtttccgc ttaggcatca tttgccatgt tcatttctga atatgctgat 2100
 atactttggt gtcttggtag ccatatacaa gagtgaacga tttaaagggt tctcctaatt 2160
 gctagtaaca gaacgctttt cgctctgcga ttttctggat taccatcccc tgattcctga 2220
 gtaacctatc acaacgcaa tgtgatggag caaacattga tgtattatga caatgttggt 2280
 tctgatcctt tgagaaaatt ttcttatatg cacttgggtg ttgtttgtaa cgcaggaatt 2340
 tcaactggaaa cagttcaatt atcgcacttc cggaaaaaaaa attcctgcat tttaaacggc 2400
 gctttaagtt cagtaggagt tttcaatttt attttctct tccctagcac gaaaagtgag 2460
 agatTTTTgt gcatatgta taccoccaa ggactatttc atggcctgat gcccgccacg 2520
 ccaatatctc tgtaaagcac tgcttccaac tagtcagtat ggggtcaaagt cttgactaag 2580
 tgcaaccctg caagcaagt tttccaacta gtcagtatgg cttcaattat ttagttgatt 2640
 tataaccca accctccact tgtgaccaag aagaatttga tttgagcaga caatcctg 2700
 acctcggatg gtttcgtaa tcgtactaag gaatcagatc tgagccacta gtccagctgg 2760
 actacagtac attatttacc tctcaagatt acataaaaag actactattg tacagagaat 2820
 gcattgttta agtggttaaca actgctgtga taagttattc ctggtataca gaaaaatggc 2880
 aggtgaaaac atcagggagt ggagtaagca tgggcagaca ttgtacttaa agagtgatag 2940
 gccaatgaga atcactgggt gtttaaggat taaaaatttg tgggtccatgc tctagacatc 3000
 caatttatgc taatatgaac ttaggacat atatttatgt ttgtttactg atcttgccgc 3060
 ttaatcgagt tctaatacgc aggtgctaac gtgtcagatt gtcgaaagga tgaattcagt 3120
 gattggcccc aatcattgct tgctattggg acatttgtaa ataagcagat tgaggaggta 3180
 gctcaggtgg agaattcatc cgacaatgtg cagtcagtgc aagataccgt caaatttaca 3240
 gaggaagaag tagacaagat acggaaagaa ttcgaaacgc tactagcaat caaagatcaa 3300
 gcagaagctc aacgctcga tgatgatgac caagtaggtt tacaanaagc tgccgatggg 3360
 gaagacaatg agaagcatat tagacagttg atcaacaaaa ggatcattgt aagtaaatca 3420
 aagaattcgt taggaaagaa aggaaataca ctcaagccga gatcagtcgc ttcgttgctc 3480
 aagttattca tgtgtaaggg tggctttacc tccgtagttc cagaaccaag gaacacattt 3540
 cctcaatcaa gaatggagaa ggtacacagt gaaattcttt ttttcttatg taacatgata 3600
 agttttacat actttctcgt cctcttatta tcttatatga tgttcattgc agttgctcaa 3660

ES 2 641 014 T3

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| ggcaatattg | cagaagaaaa | tacacccgca | aaattcttcc | acgctagttg | ctaagaggca | 3720 |
| tttggactgg | aagccagatg | agacagaaat | caatgagtgc | ctggaggatg | cactgcgtga | 3780 |
| tctagacgat | gatggtgcaa | aatgggtcaa | aactgattca | gagtgtaagt | agcatacttg | 3840 |
| cctatcatga | attgaacctt | ttcttttgcc | acttttgtca | atggagcaac | tgactgaata | 3900 |
| tgaacttttc | ttgtttccag | atattgtgct | tgaaatgtaa | agttgggtga | atatgttagt | 3960 |
| tcgttcatgc | caggtatata | cctttctttg | atccccaaat | tttcaactca | actcaaagt | 4020 |
| gaattatcct | tgatctagca | tgtctctctg | ttttgatctg | attagtgtga | ttccaatctg | 4080 |
| caggttccaa | aggtcctggc | aagcttgggg | tttatgggtg | tactacgtaa | tgatataaat | 4140 |
| atgggatata | gttagcaatg | aagctctatg | atcatgtaat | gctcctccat | tatttctgac | 4200 |
| atgaaccatc | tgtaatttga | atcatgataa | ggaggttctg | ggacaaaggc | ctattccatg | 4260 |
| tgtctactct | cttctgcctt | gaaactgtaa | agaacgcatt | caattttttc | aac | 4313 |

REVINDICACIONES

1. Método para conferir un rasgo de enraizamiento profundo a una planta, que comprende las etapas de (i) y (ii) a continuación:
- 5 (i) introducir en una célula vegetal un ADN de uno cualquiera de (a) a (e) a continuación:
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;
- 10 (b) un ADN que comprende una región codificante de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 y 17;
- (c) un ADN que codifica para una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15;
- 15 (d) un ADN que hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 y 17, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta; o
- 20 (e) un ADN que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta
- 25 o un vector que porta dicho ADN de uno cualquiera de (a) a (e); y
- (ii) regenerar una planta a partir de la célula vegetal a la que se le introdujo el ADN o el vector en la etapa (i).
- 30 2. Método para producir una planta transformada que tiene un fenotipo de enraizamiento profundo, en el que dicho método comprende las etapas de (i) y (ii) a continuación:
- (i) introducir en una célula vegetal un ADN de uno cualquiera de (a) a (e) a continuación:
- 35 (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;
- (b) un ADN que comprende una región codificante de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 y 17;
- 40 (c) un ADN que codifica para una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15;
- (d) un ADN que hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 y 17, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta; o
- 45 (e) un ADN que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta
- 50 o un vector que comprende dicho ADN de uno cualquiera de (a) a (e); y
- (ii) regenerar una planta a partir de la célula vegetal;
- 55 particularmente en el que el método comprende además la etapa de seleccionar una célula vegetal transformada o planta transformada, que tiene el ADN de (a) a (e) en una única copia.
- 60 3. Método según la reivindicación 2, que comprende las etapas de (i) a (iv) a continuación:
- (i) introducir en una célula vegetal un ADN de uno cualquiera de (a) a (e) a continuación:
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;
- 65 (b) un ADN que comprende una región codificante de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de

SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 y 17;

(c) un ADN que codifica para una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15;

(d) un ADN que hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 y 17, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta; o

(e) un ADN que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta

o un vector que comprende dicho ADN de uno cualquiera de (a) a (e);

(ii) determinar el número de copias del gen Dro1 introducido artificialmente o vector que porta el gen Dro1 en la célula vegetal de la etapa (i);

(iii) seleccionar una célula vegetal transformada que contiene el ADN o vector introducido en una única copia; y

(iv) regenerar una planta a partir de la célula vegetal transformada seleccionada en la etapa (iii).

4. Planta transformada que tiene un fenotipo de enraizamiento profundo, en la que

I) dicha planta transformada es una planta transformada con un ADN de uno cualquiera de (a) a (e) a continuación:

(a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;

(b) un ADN que comprende una región codificante de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 12, 14, y 17;

(c) un ADN que codifica para una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15;

(d) un ADN que hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 12, 14, y 17, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta; o

(e) un ADN que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta; o

II) dicha planta transformada se produce mediante la introducción en una célula vegetal de un ADN de uno cualquiera de (a) a (e) a continuación:

(a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;

(b) un ADN que comprende una región codificante de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 12, 14, y 17;

(c) un ADN que codifica para una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15;

(d) un ADN que hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 12, 14, y 17, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta; o

(e) un ADN que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta

o un vector que porta dicho ADN de uno cualquiera de (a) a (e).

5. Planta o planta transformada según la reivindicación 4, en la que la planta es una monocotiledónea, especialmente en la que la monocotiledónea es una planta gramínea, en particular en la que
- 5
- i) la planta gramínea se selecciona del grupo que consiste en arroz, variedad de trigo (trigo, cebada, centeno, avena, lágrimas de Job (*hatomugi*)), maíz, mijo, mijo menor, mijo japonés, sorgo, mijo africano, mijo perla, tef, caña de azúcar, fleo de los prados, poa de los prados, dátilo ramoso, ballico italiano, ballico perenne, festuca cañosa y grama dulce; o
- 10
- ii) la planta gramínea se selecciona del grupo que consiste en arroz, sorgo y maíz.
6. Planta transformada que es una progenie o un clon de la planta transformada según la reivindicación 4 ó 5 y comprende un ADN de uno cualquiera de (a) a (e) a continuación:
- 15
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;
- (b) un ADN que comprende una región codificante de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 12, 14, y 17;
- 20
- (c) un ADN que codifica para una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15;
- (d) un ADN que hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 12, 14, y 17, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta; o
- 25
- (e) un ADN que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta.
- 30
7. Material de propagación de la planta transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la planta transformada es homocigota para el ADN introducido y el material de propagación comprende un ADN de uno cualquiera de (a) a (e) a continuación:
- 35
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;
- (b) un ADN que comprende una región codificante de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 12, 14, y 17;
- 40
- (c) un ADN que codifica para una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15;
- 45
- (d) un ADN que hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 12, 14, y 17, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta; o
- (e) un ADN que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta.
- 50
8. Método para evaluar si una planta tiene un fenotipo de enraizamiento profundo, en el que el método es uno cualquiera de i) a iii) a continuación:
- 55
- i) un método que comprende las etapas de (a) a (c) a continuación:
- (a) preparar una muestra de ADN a partir de una planta de prueba;
- 60
- (b) amplificar a partir de la muestra de ADN una región que comprende un ADN de uno cualquiera de (A) a (E) a continuación:
- (A) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;
- 65

(B) un ADN que comprende una región codificante de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1,2, 12, 14, 16 y 17;

5 (C) un ADN que codifica para una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15;

10 (D) un ADN que hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 12, 14, 16 y 17, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta; o

15 (E) un ADN que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 13 y 15, y tiene una actividad de conferir un fenotipo de enraizamiento profundo a una planta; y

(c) comparar el peso molecular o la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN amplificado con el del ADN de uno cualquiera de (A) a (E) descritos anteriormente,

20 en el que se considera que una planta de prueba tiene un fenotipo de enraizamiento profundo cuando el peso molecular o la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN amplificado es idéntico/idéntica al/a la del ADN de uno cualquiera de (A) a (E) descritos anteriormente;

25 ii) un método que comprende las etapas de llevar a cabo PCR con un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9 usando un ADN genómico preparado a partir de una planta de prueba como molde, en el que se considera que una planta de prueba tiene un fenotipo de enraizamiento profundo cuando se obtiene un producto amplificado; o

30 iii) un método que comprende las etapas de llevar a cabo PCR con un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 usando un ADN genómico preparado a partir de una planta de prueba como molde,

35 en el que se considera que una planta de prueba no tiene un fenotipo de enraizamiento profundo cuando se obtiene un producto amplificado.

9. Método para seleccionar una planta que tiene un fenotipo de enraizamiento profundo, que comprende la etapa de evaluar mediante el método según la reivindicación 8 si una planta que se ha obtenido en la producción de un cultivar mediante cruzamiento de una planta arbitraria con una planta que tiene un fenotipo de enraizamiento profundo, tiene un fenotipo de enraizamiento profundo.

40

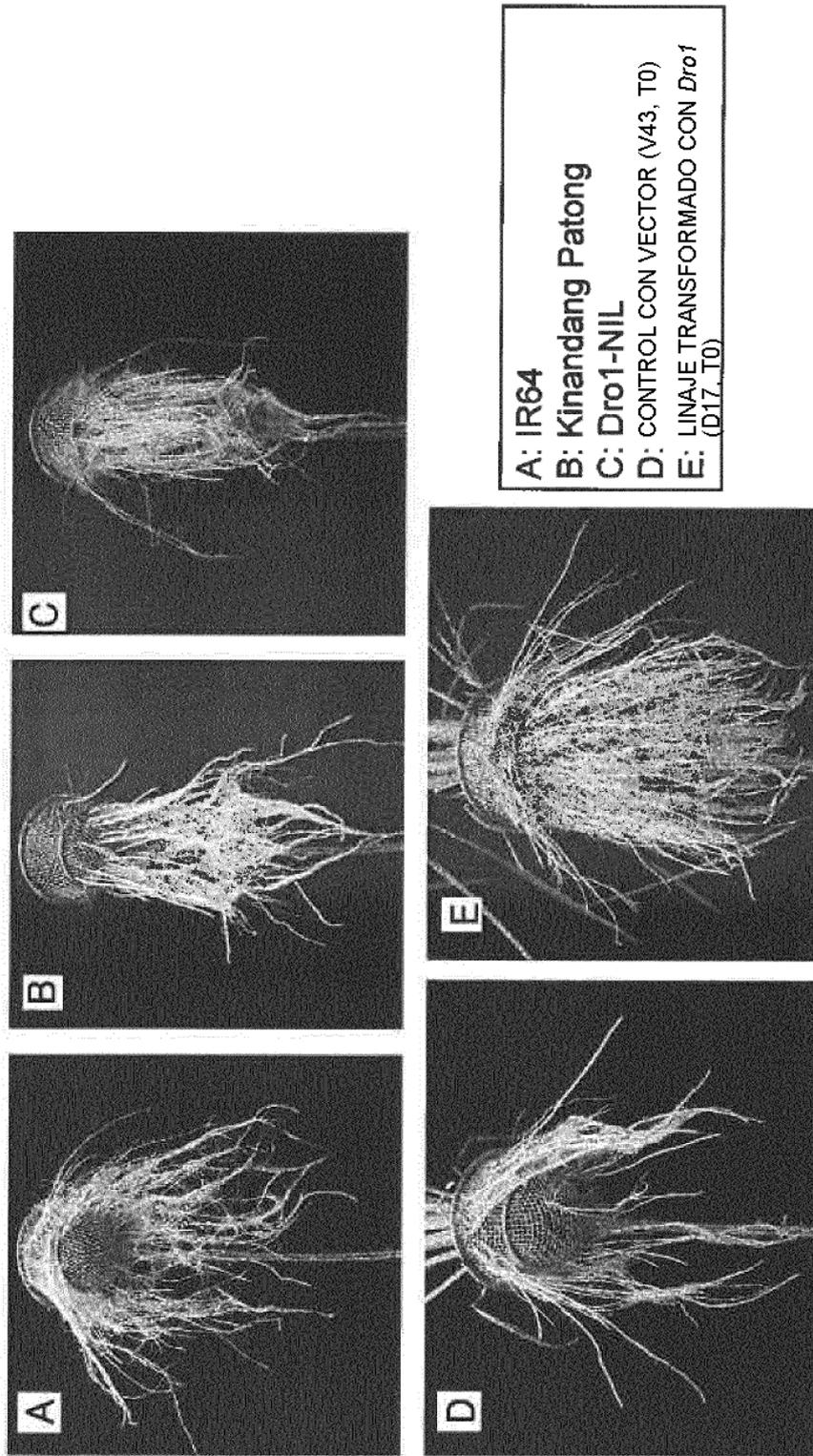


FIG. 1

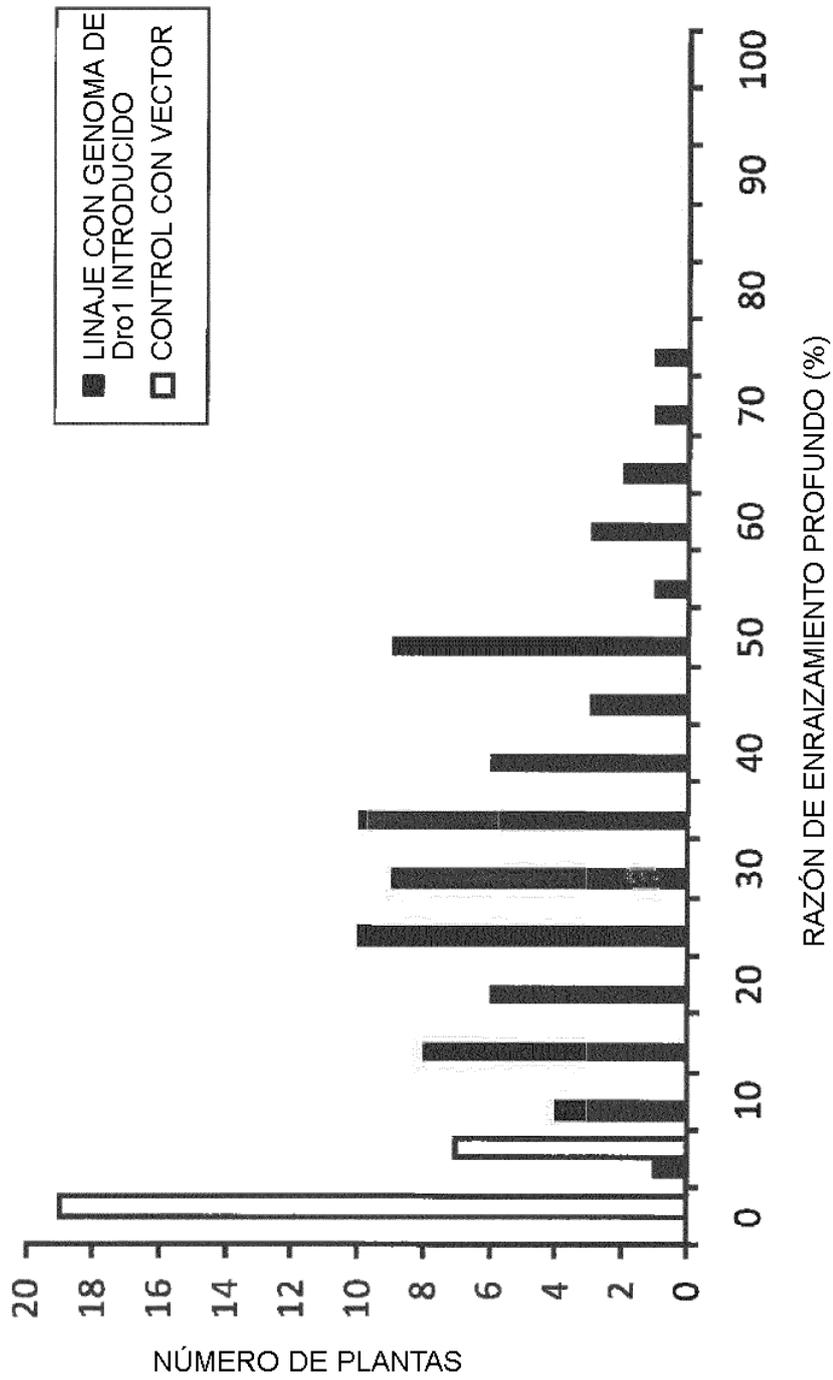


FIG. 2

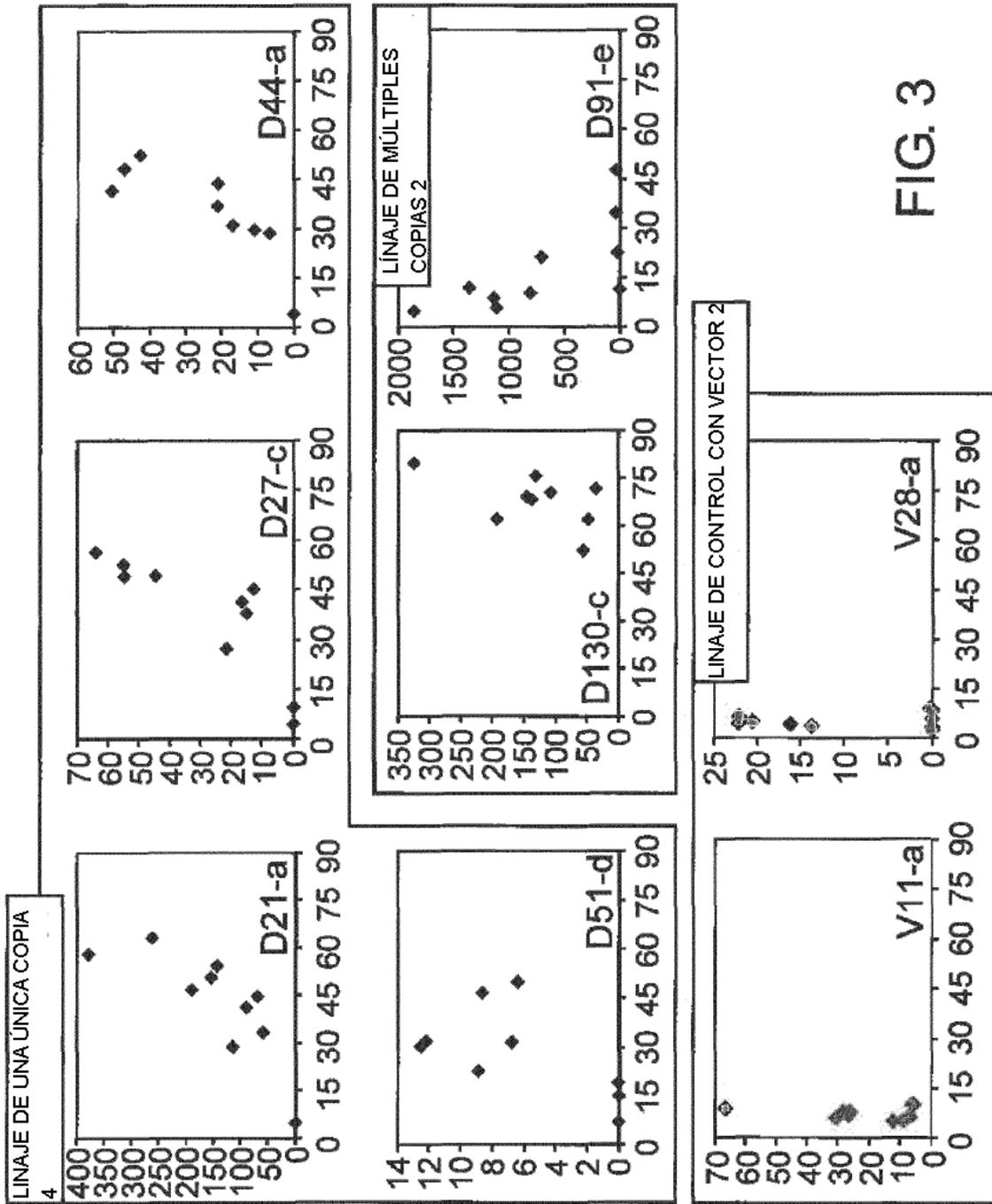


FIG. 3

RAZÓN DE ENRAIZAMIENTO PROFUNDO (%)

INTENSIDAD DE SEÑAL DEPENDIENDO DEL NÚMERO DE COPIAS DE UN VECTOR DE TRANSFORMACIÓN

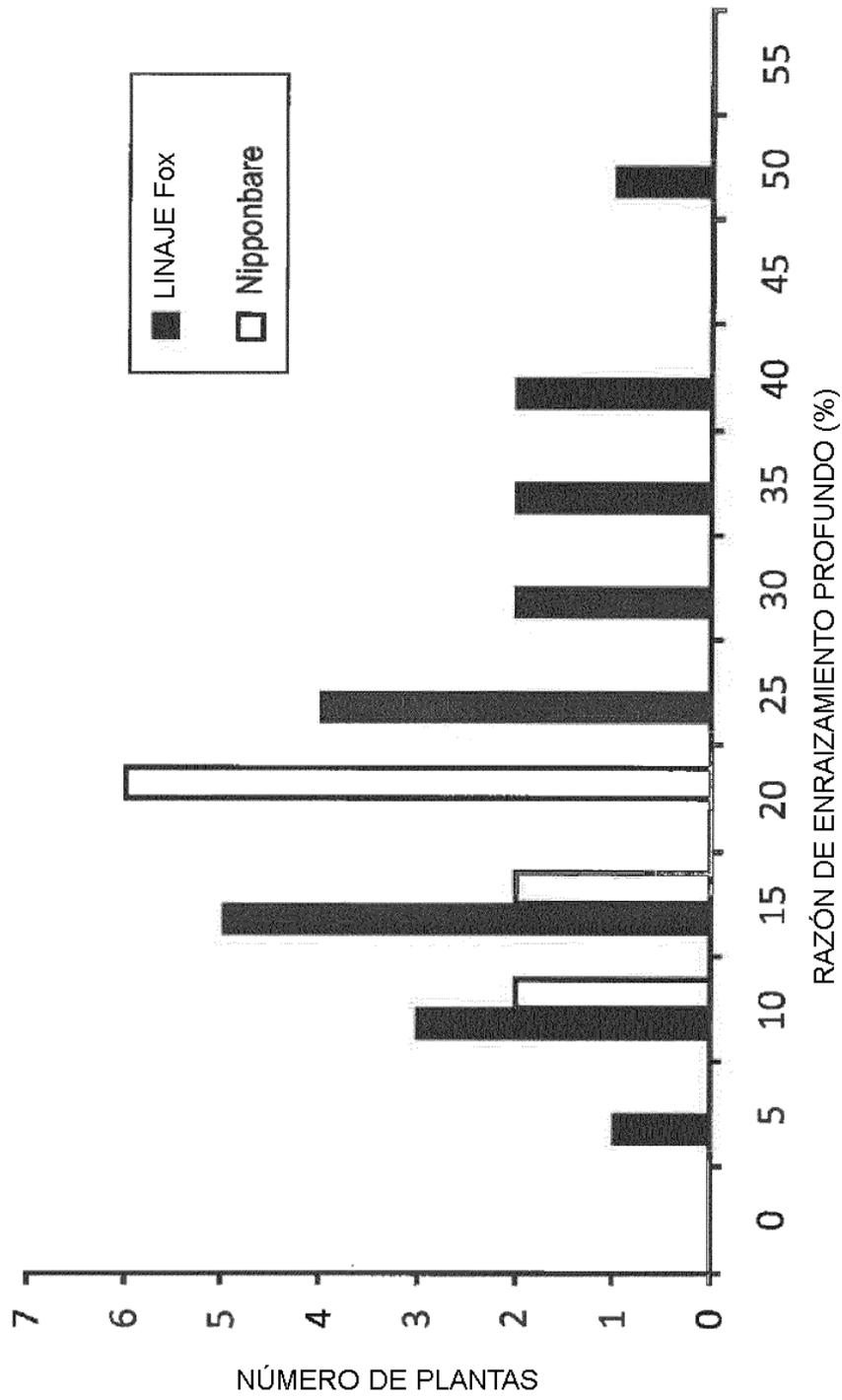


FIG. 4

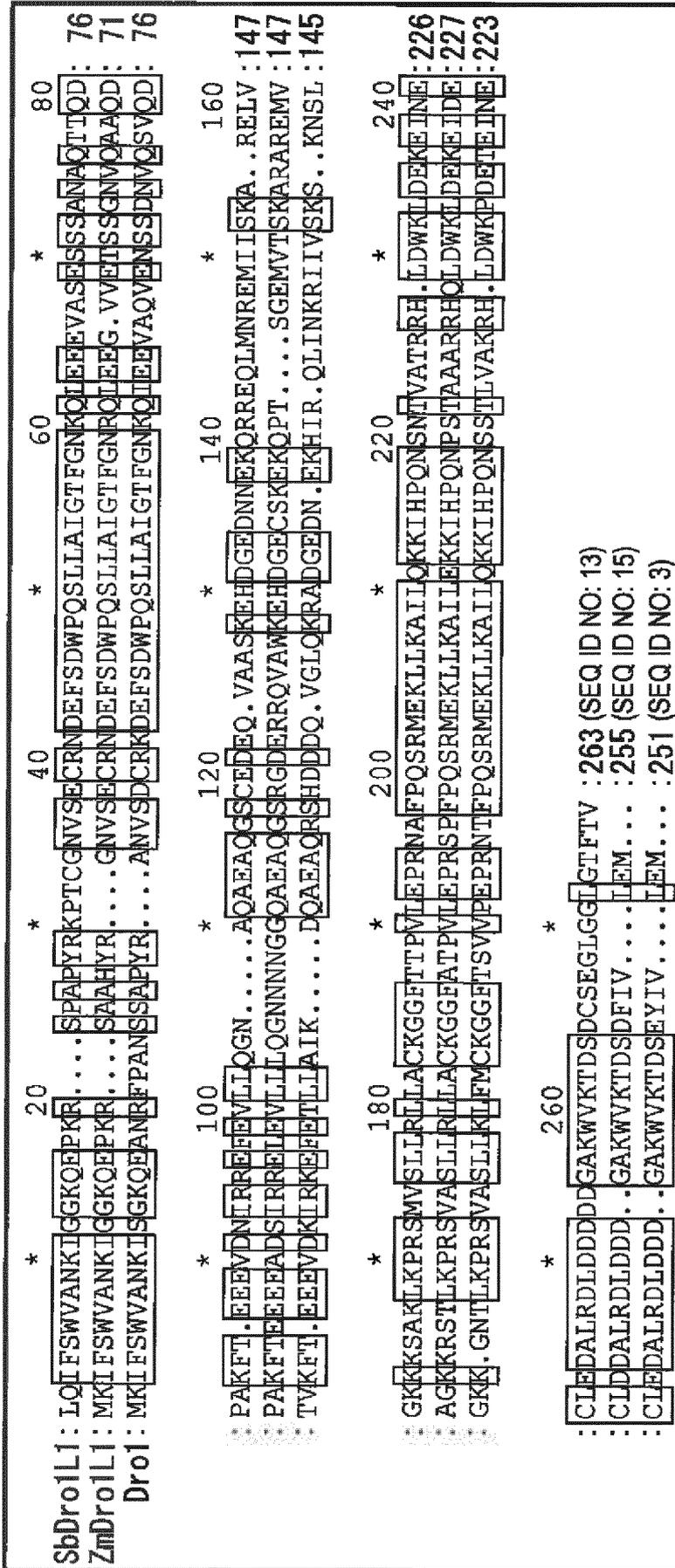
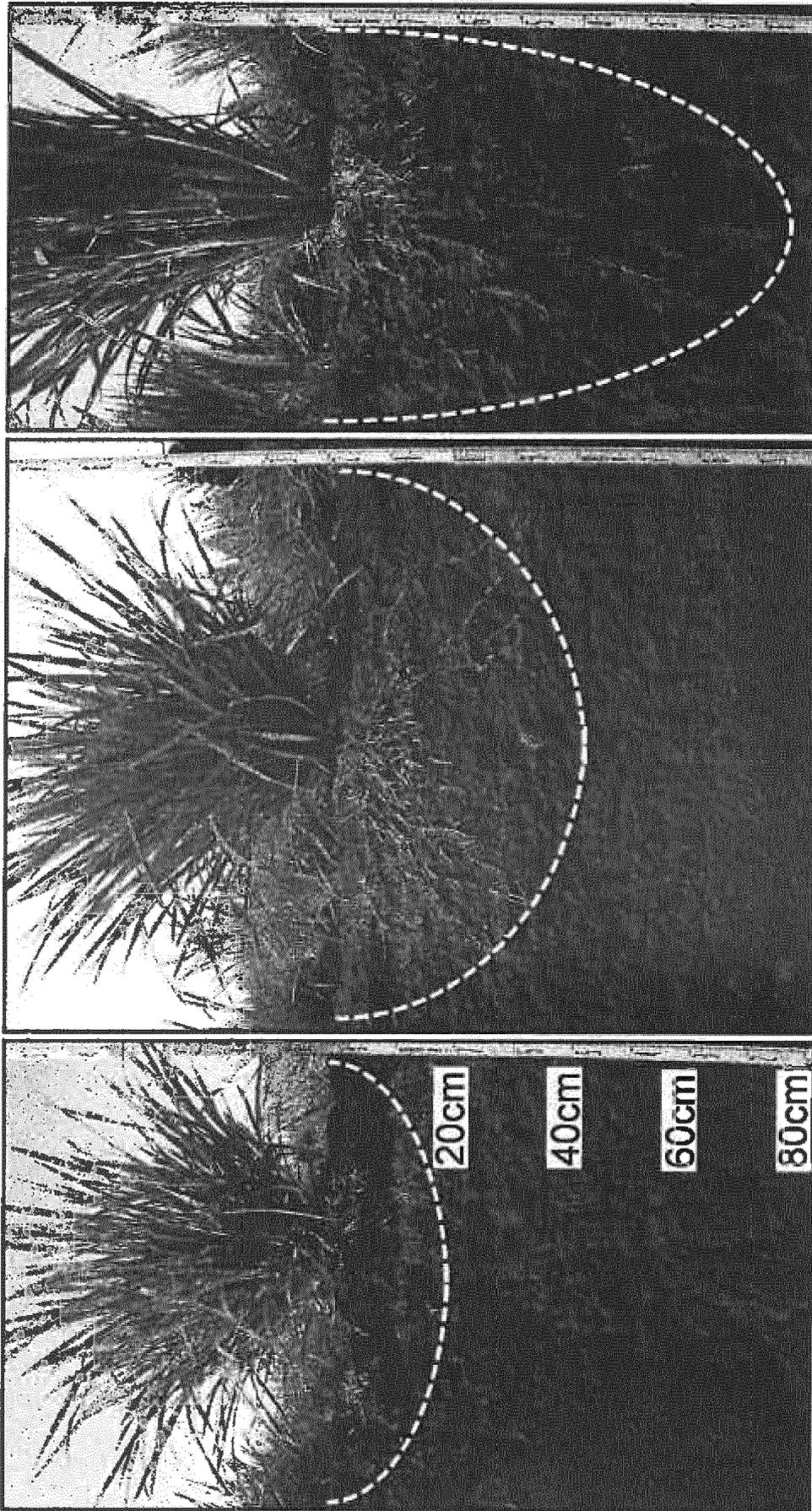


FIG. 5



Kinandang Patong

Dro1-NIL

IR64

FIG. 6

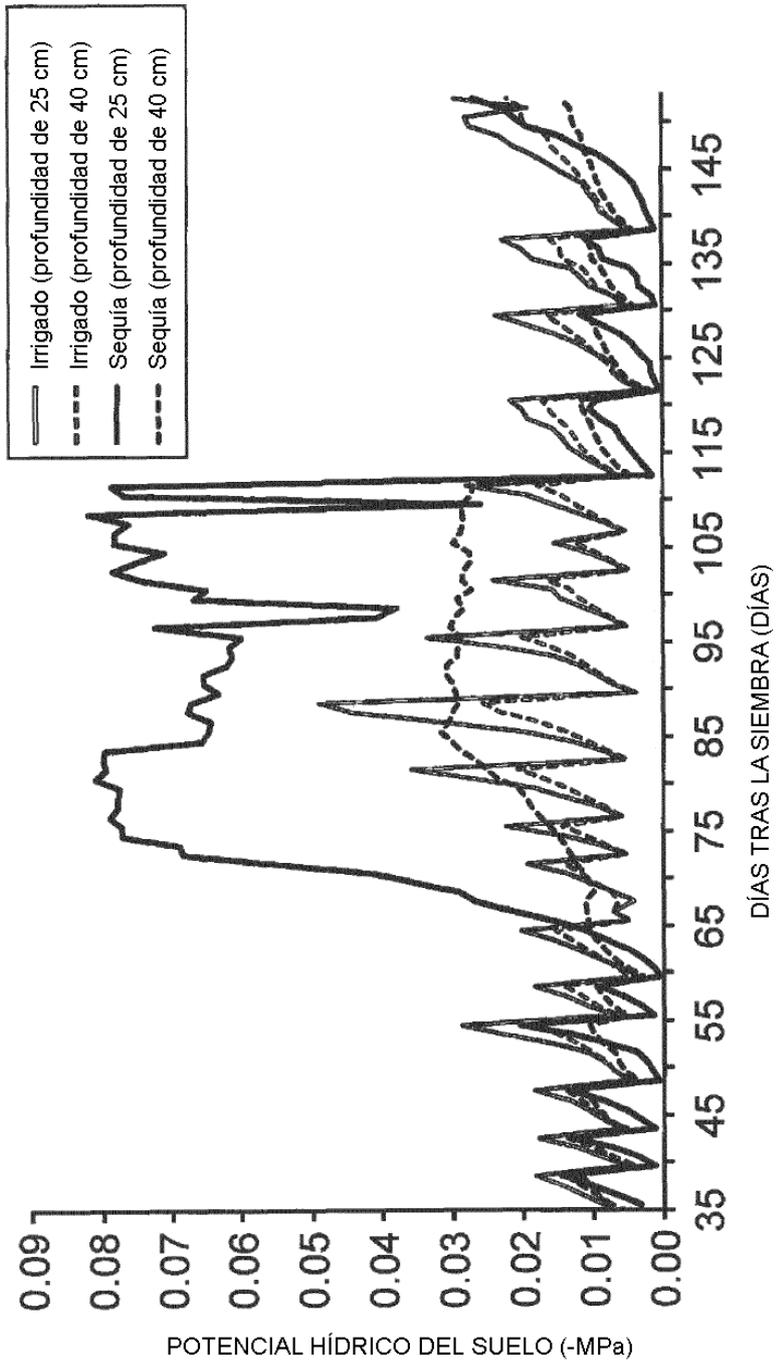
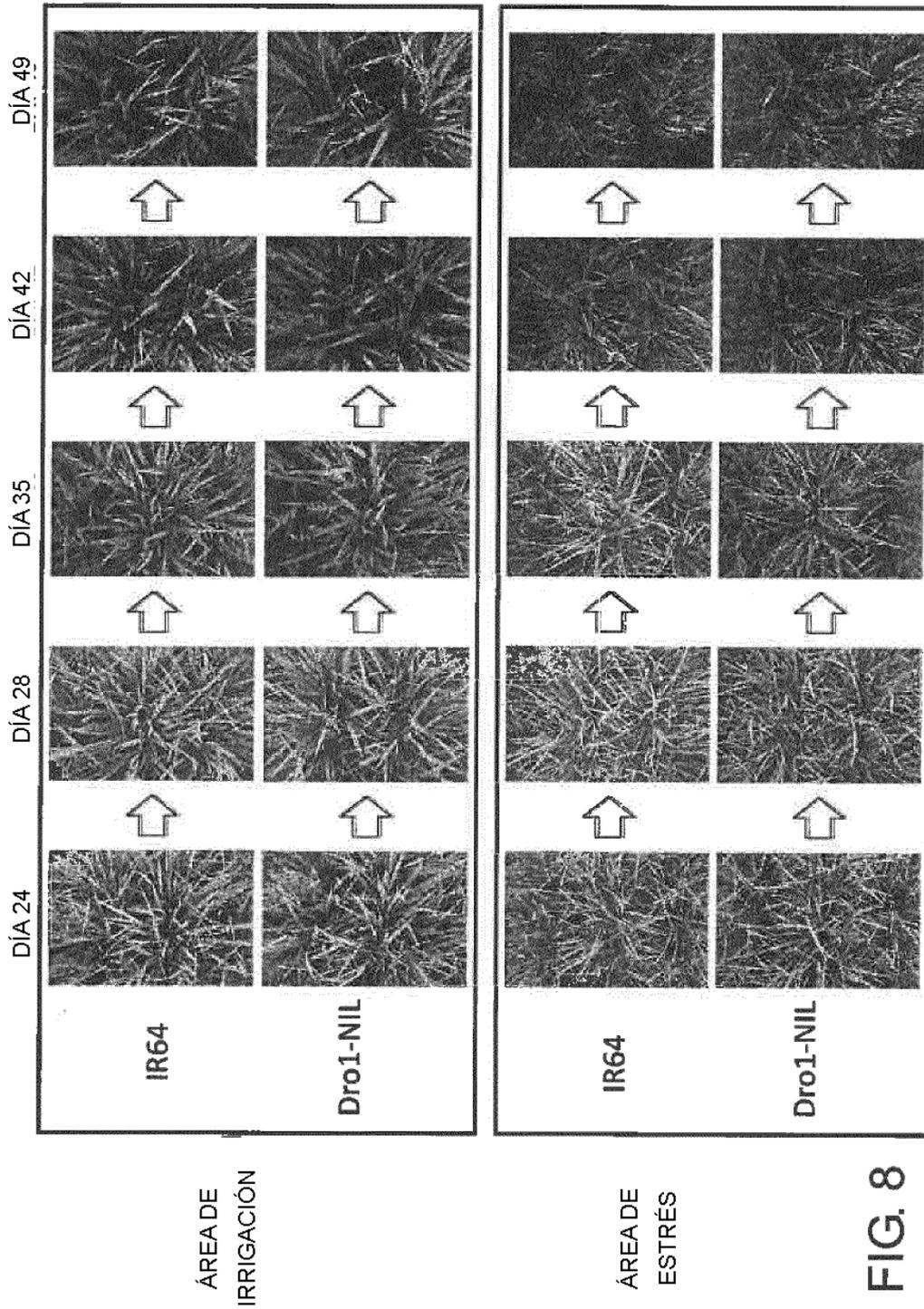


FIG. 7



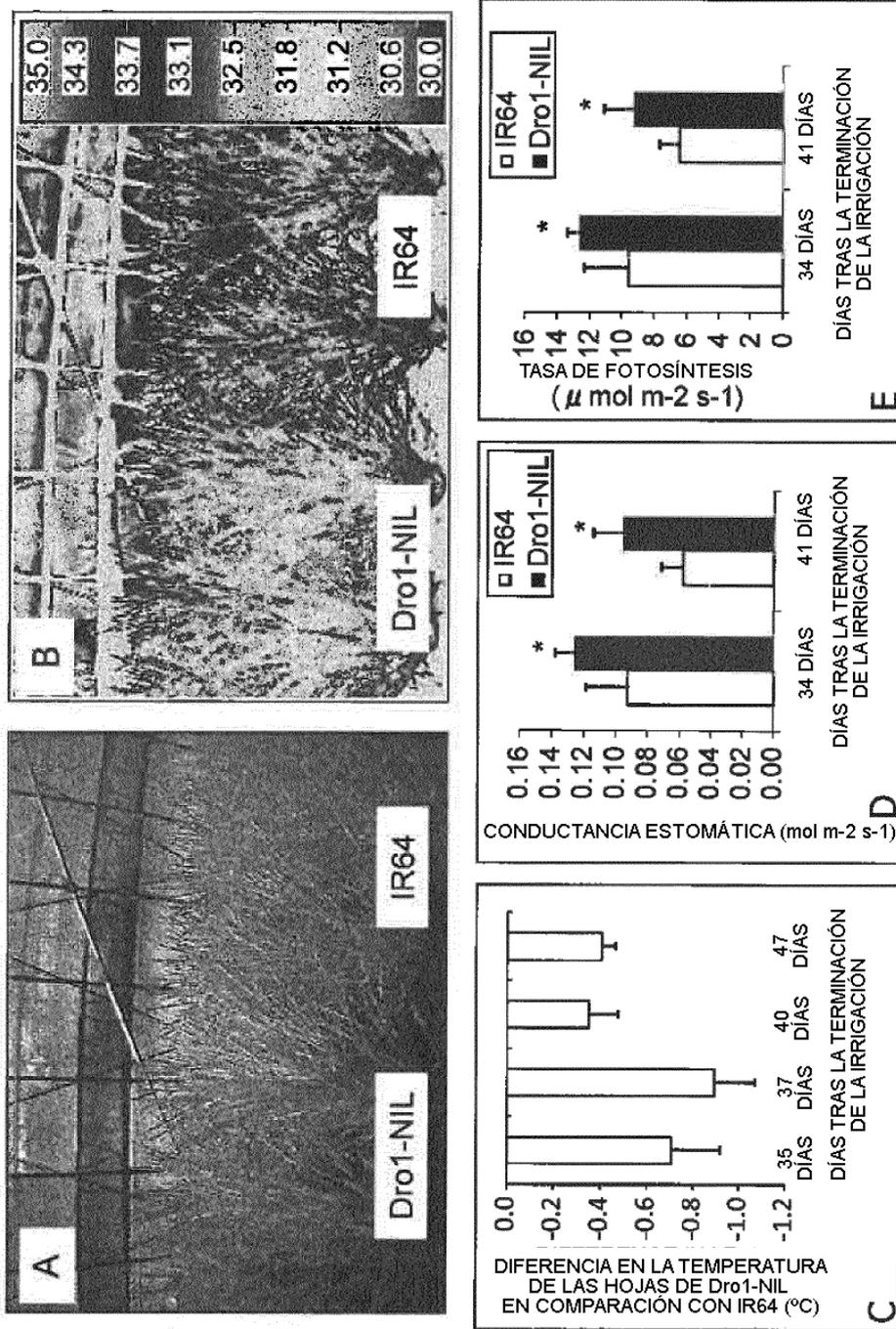


FIG. 9

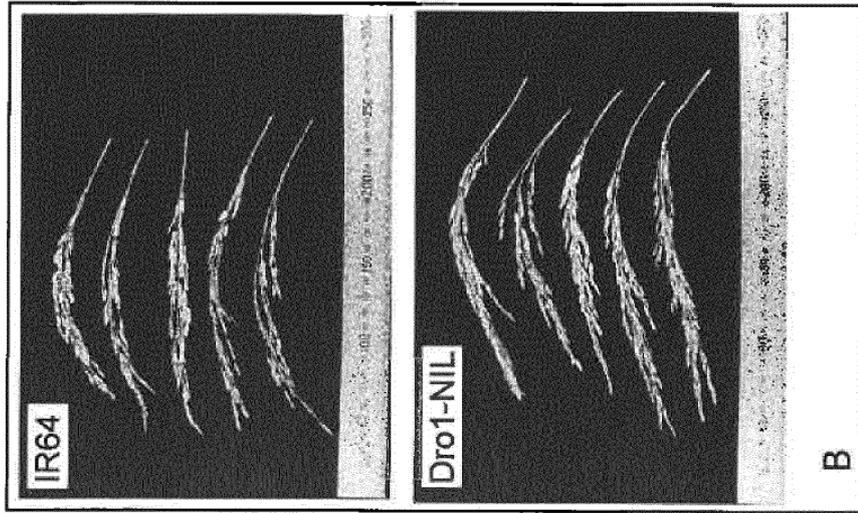
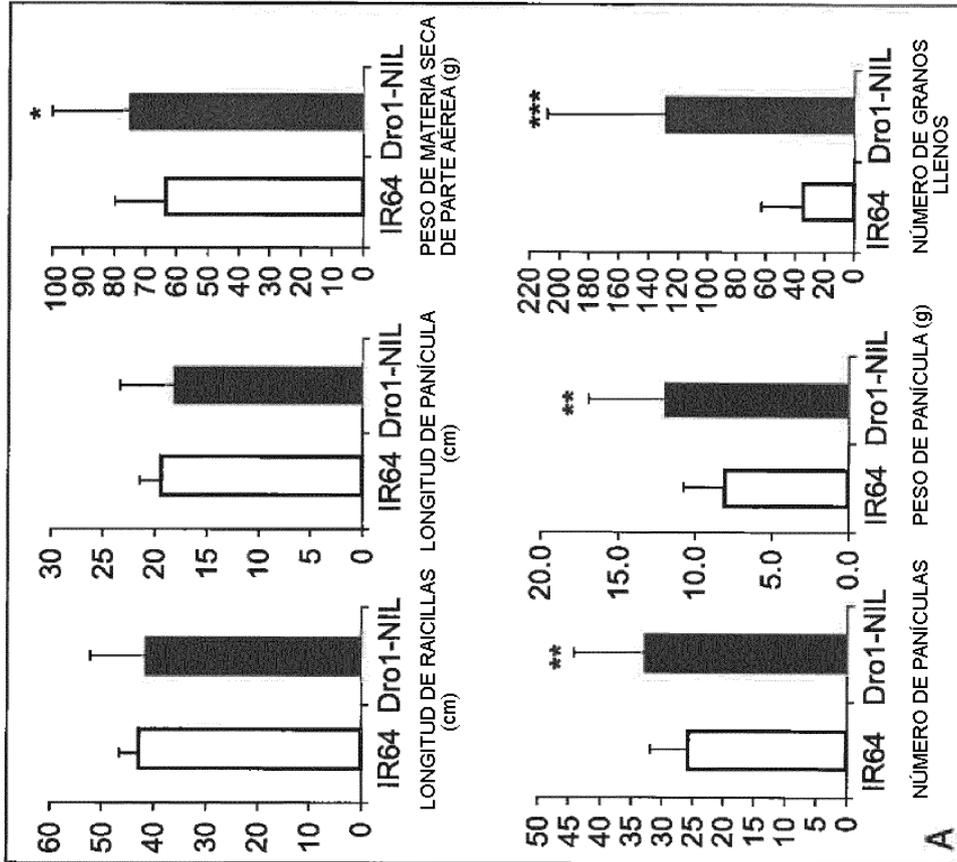


FIG. 10



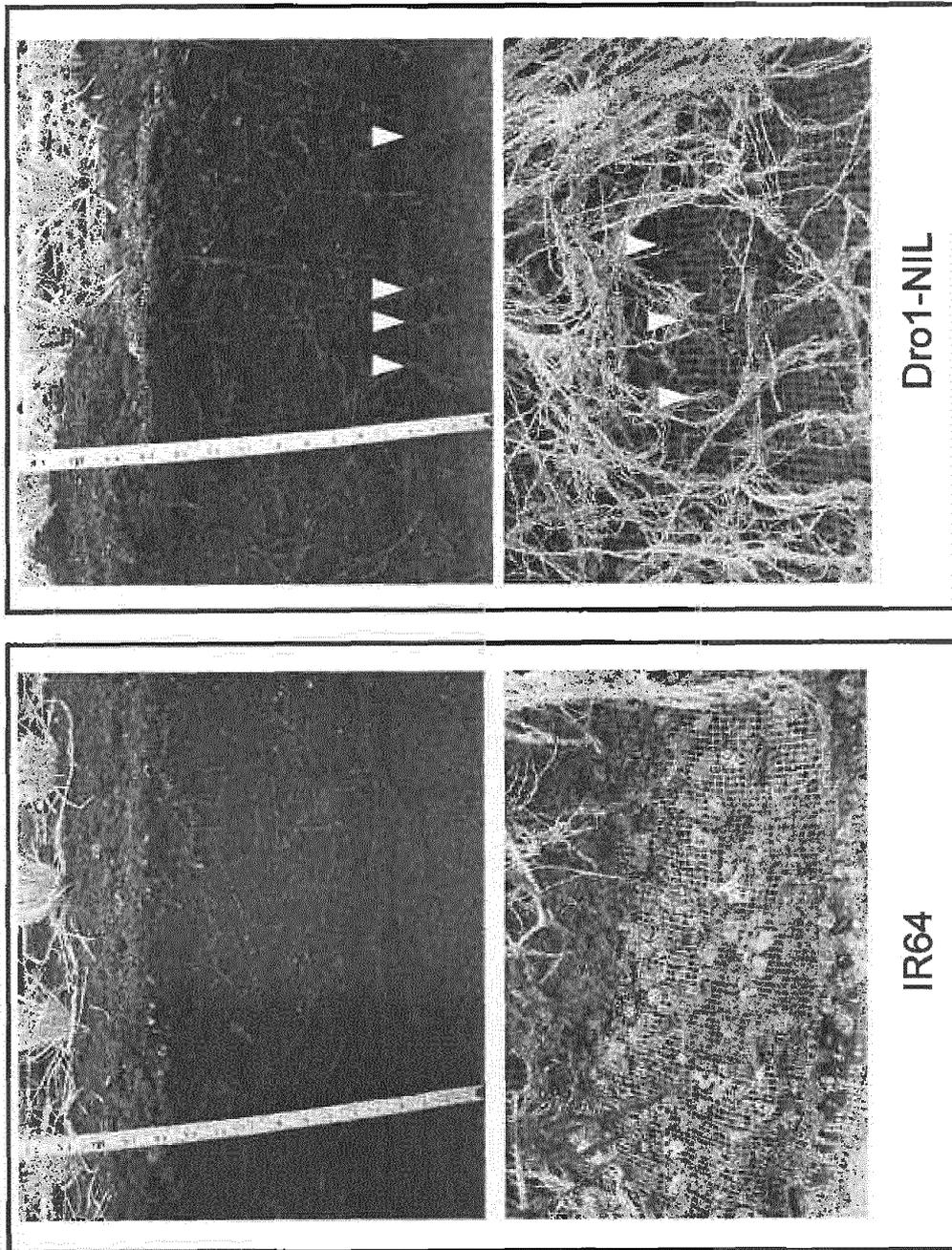


FIG. 11

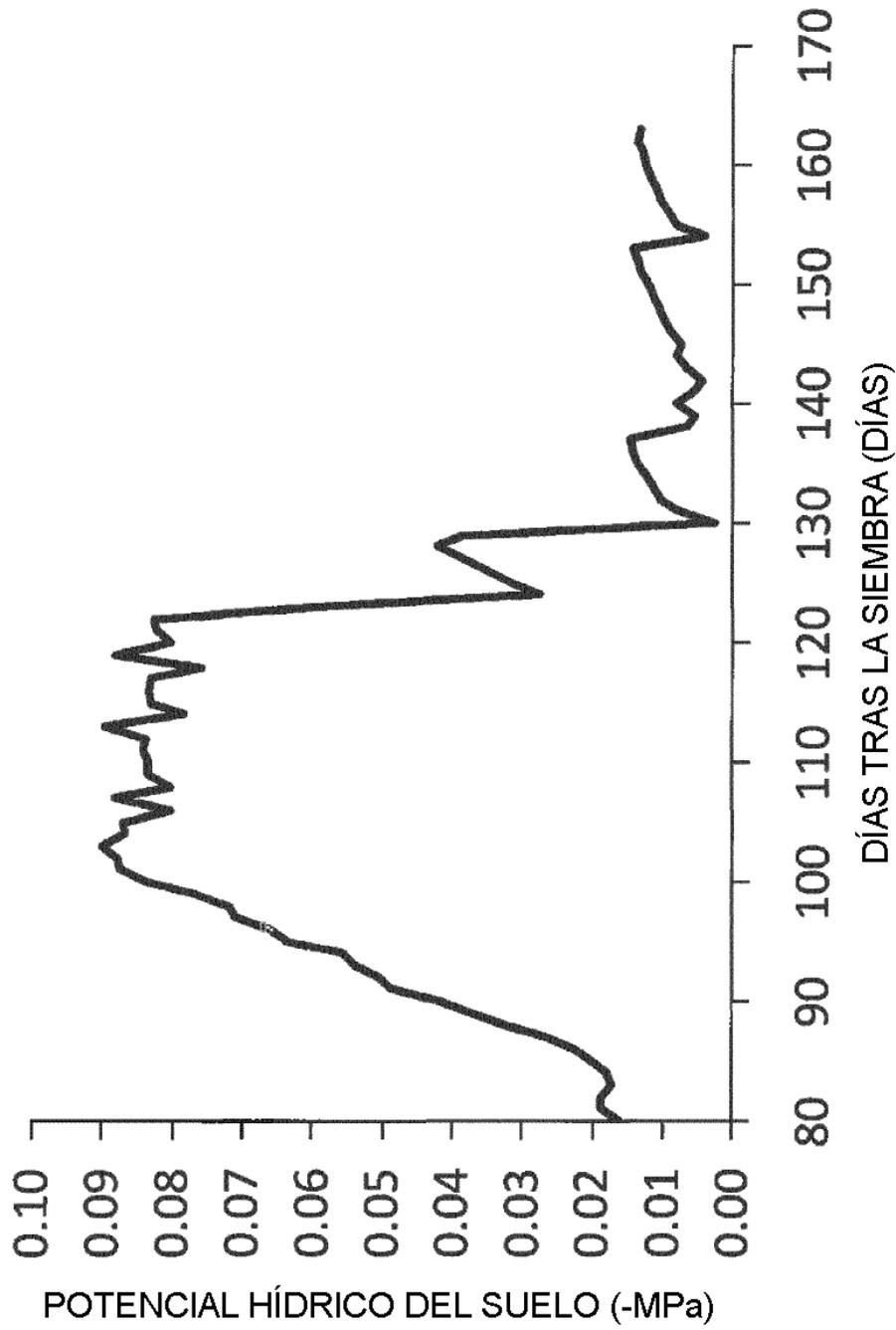
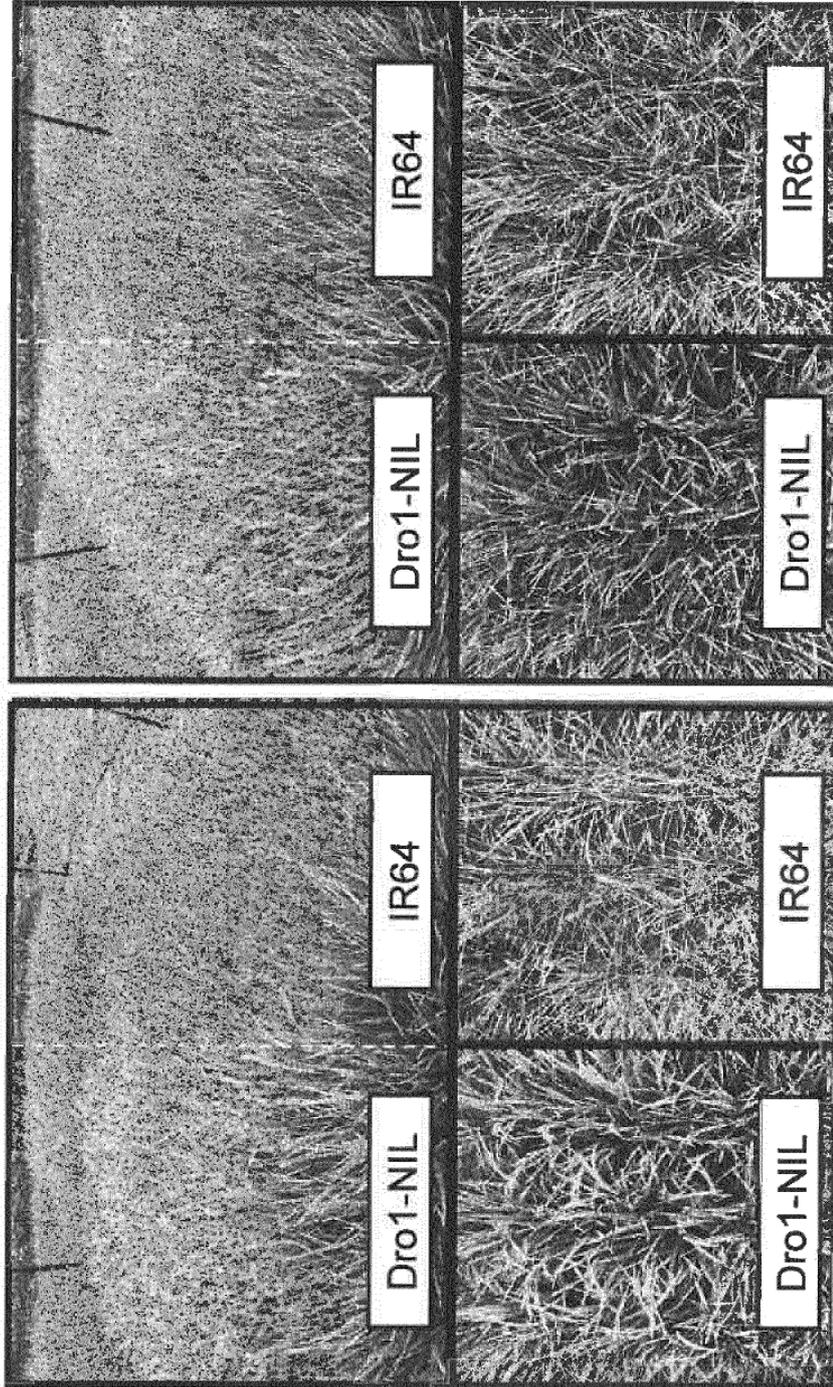


FIG. 12



ÁREA SIN FERTILIZACIÓN (DÍA 120) ÁREA CON FERTILIZACIÓN (DÍA 120)

FIG. 13

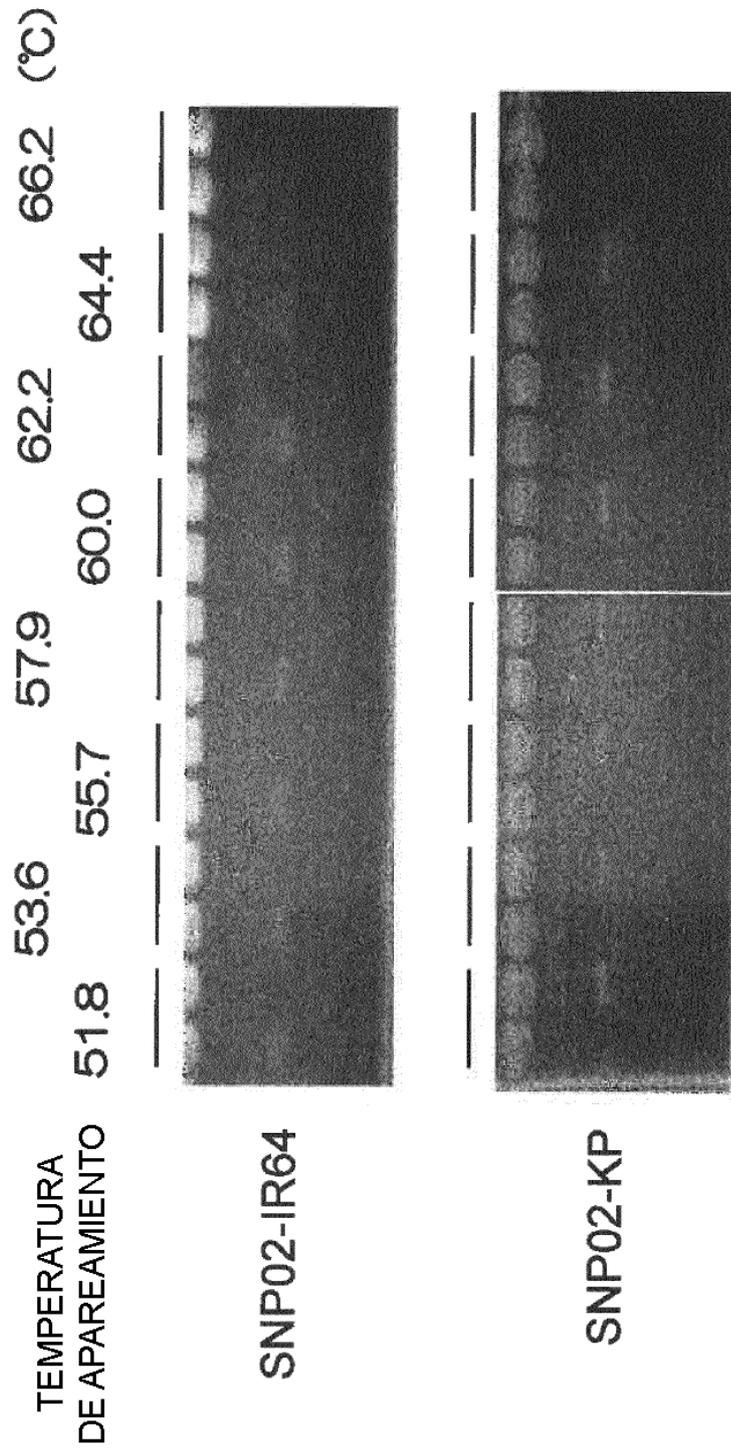


FIG. 14