(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 698 971**

(51) Int. Cl.:

A01H 5/00 (2008.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2014** **PCT/IB2014/062724**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015** **WO15001467**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2014** **E 14752936 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018** **EP 3016506**

(54) Título: **Aumento de la recombinación meiótica en plantas por la inhibición de la proteína FIDG**

(30) Prioridad:

03.07.2013 FR 1356522

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.02.2019

(73) Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (100.0%)
147, rue de l'Université
75007 Paris, FR

(72) Inventor/es:

MERCIER, RAPHAËL;
GIRARD, CHLOÉ y
CRISMANI, WAYNE

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 698 971 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

Aumento de la recombinación meiótica en plantas por la inhibición de la proteína FIDG

La presente invención está relacionada con un método para aumentar la recombinación meiótica en plantas.

La recombinación meiótica es un intercambio de ADN entre cromosomas homólogos en el curso de la meiosis; tiene lugar durante la profase de la primera división meiótica. Uno de los productos de la recombinación es el entrecruzamiento genético, que conlleva un intercambio recíproco de continuidad entre dos cromátidas homólogas. Esta profase (profase I) comprende 5 estadios sucesivos: leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. En leptoteno, los cromosomas se individualizan, formándose cada cromosoma por dos cromátidas hermanas procedentes de la duplicación que tiene lugar previamente a la profase. Durante el cigoteno, los cromosomas homólogos se aparean, formando una estructura llamada “bivalente” que contiene cuatro cromátidas, dos cromátidas hermanas maternas y dos cromátidas hermanas paternas, homólogas de las cromátidas maternas. En paquiteno, los cromosomas están totalmente apareados, y se forman nódulos de recombinación entre las cromátidas homólogas estrechamente ligadas entre ellas por el complejo sinaptonémico (SC); en diploteno, el SC se disocia progresivamente y los cromosomas homólogos empiezan a separarse, pero siguen juntos al nivel de los quiasmas, que corresponden a los sitios de entrecruzamiento genético (CO). Los cromosomas se condensan en el curso de la diacinesis; los quiasmas persisten hasta la metafase I, durante la cual mantienen el apareamiento de los bivalentes a una y otra parte de la placa ecuatorial.

La recombinación meiótica se origina por la formación de roturas bicatenarias (RBC) en una u otra de las cromátidas homólogas, y es el resultado de la reparación de estas roturas, usando como matriz una cromátida del cromosoma homólogo.

La recombinación meiótica tiene como consecuencia provocar una redistribución de los alelos de origen paterno y materno en el genoma, lo que contribuye a generar diversidad genética. Presenta por tanto un interés particular en los programas de mejora de plantas (WIJNKER y de JONG, Trends in Plant Science, 13, 640-646, 2008, CRISMANI et al, Journal of Experimental Botany, 64, 55-65, 2013). Especialmente, un control de la tasa de recombinación puede permitir aumentar la mezcla genética, y por tanto las probabilidades de obtener nuevas combinaciones de características; puede permitir también facilitar la introducción de genes de interés, así como la cartografía genética y la clonación posicional de genes de interés.

Se han propuestos diversos métodos para controlar la recombinación meiótica, basados en la sobreexpresión o silenciamiento de uno u otro de los muy numerosos genes identificados como implicados o potencialmente implicados en este mecanismo. Por ejemplo, la solicitud PCT WO/0208432 propone la sobreexpresión de la proteína RAD51, que está implicada en la recombinación homóloga, para estimular la recombinación meiótica; la solicitud US 2004023388 propone sobreexpresar un activador de la recombinación meiótica elegido entre SPO11, MRE11, RAD50, XRS2/NBS1, DMC1, RAD51, RPA, MSH4, MSHS, MLH1, RAD52, RAD54, TID1, RAD5S, RADS7, RADS9, una resolvasa, una proteína de ligamiento a ADN monocatenario, una proteína implicada en la remodelación de cromatina o una proteína del complejo sinaptonémico, para aumentar la frecuencia de recombinación entre cromátidas homólogas; la solicitud PCT WO 2004016795 propone aumentar la recombinación entre cromosomas homólogos que expresan una proteína SPO11 fusionada con un dominio de enlace con ADN; la solicitud PCT WO 03104451 propone aumentar el potencial de recombinación entre cromosomas homólogos mediante la sobreexpresión de una proteína (MutS) implicada en la reparación de desapareamientos.

Sin embargo, en la mayoría de casos, el efecto de estos genes candidatos sobre la formación de CO meióticos en plantas no se ha confirmado, es por tanto necesario identificar otros genes que intervengan en este fenómeno.

Uno de los factores conocidos por actuar sobre la tasa de recombinación meiótica es el fenómeno de interferencia: la formación de un CO en un lugar del cromosoma inhibe la formación de otros CO en la proximidad. No obstante, se ha mostrado que existían de hecho 2 rutas distintas de formación de CO meióticos (HOLLINGSWORTH y BRILL, Genes Dev., 18, 117-125, 2004; BERCHOWITZ y COPENHAVER, Current genomics, 11, 91-102, 2010). La primera genera CO interferentes denominados CO de tipo I (COI) y hace intervenir un conjunto de genes designados colectivamente con las denominaciones de genes *ZMM (ZIP1, ZIP2/SHOC1, ZIP3, HEI10, ZIP4, MER3, MSH4, MSH5, PTD)* así como las proteínas *MLH1 y MLH3;* la segunda ruta genera CO no interferentes denominados CO de tipo II (COII), y depende del gen *MUS81.*

El uso de una y/o la otra de estas dos rutas es variable de un organismo a otro. En los vegetales superiores, representados por la planta modelo *Arabidopsis thaliana,* coexisten las 2 rutas, siendo predominante la de CO de tipo I; se ha observado que la inactivación de los genes *AtMSH4, AtMSH5, AtMER3, SHOC1, PTD, AtHEI10* o *AtZIP4* inducía hasta un 85 % de reducción de la frecuencia de CO (HIGGINS et al., 2004, anteriormente citado; MERCIER et al., 2005, anteriormente citado; CHELYSHEVA et al., PLoS Genet. 3, e83, 2007; HIGGINS et al., Plant J., 55, 28-39, 2008 ; MACAISNE et al., Current Biology, 18, 1432-1437, 2008; WIJERATNE et al, Molecular Biology of the cell, 17, 1331-43; CHELYSHEVA et al, PLoS Genetics 8, e1002799, 2012). Ciertos cromosomas homólogos no están ya apareados por esto en forma de bivalentes, sino que aparecen en forma de univalentes. Esta disminución del número de bivalentes está acompañada por una gran reducción de la fertilidad.

Anteriormente, los inventores han identificado un gen, denominado *FANCM* (por "grupo M de complementación de anemia de Fanconi "*Fanconi Anemia Complementation Group* M" en inglés), cuya inactivación compensaba los efectos de la de *AtMSH5, SHOC1* o *AtZIP4,* y permitía aumentar el número de CO meióticos (solicitud PCT WO 2013/038376).

Prosiguiendo sus investigaciones, los inventores han identificado ahora otro gen cuya inactivación produce efectos similares a la de *FANCM.*

Se trata del gen "*FIDGETIN*" *(FIDG)* de *Arabidopsis thaliana (AtFIDG):* su inactivación compensa los efectos de la de *AtMSH5, SHOC1, AtZIP4* o *AtHEI10* y permite aumentar el número de CO meióticos y restaurar la fertilidad en mutantes *zmm Atzip4-/-, Atmsh5-/-, shoc1-/-* y *Athei10-/-.* Los inventores han descubierto además que los efectos de la inactivación del gen *FIDG* sobre el aumento del número de CO meióticos se producían no solamente en los mutantes *zmm,* sino igualmente en las plantas de tipo silvestre que poseían genes *ZMM* funcionales, y que cuando se combinaba la inactivación del gen *FIDG* con la del gen *FANCM,* el número de CO meióticos aumentaba aún más con relación a los observados cuando estos genes se inactivaban separadamente. Por otro lado, no se ha observado ninguna influencia de la inactivación del gen *FIDG* sobre el fenotipo somático.

Se describió el primer mutante *fidg* a partir de 1943 (Grüneberg, Journal of Genetics, 45, 22-28, 1943), como asociado en el ratón a un nuevo fenotipo que comprende asentimientos repetidos con la cabeza y movimientos circulares del animal. COX et al. (Nat Genet, 26, 198-202, 2000) han identificado al gen *FIDGETIN* cuya mutación era responsable de este fenotipo, y han descubierto igualmente la existencia, en el ratón, de dos 2 genes emparentados que han denominado *FIDGETIN-Tipo 1* y *FIDGETIN-Tipo* 2. Se han descrito diferentes funciones de las proteínas FIDG, que las implican especialmente en la regulación de la proliferación y la diferenciación de osteoblastos (PARK et al., J Bone Miner Res, 22, 889-96, 2007), la regulación de la espermatogénesis (L'HOTE et al., PLoS One, 6, e27582, 2011), el seccionamiento de microtúbulos (MUKHERJEE et al., Cell Cycle, 11, 2359-66, 2012) y la participación en un complejo que contiene hsRAD51, implicado en la reparación de cortes bicatenarios en células somáticas (YUAN y CHEN, Proc Natl Acad Sci USA, 2013).

Las proteínas FIDG pertenecen a la familia de las AAA-ATPasas (ATPasas asociadas con diversas actividades), y más particularmente al subgrupo 7 (BEYER, Protein Sci, 6, 2043-58, 1997; FRICKEY y LUPAS, J Struct Biol, 146, 2-10, 2004). Este subgrupo comprende igualmente las proteínas katanina y espastina que, como la fidgetina, se describen como enzimas de seccionamiento de microtúbulos. Están implicadas en la regulación del número y tamaño de microtúbulos en numerosas especies: *C. elegans* (YAKUSHIJI et al., FEBS Lett, 578, 191-7, 2004) *D. melanogaster* (ZHANG et al., J Cell Biol, 177, 231-42, *2007), H. sapiens* (MUKHERJEE et al., Cell Cycle, 11, 2359-66, 2012); *A. thaliana,* (STOPPIN-MELLET et al., Biochem J, 365, 337-42, 2002).

Las proteínas FIDG aparecen conservadas en animales y plantas, pero parecen ausentes en levaduras. En los animales, se han identificado de una a tres proteínas emparentadas como fidgetina (especialmente tres en mamíferos), en contraposición, se ha identificado un solo representante de esta familia en el genoma del nematodo *C. elegans,* de la rana africana de uñas, así como en los de la mayoría de plantas.

Sean animales o vegetales, las proteínas FIDG presentan dos dominios proteicos conservados: un dominio AAA-ATPasa, con un supuesto papel de hidrólisis de ATP; así como un dominio VSP4, conocido por desempeñar un papel importante en el enlace con microtúbulos. Estos dos dominios están respectivamente catalogados con las referencias PF00004 y PF09336 en la base de datos PFAM (PUNTA et al., Nucleic Acids Res. Database Issue 40: D290-D301, 2012)

La inhibición en un planta de una proteína FIDG según la presente invención conlleva un aumento de la frecuencia de CO meióticos en dicha planta.

La secuencia de la proteína FIDG de *Arabidopsis thaliana,* determinada por los inventores por secuenciación de ADN complementario (ADNc) derivado del ARN mensajero que codifica FIDG, se representa en la lista de secuencias del anexo con el número SEQ ID NO: 1. La secuencia del gen *FIDG* correspondiente es una secuencia compuesta de dos genes solapantes clasificados en la base de datos TAIR10 con las referencias AT3G27120 y AT3G27130. El ARN mensajero está compuesto por 13 exones, siendo el inicio de traducción aquel del gen predicho como AT3G27130 y perteneciendo el codón de terminación al gen predicho como AT3G27120 (la proteína está codificada por la hebra de Crick). Un sitio de corte y empalme mal predicho es el origen de la mala inscripción de este gen en las bases de datos.

Una investigación en las bases de datos de secuencias permitió identificar los ortólogos de *AtFIDG* en un amplio panel de eucariotas, y es muy probable que esta proteína esté conservada en el conjunto de plantas terrestres. A modo de ejemplos no limitantes de ortólogos de *AtFIDG,* se citarán especialmente:

- la proteína de *Brachypodium distachyon* cuya secuencia polipeptídica está disponible en la base de datos Genbank con el número de acceso XM_003576467;
- la proteína de *Carica papaya* cuya secuencia polipeptídica está predicha en la base de datos PLAZA con el número de acceso CP00171G00260;
- la proteína de *Fragaria vesca* cuya secuencia polipeptídica predicha figura en la base de datos Phytozome con el número de acceso mrna25885.1 y en la base de datos PLAZA con el número de acceso FV6G37220;

- en *Glycin max,* existen dos genes procedentes de una duplicación específica de esta especie; su secuencia polipeptídica está disponible en la base de datos Phytozome con los números de acceso Glyma19g18350.2 y Glyma05g14440.2 y en la base de datos PLAZA con los números de acceso respectivos GM19G18350 y GM05G14440;
- la proteína de *Oryza sativa* cuya secuencia polipeptídica está disponible en la base de datos GenBank con los números de acceso ABA97741 o EEC69225.1, preferiblemente EEC69225.1;
- la proteína de *Populus tricocarpa* cuya secuencia polipeptídica está disponible en la base de datos GenBank con el número de acceso POPTR_0001s33870;
- la proteína de *Ricinus communis* cuya secuencia polipeptídica está disponible en la base de datos Genbank con el número de acceso XM_002509479;
- la proteína de *Solanum lycopersicum* cuya secuencia polipeptídica está disponible en la base de datos Genbank con el número de acceso XM_004233540.1;
- la proteína de *Sorghum bicolor* cuya secuencia polipeptídica está disponible en la base de datos Genbank con el número de acceso XM_002442067.1;
- la proteína de *Theobroma cacao* cuya secuencia polipeptídica está predicha en la base de datos Phytozome con el número de acceso Thecc1EG017182t1 o Thecc1EG017182t2 (preferiblemente Thecc1EG017182t2) y en la base de datos PLAZA con el número de acceso TC04G003320;
- la proteína de *Vitis vinifera* cuya secuencia polipeptídica está disponible en la base de datos GenBank con el número de acceso CBI21358;
- la proteína de *Zea mays* cuya secuencia polipeptídica está disponible en la base de datos GenBank con el número de acceso DAA54951;
- la proteína de *Hordeum vulgare* cuya secuencia polipeptídica está disponible en la base de datos Genbank con el número de acceso BAK02801.1;
- la proteína de *Triticum urartu* cuya secuencia polipeptídica está disponible en la base de datos Genbank con el número de acceso EMS65393.1.

Se define el objeto de la presente invención por las reivindicaciones 1 a 6.

La presente invención tiene como objeto un procedimiento para aumentar la frecuencia de CO meióticos en una planta, caracterizado porque comprende la inhibición en dicha planta de una proteína denominada de aquí en adelante FIDG, teniendo dicha proteína al menos un 45 % de identidad de secuencia, o al menos un 60 % de similitud de secuencia, con la proteína AtFIDG de secuencia SEQ ID NO: 1, estando calculados dichos porcentajes con la ayuda del algoritmo Needle EMBOSS usando los parámetros por defecto para el cálculo de identidad y la matriz BLOSUM62 para el cálculo de similitud, y conteniendo un dominio AAA-ATPasa y un dominio VSP4, respectivamente, clasificados con las referencias PFAM PF00004 y PF09336.

En un modo de realización, la invención tiene como objeto un procedimiento tal como se define anteriormente, caracterizado porque comprende además la inhibición en dicha planta de una proteína denominada de aquí en adelante FANCM, teniendo dicha proteína al menos un 30 % de identidad de secuencia, o al menos un 45 % de similitud de secuencia, con la proteína AtFANCM de secuencia SEQ ID NO: 2, y conteniendo un dominio helicasa DEXDc y un dominio helicasa HELICc, respectivamente, clasificados con los números de acceso cd00046 y cd00079.

En un modo de realización, la invención tiene como objeto un procedimiento tal como se define anteriormente, caracterizado porque la inhibición de la proteína FIDG, y dado el caso de la proteína FANCM, se obtiene por mutagénesis del gen que codifica dicha proteína o su promotor.

En un modo de realización, la invención tiene como objeto un procedimiento tal como se define anteriormente, caracterizado porque la inhibición de la proteína FIDG, y dado el caso de la proteína FANCM, se obtiene por silenciamiento del gen que codifica dicha proteína expresando en dicha planta un ARN interferente orientado a dicho gen.

En un modo de realización, la invención tiene como objeto una planta mutante caracterizada porque contiene una mutación en el gen *FIDG,* induciendo dicha mutación la inhibición de la proteína FIDG en dicha planta.

En un modo de realización, la invención tiene como objeto un planta mutante tal como se define anteriormente, caracterizada porque contiene además una mutación en el gen *FANCM,* induciendo dicha mutación la inhibición de la proteína FANCM en dicha planta.

La presente descripción tiene como objeto un método para aumentar la frecuencia de los CO meióticos en una planta, caracterizado porque comprende la inhibición en dicha planta de una proteína denominada de aquí en adelante FIDG, teniendo dicha proteína al menos un 35 %, y en orden de preferencia creciente, al menos un 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 98 % de identidad de secuencia, o al menos un 50 %, y en orden preferencia creciente, al menos un 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 98 % de similitud de secuencia con la proteína AtFIDG de secuencia SEQ ID NO: 1, y que contiene un dominio AAA-ATPasa (PF00004) y un dominio VSP4 (PF09336).

Preferiblemente, dicha proteína tiene al menos un 70 %, y en orden de preferencia creciente, al menos un 75, 80, 85, 90, 95 o 98 % de identidad de secuencia, o al menos un 80 %, y en orden de preferencia creciente, al menos un 85,

90, 95 o 98 % de similitud de secuencia, con uno cualquiera de los ortólogos de *AtFIDG* cuya lista se indica a continuación.

Según un modo de ejecución preferido de la descripción, el dominio AAA-ATPasa de dicha proteína FIDG tiene al menos un 60 %, y en orden de preferencia creciente, al menos un 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 98 % de identidad de secuencia, o al menos un 70 %, y en orden de preferencia creciente, al menos un 75, 80, 85, 90, 95 o 98 % de similitud de secuencia, con el dominio AAA-ATPasa de la proteína AtFIDG (aminoácidos 431-561 de la SEQ ID NO: 1).

Según otro modo de ejecución preferido de la descripción, el dominio VSP4 de dicha proteína FIDG tiene al menos un 60 %, y en orden de preferencia creciente al menos un 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 98% de identidad de secuencia, o al menos un 70 %, y en orden de preferencia creciente al menos un 75, 80, 85, 90, 95 o 98 % de similitud de secuencia, con el dominio VSP4 de la proteína AtFIDG (aminoácidos 623-672 de la SEQ ID NO: 1).

Ventajosamente, dicha proteína FIDG contiene además un dominio de enlace con RAD51, que tiene al menos un 50 %, y en orden de preferencia creciente, al menos un 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 98 % de identidad de secuencia, o al menos un 70 %, y en orden de preferencia creciente, al menos un 75, 80, 85, 90, 95 o 98 % de similitud de secuencia, con los aminoácidos 268-346 de la SEQ ID NO: 1.

A menos que se especifique lo contrario, los valores de identidad y similitud de secuencia indicados aquí se calculan sobre la totalidad de la longitud de las secuencias comparadas, usando el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch (programa Needle EMBOSS con los parámetros por defecto). Los cálculos de similitud se efectúan usando la matriz BLOSUM62.

La inhibición puede obtenerse especialmente por mutagénesis del gen *FIDG.* Por ejemplo, una mutación en la secuencia codificante puede inducir, según la naturaleza de la mutación, la expresión de una proteína inactiva o de una proteína de actividad reducida; una mutación al nivel de un sitio de corte y empalme puede alterar o anular igualmente la función de la proteína y una mutación en la secuencia promotora puede inducir la ausencia de expresión de dicha proteína, o la disminución de su expresión.

La mutagénesis puede efectuarse por ejemplo mediante la supresión de toda o parte de la secuencia codificante o del promotor de *FIDG,* o mediante inserción de una secuencia exógena, por ejemplo un transposón o un ADN-T, dentro de dicha secuencia codificante o dicho promotor. Puede efectuarse igualmente induciendo mutaciones puntuales, por ejemplo por mutagénesis por EMS, por radiaciones o por mutagénesis dirigida, por ejemplo con la ayuda de nucleasas TALEN (nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción “Transcription Activator-Like Effector Nucleases” en inglés) o de nucleasas de dedo de cinc (CHRISTIAN et al., Genetics, 186, 757-61, 2010; CURTIN et al., Plant Gen., 5, 42-50, 2012).

Los alelos mutados pueden detectarse por ejemplo por PCR, usando cebadores específicos del gen *FIDG.*

Se describen en la técnica anterior diferentes métodos de mutagénesis y cribado de alto rendimiento. A modo de ejemplos, se pueden citar los métodos de tipo “TILLING” (Orientación a lesiones locales inducidas en el genoma “Targeting Induced Local Lesions In Genome” en inglés), descrito por McCALLUM et al., Plant Physiol., 123, 439-442, 2000). La ausencia de funcionalidad de FIDG en los mutantes puede verificarse basándose en las características fenotípicas de su descendencia; las plantas homocigóticas por una mutación inactivante del gen FIDG tienen una tasa de CO meióticos superior a la de las plantas silvestres (que no portan la mutación en el gen FIDG) de las que proceden. Generalmente, esta tasa de CO meióticos es superior en al menos un 50 %, preferiblemente al menos 2 veces superior, a la de las plantas silvestres de las que proceden.

Como alternativa, la inhibición de la proteína FIDG se obtiene por silenciamiento (silencing en inglés) del gen *FIDG*. Son conocidas en sí mismas diferentes técnicas de silenciamiento de genes en las plantas (para revisión véase, por ejemplo: WATSON y GRIERSON, Transgenic Plants Fundamentals and Applications (Hiatt, A, ed) New York Marcel Dekker, 255-281, 1992; CHICAS y MACINO, EMBO reports, 21, 992-996, 2001). Se puede citar la inhibición antisentido o cosupresión descritas por ejemplo en las patentes US 5190065 y US5283323. Es igualmente posible usar ribozimas orientadas al ARNm de la proteína FIDG.

Preferiblemente, se induce el silenciamiento del gen *FIDG* por interferencia de ARN orientado a dicho gen.

Un ARN interferente (ARNi) es un ARN pequeño que puede apagar un gen diana de manera específica de secuencia. Los ARN interferentes comprenden en particular “ARN interferentes pequeños” (ARNip) y microARN (miARN).

Inicialmente, los constructos de ADN para expresar ARN interferentes en plantas contenían un fragmento de 100 pb o más (generalmente de 100 a 800 pb) del ADNc del gen diana, bajo el control transcripcional de un promotor apropiado. Actualmente, los contructos más ampliamente usados son aquellos que pueden producir un transcrito de ARN en horquilla pequeño (ARNhp). En estos constructos, el fragmento del gen diana se repite a la inversa, generalmente con una región de espaciado entre las repeticiones (para revisión véase WATSON et al., FEBS Letters, 579, 5982-5987, 2005). Se pueden usar igualmente microARN artificiales (miARNa) dirigidos contra el gen *FIDG* (OSSOWSKI et al., The Plant Journal, 53, 674-690, 2008; SCHWAB et al., Methods Mol Biol., 592, 71-88, 2010; WEI et al., Funct Integr Genomics., 9, 499-511, 2009).

La presente descripción tiene como objeto constructos de ADN recombinante, y especialmente módulos de expresión, que producen un ARNi que permite apagar el gen *FIDG.*

Un módulo de expresión según la descripción comprende una secuencia de ADN recombinante cuyo transcrito es un ARNi, especialmente un ARNhp o un miARNa, orientado al gen *FIDG,* dispuesto bajo el control transcripcional de un promotor funcional en una célula vegetal.

Está disponible en la técnica una amplia selección de promotores apropiados para la expresión de genes heterólogos en células vegetales o plantas.

Estos promotores pueden obtenerse por ejemplo a partir de plantas, de virus de plantas o de bacterias como *Agrobacterium.* Incluyen promotores constitutivos, a saber promotores que son activos en la mayoría de tejidos y células y en la mayoría de condiciones ambientales, así como promotores específicos de tejido o específicos de célula, que son activos única o principalmente en ciertos tejidos o ciertos tipos de células, y promotores inducibles que se activan por estímulos físicos o químicos.

Son ejemplos de promotores constitutivos que se usan corrientemente en las células vegetales el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) descrito por KAY et al. (Science, 236, 4805, 1987), o sus derivados, el promotor del virus del mosaico de nervaduras de yuca (CsVMV) descrito en la solicitud internacional WO 97/48819, el promotor de ubiquitina del maíz o el promotor “actina-intrón-actina” del arroz (McELROY et al., Mol. Gen. Genet., 231, 150-160, 1991; número de acceso a GenBank S 44221).

En el marco de la presente descripción, se podrá usar también un promotor específico de la meiosis (es decir, activo exclusiva o preferentemente en células en meiosis). A modo de ejemplo no limitante, se puede citar el promotor DMC1 (KLIMYUK y JONES, Plant J., 11, 1-14, 1997).

Los módulos de expresión de la descripción comprenden generalmente un terminador transcripcional, por ejemplo el terminador 3'NOS de la nopalina sintasa (DEPICKER et al., J. Mol. Appl. Genet., 1, 561-573, 1982), o el terminador 3'CaMV (FRANCK et al., Cell, 21, 285-294, 1980). Pueden comprender igualmente otros elementos de regulación de la transcripción tales como amplificadores.

Los constructos de ADN recombinante según la descripción engloban igualmente vectores recombinantes que contienen un módulo de expresión según la descripción. Estos vectores recombinantes pueden incluir igualmente uno o varios genes marcadores, que permiten la selección de células o plantas transformadas.

La selección del vector más apropiado depende especialmente del hospedador previsto y del método considerado para la transformación del hospedador en cuestión. Están disponibles en la técnica numerosos métodos para la transformación genética de células vegetales o de plantas para numerosas especies vegetales, dicotiledóneas o monocotiledóneas. A modo de ejemplos no limitantes, se pueden citar la transformación mediada por virus, la transformación por microinyección, por electroporación, la transformación por microproyectiles, la transformación por *Agrobacterium,* etc.

La descripción tiene igualmente como objeto una célula hospedadora que comprende un constructo de ADN recombinante según la descripción. Dicha célula hospedadora puede ser una célula procariota, por ejemplo una célula de *Agrobacterium,* o una célula eucariota, por ejemplo una célula vegetal genéticamente transformada por un constructo de ADN de la descripción. El constructo puede expresarse transitoriamente, puede incorporarse también a un replicón extracromosómico estable o integrarse en el cromosoma.

La descripción proporciona igualmente un procedimiento para producir una planta transgénica que tiene una tasa de CO meióticos superior a la de la planta silvestre de la que procede, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- la transformación de una célula vegetal con un vector que contiene un módulo de expresión según la descripción;
- el cultivo de dicha célula transformada con el fin de regenerar una planta que tiene en su genoma un transgén que contiene dicho módulo de expresión.

La descripción engloba igualmente plantas genéticamente transformadas por un constructo de ADN de la descripción. Preferiblemente, dichas plantas son plantas transgénicas, en las que dicho constructo está contenido en un transgén integrado en el genoma de la planta, de modo que se transmite a generaciones sucesivas de plantas. La expresión del constructo de ADN de la descripción da como resultado una regulación negativa de la expresión del gen *FIDG,* que confiere a dichas plantas transgénicas una tasa de CO meióticos superior a la de las plantas silvestres (que no contienen el constructo de ADN de la descripción) de las que proceden. Generalmente, esta tasa de CO meióticos es superior en al menos un 50 %, preferiblemente al menos 2 veces superior a la de las plantas silvestres de las que proceden.

De manera particularmente ventajosa, la tasa de CO meióticos puede aumentar más combinando en una misma planta la inhibición de la proteína FIDG con la de la proteína FANCM. En este caso, la tasa de CO meióticos es al menos 3

veces superior, preferiblemente al menos 5 veces superior, a la de las plantas silvestres de las que proceden.

El aumento de la tasa de CO meióticos por inhibición de la proteína FANCM se describe en la solicitud PCT WO2013038376, cuyo contenido se incorpora como referencia a la presente descripción.

La proteína FANCM se define como una proteína que tiene al menos un 30 %, y en orden de preferencia creciente, al menos un 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 98 % de identidad de secuencia, o al menos un 45 %, y en orden de preferencia creciente, al menos un 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 98 % de similitud de secuencia con la proteína AtFANCM de *Arabidopsis thaliana* (GenBank: NP_001185141; UniProtKB: F4HYE4), y que contiene un dominio helicasa DEXDc (cd00046) y un dominio helicasa HELICc (cd00079). Preferiblemente, el dominio helicasa DEXDc tiene al menos un 65 %, y en orden de preferencia creciente, al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 98 % de identidad de secuencia, o al menos un 75 %, y en orden de preferencia creciente, al menos un 80, 85, 90, 95 o 98 % de similitud de secuencia con el dominio DEXDc (aminoácidos 129-272) de la proteína AtFANCM, y el dominio helicasa HELICc tiene al menos un 60 %, y en orden de preferencia creciente, al menos un 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 98 % de identidad de secuencia, o al menos un 70 %, y en orden de preferencia creciente, al menos un 75, 80, 85, 90, 95 o 98 % de similitud de secuencia con el dominio HELICc (aminoácidos 445-570) de la proteína AtFANCM. La secuencia polipeptídica de la proteína AtFANCM se representa en la lista de secuencias adjuntas con el número SEQ ID NO: 2.

La inhibición en una planta de una proteína FANCM tal como se define anteriormente conlleva un aumento de la frecuencia de CO meióticos en dicha planta.

La presente invención tiene igualmente por tanto como objeto:

- un procedimiento para aumentar la frecuencia de CO meióticos en una planta, que comprende la inhibición en dicha planta de la proteína FIDG y de la proteína FANCM;
- plantas mutantes que contienen en el gen *FIDG* una mutación que induce la inhibición de la proteína FIDG, y en el gen *FANCM* una mutación que induce la inhibición de la proteína FANCM.

La presente invención puede aplicarse especialmente en el campo de la mejora de plantas, con el fin de acelerar la obtención de nuevas variedades. Permite también facilitar la recombinación entre especies emparentadas, y por tanto la introducción de caracteres de interés. Permite igualmente acelerar el establecimiento de mapas genéticos y las clonaciones posicionales.

La presente descripción se aplica a un amplio abanico de plantas de interés agronómico monocotiledóneas o dicotiledóneas. A modo de ejemplos no limitantes, se pueden citar colza, girasol, patata, maíz, trigo, cebada, centeno, sorgo, arroz, soja, judía, zanahoria, tomate, calabacín, pimiento, berenjena, nabo, cebolla, guisante, pepino, puerro, alcachofa, remolacha, col, coliflor, lechugas, endivia, melón, sandía, fresera, manzano, peral, ciruelo, álamo, viña, algodón, rosa, tulipán, etc.

La presente descripción se comprenderá mejor con la ayuda del complemento de descripción siguiente, que se refiere a ejemplos no limitantes que ilustran los efectos de mutaciones del gen AtFIDG sobre la recombinación meiótica y la tasa de CO, así como de las figuras adjuntas:

Figura 1: Gráfica que representa el número de bivalentes en metafase I de supresores (mutantes *zmm-/-)* en comparación con el de plantas silvestres y plantas *zmm* homocigóticas no mutadas por EMS. En las abscisas fenotipo de las plantas ensayadas; en las coordenadas, número de bivalentes (en negro) y de pares univalentes (en gris claro) por meiosis.

Figura 2: Gráfica que representa las frecuencias de recombinación medidas en el doble mutante *fidg-1 fancm-1.*

Leyenda:

: Silvestre

: fidg-1

: fancm

: fidg-1 fancm-1

Eje de abscisas: intervalos ensayados según la nomenclatura de BERCHOWITZ y COPENHAVER (Nat. Protoc., 3, 41-50, 2008). I2a e I2b son dos intervalos adyacentes en el cromosoma 2; I3b e I3c en el cromosoma 3; I5c e I5d en el cromosoma 5. Eje de coordenadas: distancia genética (en cM).

EJEMPLO 1: OBTENCIÓN DE MUTANTES SUPRESORES DE MUTACIONES DE GENES *ZMM*

Se mutaron granos de *Arabidopsis thaliana* homocigóticos para inserción de ADN-T en *AtZIP4, SHOC1, AtHEI10, AtMSH5* o *AtMSH4 (Atzip4-/-, shocl-/-, Athei10-/-, Atmsh5-/- o Atmsh4-/-) p*or EMS (sulfonato de etilmetano). Las plantas procedentes de granos mutados (población M1, heterocigotos para las mutaciones inducidas por EMS, y homocigotos para la mutación del gen *ZMM)* tienen un fenotipo idéntico, resultante de la inactivación del gen *ZMM,* que se traduce por una gran disminución de la frecuencia de CO, lo que lleva a una gran disminución del número de bivalentes y a una bajada muy importante de la fertilidad (plantas "semiestériles") que da como resultado la formación de silicuas cortas que se diferencian fácilmente de las de las plantas silvestres. Se autopolinizaron plantas M1 para producir una población de descendientes (población M2) que contienen potencialmente plantas homocigóticas para las mutaciones inducidas por EMS. Se seleccionaron y genotiparon plantas de la población M2 que tienen silicuas más largas que las de las plantas *zmm* homocigóticas de la generación M1 con el fin de verificar el estado homocigótico para la inserción de ADN-T en el gen *ZMM* referido. Son supresores. Se compararon el número de bivalentes en metafase I de estos supresores con el de plantas silvestres y de plantas *zmm* homocigóticas no mutadas por EMS.

Se ilustran los resultados por la Figura 1.

Mientras que las plantas silvestres muestran sistemáticamente 5 bivalentes por meiosis, los mutantes *zmm-/-,* especialmente *Atzip4-/-,* muestran una gran disminución del número de bivalentes (y por tanto de la aparición de univalentes). Las mutaciones en *FIDGETIN* de fondo *Atzip4-/-* (supresores 339 y 346) permiten restaurar parcialmente la formación de bivalentes. Los mutantes de *fidg* sencillos presentan, como el silvestre, 5 bivalentes.

En las plantas *zmm/SUPRESOR,* se observa una mala segregación de los cromosomas que da como resultado una disminución del número de bivalentes, inducida por la mutación *zmm,* y que conduce a gametos desequilibrados no viables. Por el contrario, en las plantas *zmm/supresor,* el número de bivalentes es más elevado, asegurando una fertilidad en parte restaurada. Los mutantes *ZMM/supresor* sencillos se comportan como las plantas silvestres, se observa una segregación normal de cromosomas que conduce a la formación de gametos equilibrados.

Las plantas *zmm/supresor* y *ZMM/supresor* no presentan por otro lado diferencias somáticas fenotípicas visibles con las plantas silvestres. Las mutaciones inducidas por EMS son recesivas. Efectivamente, no se traducen en un fenotipo detectable en estado heterocigótico en la población de mutantes M1, y las plantas resultantes de retrocruzamiento de mutantes *zmm/supresor* con los mutantes *zmm* iniciales de los que proceden respectivamente tienen un fenotipo que no difiere del de los mutantes iniciales. Por otro lado, la segregación de fenotipos "fértil" y "semiestéril" en los descendientes procedentes de la autopolinización de plantas resultantes del retrocruzamiento de mutantes *zmm/supresor* con los mutantes *zmm* iniciales de los que proceden respectivamente indica que está afectado por la mutación un solo locus.

EJEMPLO 2: LOCALIZACIÓN EN EL GEN FIDGETIN

Entre los mutantes de EMS descritos en el Ejemplo 1 anterior, se aislaron dos estirpes de mutantes supresores de la mutación del gen *ZIP4* (Figura 1), tres estirpes de mutantes supresores de la mutación del gen *SHOC1,* tres estirpes de mutantes supresores de la mutación del gen *AtMSH5,* tres estirpes de mutantes supresores de la mutación del gen *AtHEI10,* así como una estirpe de mutantes supresores de la mutación del gen *AtMSH4*. Estas estirpes se denominan respectivamente: *zip4(s)339, zip4(s)346, msh5(s)*647, *msh5(s)*5, *msh5(s)*652, *shoc1(s)101, shoc1(s)123, shoc1(s)161, hei10(s)141, hei10(s)208, hei10(s)235, msh4(s)80.*

Las mutaciones correspondientes se localizaron todas en la secuencia genómica de *AtFIDGETIN.* Las pruebas de complementación confirmaron que estas mutaciones eran las responsables del fenotipo observado.

La Tabla I siguiente indica la naturaleza y posición de las mutaciones identificadas.

Tabla I

Alelos de *FIDG*		Cambio en la secuencia nucleotídica (TAIR 10)	Cambio en la secuencia proteica
zip4(s)339	*fidg-2*	Chr3 10 001 129: C>T	Sitio de corte y empalme modificado
zip4(s)346	*fidg-1*	Chr3 10 001 783: deleción de 1 pb	Desplazamiento de fase, DETENCIÓN
*msh5(s)*647	*fidg-3*	Chr3 10 000 278: C>T	DETENCIÓN
msh5(s)5	*fidg-4*	Chr3 10 004 090: C>T	DETENCIÓN
msh5(s)652	*fidg-5*	Chr3 10 001 772: C>T	Cambio de aminoácido: E>K
shoc1(s)101	*fidg-6*	Chr3 10 001 017: G>A	Cambio de aminoácido: L>F
shoc1(s)123	*fidg-7*	Chr3 10 001 812: C>T	Sitio de corte y empalme modificado
shoc1(s)161	*fidg-8*	Chr3 10 001 909: G>A	Cambio de aminoácido: R>K
hei10(s)141	*fidg-9*	Chr3 10 001 970: C>T	DETENCIÓN
hei10(s)208	*fidg-10*	Chr3 10 000 328: C>T	Cambio de aminoácido: E>K
hei10(s)235	*fidg-11*	Chr3 10 001 422: C>T	Cambio de aminoácido: D>N
msh4(s)80	*fidg-12*	Chr3 10 000 840: C>T	Cambio de aminoácido: L>F

EJEMPLO 3: INFLUENCIA DE LA INACTIVACIÓN DEL GEN *FIDG* SOBRE LA FRECUENCIA DE RECOMBINACIÓN MEIÓTICA

Se compararon las frecuencias de recombinación meiótica en plantas mutantes *fidg* y silvestres. Se midió la frecuencia de recombinación meiótica por análisis de tétradas con la ayuda de marcadores fluorescentes, como se describe por BERCHOWITZ y COPENHAVER (Nat. Protoc., 3, 41-50, 2008). Se midió la distancia genética en 2 intervalos adyacentes en el cromosoma 2 (I2a e I2b), 2 intervalos adyacentes en el cromosoma 3 (I3b e I3c), así como 2 intervalos adyacentes en el cromosoma 5 (intervalos I5c e I5d). Se ilustran los resultados por la Figura 2 y la Tabla II.

La mutación del gen *FIDGETIN* aumenta la recombinación con relación a la silvestre un 72 % de media en los 6 intervalos.

EJEMPLO 4: INFLUENCIA DE LA INACTIVACIÓN COMBINADA DE LOS GENES *FIDG Y FANCM* SOBRE LA FRECUENCIA DE RECOMBINACIÓN MEIÓTICA

De la misma forma que en el ejemplo 2, se midieron las frecuencias de recombinación en el doble mutante *fidg-1 fancm-1.* Se representan los resultados en la Figura 2 y en la Tabla II.

La Tabla II representa los tamaños genéticos (en cM) de diferentes intervalos en diferentes mutantes (los errores estándares se indican entre paréntesis; ND: no determinado).

Tabla II

cM	silvestre	+/-	*fidg-1*	+/-	*fancm-1*	+/-	*fidg-1 fancm-1*	+/-
I2a	2,86	0,26	4,91	0,29	7,41	0,73	15,10	1,68
I2b	4,82	0,20	10,33	0,52	15,82	0,99	33,17	1,09
I3b	5,62	0,36	9,20	0,37	18,07	1,40	33,75	5,46
I3c	18,30	0,73	24,81	0,96	37,44	1,83	60,60	2,69
I5c	7,35	0,53	14,08	0,75	22,72	1,55	49,32	3,36
I5d	5,54	0,37	9,80	0,53	19,63	1,33	35,70	2,61

cM	silvestre	+/-	*fidg-1*	+/-	*fancm-1*	+/-	*fidg-1 fancm-1*	+/-
I2a	2,8	(0,2)	4,9	(0,3)	9,0	(0,7)	ND	
I2b	4,8	(0,3)	9,4	(0,5)	17,1	(1,0)	ND	
I3c	5,8	(0,5)	9,7	(0,7)	15,4	(1,1)	ND	
I3d	19,7	(1,1)	24,2	(1,2)	34,5	(2,0)	ND	
I5c	6,2	(0,1)	9,6	(0,5)	17,8	(0,6)	35,7	(2,6)
I5d	6,3	(0,1)	13,5	(0,8)	21,5	(0,8)	49,3	(3,4)

Estos resultados muestran que la inactivación conjunta de *FIDG* y *FANCM (fidg-1 fancm-1)* conduce a un aumento medio de la recombinación de 5,77 veces con relación al silvestre (media de los 6 intervalos).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE MERCIER, Raphaël GIRARD, Chloé CRISMANI, Wayne

<120> AUMENTO DE LA RECOMBINACIÓN MEIÓTICA EN PLANTAS POR LA INHIBICIÓN DE LA PROTEÍNA FIDG

<130> MJP-11-F539-164PCT

<150> FR1356522
<151> 03-07-2013

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 672
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> DOMINIO
<222> (268)..(346)
<223> Dominio de enlace con RAD51

<220>
<221> DOMINIO
<222> (431)..(561)
<223> Dominio AAA

<220>
<221> DOMINIO
<222> (623)..(672)
<223> Dominio VPS4

<400> 1
```
Met Cys Gly Ser Val Val Ser Asp Ser Glu Arg Glu Phe Glu Phe His
1               5                   10                  15

Phe Trp Gly Phe Gly His Leu Gly Lys Glu Glu Glu Arg Ile Met Ala
            20                  25                  30

Gly Lys Arg Ser Ser Pro Phe Ser Ser Pro Leu Leu Arg Pro Pro Pro
        35                  40                  45

Glu Phe Leu Asn Val Lys Glu Glu Gly Glu Thr Glu Thr Pro Cys Trp
    50                  55                  60

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

Gly Ala Asp Lys Phe Leu Glu Lys Ser Asp Phe Ser Ser Ala Gln Ile
```

85 90 95

Leu Gly Leu Arg Leu Leu Gly Phe Leu Asp Ser Arg Ser Val Thr Asp
100 105 110

Ala Asp Arg Asp Phe Ile Gly Pro Ile Arg Arg Glu Val Ala Ser Lys
115 120 125

Ile Asp Leu Ala Leu Glu Gly Leu Val Ser Asp Ser Asp Arg Lys Ala
130 135 140

Phe Glu Leu Ala Asn Thr Ala Pro Gly Ala Ile Phe Gly Ser Lys Gly
145 150 155 160

Gly Phe Asp Val Glu Lys Ile Lys Gln Ser Lys Tyr Phe Gly Phe His
165 170 175

Val Ser Gln Ser Asn Gly Lys Gly Val Lys Glu Met Leu Ile Pro Lys
180 185 190

Ala Pro Lys Ser Met Met Gln Ala Lys Leu Thr Ser Leu Tyr Gly Asn
195 200 205

Ser Ile Gly Lys Pro Asp Asn Gln Arg Lys Thr Ser Val Asn Asn Gln
210 215 220

Asp Arg Ala Ser Asp Glu Cys Val Ile Val Glu Arg Ser His Gly Phe
225 230 235 240

Gly Phe Gly Thr Lys Arg Pro His Ala Glu Thr Ser Ser Leu Ala Asn
245 250 255

Asp Gly Glu Val Lys Glu Asp Gly Ala Pro Asn Gly Phe Val Ser Ala
260 265 270

Lys Ile Lys Leu Glu Met Asp Val Arg Gln Lys Arg Gly Ser Thr Glu
275 280 285

Ser Pro Ser Ser Cys Leu Ser Pro Gln Ser Asp Lys Asn Ala Leu Gly
290 295 300

Arg Gly Tyr Gly Ser Arg Ser Gly Gly Leu Arg Arg Gly Tyr Arg Ser
305 310 315 320

Asn Phe Val Pro Pro Val Lys Thr Asn Gly Asn Asn Val Gly Asn Leu
325 330 335

Thr Ser Arg Ile Gly Gly Lys Thr Asp Asp Ala Leu Asp Asp Ser Thr
340 345 350

Arg Thr Cys Leu Glu Met Leu Cys Gly Pro Asp Gly Glu Leu Pro Glu
355 360 365

Lys Leu Arg Asn Leu Glu Pro Arg Leu Ile Glu His Val Ser Asn Glu
370 375 380

Ile Met Asp Arg Asp Pro Asn Val Arg Trp Asp Asp Ile Ala Gly Leu
385 390 395 400

Glu His Ala Lys Lys Cys Val Thr Glu Met Val Ile Trp Pro Leu Leu
405 410 415

Arg Pro Asp Ile Phe Lys Gly Cys Arg Ser Pro Gly Lys Gly Leu Leu
420 425 430

Leu Phe Gly Pro Pro Gly Thr Gly Lys Thr Met Ile Gly Lys Ala Ile
435 440 445

Ala Gly Glu Ala Lys Ala Thr Phe Phe Tyr Ile Ser Ala Ser Ser Leu
450 455 460

Thr Ser Lys Trp Ile Gly Glu Gly Glu Lys Leu Val Arg Ala Leu Phe
465 470 475 480

Gly Val Ala Ser Cys Arg Gln Pro Ala Val Ile Phe Val Asp Glu Ile
485 490 495

Asp Ser Leu Leu Ser Gln Arg Lys Ser Asp Gly Glu His Glu Ser Ser
500 505 510

Arg Arg Leu Lys Thr Gln Phe Leu Ile Glu Met Glu Gly Phe Asp Ser
515 520 525

Gly Ser Glu Gln Ile Leu Leu Ile Gly Ala Thr Asn Arg Pro Gln Glu
530 535 540

Leu Asp Glu Ala Ala Arg Arg Arg Leu Thr Lys Arg Leu Tyr Ile Pro
545 550 555 560

Leu Pro Ser Ser Glu Ala Arg Ala Trp Ile Ile Gln Asn Leu Leu Lys
565 570 575

Lys Asp Gly Leu Phe Thr Leu Ser Asp Asp Asp Met Asn Ile Ile Cys
580 585 590

Asn Leu Thr Glu Gly Tyr Ser Gly Ser Asp Met Lys Asn Leu Val Lys
595 600 605

Asp Ala Thr Met Gly Pro Leu Arg Glu Ala Leu Lys Arg Gly Ile Asp
610 615 620

Ile Thr Asn Leu Thr Lys Asp Asp Met Arg Leu Val Thr Leu Gln Asp
625 630 635 640

Phe Lys Asp Ala Leu Gln Glu Val Arg Pro Ser Val Ser Gln Asn Glu
645 650 655

Leu Gly Ile Tyr Glu Asn Trp Asn Asn Gln Phe Gly Ser Leu Ser Leu
660 665 670

<210> 2
<211> 1390
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> DOMINIO
<222> (129)..(272)
<223> Dominio helicasa DEXDc

<220>
<221> DOMINIO
<222> (445)..(570)
<223> Dominio helicasa HELICc

<400> 2
Met Gly Ser Arg Val Pro Ile Glu Thr Ile Glu Glu Asp Gly Glu Phe
1 5 10 15

Asp Trp Glu Ala Ala Val Lys Glu Ile Asp Leu Ala Cys Leu Lys Thr
20 25 30

Thr Asn Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser His Phe Thr Pro Leu Ala Asn
35 40 45

Pro Pro Ile Thr Ala Asn Leu Thr Lys Pro Pro Ala Lys Arg Gln Ser
50 55 60

Thr Leu Asp Lys Phe Ile Gly Arg Thr Glu His Lys Pro Glu Asn His
65 70 75 80

Gln Val Val Ser Glu Cys Gly Val Asn Asp Asn Asp Asn Ser Pro Leu
85 90 95

Val Gly Ile Asp Pro Glu Ala Ala Lys Thr Trp Ile Tyr Pro Gly Phe
100 105 110

Val Pro Leu Arg Asp Tyr Gln Phe Ala Ile Thr Lys Thr Ala Leu Phe
115 120 125

Ser Asn Thr Leu Val Ala Leu Pro Thr Gly Leu Gly Lys Thr Leu Ile
130 135 140

Ala Ala Val Val Met Tyr Asn Tyr Phe Arg Trp Phe Pro Gln Gly Lys
145 150 155 160

Ile Val Phe Ala Ala Pro Ser Arg Pro Leu Val Met Gln Gln Ile Glu
165 170 175

Ala Cys His Asn Ile Val Gly Ile Pro Gln Glu Trp Thr Ile Asp Leu
180 185 190

Thr Gly Gln Thr Cys Pro Ser Lys Arg Ala Phe Leu Trp Lys Ser Lys
195 200 205

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

Gly Thr Cys Leu Thr Asn Tyr Leu Val Cys Leu Val Ile Asp Glu Ala
225 230 235 240

His Arg Ala Leu Gly Asn Tyr Ser Tyr Cys Val Val Val Arg Glu Leu
245 250 255

Met Ala Val Pro Ile Gln Leu Arg Ile Leu Ala Leu Thr Ala Thr Pro
260 265 270

Gly Ser Lys Thr Gln Ala Ile Gln Gly Ile Ile Asp Asn Leu Gln Ile
275 280 285

Ser Thr Leu Glu Tyr Arg Asn Glu Ser Asp His Asp Val Cys Pro Tyr
290 295 300

Val His Asp Arg Lys Leu Glu Val Ile Glu Val Pro Leu Gly Gln Asp
305 310 315 320

Ala Asp Asp Val Ser Lys Arg Leu Phe His Val Ile Arg Pro Tyr Ala
325 330 335

Val Arg Leu Lys Asn Phe Gly Val Asn Leu Asn Arg Asp Ile Gln Thr
340 345 350

Leu Ser Pro His Glu Val Leu Met Ala Arg Asp Lys Phe Arg Gln Ala
355 360 365

Pro Leu Pro Gly Leu Pro His Val Asn His Gly Asp Val Glu Ser Cys
370 375 380

Phe Ala Ala Leu Ile Thr Leu Tyr His Ile Arg Lys Leu Leu Ser Ser
385 390 395 400

His Gly Ile Arg Pro Ala Tyr Glu Met Leu Glu Glu Lys Leu Lys Glu
405 410 415

Gly Pro Phe Ala Arg Leu Met Ser Lys Asn Glu Asp Ile Arg Met Thr
420 425 430

Lys Leu Leu Met Gln Gln Arg Leu Ser His Gly Ala Pro Ser Pro Lys
435 440 445

Leu Ser Lys Met Leu Glu Ile Leu Val Asp His Phe Lys Val Lys Asp
450 455 460

Pro Lys Thr Ser Arg Val Ile Ile Phe Ser Asn Phe Arg Gly Ser Val
465 470 475 480

Arg Asp Ile Met Asn Ala Leu Ser Asn Ile Gly Asp Met Val Lys Ala
485 490 495

Thr Glu Phe Ile Gly Gln Ser Ser Gly Lys Thr Leu Lys Gly Gln Ser
500 505 510

Gln Lys Ile Gln Gln Ala Val Leu Glu Lys Phe Arg Ala Gly Gly Phe
515 520 525

Asn Val Ile Val Ala Thr Ser Ile Gly Glu Glu Gly Leu Asp Ile Met
530 535 540

Glu Val Asp Leu Val Ile Cys Phe Asp Ala Asn Val Ser Pro Leu Arg
545 550 555 560

Met Ile Gln Arg Met Gly Arg Thr Gly Arg Lys Asn Asn Gly Arg Pro
565 570 575

Leu Leu Val Leu Ala Cys Glu Gly Ser Glu Lys Asn Ser Tyr Met Arg
580 585 590

Lys Gln Ala Ser Gly Arg Ala Ile Lys Lys His Met Arg Asn Gly Gly
595 600 605

Thr Asn Ser Phe Asn Phe His Pro Ser Pro Arg Met Ile Pro His Val
610 615 620

Tyr Lys Pro Glu Val Gln His Val Glu Phe Ser Ile Lys Gln Phe Val
625 630 635 640

Pro Arg Gly Lys Lys Leu Gln Glu Glu Tyr Ala Thr Glu Thr Pro Ala
645 650 655

Phe Gln Lys Lys Leu Thr Pro Ala Glu Thr His Met Leu Ala Lys Tyr
660 665 670

Tyr Asn Asn Pro Asp Glu Glu Lys Leu Arg Val Ser Leu Ile Ala Phe
675 680 685

Pro His Phe Gln Thr Leu Pro Ser Lys Val His Lys Val Met His Ser
690 695 700

Arg Gln Thr Gly Met Leu Ile Asp Ala Met Gln His Leu Gln Glu Pro
705 710 715 720

Thr Phe Ser Glu Gln Ser Lys Ser Phe Phe Thr Glu Phe Arg Ala Pro
725 730 735

Leu Gly Glu Arg Glu Glu Leu Asp Thr Gly Leu Arg Val Thr Asn Asp
740 745 750

Pro Lys Asp Leu His Ser Val Arg Asp Leu Glu Val Asn Thr Ser Gln
755 760 765

Arg Lys Ala Lys Gln Val Glu Ser Pro Thr Ser Thr Leu Glu Thr Thr
770 775 780

Glu Lys Asp Tyr Glu Glu Ser Ser Pro Thr His Arg Tyr Leu Phe Ser
785 790 795 800

Ser Glu Cys Ala Ser Val Asp Thr Leu Gly Asn Val Phe Val Met Pro
805 810 815

Val Pro Leu Leu Phe Phe Pro Asn Val Leu Glu Ser Asp Asn Thr Pro
820 825 830

Leu Pro Lys Thr Glu Lys Gln His Ser Cys Arg Asn Thr Ser His Ile
835 840 845

Asp Leu Val Pro Val Asp Thr Ser Glu Lys His Arg Gln Asp Asn Ile

850 855 860

Ser Cys Lys Leu Lys Glu Arg Phe Ser Pro Asp Gly Ala Ser Glu Thr
865 870 875 880

Leu Glu Thr His Ser Leu Val Lys Arg Asn Ser Thr Arg Val Gly Glu
885 890 895

Asp Asp Val Ala Asn Ser Val Gly Glu Ile Val Leu Ser Ser Asp Glu
900 905 910

Asp Asp Cys Glu Gly Leu Glu Leu Ser Pro Arg Leu Thr Asn Phe Ile
915 920 925

Lys Ser Gly Ile Val Pro Glu Ser Pro Val Tyr Asp Gln Gly Glu Ala
930 935 940

Asn Arg Glu Glu Asp Leu Glu Phe Pro Gln Leu Ser Ser Pro Met Arg
945 950 955 960

Phe Ser Asn Glu Leu Ala Gly Glu Ser Ser Phe Pro Glu Arg Lys Val
965 970 975

Gln His Lys Cys Asn Asp Tyr Asn Ile Val Ser Thr Thr Thr Glu Leu
980 985 990

Arg Thr Pro Gln Lys Glu Val Gly Leu Ala Asn Gly Thr Glu Cys Leu
995 1000 1005

Ala Val Ser Pro Ile Pro Glu Asp Trp Arg Thr Pro Leu Ala Asn
1010 1015 1020

Leu Thr Asn Thr Asn Ser Ser Ala Arg Lys Asp Trp Arg Val Ser
1025 1030 1035

Ser Gly Glu Lys Leu Glu Thr Leu Arg Gln Pro Arg Lys Leu Lys
1040 1045 1050

Arg Leu Arg Arg Leu Gly Asp Cys Ser Ser Ala Val Lys Glu Asn
1055 1060 1065

Tyr Pro Gly Ile Thr Glu Ala Asp His Ile Arg Ser Arg Ser Arg
1070 1075 1080

Gly Lys Lys His Ile Arg Val Lys Trp Lys Ser Ala Glu Ser Trp
1085 1090 1095

Phe Thr Leu Ser Ser Val Ala Phe Ala Leu Val Thr Lys Lys Lys
1100 1105 1110

Lys Met Ile Met Asp Asp Asp Val Gln Val Phe Ile Asp Glu Glu
1115 1120 1125

Ala Glu Val Ser Ser Gly Ala Glu Met Ser Ala Asp Glu Asn Glu
1130 1135 1140

Asp Val Thr Gly Asp Ser Phe Glu Asp Ser Phe Ile Asp Asp Gly
1145 1150 1155

Thr Met Pro Thr Ala Asn Thr Gln Ala Glu Ser Gly Lys Val Asp
1160 1165 1170

Met Met Ala Val Tyr Arg Tyr Ile Gln Pro Lys Ile Ser Phe Phe
1175 1180 1185

Tyr Cys Glu Val Asn Glu Leu Ile Lys Asn His Lys Val Ser Phe
1190 1195 1200

His Arg Arg Ser Leu Leu Ser Gln Ser Pro Leu Pro Ala Arg Phe
1205 1210 1215

Arg Asp Leu Ala Ala Ser Ser Leu Ser Pro Tyr Ser Ala Gly Pro
1220 1225 1230

Leu Thr Arg Ile Asn Glu Ser Arg Ser Asp Ser Asp Lys Ser Leu
1235 1240 1245

Ser Ser Leu Arg Thr Pro Lys Thr Thr Asn Ser Glu Ser Asn Gln
1250 1255 1260

Asp Ala Met Met Ile Gly Asn Leu Ser Val Val Gln Ile Ser Ser
1265 1270 1275

Asp Ser Arg Lys Arg Lys Phe Ser Leu Cys Asn Ser Ala Asn Ala
1280 1285 1290

Pro Val Ile Asn Leu Glu Ser Lys Phe Ala Ala His Ala Gln Ala
1295 1300 1305

Thr Glu Lys Glu Ser His Glu Gly Val Arg Ser Asn Ala Gly Ala
1310 1315 1320

Leu Glu Tyr Asn Asp Asp Asp Asp Asp Ala Phe Phe Ala Thr Leu
1325 1330 1335

Asp Phe Asp Ala Met Glu Ala Gln Ala Thr Leu Leu Leu Ser Lys
1340 1345 1350

Gln Arg Ser Glu Ala Lys Glu Lys Glu Asp Ala Thr Val Ile Pro
1355 1360 1365

Asn Pro Gly Met Gln Arg Ser Asp Gly Met Glu Lys Asp Ala Pro
1370 1375 1380

Ser Phe Asp Leu Gly Leu Trp
1385 1390

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para aumentar la frecuencia de CO meióticos en una planta, caracterizado porque comprende la inhibición en dicha planta de una proteína denominada de aquí en adelante FIDG, teniendo dicha proteína al menos un 45 % de identidad de secuencia, o al menos un 60 % de similitud de secuencia, con la proteína AtFIDG de secuencia SEQ ID NO: 1, estando calculados dichos porcentajes con la ayuda del algoritmo Needle EMBOSS usando parámetros por defecto para el cálculo de identidad y la matriz BLOSUM62 para el cálculo de similitud, y que contiene un dominio AAA-ATPasa y un dominio VSP4, catalogados respectivamente con las referencias PFAM PF00004 y PF09336.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende además la inhibición en dicha planta de una proteína denominada de aquí en adelante FANCM, teniendo dicha proteína al menos un 30 % de identidad de secuencia, o al menos un 45 % de similitud de secuencia, con la proteína AtFANCM de secuencia SEQ ID NO: 2, y que contiene un dominio helicasa DEXDc y un dominio helicasa HELICc, catalogados respectivamente con los números de acceso cd00046 y cd00079.

3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la inhibición de la proteína FIDG, y dado el caso de la proteína FANCM, se obtiene por mutagénesis del gen que codifica dicha proteína o su promotor.

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la inhibición de la proteína FIDG, y dado el caso de la proteína FANCM, se obtiene mediante silenciamiento del gen que codifica dicha proteína que expresa en dicha planta un ARN interferente orientado a dicho gen.

5. Planta mutante caracterizada porque contiene una mutación en el gen *FIDG,* induciendo dicha mutación la inhibición de la proteína FIDG en dicha planta, no obteniéndose dicha planta exclusivamente por medio de un procedimiento esencialmente biológico.

6. Planta mutante según la reivindicación 5, caracterizada porque contiene además una mutación en el gen *FANCM,* induciendo dicha mutación la inhibición de la proteína FANCM en dicha planta.

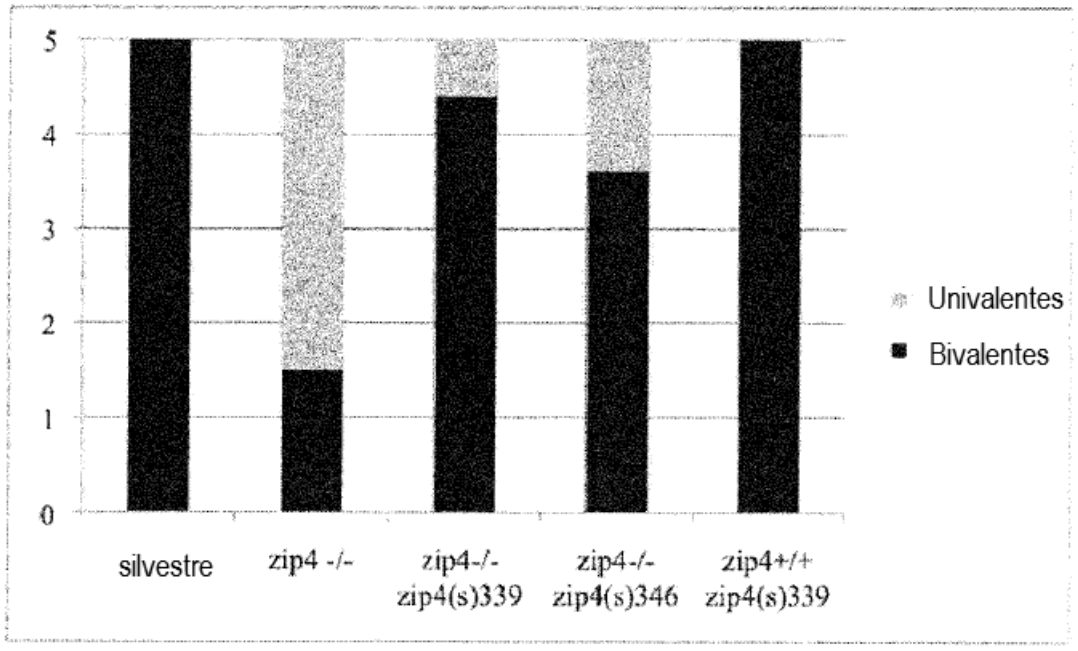

Figura 1

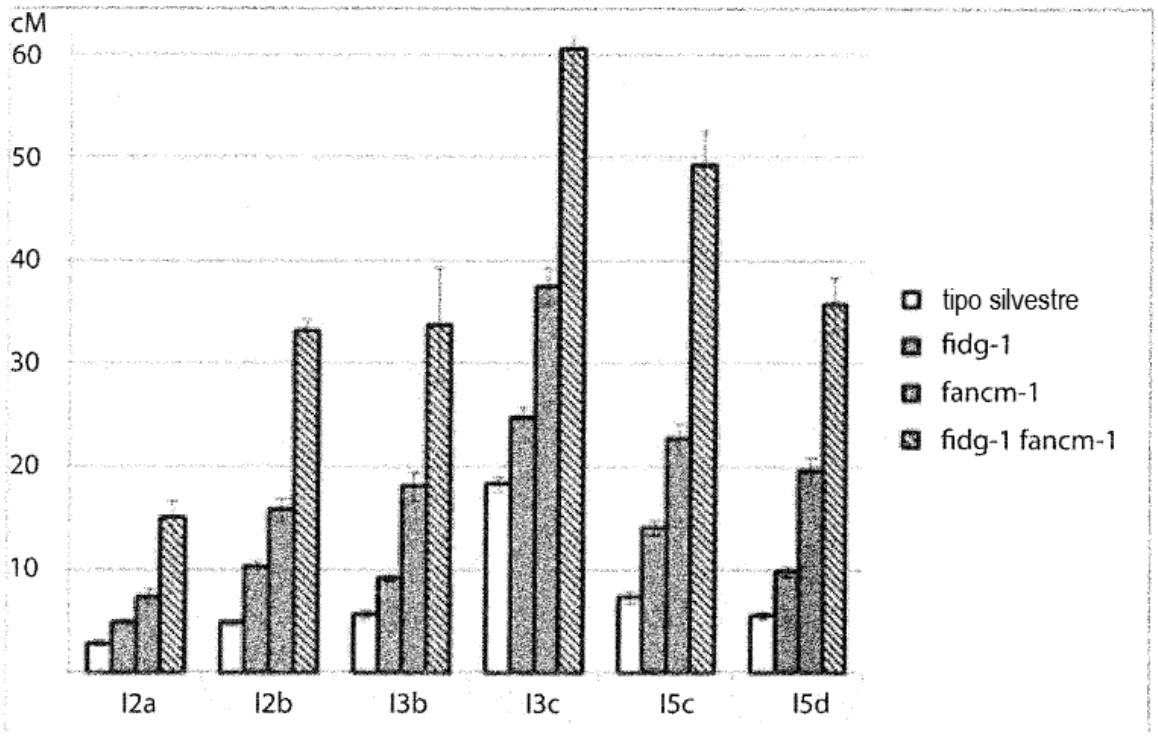

Figura 2