

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 638**

51 Int. Cl.:

A01H 1/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2008.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2012 PCT/US2012/036082**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12151254**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2012 E 12779705 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2704554**

54 Título: **Plantas con rasgos útiles y métodos relacionados**

30 Prioridad:

02.05.2011 US 201161481519 P
28.09.2011 US 201161540236 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2019

73 Titular/es:

**THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY
OF NEBRASKA (100.0%)
3835 Holdrege Street
Lincoln, NE 68583-0745, US**

72 Inventor/es:

**MACKENZIE, SALLY, ANN y
DE LA ROSA SANTAMARIA, ROBERTO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 731 638 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas con rasgos útiles y métodos relacionados

5 Antecedentes de la invención

El gen MSH1 representa un homólogo de MutS que ha experimentado al menos dos cambios importantes en la estructura génica dentro de plantas terrestres (Abdelnoor *et al.* 2003). MutS es un gen procarionta que participa en la reparación de apareamientos erróneos y la supresión de recombinación de homólogos. De manera consistente con un modelo de interacción proteína-ADN directa, MSH1 codifica para no solo los dominios de unión a ADN (dominio I) y ATPasa (dominio V), sino que ha experimentado fusión génica de manera prematura en su evolución para adquirir un dominio de tipo GIY-YIG carboxiterminal (dominio VI) (Abdelnoor *et al.* 2006). La proteína también ha adquirido los dominios II, III y IV, que aparecen bien conservados entre todas las plantas terrestres. Esta complejidad de estructura génica sugiere que MSH1 ha adquirido nuevas funciones en las plantas. Aunque numerosos homólogos de MutS están caracterizados en linajes eucariotas, no se ha encontrado ningún gen fuera de plantas terrestres que presente las características inusuales de MSH1.

Se ha estudiado la función MSH1 en *Arabidopsis* con mutantes nulos para MSH1 (inserción de ADN-T y EMS) (es decir mutantes *msh1*) y en otras especies vegetales mediante la supresión de ARNi de MSH1 (Sandhu *et al.* 2007; Xu *et al.* 2011). Lo que resultó de estos estudios es que las consecuencias fenotípicas de la supresión de ARNi son bastante similares entre especies, incluyendo la variegación de las hojas, la esterilidad masculina citoplasmática (CMS), un fenotipo de tasa de crecimiento reducida, un fenotipo de floración retardada o sin floración, y una susceptibilidad aumentada a patógenos. La exposición al calor (Shedge *et al.* 2010), un alto estrés por luz (Xu *et al.* 2011) y otras condiciones de estrés medioambiental (Hruz *et al.* 2008) dan como resultado niveles de transcrito de MSH1 reducidos notablemente.

Investigaciones de MSH1 iniciales sugirieron su influencia directa sobre la estabilidad del genoma mitocondrial de la planta. Los mutantes nulos para *msh1* en *Arabidopsis* muestran una actividad de recombinación aumentada a 47 repeticiones mitocondriales que, a lo largo de múltiples generaciones, crea una reorganización genómica significativa. Una consecuencia genómica de alteración de MSH1 es el proceso de desplazamiento subestequiométrico (SSS) (Arrieta-Montiel *et al.* 2009). La actividad SSS produce cambios drásticos en el número de copias relativas de partes del genoma mitocondrial, provocando la amplificación o supresión selectiva de genes que residen en los subgenomas afectados. Hay consecuencias fenotípicas para estos cambios genómicos; el proceso de SSS participa en la expresión de esterilidad masculina citoplasmática (Sandhu *et al.* 2007), así como su reversión espontánea a fertilidad en poblaciones naturales (Janska *et al.* 1998; Bellaoui *et al.* 1998; Davila *et al.* 2011; Mackenzie, 2011). De hecho, MSH1 puede haber desempeñado un papel en la evolución de ginodioecia como estrategia reproductiva en plantas (McCauley y Olson, 2008).

Antes de su clonación e identificación como homólogo de MutS, el gen MSH1 se denominó en primer lugar mutador de cloroplastos (CHM) por G. Redei, debido a que su mutación daba como resultado variegación y un crecimiento alterado que parecían derivar de la disfunción de cloroplastos (Redei 1973). De hecho, MSH1 codifica para una proteína seleccionada como diana de manera doble. Una proteína de transfusión génica MSH1-GFP se localiza en nucleoides tanto mitocondriales como de plástido (Xu *et al.* 2011). El nucleóide es un complejo de proteína-ARN-ADN denso, pequeño, que envuelve los genomas organulares. Sin embargo, a diferencia de la mitocondria en la que prevalece la recombinación, no se observa ninguna evidencia de recombinación mediada por repeticiones de cloroplastos potenciada en el mutante *msh1*. Es posible que la alteración de MSH1 afecte a las características de replicación del genoma de plástido.

En resumen, los efectos de la supresión de MSH1 que se han dado a conocer en las referencias mencionadas anteriormente están limitados a efectos sobre mitocondrias y plástidos vegetales.

Existe evidencia que respalda una relación entre la sensibilidad medioambiental y cambios epigenéticos tanto en plantas como en animales (Bonasio *et al.*, Science 330, 612, 2010). La heredabilidad transgeneracional de estos cambios sigue siendo objeto de investigación activa (Youngson *et al.* Annu. Rev. Genom. Human Genet. 9, 233, 2008). Estudios previos han mostrado que los patrones de metilación alterados son altamente hereditarios a lo largo de múltiples generaciones y pueden incorporarse en un análisis de variación cuantitativa (Vaughn *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2008; Johannes *et al.* 2009). Estudios tempranos de cambios de metilación en *Arabidopsis* sugieren la disposición del epigenoma a una selección recurrente y también sugieren que es factible establecer estados epigenéticos nuevos y estables (F. Johannes *et al.* PLoS Genet. 5, e1000530 (2009); F. Roux *et al.* Genetics 188, 1015 (2011). La manipulación de los mutantes *met1* y *ddmt* de *Arabidopsis* ha permitido la creación de poblaciones epi-RIL que muestran tanto heredabilidad de una formación de patrones de metilación novedosa como una segregación epialélica, enfatizando la probable influencia de la variación epigenómica en la adaptación de las plantas (F. Roux *et al.* Genetics 188, 1015 (2011)). En poblaciones naturales, una gran proporción de la variación epialélica detectada en *Arabidopsis* se encuentra como metilación de CpG dentro de regiones ricas en genes del genoma (C. Becker *et al.* Nature 480, 245 (2011), R.J. Schmitz *et al.* Science 334, 369 (2011).

Sumario de la invención

- En el presente documento se proporcionan métodos para producir una planta que presenta rasgos útiles, métodos para identificar uno o más loci cromosómicos alterados en una planta que pueden conferir un rasgo útil, métodos para obtener plantas que comprenden loci cromosómicos modificados que pueden conferir un rasgo útil, plantas que presentan los rasgos útiles, partes de esas plantas que incluyen células, hojas, tallos, flores y simientes, métodos de uso de las plantas y partes de plantas, y productos de esas plantas y partes de plantas, incluyendo productos procesados tales como un pienso o una comida.
- Se dan a conocer métodos para producir una planta que presenta un rasgo útil que comprende las etapas de: a). suprimir la expresión de un(os) gen(es) MSH1 en una primera planta o célula vegetal parental; b). cruzar la planta parental de la etapa (a), progenie de la planta parental de la etapa (a), una planta obtenida de la célula vegetal de la etapa (a), o progenie de una planta obtenida de la célula vegetal de la etapa (a) con una segunda planta en la que no se ha suprimido MSH1; c). examinar una población de plantas de progenie obtenidas del cruce de la etapa (b) para determinar al menos un rasgo útil, en la que una parte de la población de plantas de progenie expresa MSH1; y, d). Seleccionar una planta de progenie que comprende el rasgo que expresa MSH1, en la que el rasgo es hereditario y reversible. En ciertos métodos dados a conocer, el rasgo está asociado con uno o más loci cromosómicos alterados. En ciertos aspectos dados a conocer, tales loci cromosómicos alterados pueden comprender loci que están metilados. En ciertos aspectos dados a conocer, se proporcionan métodos para producir una planta que presenta un rasgo útil que comprende las etapas de: a). suprimir la expresión de un(os) gen(es) MSH1 en una primera planta o célula vegetal parental; b). cruzar la planta parental de la etapa (a), progenie de la planta parental de la etapa (a), una planta obtenida de la célula vegetal de la etapa (a), o progenie de una planta obtenida de la célula vegetal de la etapa (a) con una segunda planta en la que no se ha suprimido MSH1; c). examinar una población de plantas de progenie obtenidas del cruce de la etapa (b) para determinar al menos un rasgo útil, en la que una parte de la población de plantas de progenie expresan MSH1; y, d). Seleccionar una planta de progenie que comprende el rasgo que expresa MSH1, en la que el rasgo está asociado con uno o más loci cromosómicos mutados. En ciertos aspectos dados a conocer, los loci cromosómicos mutados comprenden inversiones, inserciones, deleciones, sustituciones o combinaciones de nucleótidos. En ciertos aspectos dados a conocer, los loci cromosómicos comprenden mutaciones que son reversibles. En ciertos aspectos dados a conocer, los loci cromosómicos comprenden mutaciones que son irreversibles. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquiera de los métodos anteriores, el método comprende además la etapa de producir simiente a partir de: i) una planta de progenie autofecundada de la etapa (d), ii) una planta de progenie cruzada de la etapa (d), o, iii) a partir de una planta de progenie autofecundada y cruzada de la etapa (d). En ciertos aspectos dados a conocer, los métodos pueden comprender además la etapa de someter a ensayo simiente o plantas que se hacen crecer a partir de la simiente para determinar la presencia del rasgo. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquiera de los métodos anteriores, la primera planta o célula vegetal parental comprende un transgén que puede suprimir la expresión de MSH1. En ciertos aspectos dados a conocer de los métodos, el transgén se selecciona del grupo de transgenes que suprimen la expresión de MSH1 produciendo un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un microARN (miARN), un ARN sentido cosupresor y/o un ARN antisentido. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquiera de los métodos anteriores, la primera planta o célula vegetal parental puede obtenerse cruzando una planta hembra con una planta macho distinta, comprendiendo al menos una de las plantas hembra o macho un transgén que suprime la expresión del gen endógeno MSH1 de la(s) planta(s) parental(es), y siendo las plantas líneas consanguíneas isogénicas antes de la introducción del transgén. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquiera de los métodos anteriores, la primera planta o célula vegetal parental era isogénica con respecto a la segunda planta parental antes de la supresión de MSH1 en la primera planta o célula vegetal parental. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquiera de los métodos anteriores, el rasgo se selecciona del grupo que consiste en rendimiento, esterilidad masculina, ausencia de floración, resistencia al estrés biótico y resistencia al estrés abiótico. En ciertos aspectos dados a conocer, el estrés abiótico puede seleccionarse del grupo que consiste en estrés por sequía, estrés osmótico, estrés por nitrógeno, estrés por fósforo, estrés por minerales, estrés por calor, estrés por frío y/o estrés por luz. En ciertos aspectos dados a conocer, la resistencia al estrés abiótico puede incluir tolerancia a la sequía, alta tolerancia a la luz, tolerancia al calor, tolerancia al frío y tolerancia a las sales. En ciertos aspectos dados a conocer de los métodos, el estrés biótico puede seleccionarse del grupo que consiste en patógenos fúngicos de plantas, patógenos bacterianos de plantas, patógenos virales de plantas, insectos, nematodos y herbívoros, y cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquiera de los métodos anteriores, el rasgo no está provocado por desplazamiento subestequiométrico (SSS) en mitocondrias de la planta de progenie. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquiera de los métodos anteriores, el rasgo es esterilidad masculina y no está provocado por desplazamiento subestequiométrico (SSS) en mitocondrias de la planta de progenie. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquiera de los métodos anteriores, la planta de progenie en la etapa (d) o progenie de la misma presentan una mejora en el rasgo en comparación con una planta que no se había sometido a supresión de la expresión de MSH1, sino que era isogénica de otro modo con respecto a la primera planta o célula vegetal parental, plantas parentales. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquiera de los métodos anteriores, la planta es una planta de cultivo. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquiera de los métodos anteriores, la planta de cultivo se selecciona del grupo que consiste en algodón, colza, trigo, cebada, lino, avena, centeno, hierba de césped, caña de azúcar, alfalfa, banana, brócoli, repollo, zanahoria, yuca, coliflor, apio, cítrico, una cucurbitácea, eucalipto, ajo, uva, cebolla, lechuga, guisante, cacahuete, pimiento, patata, álamo, pino, girasol, cártamo, soja, fresa, remolacha azucarera, batata, tabaco, yuca, coliflor, apio, cítrico, algodón, una cucurbitácea, eucalipto, ajo, uva,

- cebolla, lechuga, guisante, cacahuete, pimiento, patata, álamo, pino, girasol, cártamo, fresa, remolacha azucarera, batata, tabaco, yuca, coliflor, apio, cítrico, cucurbitáceas, eucalipto, ajo, uva, cebolla, lechuga, guisante, cacahuete, pimiento, álamo, pino, girasol, cártamo, soja, fresa, remolacha azucarera, tabaco, *Jatropha*, *Camelina* y *Agave*. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquiera de los métodos anteriores, la planta de cultivo se selecciona del grupo que consiste en maíz, soja, algodón, colza, trigo, arroz, tomate, tabaco, mijo y sorgo. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquiera de los métodos anteriores, el cultivo es sorgo. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquiera de los métodos anteriores, el cultivo es sorgo y el rasgo se selecciona del grupo que consiste en longitud de panícula, peso de panícula, biomasa seca, y combinaciones de los mismos.
- 5
- 10 En el presente documento se proporcionan plantas, partes de plantas que son simientes, que presentan rasgos útiles provocados por alteraciones y/o mutaciones en loci cromosómicos que resultan de la supresión de MSH1. En determinadas realizaciones, la simiente de planta, que presenta rasgos útiles provocados por alteraciones y/o mutaciones en loci cromosómicos que resultan de la supresión de MSH1 presenta una mejora en al menos un rasgo útil en comparación con una planta, partes de plantas que incluyen simientes, o productos de las plantas o simientes, que no se había sometido a supresión de la expresión de MSH1 sino que era isogénica de otro modo con respecto a la primera planta o célula vegetal parental. En determinadas realizaciones, tales plantas, simientes de la invención que presentan rasgos útiles provocados por alteraciones y/o mutaciones en loci cromosómicos que resultan de la supresión de MSH1 pueden comprender una o más alteraciones y/o mutaciones en uno o más loci cromosómicos que se indujeron mediante la supresión de MSH1. En determinadas realizaciones, se proporciona una planta o una planta de cultivo producida mediante cualquiera de los métodos anteriores, presentando la planta de cultivo una mejora en al menos un rasgo útil en comparación con una planta que no se había sometido a supresión de la expresión de MSH1 sino que era isogénica de otro modo con respecto a la primera planta o célula vegetal parental. En ciertos aspectos dados a conocer, cualquiera de las plantas o plantas de cultivo mencionadas anteriormente es consanguínea y presenta una mejora en al menos un rasgo útil en comparación con la planta parental o plantas parentales. También se proporciona en el presente documento simiente obtenida de cualquiera de las plantas o plantas de cultivo mencionadas anteriormente. También se dan a conocer en el presente documento productos procesados a partir de cualquiera de las plantas, plantas de cultivo o simientes mencionadas anteriormente, comprendiendo el producto una cantidad detectable de un ADN cromosómico, un ADN mitocondrial, un ADN de plástido, ADN de plástico y mitocondrial, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos dados a conocer, el producto puede comprender una cantidad detectable de un ADN cromosómico que comprende una o más alteraciones y/o mutaciones en uno o más loci cromosómicos que se indujeron mediante la supresión de MSH1. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquier de los productos procesados mencionados anteriormente, el producto puede ser aceite, comida, pelusa, cáscaras o una torta prensada.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35 También se dan a conocer en el presente documento métodos para producir simiente que comprenden recoger simiente de cualquiera de las plantas o plantas de cultivo mencionadas anteriormente de la invención. En ciertos aspectos dados a conocer, se proporcionan métodos para producir mucha simiente que comprenden las etapas de autofecundar una población de plantas o plantas de cultivo de la invención, hacer crecer las plantas autofecundadas y recoger la simiente de las mismas. En ciertos aspectos dados a conocer, la simiente recogida o una planta obtenida a partir de la misma presenta la mejora en al menos un rasgo útil.
- 40
- También se dan a conocer por la presente métodos de uso de cualquiera de las plantas o plantas de cultivo mencionadas anteriormente de la invención que comprenden cualquiera de los rasgos mejorados, comprendiendo los métodos hacer crecer, propagar o cultivar las plantas o plantas de cultivo de la invención que presentan el rasgo mejorado. También se proporcionan métodos de obtención de rendimientos mejorados que comprenden recoger cualquier parte de planta incluyendo una simiente de cualquiera de las plantas o plantas de cultivo mencionadas anteriormente de la invención. En ciertos aspectos dados a conocer, la simiente recogida o una planta obtenida a partir de la misma presenta la mejora en al menos un rasgo útil.
- 45
- 50 En ciertos aspectos dados a conocer, se proporcionan métodos para identificar uno o más loci cromosómicos alterados en una planta que pueden conferir un rasgo útil. En un aspecto dado a conocer, se proporcionan métodos que comprenden las etapas de: a. comparar una o más regiones cromosómicas en una planta de referencia que no presenta el rasgo útil con una o más regiones cromosómicas correspondientes en una planta de prueba que sí presenta el rasgo útil, expresando la planta de prueba MSH1 y obteniéndose a partir de una planta o célula vegetal parental en la que se había suprimido MSH1; y, b. seleccionar uno o más loci cromosómicos alterados presentes en la planta de prueba que están ausentes en la planta de referencia y que están asociados con el rasgo útil. En ciertos aspectos dados a conocer, un locus cromosómico alterado comprende un estado de metilación de ADN cromosómico, una modificación postraduccional de una proteína histona asociada con un locus cromosómico, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos dados a conocer, la selección comprende aislar una planta o planta de progenie que comprende el locus cromosómico alterado u obtener un ácido nucleico asociado con el locus cromosómico alterado. En ciertos aspectos dados a conocer, tanto la planta de referencia como la planta de prueba se obtienen de una población de plantas de progenie obtenidas de una planta o célula vegetal parental en la que se había suprimido MSH1. En ciertos aspectos dados a conocer, tanto la planta de referencia como la planta o célula vegetal parental eran isogénicas antes de la supresión de MSH1 en la planta o célula vegetal parental. En ciertos aspectos dados a conocer, el rasgo útil se selecciona del grupo que consiste en rendimiento, esterilidad masculina, ausencia de floración, resistencia al estrés biótico y resistencia al estrés abiótico. En ciertos aspectos
- 55
- 60
- 65

dados a conocer, el estrés abiótico puede seleccionarse del grupo que consiste en estrés por sequía, estrés osmótico, estrés por nitrógeno, estrés por fósforo, estrés por minerales, estrés por calor, estrés por frío y/o estrés por luz. En ciertos aspectos dados a conocer, la resistencia al estrés abiótico puede incluir tolerancia a la sequía, alta tolerancia a la luz, tolerancia al calor, tolerancia al frío y tolerancia a las sales. En ciertos aspectos dados a conocer de los métodos, la resistencia al estrés biótico puede seleccionarse del grupo que consiste en resistencia a patógenos fúngicos de plantas, resistencia a patógenos bacterianos de plantas, resistencia a patógenos virales de plantas, resistencia a insectos, resistencia a nematodos y resistencia a herbívoros, y cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos dados a conocer, el rasgo útil se selecciona del grupo que consiste en resistencia al encamado potenciada, tasa de crecimiento potenciada, biomasa potenciada, macollamiento potenciado, ramificación potenciada, tiempo de floración retardado y senescencia retardada. También se dan a conocer en el presente documento loci cromosómicos alterados identificados mediante cualquiera de los métodos anteriores. Tales loci cromosómicos alterados pueden comprender un estado de metilación de ADN cromosómico, una modificación postraduccional de una proteína histona asociada con un locus cromosómico, o cualquier combinación de los mismos.

También se dan a conocer en el presente documento plantas que comprenden cualquiera de los loci cromosómicos alterados identificados mediante cualquiera de los métodos anteriores.

También se dan a conocer en el presente documento métodos para producir una planta que presenta un rasgo útil. En ciertos aspectos dados a conocer, estos métodos pueden comprender las etapas de: a. introducir una modificación cromosómica asociada con un rasgo útil en una planta, comprendiendo la modificación cromosómica un locus cromosómico alterado inducido mediante la supresión de MSH1 asociada con el rasgo útil, un transgén que proporciona el mismo efecto genético que un locus cromosómico alterado inducido mediante la supresión de MSH1 asociada con el rasgo útil, o una mutación cromosómica que proporciona el mismo efecto genético que un locus cromosómico alterado inducido mediante la supresión de MSH1 asociada con el rasgo útil; y, b. seleccionar una planta que comprende la modificación cromosómica y presenta el rasgo útil. En ciertos aspectos dados a conocer, los métodos pueden comprender además la etapa de producir simiente a partir de: i) una planta de progenie autofecundada de la planta seleccionada de la etapa (b), ii) una planta de progenie cruzada de la planta seleccionada de la etapa (b), o, iii) a partir de una planta de progenie autofecundada y cruzada de la planta seleccionada de la etapa (b). En ciertos aspectos dados a conocer de los métodos, la modificación cromosómica puede comprender un locus cromosómico alterado y la planta se selecciona sometiendo a ensayo la presencia de un estado de metilación de ADN cromosómico, una modificación postraduccional de una proteína histona asociada con un locus cromosómico, o cualquier combinación de los mismos, que está asociado con el locus cromosómico alterado. En ciertos aspectos dados a conocer, la modificación cromosómica comprende el transgén o la mutación cromosómica y la planta se selecciona sometiendo a ensayo la presencia del transgén o la mutación cromosómica. En otros aspectos dados a conocer, la planta se selecciona sometiendo a ensayo la presencia del rasgo útil. En ciertos aspectos dados a conocer, la modificación cromosómica comprende un locus cromosómico alterado y el locus cromosómico alterado comprende un estado de metilación de ADN cromosómico, una modificación postraduccional de una proteína histona asociada con un locus cromosómico, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos dados a conocer, el locus cromosómico alterado tiene un efecto genético que comprende una reducción en la expresión de un gen y la modificación cromosómica comprende un transgén o una mutación cromosómica que proporciona una reducción en la expresión del gen. En ciertos aspectos dados a conocer, cuando el locus cromosómico alterado tiene un efecto genético que comprende una reducción en la expresión de un gen y la modificación cromosómica comprende un transgén, el transgén reduce la expresión del gen produciendo un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un microARN (miARN), un ARN sentido cosupresor y/o un ARN antisentido dirigido al gen. En ciertos aspectos dados a conocer, el locus cromosómico alterado tiene un efecto genético que comprende un aumento en la expresión de un gen y la modificación cromosómica comprende un transgén o una mutación cromosómica que proporciona un aumento en la expresión del gen. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquiera de los métodos anteriores, el rasgo útil se selecciona del grupo que consiste en rendimiento, esterilidad masculina, ausencia de floración, resistencia al estrés biótico y resistencia al estrés abiótico. En ciertos aspectos dados a conocer, el estrés abiótico puede seleccionarse del grupo que consiste en estrés por sequía, estrés osmótico, estrés por nitrógeno, estrés por fósforo, estrés por minerales, estrés por calor, estrés por frío y/o estrés por luz. En ciertos aspectos dados a conocer, la resistencia al estrés abiótico puede incluir tolerancia a la sequía, alta tolerancia a la luz, tolerancia al calor, tolerancia al frío y tolerancia a las sales. En ciertos aspectos dados a conocer de los métodos, el estrés biótico puede seleccionarse del grupo que consiste en patógenos fúngicos de plantas, patógenos bacterianos de plantas, patógenos virales de plantas, insectos, nematodos y herbívoros, y cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones de los métodos, el rasgo útil se selecciona del grupo que consiste en resistencia al encamado potenciada, tasa de crecimiento potenciada, biomasa potenciada, macollamiento potenciado, ramificación potenciada, tiempo de floración retardado y senescencia retardada. También se dan a conocer en el presente documento plantas preparadas mediante cualquiera de los métodos anteriores. Las plantas dentro del alcance de la invención son plantas que presentan un rasgo útil obtenidas mediante un método que comprende las etapas de

a. suprimir la expresión de un(os) gen(es) MSH1 en una primera planta o célula vegetal parental en las que se consigue dicha supresión: (I) transformando la planta o célula vegetal con un transgén que puede suprimir la expresión de MSH1; (II) introduciendo una mutación de pérdida de función en un gen MSH1 endógeno mediante: (i)

la recombinación de homólogos y sustitución de la secuencia MSH1 de tipo silvestre residente en el cromosoma con una secuencia de sustitución msh1 con la(s) mutación/mutaciones de pérdida de función; (ii) unión de extremos no homólogos y sustitución de la secuencia MSH1 de tipo silvestre residente en el cromosoma con una secuencia de sustitución msh1 con la(s) mutación/mutaciones de pérdida de función; (iii) una combinación de unión de extremos no homólogos y recombinación de homólogos y sustitución de la secuencia MSH1 de tipo silvestre residente en el cromosoma con una secuencia de sustitución msh1 con la(s) mutación/mutaciones de pérdida de función; o (iv) la introducción de una mutación en un gen MSH1 endógeno con una meganucleasa o nucleasa con dedos de cinc; (III) mutagénesis química seguida de examen de alto rendimiento para identificar plantas que comprenden mutaciones puntuales u otras mutaciones en un gen MSH1 endógeno; o (IV) la introducción de un ácido nucleico que proporciona supresión de MSH1 en la célula vegetal;

b. recuperar plantas de progenie de la planta o célula vegetal parental de la etapa (a) en la que está restaurada la función MSH1; y

c. seleccionar una línea de plantas de progenie que presenta uno o más rasgos útiles de las plantas de progenie recuperadas de la etapa (b), o un cruce de las mismas, siendo dichos rasgos hereditarios, reversibles y provocados por uno o más loci cromosómicos alterados en el núcleo de las células vegetales de progenie, habiendo experimentado dichos loci cromosómicos alterados un cambio epigenético, habiéndose inducido dichos loci cromosómicos alterados mediante la supresión de MSH1, y seleccionándose dichos rasgos del grupo que consiste en rendimiento, resistencia al estrés biótico y resistencia al estrés abiótico mejorados, en particular siendo dicho rasgo un rendimiento vegetal mejorado;

presentando dicha planta de la línea de plantas de progenie seleccionada una mejora en dicho rasgo en relación con una planta parental que no se había sometido a supresión de la expresión de MSH1 sino que era isogénica de otro modo con respecto a dicha primera planta o célula vegetal parental, y comprendiendo la planta los loci cromosómicos alterados asociados con el rasgo. En determinadas realizaciones, la planta es una planta de cultivo. En ciertos aspectos dados a conocer, la planta de cultivo se selecciona del grupo que consiste en algodón, colza, trigo, cebada, lino, avena, centeno, hierba de césped, caña de azúcar, alfalfa, banana, brócoli, repollo, zanahoria, yuca, coliflor, apio, cítrico, una cucurbitácea, eucalipto, ajo, uva, cebolla, lechuga, guisante, cacahuete, pimienta, patata, álamo, pino, girasol, cártamo, soja, fresa, remolacha azucarera, batata, tabaco, yuca, coliflor, apio, cítrico, algodón, una cucurbitácea, eucalipto, ajo, uva, cebolla, lechuga, guisante, cacahuete, pimienta, patata, álamo, pino, girasol, cártamo, fresa, remolacha azucarera, batata, tabaco, yuca, coliflor, apio, cítrico, cucurbitáceas, eucalipto, ajo, uva, cebolla, lechuga, guisante, cacahuete, pimienta, álamo, pino, girasol, cártamo, soja, fresa, remolacha azucarera, tabaco, *Jatropha*, *Camelina* y *Agave*. En determinadas realizaciones de la invención, la planta de cultivo se selecciona del grupo que consiste en maíz, soja, algodón, colza, trigo, arroz, tomate, tabaco, mijo y sorgo. En determinadas realizaciones de cualquiera de los métodos anteriores, el cultivo es sorgo. En determinadas realizaciones, el cultivo es sorgo.

También se dan a conocer en el presente documento plantas, partes de plantas, que incluyen, pero no se limitan a, simientes, hojas, tallos, raíces y flores, o productos de las plantas o partes de plantas que incluyen, pero no se limitan a, simientes, que comprende una modificación cromosómica asociada con un rasgo útil o una alteración cromosómica asociada con un rasgo útil. En ciertos aspectos dados a conocer, la parte de planta puede comprender una parte de planta no regenerable o porción no regenerable de una parte de planta. En ciertos aspectos dados a conocer, los productos pueden ser productos procesados que incluyen, pero no se limitan a, un pienso o una comida obtenido de una parte de planta. En determinadas realizaciones, la simiente de las plantas, o productos de las mismas que presentan rasgos útiles provocados por una modificación cromosómica, presenta una mejora en al menos un rasgo útil en comparación con una planta, partes de plantas que incluyen simientes, o productos de las plantas o simientes, que no comprenden la modificación cromosómica. En determinadas realizaciones, tales plantas, simientes o productos que presentan rasgos útiles, pueden comprender una modificación cromosómica que comprende un locus cromosómico alterado inducido mediante la supresión de MSH1 asociada con el rasgo útil, un transgén que proporciona el mismo efecto genético que un locus cromosómico alterado inducido mediante la supresión de MSH1 asociada con el rasgo útil, o una mutación cromosómica que proporciona el mismo efecto genético que un locus cromosómico alterado inducido mediante la supresión de MSH1 asociada con el rasgo útil. En ciertos aspectos dados a conocer, tales plantas, partes de plantas, simientes o productos que presentan rasgos útiles pueden comprender un locus cromosómico alterado que comprende un estado de metilación de ADN cromosómico, una modificación postraduccional de una proteína histona asociada con un locus cromosómico, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos dados a conocer, el locus cromosómico alterado que comprende un estado de metilación de ADN cromosómico puede comprender una porción diferenciadora del locus cromosómico alterado que no se encuentra en plantas, partes de plantas o productos de plantas que no se han sometido a supresión de MSH1. En ciertos aspectos dados a conocer, la porción diferenciadora del locus cromosómico alterado puede comprender una molécula de ADN metilada de al menos aproximadamente 25 nucleótidos, 50 nucleótidos, 100 nucleótidos, 200 nucleótidos, 500 nucleótidos o más. En ciertos aspectos dados a conocer, se proporciona una planta, célula vegetal o producto de planta producido mediante cualquiera de los métodos anteriores, presentando la planta una mejora en al menos un rasgo útil en comparación con una planta que no comprende la alteración cromosómica sino que era isogénica de otro modo con respecto a la primera planta o célula vegetal parental. En ciertos aspectos dados a conocer, cualquiera de las plantas mencionadas anteriormente

es consanguínea y presenta una mejora en al menos un rasgo útil en comparación con la planta parental o plantas parentales. También se proporciona en el presente documento simiente obtenida de cualquiera de las plantas, células vegetales o plantas de cultivo mencionadas anteriormente. También se dan a conocer en el presente documento productos procesados a partir de cualquiera de las plantas, plantas de cultivo o partes de plantas mencionadas anteriormente que incluyen, pero no se limitan a, simientes, comprendiendo el producto una cantidad detectable de un ADN cromosómico que comprende cualquiera de las modificaciones cromosómicas mencionadas anteriormente que incluyen, pero no se limitan a, un locus cromosómico alterado, un transgén que proporciona el mismo efecto genético que un locus cromosómico alterado inducido mediante la supresión de MSH1 asociada con el rasgo útil, o una mutación cromosómica que proporciona el mismo efecto genético que un locus cromosómico alterado inducido mediante la supresión de MSH1 asociada con el rasgo útil. En ciertos aspectos dados a conocer de cualquier de los productos procesados mencionados anteriormente, el producto puede ser aceite, comida, pelusa, cáscaras o una torta prensada.

También se dan a conocer en el presente documento métodos para producir simiente que comprenden recoger simiente de cualquiera de las plantas o plantas de cultivo mencionadas anteriormente de la invención. En ciertos aspectos dados a conocer, se proporcionan métodos para producir mucha simiente que comprende las etapas de autofecundar una población de plantas o plantas de cultivo de la invención, hacer crecer las plantas autofecundadas, y recoger la simiente de las mismas.

También se dan a conocer por la presente métodos de uso de cualquiera de las plantas o plantas de cultivo mencionadas anteriormente de la invención que comprenden cualquiera de los rasgos mejorados, comprendiendo los métodos hacer crecer, propagar o cultivar las plantas o plantas de cultivo de la invención que presentan el rasgo mejorado. También se proporcionan métodos de obtención de rendimientos mejorados que comprenden recoger cualquier parte de planta, incluyendo una simiente, de cualquiera de las plantas o plantas de cultivo mencionadas anteriormente de la invención.

También se proporciona en el presente documento el uso en cualquier proceso de cualquiera de las plantas, partes de plantas o porciones de las mismas que incluyen, pero no se limitan a, células vegetales, partes de plantas no regenerables o porciones de las mismas que incluyen, pero no se limitan a, células vegetales, o productos de plantas procesados. Los procesos para los que pueden usarse las plantas, partes de plantas o porciones de las mismas, partes de plantas no regenerables o porciones de las mismas, o productos de plantas procesados proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, el uso en cultivo, uso como biocombustible, uso como pienso animal, uso en productos alimenticios humanos y uso en cualquier proceso de fabricación industrial, de alimento o de pienso.

También se proporciona en el presente documento simiente que presenta el/los rasgo(s) útil(es) y plantas obtenidas a partir de la simiente que presentan la mejora en el/los rasgo(s) útil(es). En determinadas realizaciones, la simiente puede comprender un locus cromosómico alterado que está asociado con el/los rasgo(s) útil(es) o que confiere el/los rasgo(s) útil(es).

En ciertos aspectos dados a conocer, las plantas, partes de plantas, partes de plantas no regenerables, células vegetales, células vegetales no regenerables, productos de plantas o producto de planta procesado proporcionados en el presente documento pueden comprender una cantidad detectable de un ADN cromosómico que comprende un locus cromosómico alterado inducido mediante la supresión de MSH1 asociada con el rasgo útil, un transgén que proporciona el mismo efecto genético que un locus cromosómico alterado inducido mediante la supresión de MSH1 asociada con el rasgo útil, o una mutación cromosómica que proporciona el mismo efecto genético que un locus cromosómico alterado inducido mediante la supresión de MSH1 asociada con el rasgo útil. En ciertos aspectos dados a conocer, el locus cromosómico alterado que comprende un estado de metilación de ADN cromosómico puede comprender una porción diferenciadora del locus cromosómico alterado que no se encuentra en plantas, células vegetales, células vegetales no regenerables, partes de plantas, partes de plantas no regenerables, productos de plantas o productos de plantas procesados que no se han sometido a supresión de MSH1. En ciertos aspectos dados a conocer, la porción diferenciadora del locus cromosómico alterado puede comprender una molécula de ADN metilada de al menos aproximadamente 25 nucleótidos, 50 nucleótidos, 100 nucleótidos, 200 nucleótidos, 500 nucleótidos o más. Los productos procesados dados a conocer en el presente documento que comprenden el ADN cromosómico o porciones diferenciadoras del mismo incluyen, pero no se limitan a, productos que comprenden aceite, comida, pelusa, cáscaras o una torta prensada.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan a y forman parte de la memoria descriptiva, ilustran determinadas realizaciones de la presente invención. En los dibujos:

La Figura 1 ilustra diversos fenotipos que se observan en diversas plantas sometidas a supresión de MSH1 tal como esterilidad masculina citoplasmática, variegación y desarrollo de cloroplastos alterado, tasa de crecimiento reducida y enanismo, tiempo de floración alterado o ausencia de floración, biosíntesis de flavonoides reducida y ausencia de antocianinas, susceptibilidad a patógenos potenciada, morfologías de hoja alteradas y alta tolerancia a la luz.

La Figura 2 ilustra la variegación de las hojas en plantas de *Arabidopsis* (arriba), tomate (centro) y sorgo (panel inferior) que se habían sometido a supresión de MSH1.

5 La Figura 3 ilustra el enanismo en plantas de *Sorghum* (arriba) y tomate (panel inferior) que se habían sometido a supresión de MSH1.

La Figura 4 ilustra reorganizaciones de ADN mitocondrial en *Arabidopsis* que se habían sometido a supresión de MSH1.

10 La Figura 5 ilustra aumentos en especies de oxígeno reactivas (ROS) que se observan en plantas de tomate, tabaco y mijo sometidas a supresión de MSH1.

15 La Figura 6 ilustra un esquema a modo de ejemplo y no limitativo para obtener plantas que presentan diversos tipos de variación fenotípica hereditaria denominada en el presente documento "variación discreta" (V_D) como resultado de haberse sometido a supresión de MSH1 y para obtener líneas de plantas que pueden presentar "variación cuantitativa" o " V_Q " y diversos rasgos útiles.

20 La Figura 7 ilustra una línea de plantas de *Arabidopsis* (*msh1* x Col-0 F_3) que presenta aumentos de biomasa en relación con una planta parental isogénica de otro modo que no se había sometido a supresión de MSH1 (Col-0).

25 La Figura 8 ilustra la distribución de alturas de planta (en cm) que se obtienen en distintas líneas de sorgo GAIL-11 (cuadrados), GAIL-15 (triángulos), GAIL-22 (corchetes opuestos), GAIL-24 y GAIL-28 (círculos) derivadas de cruces de plantas en las que se suprimió la expresión de MSH1. La línea de referencia de tipo silvestre es fx WT (diamantes).

30 La Figura 9 ilustra la distribución de pesos de panícula (en gramos) que se obtienen en distintas líneas de sorgo GAIL-11 (cuadrados), GAIL-15 (triángulos), GAIL-22 (corchetes opuestos), GAIL-24 y GAIL-28 (círculos) derivadas de cruces de plantas en las que se suprimió la expresión de MSH1. La línea de referencia de tipo silvestre es fx WT (diamantes).

35 La Figura 10 ilustra la distribución de rendimiento de grano (en gramos) que se obtiene en distintas líneas de sorgo GAIL-11 (cuadrados), GAIL-15 (triángulos), GAIL-22 (corchetes opuestos), GAIL-24 y GAIL-28 (círculos) derivadas de cruces de plantas en las que se suprimió la expresión de MSH1. La línea de referencia de tipo silvestre es fx WT (diamantes).

40 La Figura 11 A-H ilustra el fenotipo de crecimiento potenciado de líneas MSH1-epi en *Arabidopsis* y sorgo. Se indican los procedimientos transgénicos y de cruce usados para derivar epi-poblaciones de sorgo y *Arabidopsis*. (A) El fenotipo de la progenie F_1 derivada de cruzar Tx430 x MSH1-dr. (B) Líneas de sorgo epiF2, F3 y F4 que se hacen crecer en campo muestran una variación en la arquitectura y altura de planta. (C) Panículas de Tx430 (a la izquierda, 66 g, tallo de 8 mm) frente a individuos epi-F2 (a la derecha, 112 g, tallo de 11 mm). (D) Rendimiento de simiente de las panículas mostradas en C. (E) El fenotipo de sorgo MSH1-dr en condiciones de campo. (F) Evidencia de crecimiento de roseta potenciado en una línea epi-F4 de *Arabidopsis*. (G) Plantas epi-F4 de *Arabidopsis* muestran biomasa de planta, diámetro de roseta y diámetro de tallo de flor potenciados en relación con Col-0. Datos mostrados como media \pm DE > 6 . (H) El fenotipo epiF4 de *Arabidopsis* en floración.

45 La Figura 12 ilustra una variación fenotípica potenciada en líneas MSH1-epiF2 de sorgo. Se muestran distribuciones fenotípicas para altura de planta y rendimiento de grano de tres poblaciones epiF2 de sorgo independientes que se han hecho crecer en dos plantaciones en campo. Se muestran medias de población mediante líneas verticales discontinuas.

50 Las Figuras 13 A, B ilustran una variación fenotípica en líneas MSH1-epiF2, F3 y F4 de sorgo. (A) Líneas MSH1-epiF4 seleccionadas para altura de planta y rendimiento de grano por panícula. Para altura de planta, se seleccionaron las líneas 4b-10, 10.3 y 3a.2 para altura de planta baja, todas las demás se seleccionaron para alta. Para el rendimiento de grano, se seleccionó la línea 15.2 para rendimiento bajo, todas las demás se seleccionaron para alto. (B) Gráficos de cajas que muestran la respuesta de población individual a la selección para cuatro poblaciones independientes. La línea discontinua horizontal representa la media para el tipo silvestre Tx430. En el caso de rendimiento de grano, la selección de F3 se llevó a cabo en invernadero.

55 La Figura 14 A-E ilustra que el crecimiento potenciado por MSH1-epi en *Arabidopsis* está asociado con efectos de cloroplastos. (A) Línea de hemicomplementación mitocondrial AOX-MSH1 x Col-0 F_1 ; (B) SSU-MSH1 x Col-0 F_2 complementada por plástido parece ser idéntico al tipo silvestre Col-0, (C) Diámetro de roseta y biomasa fresca de líneas F_2 derivadas de SSU-MSH1 en relación con Col-0; (D) AOX-MSH1 x Col-0 F_2 complementada por mitocondria que muestra un crecimiento potenciado; (E) Diámetro de roseta y biomasa fresca de líneas F_2 derivadas de AOX-MSH1 es significativamente mayor ($P < 0,05$) que Col-0. (F) Fenotipo de crecimiento potenciado en la generación F_4 de AOX-MSH1 x Col-0.

La Figura 15 A-C ilustra patrones de 5-metil-citosina por todo el genoma en líneas de tipo silvestre Col-0 y MSH1-epiF3 de *Arabidopsis*. (A) Contribuciones relativas de metilación de CG, CHG y CHH a la metilación diferencial y no diferencial del genoma. Obsérvese que la región intergénica está en la parte superior de la barra, seguido en orden por gen TE, pseudogenes, ARNnc, 3'-UTR, 5'-UTR, intrón y CDS. (B) Distribución de CG-DMP y CG-N-DMP a lo largo de cada cromosoma, con datos normalizados para el valor más alto para cada cromosoma en paralelo al procedimiento de análisis usado por Becker *et al.* Nature 480, 245 (2011). (C) Análisis de metilación de Col-0 tomado de la Figura 1c en Becker *et al.* (*Ibid*) para demostrar la similitud de patrones de NDMP y la disimilitud de DMP.

La Figura 16 ilustra plantas F1 de *Arabidopsis* que resultan de cruces de la línea de hemicomplementación de cloroplastos *msh1* x tipo silvestre Col-0. La hemicomplementación de cloroplastos mediada por transgenes de *msh1* restaura el fenotipo de tipo silvestre. Sin embargo, cruces de estas líneas hemicomplementadas con Col-0 da como resultado que aproximadamente el 25% de las plantas muestren rizadura de las hojas a intensidades variables en la F1. La causa de este fenotipo todavía no se conoce, pero ya no es visible en poblaciones F2 derivadas.

La Figura 17 ilustra la distribución del tiempo de floración en líneas Col-0, epiF4 y epiF5 de *Arabidopsis*. Cada distribución se dibuja en base a un mínimo de 50 plantas.

La Figura 18 A, B, C ilustra la validación de regiones metiladas de manera diferencial entre las líneas de *Arabidopsis* col-0 y *msh1-epif3* usando secuenciación por bisulfito. La alineación de la región DMR dentro de AT3G27150 (gen diana de MIR2111-5p). Se predice que las G destacadas (es decir subrayadas en la figura) están no metiladas en Col-0 y metiladas en MSH1-epiF3. Las secuencias de la figura 18A, B, y C se proporcionan en la lista de secuencias tal como sigue: AT3G27150 (SEQ ID NO:27), Col0-MIR2-2 (SEQ ID NO:28), Col0-MIR2-3 (SEQ ID NO:29), Col0-MIR2-4 (SEQ ID NO:30), Col0-MIR2-5 (SEQ ID NO:31), Col0-MIR2-6 (SEQ ID NO:32), Col0-MIR2-10 (SEQ ID NO:33), Col0-MIR2-11 (SEQ ID NO:34), Col0-MIR2-12 (SEQ ID NO:35), Col0-MIR2-26 (SEQ ID NO:36), Col0-MIR2-27 (SEQ ID NO:37), Col0-MIR2-28 (SEQ ID NO:38), Col0-MIR2-29 (SEQ ID NO:39), F3-Mir2-1 (SEQ ID NO:40), F3-Mir2-2 (SEQ ID NO:41), F3-Mir2-4 (SEQ ID NO:42), F3-Mir2-5 (SEQ ID NO:43), F3-Mir2-7 (SEQ ID NO:44), F3-Mir2-11 (SEQ ID NO:45), F3-Mir2-12 (SEQ ID NO:46), F3-Mir2-15 (SEQ ID NO:47), F3-Mir2-16 (SEQ ID NO:48), F3-Mir2-27 (SEQ ID NO:49) y F3-Mir2-28 (SEQ ID NO:50).

Descripción detallada

I. Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, la frase “modificación cromosómica” se refiere a cualquiera de: a) “loci cromosómicos alterados” y un “locus cromosómico alterado”; b) “loci cromosómicos mutados”, un “locus cromosómico mutado”, “mutaciones cromosómicas” y una “mutación cromosómica”; o c) un transgén.

Tal como se usa en el presente documento, las frases “loci cromosómicos alterados” (plural) o “locus cromosómico alterado” (singular) se refieren a porciones de un cromosoma que han experimentado un cambio epigenético hereditario y reversible en relación con los loci cromosómicos parentales correspondientes. Los cambios epigenéticos hereditarios y reversibles en loci cromosómicos alterados incluyen, pero no se limitan a, metilación de ADN cromosómico, y en particular, metilación de residuos de citosina para dar residuos de 5-metilcitosina, y/o modificación postraduccional de proteínas histona, y en particular, modificaciones de histona que incluyen, pero no se limitan a, acetilación, metilación, ubiquitinilación, fosforilación y sumoilación (unión covalente de proteínas modificadoras de tipo ubiquitina pequeñas). Tal como se usa en el presente documento, “loci cromosómicos” se refieren a loci en cromosomas ubicados en el núcleo de una célula.

Tal como se usa en el presente documento, el término “que comprenden” significa “que incluyen, pero no se limitan a”.

Tal como se usa en el presente documento, las frases “loci cromosómicos mutados” (plural) (plural), “locus cromosómico mutado” (singular), “mutaciones cromosómicas” y “mutación cromosómica” se refieren a porciones de un cromosoma que han experimentado un cambio genético hereditario en una secuencia de nucleótidos en relación con la secuencia de nucleótidos en los loci cromosómicos parentales correspondientes. Los loci cromosómicos mutados comprenden mutaciones que incluyen, pero no se limitan a, inversiones, inserciones, deleciones, sustituciones de secuencias de nucleótidos, o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, los loci cromosómicos mutados pueden comprender mutaciones que son reversibles. En este contexto, las mutaciones reversibles en el cromosoma pueden incluir, pero no se limitan a, inserciones de elementos transponibles, elementos transponibles defectuosos y ciertas inversiones. En determinadas realizaciones, los loci cromosómicos comprenden mutaciones que son irreversibles. En este contexto, las mutaciones irreversibles en el cromosoma pueden incluir, pero no se limitan a, deleciones.

Tal como se usa en el presente documento, el término “variación discreta” o “V_D” se refiere a una variación fenotípica hereditaria distinta, que incluye rasgos de esterilidad masculina, enanismo, variegación y/o tiempo de floración retardado que pueden observarse o bien en cualquier combinación o bien en aislamiento.

Tal como se usa en el presente documento, el término “MSH-dr” se refiere a cambios en macollamiento de la planta, altura, elongación internodal y densidad estomática que se observan en plantas sometidas a supresión de MSH1.

5 Tal como se usa en el presente documento, la frase “variación cuantitativa” o “V_Q” se refiere a la variación fenotípica que se observa en líneas de progenie individuales derivadas de cruces de plantas en las que se suprimió la expresión de MSH1 y que presentan variación discreta con respecto a otras plantas.

10 Tal como se usa en el presente documento, los términos “microRNA” o “miARN” se refieren tanto a un miARN que es sustancialmente similar a un miARN nativo que está en una planta como a un miARN artificial. En determinadas realizaciones, un transgén puede usarse para producir o bien un miARN que es sustancialmente similar a un miARN nativo que está en una planta o bien un miARN artificial.

15 Tal como se usa en el presente documento, la frase “obtener un ácido nucleico asociado con el locus cromosómico alterado” se refiere a cualquier método que proporciona la separación física o el enriquecimiento del ácido nucleico asociado con el locus cromosómico alterado de nucleico unido covalentemente que no se ha alterado. En este contexto, el ácido nucleico no comprende necesariamente la alteración (es decir tal como metilación) pero comprende al menos comprende uno o más de la base o bases nucleotídicas que se alteran. Por tanto, pueden obtenerse ácidos nucleicos asociados con un locus cromosómico alterado mediante métodos que incluyen, pero no están limitados a, clonación molecular, PCR o síntesis directa basada en datos de secuencia.

La frase “unido operativamente” tal como se usa en el presente documento se refiere a la unión de secuencias de ácido nucleico de modo que una secuencia puede proporcionar una función requerida a una secuencia unida. En el contexto de un promotor, “unido operativamente” significa que el promotor está conectado a una secuencia de interés de modo que la transcripción de esa secuencia de interés se controla y regula mediante ese promotor. Cuando la secuencia de interés codifica para una proteína y cuando se desea la expresión de esa proteína, “unido operativamente” significa que el promotor está unido a la secuencia de tal manera que el transcrito resultante se traducirá eficientemente. Si la unión del promotor a la secuencia codificante es una fusión transcripcional y se desea la expresión de la proteína codificada, la unión se hace de modo que el primer codón de iniciación traduccional en el transcrito resultante es el codón de iniciación de la secuencia codificante. Alternativamente, si la unión del promotor a la secuencia codificante es una fusión traduccional y se desea la expresión de la proteína codificada, la unión se hace de modo que el primer codón de iniciación traduccional contenido en la secuencia no traducida en 5' asociada con el promotor se une de modo que el producto de traducción resultante está en marco con el marco de lectura abierto traduccional que codifica para la proteína deseada. Las secuencias de ácido nucleico que pueden unirse operativamente incluyen, pero no se limitan a, secuencias que proporcionan funciones de expresión génica (es decir, elementos de expresión génica tales como promotores, regiones sin traducir en 5', intrones, regiones que codifican para proteínas, regiones sin traducir en 3', sitios de poliadenilación y/o terminadores transcripcionales), secuencias que proporcionan funciones de transferencia y/o integración de ADN (es decir, sitios de reconocimiento de recombinasa específico del sitio, sitios de reconocimiento de integrasa), secuencias que proporcionan funciones selectivas (es decir, marcadores de resistencia a antibióticos, genes biosintéticos), secuencias que proporcionan funciones de marcador puntuables (es decir, genes indicadores), secuencias que facilitan manipulaciones *in vitro* o *in vivo* de las secuencias (es decir, secuencias de poliligador, secuencias de recombinación específica del sitio, secuencias de recombinación de homólogos), y secuencias que proporcionan funciones de replicación (es decir, orígenes de replicación bacterianos, secuencias de replicación autónomas, secuencias centroméricas).

45 Tal como se usa en el presente documento, la frase “suprimir la expresión de un(os) gen(es) MSH1” se refiere a cualquier manipulación genética o ambiental que proporciona niveles disminuidos de actividad MSH1 funcional en una planta o célula vegetal en relación con los niveles de actividad MSH1 funcional que está en una planta o célula vegetal isogénica de otro modo que no se había sometido a esta manipulación genética o ambiental.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “transgén”, en el contexto de una modificación cromosómica, se refiere a cualquier ADN de una fuente heteróloga que se ha integrado en un cromosoma que se mantiene de manera estable en una célula huésped. En este contexto, las fuentes heterólogas para el ADN incluyen, pero no se limitan a, ADN de un organismo distinto del organismo de célula huésped, especies distintas de las especies de célula huésped, variedades de la misma especie que son o bien variedades distintas o bien variedades idénticas, ADN que se ha sometido a cualquier modificación *in vitro*, ADN recombinante, y cualquier combinación de los mismos.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “no regenerable” se refiere a una parte de planta o célula vegetal que no puede dar lugar a una planta completa.

II. Descripción general

65 Métodos para introducir variación hereditaria y epigenética y/o genética que dan como resultado plantas que presentan rasgos útiles se proporcionan por la presente junto con plantas, semillas de plantas, partes de plantas, células vegetales y productos de plantas procesados que pueden obtenerse mediante estos métodos. En ciertos

aspectos dados a conocer, los métodos proporcionados por la presente pueden usarse para introducir variación epigenética y/o genética en plantas varietales o no híbridadas que dan como resultado rasgos útiles así como plantas, partes de plantas útiles que incluyen, pero no se limitan a, simientes, células vegetales y productos de plantas procesados que presentan, portan o reflejan de otro modo beneficios conferidos por los rasgos útiles. En otros aspectos, los métodos proporcionados por la presente pueden usarse para introducir variación epigenética y/o genética en plantas que también son susceptibles de hibridación.

En la mayoría de las realizaciones, los métodos para obtener plantas proporcionadas por la presente implican suprimir la expresión del gen MSH1 de la planta, restaurar la expresión de un gen MSH1 de la planta funcional, y seleccionar plantas de progenie que presentan uno o más rasgos útiles. En determinadas realizaciones, estos rasgos útiles están asociados con cualquiera de uno o más loci cromosómicos alterados que han experimentado un cambio epigenético hereditario y reversible, con uno o más loci cromosómicos mutados que han experimentado un cambio genético hereditario, o combinaciones de los mismos.

III. Supresión de la expresión de MSH1 en plantas o células vegetales.

En general, los métodos para obtener plantas proporcionadas por la presente para introducir plantas de variación epigenética y/o genética requieren simplemente que la expresión de MSH1 se suprima durante un tiempo suficiente para introducir la variación. Como tal, una amplia variedad de métodos de supresión de MSH1 pueden emplearse para poner en práctica los métodos proporcionados por la presente y los métodos no están limitados a una técnica de supresión particular.

Dado que tanto el gen MSH1 como los efectos de la depleción del gen MSH1 parecen estar altamente conservados en plantas, se anticipa adicionalmente que los métodos proporcionados en el presente documento pueden aplicarse a una variedad de diferentes plantas o células vegetales. Por la presente se proporcionan secuencias de genes MSH1 o fragmentos de los mismos de *Arabidopsis*, soja, *Zea mays*, *Sorghum*, arroz, *Brachipodium*, *Vitis vinifera*, algodón y pepino. En determinadas realizaciones, tales genes pueden usarse directamente en o bien la especie vegetal homóloga o bien una especie vegetal heteróloga para proporcionar la supresión del gen endógeno MSH1 en la especie vegetal o bien homóloga o bien heteróloga. Una demostrado a modo de ejemplo, no limitativa, en la que un gen MSH1 de una especie mostró ser eficaz en la supresión del gen endógeno MSH1 en una especie tanto homóloga como heteróloga se proporciona por Sandhu *et al.* 2007, donde un transgén que proporciona un ARN inhibidor de MSH1 (ARNi) con secuencias MSH1 de tomate mostró que inhibía los genes MSH1 endógenos tanto de tomate como de tabaco. Un transgén que proporciona un ARN inhibidor de MSH1 (ARNi) con secuencias MSH1 de maíz puede inhibir los genes MSH1 endógenos de mijo, sorgo y maíz. Los genes MSH1 de otras plantas que incluyen, pero no se limitan a, algodón, colza, trigo, cebada, lino, avena, centeno, hierba de césped, caña de azúcar, alfalfa, banana, brócoli, repollo, zanahoria, yuca, coliflor, apio, cítrico, una cucurbitácea, eucalipto, ajo, uva, cebolla, lechuga, guisante, cacahuete, pimiento, patata, álamo, pino, girasol, cártamo, soja, fresa, remolacha azucarera, batata, tabaco, yuca, coliflor, apio, cítrico, algodón, una cucurbitácea, eucalipto, ajo, uva, cebolla, lechuga, guisante, cacahuete, pimiento, patata, álamo, pino, girasol, cártamo, fresa, remolacha azucarera, batata, tabaco, yuca, coliflor, apio, cítrico, cucurbitáceas, eucalipto, ajo, uva, cebolla, lechuga, guisante, cacahuete, pimiento, álamo, pino, girasol, cártamo, soja, fresa, remolacha azucarera, tabaco, *Jatropha*, *Camelina* y *Agave* pueden obtenerse mediante una variedad de técnicas y usarse para suprimir la expresión de cualquier gen MSH1 correspondiente en esas plantas o el gen MSH1 en una planta distinta. Los métodos para obtener genes MSH1 para diversas plantas incluyen, pero no se limitan a, técnicas tales como: i) buscar bases de datos de secuencias de aminoácidos y/o nucleótidos que comprenden secuencias de la especie vegetal para identificar el gen MSH1 mediante comparaciones de identidad de secuencias; ii) clonar el gen MSH1 mediante o bien PCR de secuencias genómicas o bien RT-PCR de ARN expresado; iii) clonar el gen MSH1 de una biblioteca genómica o de ADNc usando técnicas a base de PCR y/o hibridación; iv) clonar el gen MSH1 de una biblioteca de expresión, usando un anticuerpo dirigido a la proteína MSH1 para identificar el clon que contiene MSH1; v) clonar el gen MSH1 mediante la complementación de una planta deficiente en MSH1 o mutante *msh1* o; o vi) cualquier combinación de (i), (ii), (iii), (iv) y/o (v). La recuperación del gen MSH1 de la planta puede determinarse o confirmarse fácilmente construyendo una vector de transformación de planta que proporciona la supresión del gen, transformando las plantas con el vector, y determinando si las plantas transformadas con el vector presentan las respuestas características que se observan normalmente en diversas especies vegetales cuando se suprime la expresión de MSH1, que incluyen variegación de las hojas, esterilidad masculina citoplasmática (CMS), un fenotipo de tasa de crecimiento reducida, fenotipo de floración retardada o sin floración, y susceptibilidad aumentada a patógenos.

En ciertos aspectos, los genes MSH1 o fragmentos de los mismos usados en los métodos proporcionados en el presente documento tendrán secuencias de nucleótidos con al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencias de nucleótidos con uno o más de los genes MSH1 o fragmentos de los mismos proporcionados en el presente documento que incluyen, pero no se limitan a, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3-10 y SEQ ID NO:14. En ciertos aspectos dados a conocer, los genes MSH1 o fragmentos de los mismos usados en los métodos proporcionados en el presente documento codifican para proteínas MSH1 o porciones de las mismas tendrán secuencias de aminoácidos con al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencias de aminoácidos con una o más de las proteínas MSH1 proporcionadas en el presente documento que incluyen, pero no se limitan a, SEQ ID NO:2, y las proteínas MSH1 codificadas por SEQ ID NO: 3-

10. En ciertos aspectos dados a conocer, los genes MSH1 o fragmentos de los mismos usados en los métodos proporcionados en el presente documento tendrán secuencias de nucleótidos con al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencias de nucleótidos con uno o más de los genes MSH1 fragmentos de los mismos, ortólogos de los mismos u homólogos de los mismos, proporcionados en el presente documento que incluyen, pero no se limitan a, SEQ ID NO:51 y SEQ ID NO:52. En determinadas realizaciones, los genes MSH1 o fragmentos de los mismos usados en los métodos proporcionados en el presente documento que codifican para proteínas MSH1 o porciones de las mismas tendrán secuencias de aminoácidos con al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencias de aminoácidos con una o más de las proteínas MSH1 u homólogos de MSH1 proporcionados en el presente documento que incluyen, pero no se limitan a, las proteínas codificadas por SEQ ID NO:51 y SEQ ID NO:52. Los genes MSH1 de plantas distintas de las proporcionadas en el presente documento también pueden identificarse mediante los dominios de unión a ADN (dominio I), ATPasa (dominio V) y endonucleasa de tipo GIY-YIG carboxiterminal (dominio VI) codificados que caracterizan muchos genes MSH1 (Abdelnoor *et al.* 2006). A este respecto, se anticipa que fragmentos de ácido nucleico de MSH1 de 18 a 20 nucleótidos, peor más preferiblemente 21 nucleótidos o más, pueden usarse para efectuar la supresión del gen MSH1 endógeno. En ciertos aspectos dados a conocer, pueden usarse fragmentos de ácido nucleico de MSH1 de desde al menos 18, 19, 20 o 21 nucleótidos hasta aproximadamente 50, 100, 200, 500 o más nucleótidos para efectuar la supresión del gen MSH1 endógeno.

En determinadas realizaciones, la supresión de MSH1 en una planta se efectúa con un transgén. Los transgenes que pueden usarse para suprimir la expresión de MSH1 incluyen, pero no se limitan a, transgenes que producen mutantes negativos dominantes de MSH1, un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un microARN (miARN), un ARN sentido cosupresor y/o un ARN antisentido que proporcionan inhibición del gen MSH1 endógeno. Las patentes estadounidenses que describen la supresión de genes vegetales endógenos mediante transgenes incluyen US 7.109.393, US 5.231.020 y US 5.283.184 (métodos de cosupresión); y US 5.107.065 y US 5.759.829 (métodos antisentido). En ciertos aspectos dados a conocer, pueden usarse transgenes diseñados específicamente para producir moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) con homología con el gen MSH1 para reducir la expresión del gen MSH1 endógeno. En tales aspectos dados a conocer, las secuencias de hebra sentido del ARNbc pueden separarse de las secuencias antisentido mediante una secuencia espaciadora, preferiblemente una que promueve la formación de una molécula de ARNbc (ARN bicatenario). Ejemplos de tales secuencias espaciadoras incluyen, pero no se limitan a, aquellas expuestas en Wesley *et al.*, Plant J., 27(6):581-90 (2001), y Hamilton *et al.*, Plant J., 15:737-746 (1998). Un vector a modo de ejemplo y no limitativo que ha mostrado que proporciona la supresión de MSH1 en tabaco y tomate se ha descrito por Sandhu *et al.*, 2007, en el que una secuencia de intrón separa las hebras sentido y antisentido de la secuencia MSH1.

En ciertos aspectos dados a conocer, los transgenes que proporcionan la supresión de MSH1 pueden comprender promotores regulados que proporcionan o bien la inducción o bien la regulación por disminución de secuencias inhibitoras de MSH1 unidas operativamente. En este contexto, las secuencias inhibitoras de MSH1 pueden incluir, pero no se limitan a, mutantes negativos dominantes de MSH1, un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un microARN (miARN), un ARN sentido cosupresor y/o un ARN antisentido que proporcionan inhibición del gen endógeno MSH1 de una planta. Tales promotores pueden proporcionar la supresión de MSH1 durante periodos de tiempo controlados o bien proporcionando o bien reteniendo el inductor o regulación por disminución. Los promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, un promotor PR-1a (publicación de solicitud de patente estadounidense número 20020062502) o un promotor GST II (documento WO 1990/008826 A1). En otros aspectos dados a conocer, se proporcionan tanto un factor de transcripción que puede inducirse o reprimirse así como un promotor reconocido por ese factor de transcripción y unido operativamente a las secuencias inhibitoras de MSH1. Tales sistemas de factor de transcripción/promotor incluyen, pero no se limitan a: i) factores de transcripción de receptor de ecdisoma de dominio ácido RF2a/promotores semejantes que pueden inducirse mediante metoxifenoza, tebufenoza y otros compuestos (publicación de solicitud de patente estadounidense número 20070298499); ii) factores de transcripción de represor de tetraciclina quiméricos/promotores quiméricos semejantes que pueden reprimirse o desreprimirse con tetraciclina (Gatz, C., *et al.* (1992). Plant J. 2, 397-404), y similares.

En todavía otros aspectos dados a conocer, se proporcionan plantas transgénicas en las que el transgén que proporciona la supresión de MSH1 está flanqueado por secuencias que proporcionan la eliminación para el transgén. Tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias de elementos transponibles sobre las que se actúa mediante una transposasa semejante. Los ejemplos no limitativos de tales sistemas que se han usado en plantas transgénicas incluyen los sistemas cre-lox y FLP-FRT.

La supresión de MSH1 puede identificarse o monitorizarse fácilmente mediante técnicas moleculares. En ciertos aspectos dados a conocer, en los que el MSH1 endógeno está intacto, pero su expresión está inhibida, pueden monitorizarse la producción o acumulación del ARN que codifica para MSH1. Los métodos moleculares para monitorizar los niveles de expresión de ARN de MSH1 incluyen, pero no se limitan a, el uso de técnicas de reacción en cadena de la transcriptasa inversa semicuantitativas o cuantitativas (qRT-PCR). El uso de técnica de PCR semicuantitativas para monitorizar la supresión de MSH1 que resulta de la supresión mediada por ARNi de MSH1 se ha descrito (Sandhu *et al.* 2007). Pueden usarse diversos procedimientos de RT-PCR cuantitativos que incluyen, pero no se limitan a, reacciones TaqMan.TM. (Applied Biosystems, Foster City, Calif. EE. UU.), el uso de sondas Scorpion.TM. o Molecular Beacon.TM., o cualquiera de los métodos dados a conocer en Bustin, S. A. (Journal of

Molecular Endocrinology (2002) 29, 23-39). También es posible usar otras técnicas de cuantificación de ARN tales como amplificación a base de secuencias de ácido nucleico cuantitativa (Q-NASBA.TM.) o la tecnología Invader.TM. (Third Wave Technologies, Madison, Wis.).

5 En determinadas realizaciones en la que la supresión de MSH1 se consigue mediante el uso de una mutación en el gen endógeno MSH1 de una planta, la presencia o ausencia de esta mutación en el ADN genómico puede determinarse fácilmente mediante una variedad de técnicas. También pueden usarse ciertas técnicas que proporcionan la identificación de la mutación en un estado hemicigótico (es decir en el que un cromosoma porta el gen *msh1* mutado y el otro cromosoma porta el gen MSH1 de tipo silvestre). Las mutaciones en secuencias de ADN
10 de MSH1 que incluyen inserciones, deleciones, sustituciones de nucleótidos, y combinaciones de las mismas pueden detectarse mediante una variedad de métodos eficaces que incluyen, pero no se limitan a, los dados a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 5.468.613, 5.217.863; 5.210.015; 5.876.930; 6.030.787; 6.004.744; 6.013.431; 5.595.890; 5.762.876; 5.945.283; 5.468.613; 6.090.558; 5.800.944; 5.616.464; 7.312.039; 7.238.476; 7.297.485; 7.282.355; 7.270.981 y 7.250.252. Por ejemplo, pueden detectarse mutaciones mediante hibridación con sondas de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO) tal como se da a conocer en las patentes estadounidenses 5.468.613 y 5.217.863. La patente estadounidense 5.210.015 da a conocer la detección de oligonucleótidos apareados, en la que un nucleótido marcado en 5' que no está apareado se libera mediante la actividad exonucleasa 5'-3'. La patente estadounidense 6.004.744 da a conocer la detección de la presencia o ausencia de mutaciones en ADN a través de una reacción de extensión de cebador de ADN. La patente estadounidense 5.468.613 da a conocer
20 hibridaciones de oligonucleótidos específicos de alelo en las que pueden detectarse variaciones de nucleótidos simples o múltiples en la secuencia de ácido nucleico mediante un proceso en el que la secuencia que contiene la variación de nucleótido se amplifica, se fija a un soporte y se expone a una sonda de oligonucleótidos específicos de secuencia marcada. También pueden detectarse mutaciones mediante métodos de ligado de sondas tal como se da a conocer en la patente estadounidense 5.800.944, en la que la secuencia de interés se amplifica y se hibrida con sondas seguidas de ligación para detectar una parte marcada de la sonda. Las patentes estadounidenses 6.613.509 y 6.503.710, y referencias que se encuentran en las mismas proporcionan métodos para identificar mutaciones con espectroscopía de masas. Estos diversos métodos de identificación de mutaciones pretenden ser a modo de ejemplo en vez de limitativos ya que los métodos dados a conocer en la presente invención pueden usarse junto con cualquier método de tipificación de polimorfismos para identificar la presencia o ausencia de mutaciones en un gen
25 MSH1 en muestras de ADN genómico. Además, las muestras de ADN genómico usadas pueden incluir, pero no se limitan a, ADN genómico aislado directamente de una planta, ADN genómico clonado o ADN genómico amplificado.

Pueden obtenerse mutaciones en genes vegetales endógenos MSH1 de una variedad de fuentes y mediante una variedad de técnicas. Una secuencia de sustitución homóloga que contiene una o más mutaciones de pérdida de función en el gen MSH1 y secuencias homólogas en ambos extremos de la rotura bicatenaria pueden proporcionar la recombinación de homólogos y la sustitución de la secuencia MSH1 de tipo silvestre residente en el cromosoma con una secuencia de sustitución *msh1* con la(s) mutación/mutaciones de pérdida de función. Tales mutaciones de pérdida de función incluyen, pero no se limitan a, inserciones, deleciones y sustituciones de secuencias dentro de un gen MSH1 que dan como resultado o bien una pérdida completa de la función MSH1 o bien una pérdida de la
40 función MSH1 suficiente para provocar alteraciones (es decir cambios epigenéticos hereditarios y reversibles) en otros loci cromosómicos o mutaciones en otros loci cromosómicos. Las mutaciones de pérdida de función en MSH1 incluyen, pero no se limitan a, mutaciones de desplazamiento de marco, inserciones de codones de parada traducionales prematuros, deleciones de uno o más dominios funcionales que incluyen, pero no se limitan a, un dominio de unión a ADN (dominio I), uno de ATPasa (dominio V) y/o un dominio de endonucleasa de tipo GIY-YIG carboxiterminal, y similares. También se proporcionan en el presente documento mutaciones análogas a la mutación *msh1* de *Arabidopsis* que producen mediante ingeniería genética en el gen de planta MSH1 endógeno para obtener efectos similares. Se han notificado métodos para sustituir secuencias cromosómicas endógenas mediante la reparación de roturas bicatenarias homólogas en tabaco y maíz (Wright *et al.*, Plant J. 44, 693, 2005; D'Halluin, *et al.*, Plant Biotech. J. 6:93, 2008). También puede introducirse una secuencia *msh1* de sustitución de homólogos (es decir que proporciona una mutación de pérdida de función en una secuencia MSH1) en un sitio de escisión de nucleasa seleccionado como diana mediante la unión de extremos no homólogos o una combinación de unión de extremos no homólogos y recombinación de homólogos (revisado en Puchta, J. Exp. Bot. 56, 1, 2005; Wright *et al.*, Plant J. 44, 693, 2005). En determinadas realizaciones, puede introducirse al menos una rotura bicatenaria específica del sitio en el gen endógeno MSH1 mediante una meganucleasa. La modificación genética de meganucleasas puede proporcionar meganucleasas que se cortan dentro de una secuencia de reconocimiento que coincide exactamente o está relacionada estrechamente con la secuencia diana MSH1 endógena específica (documentos WO/06097853A1, WO/06097784A1, WO/04067736A2, U.S. 20070117128A1). Por tanto, se anticipa que puede seleccionarse o diseñarse una nucleasa que se cortará dentro de una secuencia MSH1 diana. En otros aspectos dados a conocer, puede introducirse al menos una rotura bicatenaria específica del sitio en la secuencia
50 diana MSH1 endógena con una nucleasa con dedos de cinc. También se ha dado a conocer el uso de nucleasa con dedos de cinc modificada por ingeniería genética para proporcionar la recombinación de homólogos en plantas (documentos WO 03/080809, WO 05/014791, WO 07014275, WO 08/021207). En todavía otros aspectos dados a conocer, pueden identificarse mutaciones en genes MSH1 endógenos a través del uso de la tecnología TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) tal como se describe por Henikoff *et al.* en el que la mutagénesis química tradicional irá seguida de examen de alto rendimiento para identificar plantas que comprenden mutaciones puntuales u otras mutaciones en el gen endógeno MSH1 (Henikoff *et al.*, Plant Physiol. 2004, 135:630-636).

En ciertos aspectos dados a conocer, la supresión de MSH1 puede efectuarse exponiendo plantas completas, o estructuras reproductivas de plantas, a condiciones de estrés que dan como resultado la supresión del gen MSH1 endógeno. Tales condiciones de estrés incluyen, pero no se limitan a, estrés por luz alta y estrés por calor. Las condiciones de estrés por luz alta a modo de ejemplo y no limitativas incluyen la exposición continua a de aproximadamente 300 a aproximadamente 1200 μmol de fotones/ $\text{m}^2\cdot\text{s}$ durante de aproximadamente 24 a aproximadamente 120 horas. Las condiciones de estrés por calor a modo de ejemplo y no limitativas incluyen la exposición continua a temperaturas de aproximadamente 32°C a aproximadamente 37°C durante de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 24 horas. También se dan a conocer condiciones de estrés por calor, luz y ambientales de otro tipo a modo de ejemplo y no limitativas que también pueden proporcionar la supresión de MSH1, para calor (Shedge *et al.* 2010), estrés por luz alta (Xu *et al.* 2011) y otras condiciones de estrés ambientales (Hruz *et al.* 2008).

En el presente documento también se proporcionan métodos en los que la supresión de MSH1 se efectúa en células vegetales cultivadas. En ciertos aspectos dados a conocer, la supresión de MSH1 puede efectuarse cultivando células vegetales en condiciones de estrés que dan como resultado la supresión del gen MSH1 endógeno. Tales condiciones de estrés incluyen, pero no se limitan a, estrés por luz alta. Las condiciones de estrés por luz alta a modo de ejemplo y no limitativas incluyen la exposición continua a de aproximadamente 300 a aproximadamente 1200 μmol de fotones/ $\text{m}^2\cdot\text{s}$ durante de aproximadamente 24 a aproximadamente 120 horas. Las condiciones de estrés por calor a modo de ejemplo y no limitativas incluyen la exposición continua a temperaturas de aproximadamente 32°C a aproximadamente 37°C durante de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 24 horas. También se dan a conocer condiciones de estrés por calor, luz y otras condiciones de estrés ambientales a modo de ejemplo y no limitativas que también pueden proporcionar la supresión de MSH1, para calor (Shedge *et al.* 2010), estrés por luz alta (Xu *et al.* 2011) y otras condiciones de estrés ambientales (Hruz *et al.* 2008). En determinadas realizaciones, la supresión de MSH1 se efectúa en células vegetales cultivadas introduciendo un ácido nucleico que proporciona tal supresión en las células vegetales. Los ácidos nucleicos que pueden usarse para proporcionar la supresión de MSH1 en células vegetales cultivadas incluyen, pero no se limitan a, transgenes que producen un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un microARN (miARN), un ARN sentido cosupresor y/o un ARN antisentido dirigido al gen MSH1. Los ácidos nucleicos que pueden usarse para proporcionar la supresión de MSH1 en células vegetales cultivadas incluyen, pero no se limitan a, un ARN inhibidor pequeño (ARNip) o un microARN (miARN) dirigido contra el gen MSH1 endógeno. Las moléculas de ARN que proporcionan la inhibición de MSH1 pueden introducirse mediante electroporación. La introducción de ARN inhibidores en células vegetales cultivadas para inhibir genes diana puede llevarse a cabo en determinadas realizaciones tal como se da a conocer en Vanitharani *et al.* (Proc Natl Acad Sci U S A., 2003, 100(16):9632-6), Qi *et al.* (Nucleic Acids Res. 2004 Dec 15;32(22):e179), o J. Cheon *et al.* (Microbiol. Biotechnol. (2009), 19(8), 781-786).

La supresión de MSH1 también puede identificarse o monitorizarse fácilmente mediante métodos tradicionales en los que se observan fenotipos de plantas. Por ejemplo, la supresión de MSH1 puede identificarse o monitorizarse observando efectos organulares que incluyen variegación de las hojas, esterilidad masculina citoplasmática (CMS), un fenotipo de tasa de crecimiento reducida, fenotipo de floración retardada o sin floración, y/o susceptibilidad aumentada a patógenos. Fenotipos indicativos de supresión de MSH1 en diversas plantas se muestran en las Figuras 1, 2, y 3. Estos fenotipos que están asociados con la supresión de MSH1 se denominan en el presente documento "variación discreta" (V_D). La supresión de MSH1 también puede producir cambios en el macollamiento de la planta, altura, elongación internodal y densidad estomática (denominada en el presente documento "MSH1-dr") que pueden usarse para identificar o monitorizar la supresión de MSH1 en plantas. También pueden usarse otros rasgos bioquímicos y moleculares para identificar o monitorizar la supresión de MSH1 en plantas, supresión de MSH1. Tales rasgos moleculares pueden incluir, pero no se limitan a, cambios en la expresión de genes implicados en la regulación del ciclo celular, el catabolismo del ácido giberélico, la biosíntesis de auxina, la expresión del receptor de auxina, reguladores de floración y vernalización (es decir expresión de *FLC* aumentada y de *SOC1* reducida), así como niveles de *miR156* aumentados y de *miR172* reducidos. Tales rasgos bioquímicos pueden incluir, pero no se limitan a, regulación por incremento de la mayoría de los compuestos de las rutas metabólicas de TCA, NAD y carbohidratos, regulación por disminución de biosíntesis de aminoácidos, depleción de sacarosa en ciertas plantas, aumentos en azúcares o alcoholes sacáricos en ciertas plantas, así como aumentos en ascorbato, alfatocoferoles, y flavonas sensibles al estrés, apigenina y apigenina-7-oglucoído, isovitexina, alcanferol 3-O-beta-glucoído, luteolina-7-O-glucoído y vitexina. Se contempla adicionalmente que en determinadas realizaciones pueda usarse una combinación de métodos tanto moleculares, bioquímicos, como métodos tradicionales para identificar o monitorizar la supresión de MSH1 en plantas.

IV. Recuperación, autofecundación y cruce de progenie de plantas con supresión de MSH1

En el presente documento se proporcionan una variedad de métodos que proporcionan la supresión de MSH1 en una planta seguida de recuperación de plantas de progenie en las que está restaurada la función MSH1. En ciertos aspectos dados a conocer, tales plantas de progenie pueden recuperarse regulando por disminución la expresión de un transgén que inhibe MSH1 o eliminando el transgén que inhibe MSH1 con una transposasa. En ciertos aspectos dados a conocer de los métodos proporcionados en el presente documento, se suprime MSH1 en una planta o célula vegetal diana y se recuperan plantas de progenie que expresan MSH1 mediante técnicas genéticas

tradicional. En un aspecto dado a conocer a modo de ejemplo y no limitativo, pueden obtenerse plantas de progenie autofecundando una planta que es heterocigótica para el transgén que proporciona segregación de MSH1. La autofecundación de tales plantas heterocigóticas (o autofecundación de plantas heterocigóticas regeneradas a partir de células vegetales) proporciona el transgén para segregar un subconjunto de la población de planta de progenie. Cuando se suprime MSH1 mediante el uso de una mutación recesiva en un gen MSH1 endógeno (es decir una planta *msh1*), plantas *msh1/msh1* pueden, en aún otra realización a modo de ejemplo y no limitativa, cruzarse con plantas MSH1 y entonces autofecundarse para obtener plantas de progenie que son homocigóticas para un alelo MSH1 de tipo silvestre, funcional. En otros aspectos dados a conocer, se suprime MSH1 en una planta o célula vegetal diana y se recuperan plantas de progenie que expresan MSH1 mediante técnicas genéticas moleculares. Realizaciones no limitativas y a modo de ejemplo de tales técnicas genéticas moleculares incluyen: i) la regulación por disminución de un transgén que suprime MSH1 bajo el control de un promotor regulado mediante la retirada de un inductor requerido para la actividad de ese promotor o la introducción de un represor de ese promotor; o, ii) la exposición de un transgén que suprime MSH1 flanqueado por sitios de reconocimiento de transposasa a la transposasa semejante que proporciona la eliminación de ese transgén.

En ciertos aspectos dados a conocer de los métodos proporcionados en el presente documento, plantas de progenie derivadas de plantas en las que se suprimió la expresión de MSH1 que presentan esterilidad masculina, enanismo, variegación, y/o tiempo de floración retardado y expresan MSH1 funcional se obtienen y se mantienen como líneas de cultivo independientes. Se ha encontrado que tales fenotipos parecen clasificarse, de modo que es factible seleccionar una planta estéril macho citoplasmática que presenta una tasa de crecimiento normal y no variegación, por ejemplo, o una planta fértil macho, raquílica, que está altamente variegada. Se hace referencia a este fenómeno en el presente documento como variación discreta (V_D). Una ilustración a modo de ejemplo y no limitativa de este fenómeno tal como se produce en poblaciones de plantas autofecundadas que han perdido un transgén que inhibe MSH1 mediante segregación se proporciona en la Figura 6. Se contempla adicionalmente que tales líneas individuales que presentan variación discreta (V_D) puede obtenerse mediante cualquier de técnicas genéticas tradicionales mencionadas anteriormente, técnicas genéticas moleculares, o combinaciones de las mismas.

Líneas individuales obtenidas de plantas en las que se suprimió la expresión de MSH1 que presentan variación discreta (V_D) pueden cruzarse con respecto a otras plantas para obtener plantas de progenie que carecen de los fenotipos asociados con variación discreta (V_D) (es decir esterilidad masculina, enanismo, variegación y/o tiempo de floración retardado). Se ha encontrado sorprendentemente que la progenie de tales cruces puede autofecundarse para obtener líneas de progenie individuales que presentan una variación fenotípica significativa. Tal variación fenotípica que se observa en estas líneas de progenie individuales derivadas de cruces de plantas en las que se suprimió la expresión de MSH1 y que presentan variación discreta con respecto a otras plantas se denomina en el presente documento "variación cuantitativa" (V_Q). Ciertas líneas de plantas de progenie individuales obtenidas de los cruces de plantas en las que se suprimió la expresión de MSH1 con respecto a otras plantas pueden presentar una variación fenotípica útil en la que uno o más rasgos están mejorados en relación con cualquier línea parental y pueden seleccionarse. La variación fenotípica útil que puede seleccionarse en tales líneas de progenie individuales incluye, pero no se limita a, aumentos en la biomasa fresca y en peso seco en relación con cualquier línea parental. Una ilustración a modo de ejemplo y no limitativa de este fenómeno tal como se produce en la progenie F2 de cruces de plantas que presentan variación discreta con respecto a plantas que no presentan variación discreta se proporciona en la Figura 6.

En ciertos aspectos dados a conocer, un cruce de una línea individual que presenta variabilidad discreta puede ser con una planta que no se ha sometido a supresión de MSH1 pero es isogénica de otro modo con la línea individual que presenta variación discreta. En ciertos aspectos a modo de ejemplo dados a conocer, una línea que presenta variación discreta se obtiene suprimiendo MSH1 en un germoplasma dado y puede cruzarse con una planta que tiene el mismo germoplasma que no se sometió a supresión de MSH1. En otros aspectos dados a conocer, un cruce de una línea individual que presenta variabilidad discreta puede ser con una planta que no se ha sometido a supresión de MSH1 pero no es isogénica con la línea individual que presenta variación discreta. Por tanto, en ciertos aspectos dados a conocer, un cruce de una línea individual que presenta variabilidad discreta también puede ser con una planta que comprende uno o más polimorfismos cromosómicos que no se producen en la línea individual que presenta variabilidad discreta, con una planta derivada de germoplasma parcial o completamente diferente, o con una planta de un grupo heterótico diferente (en casos en los que tales grupos heteróticos distintos existen). También se reconoce que un cruce de este tipo puede hacerse en cualquier dirección. Por tanto, una línea individual que presenta variabilidad discreta puede usarse o bien como donador de polen o bien como receptor de polen con respecto a una planta que no se ha sometido a supresión de MSH1 en tales cruces. En ciertos aspectos dados a conocer, la progenie del cruce se autofecunda entonces para establecer líneas individuales que pueden examinarse por separado para identificar líneas con rasgos mejorados en relación con líneas parentales. Tales líneas individuales que presentan los rasgos mejorados se seleccionan entonces y pueden propagarse mediante autofecundación adicional. Una ilustración a modo de ejemplo y no limitativa de este procedimiento en el que se obtiene la progenie F2 de cruces de plantas que presentan variación discreta con plantas que no presentan variación discreta se proporciona en la Figura 6. Tales líneas de progenie F2 se examinan para determinar las mejoras de rasgo deseadas en relación con las plantas parentales y se seleccionan líneas que presentan tales mejoras.

V. Comparación y selección de loci cromosómicos alterados en plantas que pueden conferir un rasgo útil

- También pueden identificarse y seleccionarse loci cromosómicos alterados que pueden conferir rasgos útiles realizando análisis comparativos apropiados de plantas de referencia que no presentan los rasgos útiles y plantas de prueba obtenidas a partir de una planta o célula vegetal parental que se habían sometido a supresión de MSH1 y obtener o bien los loci alterados o bien plantas que comprenden los loci alterados. Se anticipa que puede usarse una variedad de plantas de referencia y plantas de prueba en tales comparaciones y selecciones. En ciertos aspectos dados a conocer, las plantas de referencia que no presentan el rasgo útil incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de: a) una planta de tipo silvestre; b) una subpoblación distinta de plantas dentro de una población F2 de plantas dada de una línea de planta dada (en la que la población F2 es cualquier tipo o variedad de planta aplicable obtenido de la manera mostrada en la Figura 6); c) una población F1 que presenta un fenotipo de tipo silvestre (en la que la población F1 es cualquier tipo o variedad de planta aplicable obtenido de la manera mostrada en la Figura 6); y/o, d) una planta que es isogénica con las plantas parentales o células parentales de las plantas de prueba antes de la supresión de MSH1 en aquellas plantas parentales o células vegetales (es decir la planta de referencia es isogénica con las plantas o células vegetales que se sometieron posteriormente a supresión de MSH1 para obtener las plantas de prueba). En ciertos aspectos dados a conocer, las plantas de prueba que presentan el rasgo útil incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de: a) cualquier segregante no transgénico que presente el rasgo útil y que se derive de plantas o células vegetales parentales que se habían sometido a supresión de MSH1 mediada por transgén, b) una subpoblación distinta de plantas dentro de una población F2 de plantas dada de una línea de planta dada que presentan el rasgo útil (en la que la población F2 es cualquier tipo o variedad de planta aplicable obtenido de la manera mostrada en la Figura 6); c) cualquier planta de progenie obtenida de las plantas de (a) o (b) que presentan el rasgo útil; o d) una planta o célula vegetal que se había sometido a supresión de MSH1 que presentan el rasgo útil.
- En general, un objetivo de estas comparaciones es identificar diferencias en los perfiles de ARN pequeños y/o la metilación de ciertos loci cromosómicos de ADN entre plantas de prueba que presentan los rasgos útiles y plantas de referencia que no presentan los rasgos útiles. Los loci alterados así identificados pueden entonces aislarse o seleccionarse en plantas para obtener plantas que presentan los rasgos útiles.
- En ciertos aspectos dados a conocer, pueden identificarse loci cromosómicos alterados identificando ARN pequeños que están regulados por incremento o por disminución en las plantas de prueba (en comparación con plantas de referencia). Este método se basa en parte en la identificación de loci cromosómicos alterados en los que ARN interferentes pequeños dirigen la metilación de dianas génicas específicas mediante metilación de ADN dirigida por ARN (RdDM). El proceso de metilación de ADN dirigida por ARN (RdDM) se ha descrito (Chinnusamy V *et al.* *Sci China Ser C-Life Sci.* (2009) 52(4): 331-343). Puede usarse cualquier plataforma de tecnología aplicable para comparar ARN pequeños en las plantas de prueba y de referencia, que incluyen, pero no se limitan a, métodos a base de micromatriz (Franco-Zorilla *et al.* *Plant J.* 2009 59(5):840-50), métodos a base de secuenciación profunda (Wang *et al.* *The Plant Cell* 21:1053-1069 (2009)), y similares.
- En ciertos aspectos dados a conocer, pueden identificarse loci cromosómicos alterados identificando proteínas histona asociadas con un locus y que están metiladas o aciladas en las plantas de prueba (en comparación con plantas de referencia). El análisis de loci cromosómicos asociados con histonas metiladas o aciladas puede llevarse a cabo enriqueciendo y secuenciando aquellos loci usando anticuerpos que reconocen histonas metiladas o aciladas. La identificación de regiones cromosómicas asociadas con la metilación o acetilación de residuos lisina específicos de histona H3 usando anticuerpos específicos para H3K4me3, H3K9ac, H3K27me3 y H3K36me3 se ha descrito (Li *et al.*, *Plant Cell* 20:259-276, 2008; Wang *et al.* *The Plant Cell* 21:1053-1069 (2009)).
- En ciertos aspectos dados a conocer, pueden identificarse loci cromosómicos alterados identificando regiones cromosómicas (ADN genómico) que tienen un estado de metilación alterado en las plantas de prueba (en comparación con plantas de referencia). Un estado de metilación alterado puede comprender o bien la presencia o bien la ausencia de metilación en uno o más loci cromosómicos de una planta de prueba en comparación con una planta de referencia. Puede usarse cualquier plataforma de tecnología aplicable para comparar el estado de metilación de loci cromosómicos en las plantas de prueba y de referencia. Las tecnologías aplicables para identificar loci cromosómicos con cambios en su estado de metilación incluyen, pero no se limitan a, métodos basados en la inmunoprecipitación de ADN con anticuerpos que reconocen 5-metilcitosina, métodos basados en el uso de endonucleasas de restricción dependientes de metilación y PCR tal como métodos de MCR-PCR (Rabinowicz, *et al.* *Genome Res.* 13: 2658-2664 2003; Li *et al.*, *Plant Cell* 20:259-276, 2008), la secuenciación de ADN convertido por bisulfito (Frommer *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (5): 1827-31; Tost *et al.* *BioTechniques* 35 (1): 152-156, 2003), análisis de PCR específico de metilación de ADN tratado con bisulfito (Herman *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (18): 9821-6, 1996), métodos a base de secuenciación profunda (Wang *et al.* *The Plant Cell* 21:1053-1069 (2009)), extensión de cebador de nucleótido simple sensible a la metilación (MsSnuPE; Gonzalzo y Jones *Nucleic Acids Res.* 25 (12): 2529-2531, 1997), espectroscopía de correlación de fluorescencia (Umezu *et al.* *Anal Biochem.* 415(2):145-50, 2011), métodos de secuenciación en tiempo real de moléculas simples (Flusberg *et al.* *Nature Methods* 7, 461-465), análisis de fusión de alta resolución (Wojdacz y Dobrovic (2007) *Nucleic Acids Res.* 35 (6): e41), y similares.

VI. Introducción de una modificación cromosómica asociada con un rasgo útil en una planta

También se proporcionan en el presente documento métodos para introducir diversas modificaciones cromosómicas que pueden conferir un rasgo útil a una planta, así como las plantas, partes de plantas, y productos de esas partes de plantas. Pueden identificarse alteraciones cromosómicas y/o mutaciones cromosómicas inducidas mediante la supresión de MSH1 tal como se describe en el presente documento. Una vez identificadas, las modificaciones cromosómicas que incluyen, pero no se limitan a, alteraciones cromosómicas, mutaciones cromosómicas, o transgenes que proporcionan el mismo efecto genético que las alteraciones cromosómicas y/o mutaciones cromosómicas inducidas mediante la supresión de MSH1 pueden introducirse en plantas huésped para obtener plantas que presentan el rasgo deseado. En este contexto, el “mismo efecto genético” significa que la modificación cromosómica introducida proporciona un aumento y/o una reducción en la expresión de uno o más genes vegetales endógenos que es similar al observado en una planta que se ha sometido a supresión de MSH1 y presenta el rasgo útil. En ciertos aspectos dados a conocer en los que un gen endógeno está metilado en una planta sometida a supresión de MSH1 y presenta tanto una expresión reducida de ese gen como un rasgo útil, se proporcionan modificaciones cromosómicas en otras plantas que también dan como resultado una expresión reducida de ese gen y el rasgo útil. En ciertos aspectos dados a conocer en los que un gen endógeno está desmetilado en una planta sometida a supresión de MSH1 y presenta tanto expresión aumentada de ese gen como un rasgo útil, se proporcionan modificaciones cromosómicas en otras plantas que también dan como resultado la expresión aumentada de ese gen y ese rasgo útil.

En ciertos aspectos dados a conocer, la modificación cromosómica que se introduce es una alteración cromosómica. Pueden introducirse alteraciones cromosómicas que incluyen, pero no se limitan a, una diferencia en un estado de metilación cruzando una planta que comprende la alteración cromosómica con una planta que carece de la alteración cromosómica y seleccionando para determinar la presencia de la alteración en F1, F2, o cualquier planta de progenie de generación posterior del cruce. En todavía otras realizaciones, las alteraciones cromosómicas en genes diana específicos pueden introducirse mediante la expresión de un ARNip o ARN en horquilla dirigido como diana a ese gen mediante metilación de ADN dirigida por ARN (Chinnusamy V *et al.* *Sci China Ser C-Life Sci.* (2009) 52(4): 331-343; Cigan *et al.* *Plant J* 43 929-940, 2005; Heilersig *et al.* (2006) *Mol Genet Genomics* 275 437-449; Miki y Shimamoto, *Plant Journal* 56(4):539-49; Okano *et al.* *Plant Journal* 53(1):65-77, 2008).

En determinadas realizaciones, la modificación cromosómica es una mutación cromosómica. Las mutaciones cromosómicas que proporcionan reducciones o aumentos en la expresión de un gen endógeno de un locus cromosómico pueden incluir, pero no se limitan a, inserciones, deleciones y/o sustituciones de secuencias de nucleótidos en un gen. Las mutaciones cromosómicas pueden dar como resultado una expresión reducida de un gen mediante una variedad de mecanismos que incluyen, pero no se limitan a, la introducción de codones de cambio de sentido, mutaciones de desplazamiento de marco, codones de parada traducionales prematuros, deleciones de promotor, mutaciones que alteran el procesamiento de ARNm, y similares. Las mutaciones cromosómicas que dan como resultado una expresión aumentada de un gen incluyen, pero no se limitan a, sustituciones de promotor, la eliminación de elementos reguladores negativos del gen, y similares. Las mutaciones cromosómicas pueden introducirse en loci específicos de una planta mediante cualquier método aplicable. Los métodos aplicables para introducir mutaciones cromosómicas en loci cromosómicos de planta endógenos incluyen, pero no se limitan a, la reparación de la rotura bicatenaria homóloga (Wright *et al.*, *Plant J.* 44, 693, 2005; D'Halluin, *et al.*, *Plant Biotech. J.* 6:93, 2008), la unión de extremos no homólogos o una combinación de unión de extremos no homólogos y recombinación de homólogos (revisado en Puchta, *J. Exp. Bot.* 56, 1, 2005; Wright *et al.*, *Plant J.* 44, 693, 2005), la reparación de la rotura bicatenaria específica del sitio inducida por meganucleasa (documentos WO/06097853A1, WO/06097784A1, WO/04067736A2, U.S. 20070117128A1), y recombinación de homólogos mediada por nucleasa con dedos de cinc (documentos WO 03/080809, WO 05/014791, WO 07014275, WO 08/021207). En todavía otros aspectos dados a conocer, pueden identificarse mutaciones deseadas en loci cromosómicos de planta endógenos a través del uso de la tecnología TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) tal como se describe (Henikoff *et al.*, *Plant Physiol.* 2004, 135:630-636).

En otras realizaciones, las modificaciones cromosómicas que proporcionan el efecto genético deseado pueden comprender un transgén. Los transgenes que pueden dar como resultado la expresión reducida de un gen mediante una variedad de mecanismos que incluyen, pero no se limitan a, mutantes negativos dominantes, un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un microARN (miARN), un ARN sentido cosupresor y/o un ARN antisentido y similares. Las patentes estadounidenses que describen la supresión de genes vegetales endógenos mediante transgenes incluyen US 7.109.393, US 5.231.020 y US 5.283.184 (métodos de cosupresión); y US 5.107.065 y US 5.759.829 (métodos antisentido). En ciertos aspectos dados a conocer, pueden usarse transgenes diseñados específicamente para producir moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) con homología con el gen endógeno de un locus cromosómico para reducir la expresión de ese gen endógeno. En tales aspectos dados a conocer, las secuencias de hebra sentido del ARNbc pueden separarse de las secuencias antisentido mediante una secuencia espaciadora, preferiblemente una que promueve la formación de una molécula de ARNbc (ARN bicatenario). Los ejemplos de tales secuencias espaciadoras incluyen, pero no se limitan a, aquellas expuestas en Wesley *et al.*, *Plant J.*, 27(6):581-90 (2001), y Hamilton *et al.*, *Plant J.*, 15:737-746 (1998). Vectores para inhibir genes vegetales endógenos con la expresión medida por transgén de ARN de horquilla se dan a conocer en las solicitudes de patente estadounidense n.^{os}

20050164394, 20050160490 y 20040231016, cada una de las cuales se incorpora mediante referencia en su totalidad al presente documento.

Los transgenes que dan como resultado la expresión aumentada de un gen de un locus cromosómico incluyen, pero no se limitan a, un gen recombinante fusionado con promotores heterólogos que son más fuertes que el promotor nativo, un gen recombinante que comprende elementos tales como intrones heterólogos, regiones sin traducir en 5', regiones sin traducir en 3' que proporcionan expresión aumentada, y combinaciones de los mismos. Tal promotor, intrón, regiones sin traducir en 5', regiones sin traducir en 3', y cualquier región de poliadenilación necesaria pueden unirse operativamente al ADN de interés en moléculas de ADN recombinante que comprenden partes de transgenes útiles para hacer modificaciones cromosómicas tal como se proporciona en el presente documento.

Los promotores a modo de ejemplo útiles para la expresión de transgenes incluyen, pero no se limitan a, versiones potenciadas o duplicadas de los viral CaMV35S y FMV35S transgenes útiles (patente estadounidense n.º 5.378.619, incorporada mediante referencia en su totalidad al presente documento), promotores 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor Act1 de arroz y el promotor 35S del virus del mosaico de la celidonia (FMV) (patente estadounidense n.º 5.463.175; incorporada mediante referencia en su totalidad al presente documento). Los intrones a modo de ejemplo útiles para la expresión de transgenes incluyen, pero no se limitan a, el intrón hsp70 de maíz (patente estadounidense n.º 5.424.412), el intrón Act1 de arroz (McElroy *et al.*, 1990, *The Plant Cell*, Vol. 2, 163-171), el intrón CAT-1 (Cazzonnelli y Velten, *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 271-280, septiembre de 2003), el intrón pKANNIBAL (Wesley *et al.*, *Plant J.* 2001 27(6):581-90; Collier *et al.*, 2005, *Plant J* 43: 449-457), el intrón PIV2 (Mankin *et al.* (1997) *Plant Mol. Biol. Rep.* 15(2): 186-196) y el intrón "super-ubiquitina" (patente estadounidense n.º 6.596.925; Collier *et al.*, 2005, *Plant J* 43: 449-457). Las secuencias de poliadenilación a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, el gen de nopalina sintasa (NOS) de plástico inducido por tumor (Ti) de *Agrobacterium* y las secuencias de poliadenilación del ssRUBISCO E9 de guisante.

VII. Examen y selección de progenie cruzada de plantas en las que se ha suprimido MSH1 o plantas que comprenden loci cromosómicos modificados que presentan rasgos mejorados o útiles

Las líneas de plantas obtenidas mediante los métodos proporcionados en el presente documento pueden examinarse y seleccionarse para una variedad de rasgos útiles usando una amplia variedad de técnicas. En realizaciones particulares proporcionados en el presente documento, líneas de plantas de progenie individuales obtenidas de los cruces de plantas en las que se suprimió la expresión de MSH1 con respecto a otras plantas se examinan y se seleccionan para los rasgos útiles deseados.

En determinadas realizaciones, el rasgo examinado y seleccionado es el rendimiento vegetal mejorado. En determinadas realizaciones, tales mejoras de rendimiento son mejoras en el rendimiento de una línea de planta en relación con una o más línea(s) parental(es) en condiciones de no estrés. Las condiciones de no estrés comprenden condiciones en las que el agua, la temperatura, los nutrientes, los minerales y la luz caen dentro de intervalos típicos para el cultivo de la especie vegetal. Tales intervalos típicos para el cultivo comprenden cantidades o valores de agua, temperatura, nutrientes, minerales y/o luz que no son insuficientes ni excesivos. En determinadas realizaciones, tales mejoras de rendimiento son mejoras en el rendimiento de una línea de planta en relación con la(s) línea(s) parental(es) en condiciones de estrés abiótico. Tales condiciones de estrés abiótico incluyen, pero no se limitan a, condiciones en las que el agua, la temperatura, los nutrientes, los minerales y/o la luz no son insuficientes ni excesivos. Por tanto, las condiciones estrés abiótico incluyen, pero no se limitan a, estrés por sequía, estrés osmótico, estrés por nitrógeno, estrés por fósforo, estrés por minerales, estrés por calor, estrés por frío y/o estrés por luz. En este contexto, el estrés por minerales incluye, pero no se limita a, estrés debido a potasio, calcio, magnesio, hierro, manganeso, cobre, cinc, boro, aluminio o silicio insuficiente o excesivo. En este contexto, el estrés por minerales incluye, pero no se limita a, estrés debido a cantidades excesivas de metales pesados que incluyen, pero no se limitan a, cadmio, cobre, níquel, cinc, plomo y cromo.

Pueden identificarse mejoras en el rendimiento en líneas de plantas obtenidas mediante los métodos proporcionados en el presente documento mediante mediciones directas de biomasa húmeda o seca que incluye, pero no se limita a, grano, pelusa, hojas, tallos o simiente. También pueden evaluarse las mejoras en el rendimiento midiendo el rendimiento de rasgos relacionados que incluyen, pero no se limitan a, el peso de 100 simientes, un índice de recogida y el peso de la simiente. En determinadas realizaciones, tales mejoras del rendimiento son mejoras en el rendimiento de una línea de planta en relación con una o más línea(s) parental(es) y pueden determinarse fácilmente haciendo crecer líneas de plantas obtenidas mediante los métodos proporcionados en el presente documento en paralelo con las plantas parentales. En determinadas realizaciones, pueden emplearse ensayos de campo para determinar diferencias en el rendimiento, en los que se replican, aleatorizan y controlar gráficos de plantas de prueba y control para determinar la variación (Giesbrecht FG y Gumpertz ML. 2004. *Planning, Construction, and Statistical Analysis of Comparative Experiments*. Wiley. Nueva York; Mead, R. 1997. *Design of plant breeding trials*. En *Statistical Methods for Plant Variety Evaluation*. eds. Kempton y Fox. Chapman y Hall. Londres). Los métodos para espaciar las plantas de prueba (es decir plantas obtenidas con los métodos de esta invención) con plantas de comprobación (parentales u otros controles) para obtener datos de rendimiento adecuados para comparaciones se proporcionan en referencias que incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de Cullis, B. *et al.* *J. Agric. Biol. Env. Stat.* 11:381-393; y Besag, J. y Kempton, RA. 1986. *Biometrics* 42: 231-251.).

En determinadas realizaciones, el rasgo examinado y seleccionado es la resistencia mejorada a estrés vegetal biótico en relación con las líneas parentales. El estrés vegetal biótico incluye, pero no se limita a, estrés impuesto mediante patógenos fúngicos de plantas, patógenos bacterianos de plantas, patógenos virales de plantas, insectos, nematodos y herbívoros. En determinadas realizaciones, se proporciona un examen y una selección de líneas de plantas que presentan resistencia a patógenos fúngicos que incluyen, pero no se limitan a, *Alternaria* sp., *Ascochyta* sp., *Botrytis* sp.; *Cercospora* sp., *Colletotrichum* sp., *Diaporthe* sp., *Diplodia* sp., *Erysiphe* sp., *Fusarium* sp., *Gaeumanomyces* sp., *Helminthosporium* sp., *Macrophomina* sp., *Nectria* sp., *Peronospora* sp., *Phakopsora* sp., *Phialophora* sp., *Phoma* sp., *Phymatotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Plasmopara* sp., *Puccinia* sp., *Podosphaera* sp., *Pyrenophora* sp., *Piricularia* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Scerotium* sp., *Sclerotinia* sp., *Septoria* sp., *Thielaviopsis* sp., *Uncinula* sp., *Venturia* sp. y *Verticillium* sp. En determinadas realizaciones, se proporciona un examen y una selección de líneas de plantas que presentan resistencia a patógenos bacterianos que incluyen, pero no se limitan a, *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp. y *Xanthomonas* sp. En determinadas realizaciones, se proporciona un examen y una selección de líneas de plantas que presentan resistencia a insectos que incluyen, pero no se limitan a, pulgones y otros insectos perforadores/succionadores tales como *Lygus* sp., insectos lepidópteros tales como *Armigera* sp., *Helicoverpa* sp., *Heliothis* sp. y *Pseudoplusia* sp., e insectos coleópteros tales como *Diabrotica* sp. En determinadas realizaciones, se proporciona un examen y una selección de líneas de plantas que presentan resistencia a nematodos que incluyen, pero no se limitan a, *Meloidogyne* sp., *Heterodera* sp., *Belonolaimus* sp., *Ditylenchus* sp., *Globodera* sp., *Nacobbus* sp. y *Xiphinema* sp.

Otros rasgos útiles que pueden obtenerse mediante los métodos proporcionados en el presente documento incluyen diversos rasgos de calidad de simiente que incluyen, pero no se limitan a, mejoras en cualquiera de las composiciones o cantidades de aceite, proteína o almidón en la simiente. Todavía otros rasgos útiles que pueden obtenerse mediante los métodos proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, biomasa aumentada, ausencia de floración, esterilidad masculina, digestibilidad, periodo de llenado de simiente, madurez (ya sea antes o después, según se desee), encamado reducido y altura de planta (ya sea aumentada o reducida según se desee).

Además de cualquiera de los rasgos mencionados anteriormente, los rasgos particularmente útiles para sorgo que pueden obtenerse mediante los métodos proporcionados en el presente documento también incluyen, pero no se limitan a: i) rasgos agronómicos (tiempo de floración, días hasta la floración, días hasta la floración tras lluvia, días hasta la floración con lluvia; ii) resistencia a enfermedad fúngica (resistencia al mildiú de sorgo - invernadero, campo de resistencia al mildiú de sorgo, molde de grano de sorgo, resistencia al chanco de hojas de sorgo, resistencia a la roya del sorgo; iii) rasgo relacionado con el grano: (peso seco de grano, número de granos, número de granos por metro cuadrado, peso de grano con respecto a la panícula, color de simiente, lustre de simiente, tamaño de simiente); iv) rasgos relacionados con la fase de crecimiento y de desarrollo (número de arados basales, días hasta la recogida, días hasta la madurez, macollamiento nodal, altura de planta, altura de planta tras la lluvia); v) rasgo de morfología y anatomía de inflorescencia (capacidad de desgranado); vi) resistencia al daño por insectos (resistencia a la mosca de los brotes de sorgo tras la lluvia, resistencia a la mosca de los brotes de sorgo durante la lluvia, resistencia a barrenadores del tallo de sorgo); vii) rasgos relacionados con las hojas (color de hoja, color de nervio central de la hoja, color de la vena de la hoja, peso de hoja bandera, peso de la hoja, peso del resto de hojas); viii) rasgos relacionados con el contenido en mineral e iones (contenido de potasio en los brotes, contenido de sodio en los brotes); ix) rasgos relacionados con la panícula (número de panículas, compacidad y forma de la panícula, esfuerzo de panícula, índice de recogida de panícula, longitud de panícula, peso de panícula, peso de panícula sin grano, anchura de panícula); x) contenido en compuesto fitoquímico (pigmentación vegetal); xii) rasgos de morfología y de anatomía en espiguilla (color de gluma, cobertura de gluma); xiii) rasgo relacionado con el tallo (peso de tallo con respecto a hoja, peso de tallo); y xiv) rasgos misceláneos (rasgos relacionados con el rastrojo, energía metabolizada, capacidad de digestión de nitrógeno, digestibilidad de materia orgánica, rastrojo por peso).

50 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deberán apreciar que las técnicas dadas a conocer en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y por tanto puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberán apreciar, a la luz de la presente divulgación, que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se dan a conocer y todavía obtenerse un resultado idéntico o similar sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención.

60 Ejemplo 1. Construcción de plantas transgénicas que proporcionan supresión de MSH1

Se construyó un vector que proporciona la supresión de MSH1 en tomate y tabaco tal como sigue. Se derivó un segmento que codifica para aminoácidos 651-870 de la proteína MSH1 de una secuencia EST de tomate (SEQ ID NO:5) usando las secuencias cebadoras *TOM-CD1F* (5_-CGCAGGTATCACGAGGCAAGTGCTAAGG-3; SEQ ID NO:11) y *TOM-CD1R* (5_-ATCCCCAAACAGCCAATTTTCGTCCAGGATCCCCAAACAGCCAATTTTCGTCCAGG-3; SEQ ID NO:12) y se clonó en orientación directa e inversa, separado por una secuencia de intrón. El vector de base, pUCRNAi-intrón, alberga el segundo intrón de la riboproteína nuclear pequeña de *Arabidopsis* (At4g02840; SEQ ID

NO: 13). El promotor CaMV35S y el terminador de la transcripción regulan la expresión de la construcción y el gen indicador de neomicina fosfotransferasa II (*nptII*), y el inserto está flanqueado por secuencias de integración de borde izquierdo y borde derecho. Se usó la cepa C58C1/pMP90 (28) de *Agrobacterium tumefaciens* para su transformación en tabaco (Horsch RB, *et al.* (1985) *Science* 227:1229-1231) y tomate (McCormick *et al.* 1986) *Plant Cell Rep* 5:81-84).

Se derivaron líneas de ARNi de mijo y sorgo mediante procedimientos y materiales similares, llevándose a cabo transformaciones y regeneración de plantas según los procedimientos de Howe *et al.* (*Plant Cell Rep* 25:784-91, 2006). El vector de ARNi para el mijo se dirigió contra el gen MSH1 de mijo, mientras que el vector de ARNi para sorgo se dirigió contra el gen del sorgo MSH1 (SEQ ID NO: 6). Se amplificaron segmentos que codifican para 157 aminoácidos del extremo C-terminal de MSH1 a partir de ADNc total de mijo perla y sorgo usando cebadores: zm-msf8 (5'-GGTTGAGGAGCCTGAATCTCTGAAGAAC-3'; SEQ ID NO:15) y zm-msr8 (5'-CTCGCCAGAGATTCGAGATATACCGAAG-3'; SEQ ID NO:16). Se clonaron productos de PCR en orientación directa e inversa, separados por una secuencia de intrón. El vector de base, pUCRNAi-intrón, que alberga el segundo intrón de la riboproteína nuclear pequeña de *Arabidopsis* (At4g02840; SEQ ID NO: 13), se proporcionó por H. Cerutti (University of Nebraska, Lincoln, NE). El vector pPTN290, un derivado de pPZP212 (Hajdukiewicz *et al.* 1994, *Plant Mol Biol.*; 25(6):989-94), se usó para introducir los casetes Msh1-ARNi bajo el control del promotor 1 de ubiquitina de maíz acoplado con su primer intrón, y se transcripción se termina mediante el terminador CaMV 35S. El promotor CaMV 35S y el terminador regulan la expresión del gen indicador de neomicina fosfotransferasa II (*nptII*), y el inserto está flanqueado por secuencias de integración de borde derecho y borde izquierdo. La cepa NTL4 de *Agrobacterium tumefaciens* (Luo Z-Q *et al.*, 2001, *Mol Plant Microbe Interact.*, 14(1):98-103) se usó para inocular embriones de líneas Tift23 DBE1 de mantenimiento de mijo perla y líneas Tx430 de sorgo. Los procedimientos de transformación detallados usados para mijo perla son los mismos que para el sorgo (Howe *et al.*, 2006, *Plant Cell Rep* 25:784-91).

Ejemplo 2. Efecto fenotípicos de la supresión de MSH1

La expresión de MSH1 suprimida de manera transgénica mediante el uso de ARNi en cinco especies vegetales: soja (*Glycine max* (L.) Merr), tomate (*Solanum lycopersicum* L), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), mijo (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) y sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). En cada caso se observaron cambios similares, incluyendo esterilidad masculina citoplasmática, evidencia de variegación y desarrollo de cloroplastos alterado, tasa de crecimiento reducida y enanismo, tiempo de floración alterado o ausencia de floración, ramificación potenciada, biosíntesis de flavonoides reducida y ausencia de antocianinas, susceptibilidad a patógenos potenciada, y morfologías de hoja alteradas (véase la Figura 1). También se observan variegación, enanismo y reorganizaciones de ADN mitocondrial en diversas plantas sometidas a supresión de MSH1 tal como se muestra en las Figuras 2, 3 y 4, respectivamente. Fisiológicamente, las plantas muestran niveles de ATP reducidos y de ROS potenciados, motilidad mitocondrial reducida, mitofagia potenciada, expresión de rutas de respuesta al estrés, y metabolismo de GA y citoquinina (data de ROS en la Figura 5).

Las similitudes fenotípicas notables entre especies vegetales indican que muchos de los cambios asociados a *msh1* son respuestas programadas. Análisis de transcritos y metabólicos han identificado varias rutas asociadas con los fenotipos emergentes (tabla 1). Experimentos de perfilado de transcritos de *Sorghum* y *Arabidopsis* muestran una expresión reducida de genes del ciclo celular, una expresión del gen de floración alterada (FLC) y un catabolismo de GA potenciado (GA20-ox2 y GA20-ox6) en los fenotipos de crecimiento reducido. Se restaura la tasa de crecimiento y la inducción de floración en las plantas con la aplicación de ácido giberélico.

Tabla 1. Resultados del perfilado de transcrito/metabólico de muestras en *Arabidopsis* que muestran correspondencia en los cambios de ruta.

Perfilado de transcrito		Perfilado metabólico			
A. Respuesta al estrés oxidativo/redox					
AGI	Gen	<i>msh1</i> *	Metabolito	Col-0	<i>msh1</i>
AT3G22370	AOX1A	2,2	Glutatiónt	22.520	33.322
AT5G20230	ATBCB	10,9	Ascorbato†	289.996	460.261
AT2G21640	Respuesta al estrés oxidativo	2,9	fosfato	12,3 M	32,1 M
AT4G20830	Proteína de dominio de unión a FAD	2,6			
B. Genes de fotosíntesis					
AT5G66570	PSBO-1	-1,3	Sacarosa†	26.969,4	N.D.
AT3G50820	PSBO-2	-1,4	Rafinosa†	49.427,8	N.D.
AT4G02770	PSAD-1	-1,6			
AT2G30790	PSBP-2	-2			

C. Respuestas de GA

AT1G30040	ATGA20X2 (catabolismo de GA)	1,7	GA53	11 ng/g DW	N.D.
AT1G02400	ATGA20X6 (catabolismo de GA)	9,3	GA19	7 ng/g DW	N.D.
AT2G14900	Proteína regulada por GA	-3,3			

* Cambio en veces de los niveles en *msh1* en relación con Col-0, † los valores son recuentos de área sin procesar normalizados de análisis de espectrómetro de masas, N.D. no detectable

Se muestra un conjunto de datos limitado. El sombreado indica regulación por disminución en *msh1*.

Ejemplo 3. Análisis genético de líneas de sorgo Tx430 tras la exposición a y pérdida del transgén de ARNi de MSH1 mediante segregación

Se obtuvo una planta de sorgo TX430 no transgénica, con mucho enanismo, con floración retardada y variegada de una población de segregación de plantas de progenie de una planta de sorgo Tx430 parental que era heterocigótica para un transgén que inhibe la expresión de MSH1 mediante interferencia de ARN (ARNi). Tx430 era el genotipo original usado para obtener la planta de sorgo transgénica que comprende el transgén que inhibe la expresión de MSH1. El cruce de esta planta de sorgo TX430 no transgénica, con mucho enanismo, con floración retardada y variegada mediante el tipo silvestre TX430 isogénico como planta polinífera parental, produjo un fenotipo F1 de tipo silvestre que no mostró ninguna evidencia del enanismo original, retardo en la floración o fenotipos de variegación (Figura 6). Esto era un resultado sorprendente, dado que se había asumido que los cambios inducidos por ARNi eran organulares, y se anticipó la transmisión materna de los fenotipos. La introducción del genoma de tipo silvestre neutralizó los efectos inducidos por ARNi originales. La población F2, derivada mediante autopolinización de estas plantas F1, produjo una distribución amplia de variación fenotípica, denominada variación cuantitativa (VQ), parte de la cual se describe en la Tabla 2. Se usó SAS PROC MIXED para todos los análisis en la Tabla 2. Cada rasgo se analizó con el efecto fijado de línea en el modelo y se asumieron varianzas heterogéneas entre las líneas y se estimaron, junto con errores estándar de las estimaciones. Se realizó una prueba de chi-cuadrado del modelo de varianza heterogénea frente al modelo de varianza homogénea. Un valor de chi-cuadrado significativo indica diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas de línea. Aunque una pequeña proporción (aproximadamente 1/50 plantas) muestra el fenotipo de enanismo, variegado, y aproximadamente el 50% muestra esterilidad masculina citoplasmática como lesión genética mitocondrial probable (Hanson y Bentolila, 2004), una gran proporción de la población muestra una variación cuantitativa significativa en biomasa fresca por encima del suelo y en peso seco, peso de panícula, y otras características agronómicas útiles. Resulta particularmente intrigante en estos datos la capacidad observada dentro de la población para superar a sus padres para varios rasgos. El intervalo de diversidad no puede explicarse de manera razonable mediante variación genética nuclear, dado que el cruce original es TX430 x TX430 (hecho en invernadero con panículas embolsadas).

Tabla 2. Evaluación de la variación fenotípica en sorgo

	Línea	N ¹	Lsmedia	Varianza	DE de la varianza	Chi-cuadrado ^z	Valor P
Altura de la planta (cm)	F1	31	156,65	1195,5	308,68	156,98	<0,0001
Altura de la planta (cm)	F2	274	143,63	1400,33	119,86		
Altura de la planta (cm)	Enana	55	48,29	61,17	11,77		
Altura de la planta (cm)	Tipo silvestre	18	131,11	32,58	11,17		
Longitud de la panícula (cm)	F1	13	27,154	11,81	4,82	4,75	0,0931
Longitud de la panícula (cm)	F2	275	27,171	17,20	1,47		
Longitud de la panícula (cm)	Tipo silvestre	11	26,636	5,85	2,61		
Peso de la panícula (gramos)	F1	16	46,63	252,65	92,25	14,49	0,0007
Peso de la panícula (gramos)	F2	368	45,26	365,78	27,00		
Peso de la panícula (gramos)	Tipo silvestre	17	33,53	67,51	23,87		
Biomasa seca (gramos)	F1	3	294,7	12258 ³	12258	16,46	0,0009
Biomasa seca (gramos)	F2	52	224,8	3023,4	598,7		
Biomasa seca (gramos)	Enana	11	195,8	2696,6	1205,9		
Biomasa seca (gramos)	Tipo silvestre	10	193,6	283,1	133,5		

1) N = número de observaciones en una línea

- 2) La prueba del chi-cuadrado es un prueba para diferencias entre varianzas de línea
 3) La varianza inusualmente alta es la consecuencia de un tamaño de muestra pequeño para este rasgo.

Ejemplo 4. Análisis de progenie F3 MSH1/MSH1 F3 de *Arabidopsis* de un cruce msh1/msh1 xMSH1/MSH1

En estos experimentos, se eliminó la mutación msh1 recesiva mediante segregación. El padre de ecotipo Columbia msh1/msh1 recesivo se clonó en primer lugar con plantas de ecotipo Columbia de tipo silvestre como donador de polen (Col-0 msh1 x Col-0wt) para obtener una población F1 de plantas msh1/MSH1. La progenie F1 se autofecundó para obtener una población F2 que se segrega para el locus msh1. Se seleccionó la progenie F2 de MSH1/MSH1 de la población F2 y se autofecundó para obtener la progenie F3 de MSH1/MSH1 del padre F2 MSH1/MSH1 seleccionado.

Para evaluar la variación fenotípica en las líneas de *Arabidopsis* MSH1/MSH1 F3 seleccionadas, se promediaron mediciones de cuatro plantas cada una de la línea de progenie F3 Col-0 de tipo silvestre y la seleccionada tal como se muestra en la Tabla 3. La biomasa fresca era tejido de hojas por encima del suelo total, el diámetro de base era el diámetro de la zona de transición raíz-tallo, y el diámetro del tallo era el diámetro del tallo floral. Cada parámetro mostró un aumento del 20-24% en la línea F3 de progenie seleccionada, incluso aunque la progenie de las dos poblaciones de plantas (es decir Col-O y MSH1/MSH1 F3) deba ser genéticamente idéntica. Se seleccionaron plantas de cada grupo para representar la misma fase de desarrollo y el mismo número de hojas (promedio de 48 hojas por planta en cada grupo). Los datos de la Tabla 3 y las plantas mostradas en la Figura 7 representan una población F3 seleccionada. Otras poblaciones F3 seleccionadas (no mostradas) demostraron un crecimiento promedio mostrado uniformemente en relación con el tipo silvestre.

Un cruce de progenie F3 de MSH1/MSH1 F3 derivada del cruce Col-0 msh1 x Col-0wt mostró un crecimiento marcadamente potenciado tal como se muestra en la Figura 7 y la Tabla 3. Tal crecimiento potenciado marcado se asemeja a un vigor híbrido porque la progenie F3 del cruce presenta un crecimiento aumentado en relación con el germoplasma parental de Col-O. Sin embargo, estos experimentos pueden distinguirse de casos en los que se obtiene vigor híbrido cruzando las líneas parentales de dos antecedentes genético heteróticos distintos dado que las dos líneas parentales usadas en este caso tenían ambas antecedentes genéticos de ecotipo Columbia y diferían solo en presencia de la mutación msh1 recesiva en uno de los padres de ecotipo Columbia.

Tabla 3. Evaluación de la variación fenotípica en *Arabidopsis*.

	Col-0 (padre de tipo silvestre)	msh1 x Col-0 F3 (progenie positiva para MSH1)
Biomasa fresca (g)	4,9	6,3
Diámetro de base (mm)	2,2	2,9
Diámetro de tallo (mm)	1,6	2,0

Ejemplo 5. Variación de la altura de la planta, el peso de la panícula y el rendimiento de grano en plantas de sorgo individuales en una población F2 obtenida de un cruce con sorgo en el que se ha suprimido MSH1

Se sometieron a ensayo poblaciones F2 de plantas de sorgo derivadas de plantas de sorgo Tx430 parentales que se habían sometido a supresión de MSH1 tal como se describe en la Figura 6 y el Ejemplo 3 para la variación en altura de planta (Figura 8), el peso de panícula (Figura 9) y el rendimiento de grano (Figura 10) comparando los valores para plantas individual en la población.

Se observó una variación significativa entre plantas individuales dentro de la población F2. Más específicamente, ciertas líneas de sorgo presentaron distribuciones bifásicas distintivas de plantas dentro de las poblaciones F2 con respecto a estos rasgos. Por ejemplo, la población F2 de la línea de sorgo GAll-11 presentó una subpoblación de plantas con una altura de planta entre aproximadamente 105 y 125 cm y otra subpoblación de plantas con una altura de planta de entre aproximadamente 185 y 215 cm. Estas subpoblaciones se representaron mediante "picos" en el gráfico de la Figura 8. También se observaron distribuciones de subpoblaciones similares para las líneas de sorgo GAll-15, GAll-28 y GAll-24 en el gráfico de la Figura 8. Para las poblaciones F2 de GAll-11, GAll-15, GAll-28 y GAll-24, un conjunto de subpoblaciones o bien se solapó o bien tenía un valor menor que el de las alturas de planta del control TA430 de tipo silvestre, mientras que otra subpoblación tenía un valor que era claramente mayor que el de las plantas control PA430 de tipo silvestre (Figura 8). Subpoblaciones y/o plantas individuales en las poblaciones F2 de GAll-11, GAll-15, GAll-28 y GAll-24 también presentaron pesos de panícula y rendimientos de grano que o bien se solapaban o bien tenían un valor menor que el de las alturas de planta del control TA430 de tipo silvestre, mientras que otras subpoblaciones o plantas tenían un valor que era claramente mayor que el de las plantas control PA430 de tipo silvestre (Figuras 9 y 10).

Se concluye que se observan diferencias en altura de planta, peso de panícula y rendimiento de grano de sorgo entre: a) distintas subpoblaciones de plantas dentro de una población F2 dada de plantas de sorgo de una línea de sorgo dada; y/o: b) distintas subpoblaciones de plantas dentro de una población F2 dada de plantas de sorgo de una

línea de sorgo dada y la línea control parental de tipo silvestre. Se contempla adicionalmente que aquellas subpoblaciones de plantas de sorgo que presentan aumentos deseables en altura de planta, número de panículas y/o rendimiento de grano pueden comprender ciertas diferencias en su estado de metilación de ADN cromosómico, su secuencia de ADN cromosómico, modificaciones postraduccionales de una proteína histona asociada con un locus cromosómico, o cualquier combinación de los mismos que o bien contribuyen directamente a tales rasgos útiles (es decir tiene una relación causal directa con el rasgo útil) o bien están asociados con cualquier unión genética o epigenética a loci que contribuyen directamente a tales rasgos deseables.

Ejemplo 6. Caracterización de perfiles de ARN pequeños y el estado de metilación de ADN en plantas que presentan rasgos útiles asociados con la supresión de MSH1

Puede usarse una comparación de perfiles de ARN pequeños y estados de metilación de ADN en plantas de referencia que no presentan un fenotipo útil y plantas de prueba que comprenden un locus cromosómico alterado asociado con un rasgo útil para identificar loci cromosómicos alterados. En este ejemplo se proporcionan métodos para hacer tales comparaciones que pueden generalizarse para una variedad de plantas.

En una realización a modo de ejemplo particular, se comparan los perfiles de ARN pequeños y estados de metilación de ADN de diversos loci cromosómicos en: a) distintas subpoblaciones de plantas dentro de una población F2 dada de plantas de sorgo de una línea de sorgo dada; y/o: b) distintas subpoblaciones de plantas dentro de una población F2 dada de plantas de sorgo de una línea de sorgo dada y la línea control parental de tipo silvestre. El objetivo de estas comparaciones es identificar diferencias en los perfiles de ARN pequeños y/o la metilación de ciertos loci cromosómicos de ADN entre aquellas plantas de sorgo que presentan los rasgos útiles y plantas de sorgo que no presentan los rasgos útiles. Tales diferencias pueden usarse entonces para identificar ARNp o loci cromosómicos que o bien contribuyen directamente a tales rasgos útiles o bien están asociados mediante cualquier unión genética o a través de un mecanismo epigenético con loci que contribuyen directamente a tales rasgos útiles. Las plantas de sorgo que se examinarán pueden incluir plantas de tipo silvestre, plantas de distintas subpoblaciones y/o plantas individuales en las poblaciones F2 de líneas de sorgo GAIL-11, GAIL-15, GAIL-28 y GAIL-24 u otras que presentan alturas de planta, pesos de panícula y/o rendimientos de grano que o bien se solapan o bien tienen un valor menor que el de las alturas de planta del control TA430 de tipo silvestre así como plantas de distintas subpoblaciones y/o plantas individuales en las poblaciones F2 de líneas de sorgo GAIL-11, GAIL-15, GAIL-28 y GAIL-24 u otras que presentan alturas de planta, pesos de panícula y/o rendimientos de grano que son claramente mayores que los de las plantas control TA430 de tipo silvestre. Tales plantas y tales subpoblaciones se describen a modo de ejemplo en el Ejemplo 5 anterior y en las Figuras 8, 9, y 10.

Se determinan los perfiles de ARN pequeño (ARNp) de sorgo de tipo silvestre (Tx430), sorgo F1 y plantas de sorgo F2 seleccionadas derivadas de diferentes subpoblaciones. Las subpoblaciones o plantas de sorgo que se examinarán pueden incluir plantas de tipo silvestre, y subpoblaciones y/o plantas individuales en las poblaciones F2 de sorgo GAIL-11, GAIL-15, GAIL-28 y GAIL-24 u otras tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, ciertas poblaciones de sorgo sometidas a supresión de MSH1 pueden presentar pesos de panícula y rendimientos de grano que o bien se solapan o bien tienen un valor menor que el de las altura de planta de control TA430 de tipo silvestre mientras que otras subpoblaciones o plantas de sorgo pueden tener un valor que era claramente mayor que el de las plantas control TA430 de tipo silvestre tal como se muestra en las Figuras 9 y 10 pueden someterse a secuenciación profunda para identificar los tipos (análisis cualitativo) y cantidades relativas (análisis cuantitativo) de ARNps presente en estas diversas líneas de planta. Tales análisis cualitativos y cuantitativos pueden usarse entonces para establecer correlaciones entre la presencia o ausencia de un fenotipo dado y la presencia, ausencia o abundancia relativa de un ARNp dado.

Las técnicas de secuenciación profunda para caracterizar poblaciones de ARNp pueden determinarse tal como se describe mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos por Zhou *et al.* PLoS One. 2010; 5(12): e15224; o Glazov *et al.* PLoS One. 27 de julio de 2009;4(7):e6349. En determinadas realizaciones, tres replicaciones biológicas pueden secuenciarse para cada muestra y pueden prepararse bibliotecas de ARNp y secuenciarse según un protocolo Illumina™. Resumiendo, pueden aislarse ARNps de bajo peso molecular (17-27 nt de longitud) de ARN total mediante fraccionamiento por tamaño. Tras la unión de adaptadores 3' y 5' a ARNps, se realizará una RT-PCR para construir la biblioteca de ARNp. La biblioteca se depurará y se validará según el protocolo Illumina™ y puede realizarse una secuenciación profunda basada en Illumina™ de la biblioteca.

Tras la eliminación de las secuencias comunes (ARNr, ARNt, ARNnp y ARNnop), las secuencias de ARNp restantes se someterán a varios análisis. El primer análisis es para evaluar la distribución de ARNps en el genoma, con la expectativa de identificar una distribución de ARNp alterada mediante la alteración de la función MSH1. El análisis del agrupamiento genómico se usará para examinar la distribución de loci que generan ARNp en el genoma. Un agrupamiento de ARNp se definirá como grupo de ARNps, en el que cada ARN pequeño está <100 nt de su vecino más cercano tal como se describe en Johnson *et al.* (2009). Basándose en esta definición, los ARNps en los extremos de un agrupamiento están > 100 nt del siguiente ARN pequeño más próximo fuera del agrupamiento (Johnson *et al.*, 2009). La expresión diferencial de firmas de ARNp entre diferentes líneas de plantas puede compararse para conocer su relación con la función MSH1 alterada. Esto se llevará a cabo comparando la abundancia relativa de miARN o ARNip en cada biblioteca derivada de cada línea de planta. Puede usarse el

método SAMseq para realizar el análisis estadístico de niveles significativos de expresión diferencial. Pueden seleccionarse varios ARNps que presentan patrones de expresión diferencial en un análisis por secuenciación profunda para su validación usando un análisis de transferencia en gel de ARN.

- 5 Para obtener información sobre la relación entre alteraciones en la metilación de ADN y los niveles de ARNps en diversas muestras, pueden mapearse regiones que contienen metilación de ADN (descrito más adelante) frente al ARNps obtenido de su estudio y otras bases de datos disponibles públicamente, para identificar regiones que contienen metilación de ADN que se seleccionan potencialmente como diana por ARNp.
- 10 Pueden compararse los perfiles de metilación de ADN y ARNp obtenidos de diferentes líneas para determinar si las alteraciones en el contenido de metilación de ADN se correlacionan con cambios en la abundancia de ARNp en diversas muestras de planta que presentan diferentes fenotipos inducidos por MSH-1. Una preocupación en tales análisis es que los ARNps pueden ser demasiado cortos para detectarlos. Los ARNps se generan normalmente a partir de transcritos mucho más largos en plantas. Por tanto, pueden expandirse los análisis de metilación de ADN a 15 500 pb a cada lado del locus cromosómico que contiene ARNps tal como se notifica (Wang *et al.*, 2009). Este análisis podría indicar si la metilación de ADN puede haberse inducido potencialmente por ARNps. Tales estudios pueden usarse para identificar alteraciones detectables en la población de ARNp que alteran los patrones de metilación del genoma, lo que puede resultar de la supresión de MSH1. Cualquiera de los ARNps y/o las regiones genómicas identificadas en tales estudios puede entonces suprimirse y/o regularse por incremento usando enfoques 20 transgénico u otros a base de alteración genómica para obtener fenotipos deseables que pueden resultar de la supresión de MSH1.

También puede determinarse la asociación de fenotipos útiles inducidos mediante la supresión de MSH1 en diversas plantas y líneas de plantas con alteraciones cromosómicas mediante la detección de metilo C en experimentos de 25 secuenciación por bisulfito de genoma completo. El método de secuenciación profunda por bisulfito genómico (Lister 2009) puede usarse para obtener una vista de genoma completo de todas las citosinas metiladas posibles en los genomas de plantas sometidas a supresión de MSH1 que incluyen, pero no se limitan a, esas plantas que presentan fenotipos deseables o fenotipos no deseables, y plantas control adecuadas que incluyen, pero no se limitan a, líneas parentales que no se han sometido a supresión de MSH1. En un método a modo de ejemplo, pueden aislarse 30 aproximadamente cinco microgramos de ADN genómico y añadirseles de manera conocida 25 nanogramos de ADN lambda no metilado que sirve como control interno para la eficacia de conversión por bisulfito de nucleótidos de citosina no metilados a uracilos. El ADN puede sonicarse hasta una longitud promedio de aproximadamente 300 pb y puede construirse una biblioteca de ADN. Puede usarse un método a modo de ejemplo que sigue un protocolo Illumina™ Paired End que comprende modificaciones en las que el cóctel de reparación de extremos no contiene 35 dCTP y los adaptadores contienen citosinas metiladas (Illumina™). La conversión por bisulfito del ADN ligado a adaptador puede ir seguida de ciclos limitados de PCR con una ADN polimerasa PfuTurboCx insensible al uracilo (Stratagene™). Se secuenciarán productos de 200-300 pb aislados por gel hasta una longitud de 110 bases en el sistema Illumina™ GA II. Se usarán el análisis de imágenes Illumina™ convencional, asignación de bases y un tubo de procesamiento sed para obtener las secuencias procesadas iniciales. En determinadas realizaciones, solo 40 aquellas secuencias que pasen los filtros Illumina™ internos (pureza > 0,6) se almacenarán junto con las puntuaciones de calidad de secuencia similar a PHRED en archivos FastQ. Las lecturas de secuencias se cortarán hasta antes de la primera aparición de descripción de proyecto 12 de una base de baja calidad (puntuación PHRED <2). Cualquier base de citosina restante en las secuencias puede convertirse en timina y retenerse la posición genómica de esta en un archivo de cobertura de metilo C. En determinadas realizaciones pueden generarse dos 45 genomas de referencia. En el primer genoma de referencia, correspondiente a la hebra "Watson", las citosinas pueden convertirse en timinas. En el segundo, correspondiente a la hebra Crick, pueden convertirse guaninas en adeninas. La misma conversión puede realizarse para el lambda ADN de control interno, que se analizarán como genomas de referencia independientes para la eficacia de conversión de citosinas no metiladas. Las secuencias Illumina estarán alineadas con los dos genomas de referencia con Bowtie (Langmead *et al.*, 2009). En determinadas 50 realizaciones, solo se anotarán lecturas de secuenciación con posiciones de partida únicas (se descartará una segunda secuencia que empiece en la misma posición para minimizar una distorsión por amplificación por PCR desigual de los datos). Para el control interno Lambda se espera una tasa de conversión de citosinas no metiladas a timinas de más del 99% y se confirmará en estudios piloto y un análisis de un solo carril de cada biblioteca (antes de la secuenciación adicional de la biblioteca), tal como se determina usando las secuencias control de ADN lambda. 55 La aparición de citosinas en el ADN lambda tratado por bisulfito puede calcularse en función de la cobertura de secuencia (cada lectura de secuencia cuenta como cobertura de 1). Se establecerán valores umbral para tener un valor <0,01 para una citosina que se produce por un error de secuenciación o una conversión incompleta a uracilo.

Pueden usarse dos replicaciones biológicas para cada tipo de genoma analizado. La cobertura puede ser de 10 x 60 para cada hebra. Esto debería ser una cobertura suficiente para comparar las replicaciones biológicas individuales en la mayoría de las posiciones para variación individual. Los datos de secuencia combinados de los dos individuos se combinarán para una cobertura 20x, de cada hebra cuando se comparan diferentes muestras de genotipo. Las replicaciones biológicas individuales pueden usarse para establecer umbrales porcentuales de cobertura y metilación para tener una tasa de descubrimiento falso (FDR) de < 0,05 para diferencias en posición específicas. 65 Regiones seleccionadas que muestran diferencias de metilo C pueden analizarse mediante el método de clonación por PCR por bisulfito tradicional para validar los datos de genoma completo y predicciones de FDR.

Ejemplo 7. Análisis cuantitativo de metilación y variación fenotípica en respuesta a la supresión de MSH1

Es posible aprovechar la variación fenotípica cuantitativa que surge en una población F2 derivada cruzando una variante fenotípica derivada de ARNi de MSH1 x tipo silvestre. Pueden determinarse la heredabilidad y la variación cuantitativa en diversas poblaciones de sorgo sometidas a supresión de MSH1 y plantas de sorgo control descritas en el presente documento para identificar alteraciones cromosómicas que confieren rasgos útiles. En determinadas realizaciones, estos métodos pueden conllevar el uso de polimorfismos de SNP de ADN derivado por bisulfito identificados mediante experimentos de secuenciación al azar de sorgo en el desarrollo y la detección de SNP. El genoma de sorgo tiene aproximadamente 1628 cM, y se buscará una densidad de marcador de SNP de aproximadamente 1 SNP/10 cM (centimorgans). Por tanto, se seleccionarán 163 sitios de Me-C para el análisis QTL basándose en su metilación diferencial en el análisis de genoma completo de hasta cinco tipos de muestras (es decir (1) tipo silvestre, (2) plantas inactivadas para MSH1 transgénicas que muestran una tasa de crecimiento reducida drásticamente y una floración retardada, (3) segregantes no transgénicos que conservan el fenotipo de crecimiento alterado, (4) plantas F1 (tal como se muestra en la Figura (6) y (5) y plantas F2 seleccionadas que presentan variación cuantitativa (Figura 6)), y para un espaciado de 10-cM regular por todo el genoma de sorgo.

El ADN de 200 individuos F2 puede tratarse con bisulfito para crear un C/T SNP en el producto de PCR posterior. La razón de C/T dependerá del grado de Me-C en cada sitio de metilación. Se usarán cebadores de PCR diseñados para las secuencias agotadas con respecto a C para amplificar regiones de SNP de Me-C seleccionadas como diana en el ADN tratado con bisulfito. El polimorfismo de C/T se detectará en un sistema de PCR LightCycler 480 usando Hybprobes™ (Roche, Indianápolis, IN, EE. UU.). Hybprobes™ usan transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre sondas adyacentes hibridadas con el producto de PCR y fusión diferencial para determinar la frecuencia de C/T en la posición de SNP de Me-C. Se usará el software de diseño de sondas LightCycler™ (Roche) para diseñar las HybProbes, con el polimorfismo C/T en el centro de la sonda de sensor. La razón de cebadores de PCR para obtener una PCR asimétrica óptima de la hebra de Me-C para hibridación con las HybProbes™ se determinará experimentalmente para cada SNP.

Análisis de heredabilidad. Hasta aproximadamente doscientas o más familias F3 pueden desarrollarse en sorgo. Puede extraerse ADN de cada individuo F2 dando lugar a cada familia F3. Puede realizarse un ensayo de campo replicado de las familias F3 para realizar el análisis de heredabilidad de la variación epigenética putativa generada por los efectos transgeneracionales del transgén de ARNi MSH1 (es decir supresión de MSH1). For cada especie se dispondrán filas de tres metros individuales en un diseño de bloque completo aleatorizado con dos replicaciones. Se harán crecer las poblaciones en campos experimentales.

Análisis QTL. Junto con los datos de marcador en los 200 individuos F2, se usarán los datos fenotípicos en un análisis QTL para ubicar regiones genómicas afectadas por MSH1 en generaciones previas que están generando la variación observada para el rendimiento de simiente y biomasa total. Se construirá un mapa genético usando datos de segregación sobre cambios de sitios de metilación, seguido de mapeo de intervalos compuestos convencional.

Ejemplo 8. Uso de la supresión de Msh1 para alterar el epigenoma para producir cambios drásticos y hereditarios en el crecimiento de la planta

Se usó la supresión de Msh1 para inducir una variación fenotípica y epigenética, y para seleccionar fenotipos derivados en la especie de cultivo *Sorghum bicolor* (L.) Moench y la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

La Figura 11 muestra el transgén y el proceso de cruce que se usó en este estudio tanto para *Arabidopsis* como para sorgo. En sorgo, todos los experimentos se realizaron con la línea consanguínea Tx430 (F.R. Miller, Crop Sci. 24, 1224, 1984), mientras que los experimentos con *Arabidopsis* se llevaron a cabo en el ecotipo consanguíneo Columbia-0. Las plantas de sorgo MSH1-dr que ya no contienen el transgén MSH1-ARNi se restauran a niveles de transcrito de MSH1 normales; no obstante, mantienen el fenotipo de crecimiento alterado a través de múltiples generaciones de autopolinización. Cuando se cruza recíprocamente con la línea Tx430 consanguínea de tipo silvestre, la progenie se restaura a un fenotipo normal. La progenie F1 derivada, designada como MSH1-epiF1, ya no muestra el fenotipo con enanismo, macollamiento y floración tardía. De hecho, las plantas crecen más altas y generalmente producen más simiente que el tipo silvestre (Figura 11A). La autopolinización de las plantas MSH1-epiF1 produjo una población F2 (MSH1-epiF2) que era sorprendentemente variable en el fenotipo de planta, pero no mostraba ningún fenotipo MSH1-dr (Figura 11B-D). Un proporción de familias MSH1-epiF3 que se hacen crecer en invernadero sí mostró el fenotipo MSH1-dr a una frecuencia de aproximadamente el 8% (tabla 4), y no apareció fenotipo de enanismo en las líneas epi-F4.

Tabla 4. Frecuencia del fenotipo MSH1-dr (8,4%) en familias epi-F3 derivadas de Tx430 MSH1-dr x Tx430 de sorgo y que se hacen crecer en invernadero. Las familias epi-F4 derivadas no mostraron ninguna evidencia de fenotipo MSH1-dr (no mostrado).

Familia F3	N	Altura de planta media (cm)	Alta o de tipo silvestre	Enana
1	10	160	10	0
2	9	208	9	0
3	10	167	10	0
4	10	189	10	0
5	8	186	7	1
6	10	114	10	0
7	9	203	9	0
8	7	102	6	1
9	2	107	2	0
10	9	116	9	0
11	4	89	3	1
12	6	118	6	0
13	10	187	10	0
14	8	150	6	2
15	7	81	3	4
16	10	143	7	3
17	5	122	5	0
18	10	137	9	1
19	10	98	10	0
19	154		141	13

5 Las plantas F2, y poblaciones posteriores derivadas mediante autopolinización, mostraban una variación para rasgos de rendimiento agronómicos, incluyendo arquitectura de panícula y planta, tiempo y número de macollamientos, altura de planta y biomasa por encima del suelo, y componentes de rendimiento de panícula y peso de simiente (tabla 5 para altura de planta y rendimiento de grano). De manera similar se observaron cambios drásticos en el crecimiento en poblaciones de *Arabidopsis* derivadas de cruzar el mutante *msh1* con el tipo silvestre, seguido de selección para las plantas F2 MSH1/MSH1 homocigóticas y autopolinización en serie (Figura 11F-H).

10 Poblaciones MSH1-epiF2, MSH1-epiF3, y MSH1-epiF4 de sorgo que se han hecho crecer en condiciones de campo en 2010 y 2011 permitieron evaluaciones a mayor escala de cambios de crecimiento de la planta (Tablas 5, 6, 7). Se desarrollaron distribuciones fenotípicas a partir de resultados de dos experimentos de campo de sorgo, demostrando patrones en MSH1-epiF2 que se aproximan a la bimodalidad (Figura 12). Todos los rasgos mostraron patrones de variación cuantitativos. Se sometieron a prueba las progenies F3 y F4 en condiciones tanto de campo como de invernadero, mostrando heredabilidad para la altura de planta con una uniformidad creciente entre plantas de cada generación, y respuesta a la selección para rendimiento de grano, aunque este rasgo se sometió a una selección menos rigurosa durante el crecimiento en invernadero (Figura 13). Estos resultados sugieren un alto grado de heredabilidad y respuesta de selección para la variación observada.

15 El desarrollo de plantas alterado en líneas mutantes MSH1-dr de sorgo y *msh1* de *Arabidopsis*, incluyendo la variación en la tasa de crecimiento, ramificación, maduración y floración, estaba condicionado por cambios de cloroplastos (véase el siguiente Ejemplo 9). Resultaba de interés evaluar la relación de la variación de MSH1-epiF2 con estas influencias organulares. Las líneas de hemicomplementación MSH1 de *Arabidopsis*, derivadas introduciendo un transgén MSH1 dirigido como diana a mitocondrias frente a cloroplastos en la línea mutante *msh1* (Y.-Z. Xu *et al.* Plant Cell 239:3428, 2011) distinguen entre contribuciones de mitocondrias y cloroplastos al fenómeno. Se cruzaron líneas de hemicomplementación tanto de mitocondrias como de cloroplastos como hembras con el tipo silvestre (Col-0) para producir progenie F1 y F2. Las plantas F1 de cruces con la línea complementada con cloroplastos produjeron fenotipos similares al tipo silvestre, aunque aproximadamente el 25% de las plantas F1 mostraron una rizadura de las hojas alterada y una floración retardada (Figura 16). Este fenotipo de rizadura puede ser una consecuencia de la sobreexpresión de MSH1, dado que las plantas F1 contienen tanto el alelo MSH1 de tipo silvestre como el transgén. El fenotipo se asemeja a los efectos de la regulación de la ruta de ácido salicílico alterado, un proceso regulados epigenéticamente (T.L.Stokes *et al.* Genes Dev 16, 171, 2002). La progenie F1 de

cruces con la línea complementada con mitocondrias mostró una variación fenotípica en el crecimiento de la planta, mostrando más del 30% de las plantas un crecimiento potenciado, un diámetro de roseta mayor, tallos florales más gruesos y un tiempo de floración más temprano, similar a los fenotipos MSH1-epiF3 (Figuras 14A y 17; Tabla 8). Estos resultados se confirmaron adicionalmente en las poblaciones F2 complementadas con mitocondrias frente a cloroplastos (Figura 14B-E), y sugieren que los cambios de crecimiento potenciados por MSH1-epiF3 derivan de la restauración de la función MSH1 en plantas que han experimentado el fenómeno de reprogramación de desarrollo de MSH1-dr.

Se investigaron plantas de tipo silvestre de *Arabidopsis* y MSH1-epiF3, ambas con antecedentes Col-0, para determinar la evidencia de cambios de metiloma que pueden acompañar a fenotipos derivados de MSH1 hereditarios. Los experimentos usaron ADN genómico tratado con bisulfito de sodio y análisis de siguiente secuencia génica en todo el genoma (Lister *et al.* Cell 133, 523, 2008). Los cambios de metilación fueron extensos, implicando las posiciones metiladas de manera diferencial predominantemente sitios CpG, con más de 91.000 posiciones metiladas de manera diferencial en más de 1700 regiones (tabla 11, Figura 15A). El patrón de cambios de metilación era consistente con la heredabilidad observada de fenotipos alterados, asemejándose la gran proporción de cambios en las regiones de codificación génica del genoma a los datos de estudios de variación epigenética natural (C. Becker *et al.* Nature 480, 245,2011; R.J. Schmitz *et al.* Science 334, 369, 2011). La comparación de los patrones diferenciales de no metilación en líneas de tipo silvestre y MSH1-epiF3 en este estudio frente a patrones notificados por un estudio de *Arabidopsis* reciente de variación de metilación natural (C. Becker *et al.* Nature 480, 245,2011), mostró una correspondencia notable de patrón (Figura 15B, línea 2 de MSH1-epiF5), lo que confirma la consistencia del análisis de metilación del genoma de Col-0 entre los dos estudios. Resultaron evidentes diferencias sorprendentes entre los dos estudios para las regiones de los cromosomas enriquecidos para posiciones metiladas de manera diferencial; el análisis de Becker *et al.* de variación natural, mostrado con fines ilustrativos en la Figura 15C, mostró una distribución de metilación diferencial bastante uniforme que abarca cada cromosoma, mientras que las líneas MSH1-epiF3 revelaron patrones irregulares de metilación diferencial que se concentraban en regiones discretas del genoma (Figura 5B, línea roja). Se confirmaron varias DMR que muestran cambios en la metilación mediante amplificación por PCR seleccionada como diana y secuenciación de intervalos de ADN tratado con bisulfito (Figura 18, Tabla 9). A partir de estos resultados se infiere que la variación de desarrollo que acompaña a la alteración de MSH1 implica cambios pronunciados en la arquitectura de metilación de la planta. El patrón de herencia del fenotipo MSH1-dr, que muestra independencia del transgén y la implicación de numerosas rutas de desarrollo, indica también que se produce cambios epigenéticos en las líneas MSH1-dr.

Tabla 5. La mayoría de las familias de epi-línea F₂ de sorgo muestran de manera consistente un aumento estadísticamente significativo en la variación (valor p < 0,05) en la altura de planta y el rendimiento de grano en comparación con el tipo silvestre Tx430. Se recogieron datos de plantas que se hicieron crecer en condiciones de campo en 2010 y 2011

Año	Familia	Altura de la planta				Rendimiento de grano por panícula			
		Media (cm)	Error est. (cm)	Varianza (cm ²)	valor p †	Media (g)	Error est. (g)	Varianza (g ²)	valor p †
2010	Tx430	132,10	2,42	58,54	-	24,19	0,93	27,11	-
2010	msh1-epi11 F2	165,77	8,40	2116,67	<0,001	51,29	3,45	368,88	<0,001
2010	msh1-epi15 F2	135,30	5,02	1182,95	<0,001	33,69	2,47	293,54	<0,001
2010	msh1-epi22 F2	155,96	8,13	1783,50	<0,001	35,84	2,77	290,84	<0,001
2010	msh1-epi24 F2	140,04	3,40	1031,38	<0,05	34,35	1,04	185,51	<0,001
2010	msh1-epi28 F2	140,87	3,61	1130,67	<0,01	23,75	1,58	141,69	<0,001
2011	Tx430	134,50	0,55	64,95	-	45,20	0,89	146,49	-
2011	msh1-epi11 F2	186,57	3,93	1912,00	<0,001	53,96	1,55	272,73	<0,05
2011	msh1-epi15 F2	177,04	2,41	1532,86	<0,001	53,66	0,94	184,36	<0,05
2011	msh1-epi22 F2	180,73	10,62	1691,50	<0,001	56,62	2,59	114,08	NS
2011	msh1-epi24 F2	154,78	1,98	1196,96	<0,001	47,92	1,12	266,97	<0,001
2011	msh1-epi28 F2	156,91	3,57	1238,75	<0,001	47,49	1,27	222,84	<0,05

† valores p basados en la prueba de Levene para la homogeneidad de la varianza en comparación con el tipo silvestre Tx430.

NS = no significativo

Tabla 6. Tres de cinco familias de línea epi-F2 de sorgo medidas para la biomasa seca muestran un aumento estadísticamente significativo en la variación (valor $p < 0,05$) en comparación con el tipo silvestre Tx430. Se recogieron datos de plantas que se hicieron crecer en condiciones de campo en 2011.

Familia	Rendimiento de biomasa seca			
	Media (g)	Error est. (g)	Varianza (g ²)	valor p †
Tx430	53,11	1,94	79,35	-
msh1-epi11 F2	85,49	2,77	99,53	NS
msh1-epi15 F2	75,08	3,24	252,04	<0,05
msh1-epi22 F2	92,33	7,90	311,83	NS
msh1-epi24 F2	68,26	3,54	363,73	<0,001
msh1-epi28 F2	66,93	5,79	503,32	<0,001

† valores p basados en la prueba de Levene para la homogeneidad de la varianza en comparación con el tipo silvestre Tx430.

NS = no significativo

10

Tabla 7. Datos de generación F₄ de sorgo que muestran diferencias significativas (valor $p < 0,05$) para muchas familias epi-F4 en la altura de planta (37 de 39 líneas) y el rendimiento de grano (11 de 39 líneas) en comparación con el tipo silvestre Tx430. Se recogieron datos de plantas que se hicieron crecer en condiciones de campo en 2011.

Línea	Altura de la planta				Rendimiento de grano por panícula			
	Media (cm)	Error est. (cm)	Varianza (cm)	valor p *	Media (g)	Error est. (g)	Desv. est. (g)	valor p *
Tx430	134,45	0,56	8,08	-	45,44	0,88	11,95	-
10,3	135,29	1,42	6,515	NS	40,71	2,17	9,71	NS
12,1	186,24	8,77	47,23	<0,001	44,33	2,73	11,60	NS
12,10	238,85	2,01	9,00	<0,001	51,84	2,68	11,99	NS
12,3	220,00	2,55	11,11	<0,001	54,86	3,15	13,72	NS
14,1	187,20	5,72	25,59	<0,001	56,59	3,50	14,87	<0,05
15,2	222,75	1,76	8,63	<0,001	33,88	1,74	8,52	<0,001
17,2	174,52	6,55	36,49	<0,001	61,25	2,54	11,05	<0,001
17,3	192,54	5,66	27,72	<0,001	47,02	1,74	8,16	NS
2a-9	216,00	4,44	19,34	<0,001	48,12	3,40	14,41	NS
2b-1	217,83	3,41	14,49	<0,001	43,88	4,29	17,69	NS
2b-3	221,24	2,10	8,67	<0,001	54,82	3,94	16,25	NS
2b-4	217,44	2,65	10,60	<0,001	44,75	3,36	12,08	NS
2b-5	231,32	3,46	15,07	<0,001	53,40	3,00	12,70	NS
2b-6	229,90	1,49	6,67	<0,001	50,52	2,43	10,87	NS
2b-8	231,21	1,61	7,89	<0,001	39,95	2,71	13,27	NS
2b-10	207,80	4,01	17,94	<0,001	66,94	3,99	17,84	<0,001
3a-1	226,79	2,74	11,93	<0,001	44,39	3,09	12,73	NS
3a-2	141,10	1,78	7,97	<0,05	46,61	2,61	11,96	NS
3a-6	233,14	1,63	7,48	<0,001	44,35	2,24	10,27	NS
3a-7	190,29	9,58	43,89	<0,001	40,30	3,91	15,15	NS
3b-1	219,44	2,51	10,68	<0,001	41,47	3,69	13,82	NS
3b-2	216,65	2,49	11,12	<0,001	52,14	1,96	8,77	<0,05
3b-3	210,28	3,34	14,17	<0,001	39,99	3,69	11,08	NS
3b-4	207,64	4,72927	22,18	<0,001	51,17	2,27	10,39	NS
3b-7	223,41	2,353125	9,70	<0,001	53,10	3,45	14,22	NS
3b-10	234,14	2,170879	8,12	<0,001	43,04	3,22	9,10	NS
4a-1	213,07	3,164821	11,84	<0,001	60,54	6,29	22,66	<0,01
4a-2	217,67	7,862307	30,45	<0,001	52,33	3,40	10,77	NS
4a-4	225,56	5,02882	21,34	<0,001	52,11	3,58	14,78	NS
4a-7	233,28	2,471809	10,49	<0,001	41,28	2,15	8,87	NS
4a-8	200,31	7,515885	38,32	<0,001	48,04	2,60	11,05	NS
4b-10	133,06	1,403771	5,62	NS	63,96	3,39	13,55	<0,001
5a-1	216,48	4,470243	17,88	<0,001	68,90	4,72	18,28	<0,001
5a-2	219,05	2,415699	11,07	<0,001	43,20	1,64	7,49	NS

5a-3	220,58	2,359566	8,17	<0,001	58,30	2,66	9,58	<0,001
5a-5	214,67	3,178769	13,49	<0,001	52,16	2,60	11,02	NS
5a-6	216,94	3,335935	13,75	<0,001	53,35	2,80	11,21	NS
5a-8	212,90	3,568814	19,55	<0,001	52,74	1,41	7,74	<0,001
5a-9	227,29	2,318808	10,63	<0,001	59,80	3,36	15,38	<0,01

* valores p basados en la prueba de la *t* máxima para comparación múltiples de medias (contrastes de Dunnett) usando la estimación de covarianza consistente heteroscedástica (E. Heberich *et al.* PLoS Onc. 5(3):e9788 (2010)), frente al tipo silvestre Tx430.
NS = no significativo

5 Tabla 8. Análisis de datos de fenotipo de familias F₂ de *Arabidopsis* individuales derivadas cruzando líneas de hemicomplementación x Col-0 de tipo silvestre. SSU-MSH1 se refiere a líneas transformadas con la formada dirigida como diana a plástidos de MSH1; AOX-MSH1 se refiere a líneas que contienen la forma dirigida como diana a mitocondrias del transgén MSH1. En todos los experimentos genéticos que usan hemicomplementación, se confirmó la presencia del transgén con un ensayo a base de PCR.

Población	Diámetro de roseta					Biomasa fresca				
	Media (cm)	N	Error est.	Desv. est.	valor p	Media(g)	N	Error est.	Desv. est.	valor p
AOX-MSH1	11,07	36	0,37	2,23	<0,001	8,86	10	0,47	1,33	NS
SSU-MSH1	11,76	18	0,26	1,10	<0,001	10	10	0,55	1,55	NS
Col-0	12,98	42	0,24	1,59	-	9,45	10	0,43	1,36	-
F-2	12,83	21	0,34	1,57	NS	15,07	10	0,66	2,07	<0,001
(AOX-MSH1 x Col-0)F-22	13,82	21	0,42	1,92	<0,10	14,62	10	0,92	2,24	<0,001
(AOX-MSH1xCol-0)F-28	14,85	21	0,31	1,42	<0,001	13,27	10	0,70	1,99	<0,001
(AOX-MSH1xCol-0)F-26	12,82	20	0,25	1,12	NS	10,57	10	0,66	1,74	NS
(SSU-MSH1xCol-0)F-29	11,9	21	0,27	1,25	<0,001	10,5	10	0,45	1,19	NS

Los valores p se basan en la comparación de la prueba de la *t* de Student de dos colas con Col-0
NS = no significativo

10

Tabla 9. Datos de metilación diferencial de muestras para cuatro DMR, derivadas mediante análisis a base de PCR de ADN tratado con bisulfito de líneas MSH1-epiF3 y Col-0 de tipo silvestre de *Arabidopsis*.

AGI	Gen	Tamaño de región (pb)	N.º DMP en la región	Sitio	% de metilación en Col-0	% de metilación en F3
AT5G67120	Proteína de la superfamilia RING/U-box	200	8	1	20%	86%
				2	30%	86%
				3	20%	100%
				4	30%	100%
				5	30%	100%
				6	30%	100%
				7	30%	86%
				8	20%	100%
AT1G20690	Proteína relacionada con SWI-SNF	100	6	1	27%	75%
				2	27%	83%
				3	18%	100%
				4	18%	92%
				5	18%	83%
				6	63%	92%
AT3G2	Diana de					

7150	MIR2 111-5p					
	región 1	200	9	1	0	58%
				2	0	67%
				3	0	92%
				4	0	100%
				5	0	83%
				6	0	92%
				7	0	67%
				8	0	92%
				9	0	75%
	región 2	250	17	1	0	100%
				2	0	100%
				3	58%	100%
				4	0	100%
				5	0	100%
				6	0	100%
				7	0	100%
				8	0	73%
				9	8%	100%
				10	8%	82%
				11	0	82%
				12	8%	100%
				13	0	91%
				14	0	82%
				15	0	82%
				16	0	73%
				17	0	91%

Tabla 10. Cebadores usados en el estudio

<i>Para la secuenciación por bisulfito:</i>	
Nombre de cebador	Secuencia (SEQ ID NO:)
AT5G67120RING-F	5'-TTTTTAGGAATTATTGAGTATTATTGA-3' (SEQ ID NO: 17)
AT5G67120RING-R	5'-AAATAAAAATCATACCCACATCCC-3' (SEQ ID NO:18)
AT1G20690SWI-F	5'-TGTTGAATTATTAAGATATTTAAGAT-3' (SEQ ID NO:19)
AT1G20690SWI-R	5'-TCAACCAATAAAAATTACCATCTAC-3' (SEQ ID NO:20)
AT3g271501stMir2-F	5'-TAAGTTTTTTTTAAGAGTTTGTATTTGTAT-3' (SEQ ID NO:21)
AT3g271501stMir2-R	5'-TAAAAATAATCAAAACCTAACTTAC-3' (SEQ ID NO:22)
AT3g271502ndMir2-F	5'-ATTGTTTATTAATGTTTTTTAGTT-3' (SEQ ID NO:23)
AT3g271502ndMir2-R	5'-CTAACCAATTCCCAAACCTTATC-3' (SEQ ID NO:24)
<i>Para el ensayo por PCR de transgén MSH1-ARNi:</i>	
ARNi-F	5'-GTGTA CT CATCTGGATCTGTATTG-3' (SEQ ID NO:25)
ARNi-R	5'-GGTTGAGGAGCCTGAATCTCTGAAC-3' (SEQ ID NO:26)

5

Tabla 11. Análisis de 5-metilcitosina por todo el genoma en plantas Col-0 y MSH1-epiF3 de *Arabidopsis*.

Antecedentes	CpG	CHG	CHH
Mapeado	4.382.312	4.749.451	19.727.351
Metilado	950.806	589.084	1.062.553
DMP	91.150	10.324	1.789
DMR	1.770	93	15

10 Los fenotipos de planta derivados del cruce de las selecciones de MSH1-dr con el tipo silvestre no parecían asemejarse a los notificados de otros tipos de cambios de metilación inducidos, incluso aunque los cambios de

metiloma eran evidentes en las poblaciones resultantes. Poblaciones EpiRIL producidas a partir de cruces que implican el mutante met1 de *Arabidopsis* dan lugar a una variedad de fenotipos variantes (J. Reinders *et al.*, Genes Dev. 23, 939 (2009). Sin embargo, estos estudios anteriores no notifican el vigor potenciado, el tamaño de planta y de tallo marcadamente mayor, o una mayor producción de simiente que lo que se ve con manipulación de MSH1.

5 Los materiales y métodos usados en este ejemplo son tal como se describen a continuación.

Materiales vegetales y condiciones de crecimiento

10 Se obtuvieron líneas mutantes Col-0 y msh1 de *Arabidopsis* del centro de reserva de *Arabidopsis* y se hicieron crecer una mezcla de metro con 12 h de luz solar a 22°C. Se derivaron líneas MSH1-epi cruzando líneas MSH1-dr con plantas de tipo silvestre. Se midieron la biomasa de la planta y el diámetro de roseta de *Arabidopsis* para plantas de 4 semanas de edad. Se midió el tiempo de floración de *Arabidopsis* como la fecha de la primera aparición de capullo de flor visible. Para cruces con hemicomplementación, se cruzaron líneas homocigóticas complementadas con mitocondrias (AOX-MSH1) y plástidos (SSU-MSH1) con plantas de tipo silvestre Columbia-0. Cada planta F1 se genotipó para el transgén y el alelo MSH1 de tipo silvestre y se recogieron por separado. Tres familias F2 de AOX-MSH1 x Col-0 y dos familias F2 de SSU-MSH1 x Col-0 se evaluaron para determinar parámetros de crecimiento. 15 Todas las familias se hicieron crecer en las mismas condiciones, y se midieron la biomasa, el diámetro de roseta y el tiempo de floración. Se usó la prueba de la t de Student de dos colas para calcular los valores p.

20 El germoplasma de sorgo usado en estos experimentos se derivó de Tx430, una línea de sorgo consanguínea (Miller, 1984). Se derivaron varios hermanos de sorgo T3 de una única planta MSH1-dr, que se hicieron crecer en condiciones de invernadero y se designaron como GAI11-GAI30. Se confirmó que cada una de las líneas eran transgenes nulos. Seis de ellos, GAI11, GAI15, GAI22, GAI24, GAI25 y GAI28 se usaron como hembras en los cruces con Tx430 consanguíneo de tipo silvestre para derivar simiente F1. Tres plantas adicionales, GAI22, GAI23 y GAI27, se usaron como machos en cruces recíprocos. La temperatura de día en el invernadero era de 79 a 83°F, y de noche era de 69 a 73°F. Las plantas se hicieron crecer con una duración de día corta (10 h).

25 Se hicieron crecer progenies F1 en las mismas condiciones de invernadero, con progenies que oscilan en tamaño entre 5-19 individuos. Las progenies T4 derivadas se hicieron crecer a partir de las seis plantas msh1-dr maternas usadas para derivar F1 (GAI11, GAI15, GAI22, GAI24, GAI25, y GAI28), con poblaciones que oscilan en tamaño entre 15-19 individuos. La simiente autopolinizada de cada planta F1 se recogió individualmente para derivar las familias F2 correspondientes

35 Experimentos de campo

Durante los veranos de 2010 y 2011, se hicieron crecer familias F2 en dos experimentos de campo establecidos en condiciones de secano en la estación de experimentos Havelock de la Universidad de Nebraska en Lincoln. Los experimentos se dispusieron en un diseño de bloques incompletos, consistiendo el experimento de 2010 en una 40 replicación con 15 bloques y 30 entradas por bloque (red alfa de 30 x 15). Se plantaron líneas individuales en un único plano de una panícula por fila, con un único diagrama de filas de 5 m de longitud y 0,75 m de espacio entre filas. La simiente F3 se recogió de plantas individuales.

45 El experimento de 2011 comprendía siete bloques de 28 entradas cada uno (red alfa de 28 x 7), con dos repeticiones fertilizadas con nitrógeno complementario a una dosificación de 100 kg/ha. Se seleccionaron cuarenta y ocho muestras del experimento de 2010 para componer la F3. Estas muestras se derivaron de los seis cruces originales e incluyeron valores de rendimiento de grano F2 altos y bajos. Además, se seccionó un subgrupo que se hizo crecer en invernadero de 17 F3 muestras, basado en el peso seco de panícula, para derivar la simiente F4. Por tanto, el experimento de campo de 2011 comprendía 48, 77 y 42 entradas que correspondían a las generaciones F2, 50 F3 y F4, respectivamente, con Tx430 de tipo silvestre como control.

Evaluación fenotípica de sorgo

55 En los experimentos de campo de 2010 y 2011, los rasgos fenotípicos de sorgo registrados incluyeron la altura de planta (PH), en cm desde el suelo hasta la punta de la panícula, la longitud de panícula (PL), en cm desde la base de la panícula hasta la punta, el peso fresco y seco de panícula (FPW y DPW) (g), el rendimiento de biomasa fresca y seca (FBY y DBY) (g), y el rendimiento de grano neto (NGY) (g). El tamaño de muestra para PH, PL, FPW, DPW y NGY varió de cinco a diez plantas de fila interna, aleatorias, por fila. Se embolsaron cabezas bien conformadas, sanas, antes de la antesis para la autofecundación, y se recogieron tras la madurez fisiológica, cuando se midió 60 FPW. Las muestras se secaron a 80°F durante 30 días antes de medir DPW y NGY. Las muestras de biomasa consistían en una muestra de tres plantas, embolsadas y pesadas tras el corte para obtener FBW. Las plantas eran selecciones de fila interna, aleatorias, y las muestras se secaron completamente a 160°F a lo largo de 15 días para DBW.

65

Ensayo de PCR para el transgén de ARNi

El ensayo de PCR para la presencia del transgén de MSH1-ARNi en materiales de sorgo usó los cebadores enumerados en la Tabla S7. Las condiciones de reacción eran: 95°C 5 min, 30 ciclos de 95°C 30 s, 55°C 1 min, 72°C 2 min; la extensión final era a 72°C 10 min. Se incluyeron controles positivos y negativos de una línea transgénica confirmada y Tx430 de tipo silvestre, respectivamente.

Construcción y secuenciación de una biblioteca genómica tratada con bisulfito

Se sonicó ADN genómico de *Arabidopsis* (aproximadamente 15 ug) preparado a partir de plantas Col-0 y epi-F3 hasta un intervalo de pico de 200 pb a 600 pb, se purificó con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. El ADN sonicado (aproximadamente 12 ug) se trató con Mung Bean Nuclease (New England Biolabs), se extrajo con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. El ADN genómico tratado con Mung Bean Nuclease (aproximadamente 3 ug) se reparó en los extremos y se adeniló en el extremo 3' con el kit de preparación de muestras de ADN genómico Illumina (Illumina, San Diego CA). El fragmento de ADN adenilado se ligó entonces a adaptadores de metilación (Illumina, San Diego, CA). Entonces se purificaron en columna las muestras y fraccionaron en agarosa. Una fracción de 280 pb a 400 pb se purificó en gel con el kit de purificación en gel QIAquick (Qiagen, Valencia, CA). Otros 3 ug de ADN genómico tratado con Mung Bean Nuclease se usaron para repetir el proceso, y las dos fracciones se combinaron y se sometieron a tratamiento con bisulfito de sodio con el kit MethylEasy Xceed (Human Genetic Signatures Pty Ltd, North Ryde, Australia) según las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo tres enriquecimientos por PCR de bibliotecas independientes con 10 ul de un total de 30 ul ADN tratado con bisulfito como plantilla de entrada. La mezcla de reacción de PCR era 10 ul de ADN, 5 ul de tampón 10x pfuTurbo Cx, 0,7 ul de cebador PE1.0, 0,7 ul de cebador PE2.0, 0,5 ul de dNTP (25 mM), 1 ul de ADN polimerasa PfuTurbo Cx Hotstart (Stratagene, Santa Clara, CA), y agua hasta un volumen total de 50 ul. Los parámetros de PCR eran 95°C durante 2 min, seguido de 12 ciclos de 95°C 30 s, 65°C 30 s y 72°C 1 min, entonces 72°C durante 5 min. El producto de PCR se purificó en columna y se combinó un volumen igual de cada reacción de PCR hasta una concentración final de 10 nM.

Las bibliotecas se sometieron a secuenciación de ADN en el Illumina Genome Analyzer II con tres kits de secuenciación TrueSeq de 36 ciclos v5 para leer 116 nucleótidos de secuencia desde un único extremo de cada inserto (protocolo V8).

Tratamiento con bisulfito de ADN para el análisis de PCR

Se trató con bisulfito ADN genómico de *Arabidopsis* usando el kit MethylEasy Xceed según las instrucciones del fabricante. Se realizó una PCR usando los cebadores enumerados en la Tabla S7, y se clonaron los productos de PCR (kit de clonación Topo TA, Invitrogen) y se sometieron a secuenciación de ADN. La alineación de secuencias se realizó usando el servidor de alineación de múltiples secuencias T-Coffee (C Notredame, *et al.*, J Mol Biol. 302:205-217, 2000).

Análisis de secuencias de ADN e identificación de citosinas metiladas de manera diferencial (DMC)

Se alinearon archivos Fastq con el genoma de referencia TAIR10 usando Bismark (F Krueger, SR Andrews. Bioinformatics 27:1571-1572 (2011), que también se usó para determinar el estado de metilación de citosinas. Se permitió un apareamiento incorrecto en los primeros 50 nucleótidos de la lectura. Bismark solo conserva lecturas que pueden mapearse exclusivamente en una ubicación en el genoma.

Solo se usaron las posiciones de citosina identificadas como metiladas en al menos dos lecturas para al menos uno de los genotipos y secuenciadas al menos cuatro veces en cada uno de los genotipos para la identificación de DMC. Para estas posiciones de citosina se tabuló el número de lecturas indicando metilación o no metilación para cada genotipo usando R (<http://www.r-project.org>). La prueba exacta de Fisher se llevó a cabo para someter a prueba la metilación diferencial en cada posición. El ajuste para múltiples pruebas a lo largo de todo el genoma se realizó tal como se sugiere en Storey y Tibshirani (JD Storey, R Tibshirani. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:9440-9445 (2003) y se usó una tasa de descubrimiento falso (FDR) de 0,05 para identificar citosinas metiladas de manera diferencial. Se han cargado datos de secuencia de metiloma a Gene Expression Omnibus con el número de registro GSE36783.

Mapeo de DMC para el contexto genómico e identificación de regiones metiladas de manera diferencial (DMR)

Se usó la notación TAIR10 (disponible en el sitio ftp de Internet "ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Genes/TAIR10_genome_release/TAIR10_gff3") para determinar los recuentos para DMC o citosinas metiladas de manera no diferencial en regiones de codificación génica, 5'-UTR, 3'-UTR, intrones, pseudogenes, ARN no codificantes, genes de elementos transponibles y regiones intergénicas. Las regiones intergénicas se definieron como regiones que no corresponden a ninguna característica anotada.

Para cada contexto de metilación (CpG, CHG, CHH), se hizo un barrido del genoma para regiones enriquecidas en DMC usando una ventana de 1 kb en incrementos de 100 pb. Se conservaron las ventanas con al menos cuatro

DMC y las ventanas solapantes se fusionaron para dar regiones. Las regiones con al menos 10 DMC se conservaron con el límite cortado a las DMC más lejanas en la región. Entonces se realizó la prueba exacta de Fisher para cada región fusionando todos los recuentos de lectura metilados/no metilados en todas las posiciones de citosina en la región. Ajustando para todas las regiones sometidas a prueba, la FDR se controla a 0,1.

5

Ejemplo 10. Tabla resumen de secuencias de ácido nucleico y SEQ ID NO

Tabla 12. Secuencias de nucleótidos proporcionadas en la lista de secuencias

Información de registro en Internet	SEQ ID NO	Comentarios
The Arabidopsis Information Resource (TAIR) 1009043787 en Internet (world wide web) en arabidopsis.org	1	Arabidopsis MSH1 ADNc de longitud completa (secuencia de ADN)
The Arabidopsis Information Resource (TAIR) 1009118392 en Internet (world wide web) en arabidopsis.org	2	Proteína MSH1 de <i>Arabidopsis</i> (secuencia de aminoácidos)
NCBIAY856369 en la world wide web en ncbi.nlm.nih.gov/nuccore	3	MSH1 de soja >gi 61696668 gb AY856369.1 <i>Glycine max</i> , proteína de reparación de apareamientos erróneos de ADN (MSH1), cds completa; (secuencia de ADN)
Registro NCBI AY856370 en la world wide web en ncbi.nlm.nih.gov/nuccore	4	MSH1 de <i>Zea mays</i> gi 61696670 gb AY856370.1 <i>Zea mays</i> , proteína de reparación de apareamientos incorrectos de ADN (MSH1), cds completa; (secuencia de ADN)
Registro NCBI AY866434,1 en la world wide web en ncbi.nlm.nih.gov/nuccore	5	MSH1 de tomate >gi 61696672 gb AY866434.1 <i>Lycopersicon esculentum</i> , proteína de reparación de apareamientos erróneos de ADN (MSH1), cds parcial; (secuencia de ADN)
NCBI XM002448093,1 en la world wide web en ncbi.nlm.nih.gov/nuccore	6	Sorghum MSH1 >gi 242076403:1-3180 <i>Sorghum bicolor</i> proteína hipotética; (secuencia de ADN)
Os04g42784,1 Rice Genome Annotation Project - MSU	7	Arroz (<i>Oryza sativa</i>) MSH1 secuencia codificante (secuencia de ADN)
Rice Genome Annotation (Osa1) Release 6.1 Dirección de Internet rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml		
Brachipodium	8	<i>Brachipodium</i>

Información de registro en Internet	SEQ ID NO	Comentarios
<p>Bradi5g15120.1</p> <p>En la world wide web en gramene.org/Brachipodium_distachyon/Gene/Summary?db=core:g=BRAD15G15120;r=5:18500245-18518223;t=BRAD15G15120.1</p>		<p>Región codificante de MSH1 (secuencia de ADN)</p>
<p>GSVIVT01027931001</p> <p>En la world wide web en genoscope.cns.fr/spip/Vitis-vinifera-e.html</p>	9	<p><i>Vitis vinifera</i></p> <p>ADNc de MSH1 (secuencia de ADN)</p>
<p>Cucsa.255860.1</p> <p>En Internet (world wide web) en phytozome.net/</p>	10	<p>Pepino (<i>Cucumis sativa</i>)</p> <p>Secuencia codificante de MSH1; (secuencia de ADN)</p>
<p><i>TOM-CD1F</i></p>	11	<p>Cebador (secuencia de ADN)</p>
<p><i>TOM-CD1R</i></p>	12	<p>Cebador (secuencia de ADN)</p>
<p>At4g02840</p> <p>The Arabidopsis Information Resource (TAIR) en Internet (world wide web) en arabidopsis.org</p>	13	<p>Segundo intrón de la riboproteína nuclear pequeña de <i>Arabidopsis</i> (At4g02840); (secuencia de ADN)</p>
<p>Registro GenBank ES831813.1 en la world wide web en ncbi.nlm.nih.gov/nucest</p>	14	<p>Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>) Secuencia de ADNc parcial de MSH1 (EST); (secuencia de ADN)</p>
<p>Primer zm-msf8</p>	15	<p>Cebador (secuencia de ADN)</p>
<p>Primer zm-msr8</p>	16	<p>Cebador (secuencia de ADN)</p>
<p>AT5G67120RING-F</p>	17	<p>Cebador (secuencia de ADN)</p>
<p>AT5G67120RING-R</p>	18	<p>Cebador (secuencia de ADN)</p>
<p>AT1G20690SWI-F</p>	19	<p>Cebador (secuencia de ADN)</p>
<p>AT1G20690SWI-R</p>	20	<p>Cebador (secuencia de ADN)</p>
<p>AT3g271501stMir2-F</p>	21	<p>Cebador (secuencia de ADN)</p>
<p>AT3g271501stMir2-R</p>	22	<p>Cebador (secuencia de ADN)</p>
<p>AT3g271502ndMir2-F</p>	23	<p>Cebador (secuencia de ADN)</p>
<p>AT3g271502ndMir2-R</p>	24	<p>Cebador (secuencia de ADN)</p>
<p>ARNi-F</p>	25	<p>Cebador (secuencia de ADN)</p>
<p>ARNi-R</p>	26	<p>Cebador (secuencia de ADN)</p>
<p>AT3G27150</p> <p>The Arabidopsis Information Resource (TAIR) en Internet (world wide web) en arabidopsis.org</p>	27	<p>secuencia de ADN</p>
<p>Col0-MIR2-2</p>	28	<p>secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)</p>
<p>Col0-MIR2-3</p>	29	<p>secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)</p>

Información de registro en Internet	SEQ ID NO	Comentarios
Col0-MIR2-4	30	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
Col0-MIR2-5	31	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
Col0-MIR2-6	32	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
Col0-MIR2-10	33	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
Col0-MIR2-11	34	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
Col0-MIR2-12	35	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
Col0-MIR2-26	36	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
Col0-MIR2-27	37	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
Col0-MIR2-28	38	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
Col0-MIR2-29	39	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
F3-Mir2-1	40	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
F3-Mir2-2	41	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
F3-Mir2-4	42	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
F3-Mir2-5	43	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
F3-Mir2-7	44	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
F3-Mir2-11	45	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
F3-Mir2-12	46	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
F3-Mir2-15	47	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
F3-Mir2-16	48	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
F3-Mir2-27	49	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
F3-Mir2-28	50	secuencia de ADN (secuenciación por bisulfito)
Brassica Locus Bra015033 (Msh1 ortholog) Disponibile en Internet (world wide web) en chibba.agtec.uga.edu/duplicación/index/details?lc=Bra015033	51	secuencia de ADN del ortólogo de Msh1 de <i>Brassica rapa</i>
Wheat Locus Q8RVT1 Registro GenBank n.º: AF354709.1 Secuencia codificante parcial Disponibile en Internet (world wide web) en ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF354709	52	homólogo 7 de WHEAT MutS (fragmento)

Referencias

- Abdelnoor, R.V., Christensen, A.C., Mohammed, S., Munoz-Castillo, B., Moriyama, H. y Mackenzie, S.A. 2006. Mitochondrial genome dynamics in plants and animals: Convergent gene fusions of a MutS homolog. *J. Molec. Evol.* 63(2):165-73.
- 5 Abdelnoor, R.V., Yule, R., Elo, A., Christensen, A., Meyer-Gauen, G. y Mackenzie, S. 2003. Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to MutS. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100:5968-5973.
- 10 Arrieta-Montiel MP, Shedge V, Davila J, Christensen AC, Mackenzie SA. 2009. Diversity of the Arabidopsis mitochondrial genome occurs via nuclear-controlled recombination activity. *Genetics* 183:1261-8et al
- Bellaoui M, Martin-Canadell A, Pelletier G, Budar F. 1998. Low-copy-number molecules are produced by recombination, actively maintained and can be amplified in the mitochondrial genome of Brassicaceae: relationship to reversion of the male sterile phenotype in some cybrids. *Mol Gen Genet.* 257:177-85
- 15 Buchanan BB, Balmer Y (2005). Redox Regulation: A Broadening Horizon. *Annu Rev Plant Biol* 56: 187-220.
- Cokus, SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M y Jacobsen SE (2008) Shotgun bisulphate sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 452:215-219.
- 20 Davila, J., Arrieta-Montiel, M., Wamboldt, Y., Xu, Y.-Z., Mackenzie, SA. 2011. Double-strandbreak repair processes drive evolution of the mitochondrial genome in Arabidopsis. *Theor Appl Genet.* 2012 Mar 18. [publicación electronica previa a la imprea].
- 25 De Gara L, Locato V, Dipierro S, de Pinto MC (2010) Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respir Physiol Neurobiol.* 173 Suppl:S13-9.
- 30 Fu J, Keurentjes JJB, Bouwmeester H, American T, Verstappen FWA, Ward JL, Beale MH, de Vos RCH, Dijkstra M, Scheltema RA, Johannes F, Koornneef M, Vreugdenhil D, Breitling R, Jansen RC (2009) System-wide molecular evidence for phenotypic buffering in Arabidopsis. *Nature Genet* 41:166-167.
- Hanson, M. and Bentolila, S. 2004. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* 16 (suppl.): S154-S169.
- 35 Hawes SM, Sapienza C, Latham KE (2002) Ooplasmic donation in humans: the potential for epigenetic modifications. *Hum Reprod* 17:850-2.
- 40 Hauben M, Haesendonckx B, Standaert E, Van Der Kelen K, Azmi A, Akpo H, Ven Breusegem F, Guisez Y, Bots M, Lambert B, Laga B, De Block M (2009) Energy use efficiency is characterized by an epigenetic component that can be directed through artificial selection to increase yield. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:20109-20114.
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P. (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the metaanalysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics.* 2008:420747.
- 45 Ifuku K, Ishihara S, Sato F (2010). Molecular functions of oxygen-evolving complex family proteins in photosynthetic electron flow. *J Integr. Plant Biol* 52:723-734.
- 50 Jablonka E, Oborny B, Molnar I, Kisdi E, Holbauer J, *et al.* (1995) The adaptive advantage of phenotypic memory in changing environments. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350:133-141.
- Janska, H., Sarria, R., Woloszynska, M., Arrieta-Montiel, M. y Mackenzie, S. 1998. Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility. *Plant Cell* 10:1163-1180.
- 55 Johannes F, Porcher E, Teixeira FK, Saliba-Colombani V, Simon M, Agier N, Bulski A, Albuissou J, Heredia F, Audigier P, Bouchez D, Dillmann C, Guerche P, Hospital F, Colot V (2009) Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. *PLoS Genet* 5:1-11.
- 60 Johnson, C., Kasprzewska, A., Tennessen, K., Fernandes, J., Nan, G.L., Walbot, V., Sundaresan, V., Vance, V., y Bowman, L.H. (2009). Clusters and superclusters of phased small RNAs in the developing inflorescence of rice. *Genome Res* 19, 1429-1440.
- 65

- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10:R25.
- 5 Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo Q-M, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Echer JR (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462:315-322.
- Llorente B, Smith CE, Symington LS 2008. Break-induced replication: What is it and what is it for? *Cell Cycle* 7:859-864.
- 10 Mackenzie, SA. 2011. Male sterility and hybrid seed production. In A. Altman and P.M. Hasegawa (eds). *Plant Biotechnology and Agriculture: Prospects for the 21st Century*, Elsevier Publ, en prensa.
- 15 McCauley DE y Olson MS 2008 Do recent findings in plant mitochondrial molecular and population genetics have implications for the study of gynodioecy and cytonuclear conflict? *Evolution* 62:1013-1025.
- Pfannschmidt, T. (2010) Plastidial retrograde signaling -a true "plastid factor" or just metabolite signatures? *Trends Plant Sci* 15:427-435.
- 20 Redei, G.P. 1973. Extra-chromosomal mutability determined by a nuclear gene locus in *Arabidopsis*. *Mutat. Res.* 18, 149-162.
- Reik, W., Walter J (2000) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Rev Genet* 2: 21-32.
- 25 Sandhu, A.S., Abdelnoor, R.V. y Mackenzie, S.A. 2007. Transgenic induction of mitochondrial rearrangements for cytoplasmic male sterility in crop plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:1766-70.
- Shedge, V., Arrieta-Montiel, M., Christensen, A.C. y Mackenzie, S.A. 2007. Plant mitochondrial recombination surveillance requires novel RecA and MutS homologs. *Plant Cell* 19:1251-1264.
- 30 Shedge V, Davila J, Arrieta-Montiel MP, Mohammed S, Mackenzie SA. 2010. Extensive rearrangement of the *Arabidopsis* mitochondrial genome elicits cellular conditions for thermotolerance. *Plant Physiol.* 152:1960-70.
- 35 Smiraglia DJ, Kulawiec M, Bistulfi GL, Gupta SG, Singh KK (2008) A novel role for mitochondria in regulating epigenetic modification in the nucleus. *Cancer Biol Ther.* 7: 1182-1190.
- Vaughn, MW, Tanurd I, Lippman Z, Jiang H, Carrasquillo R, *et al.* (2007) Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol* 5:e174.
- 40 Xu Y-Z, Arrieta-Montiel MP, Wamboldt YJ, Virdi K, De Paula WBM, Widhalm JR, Basset GJ, Davila JI, Elthon TE, Elowsky CG, Sato SJ, Clemente TE y Mackenzie SA, (2011). MSH1 is a multi-functional protein in plants that alters mitochondrial and plastid properties and response to high light. *Manuscrito entregado*.
- 45 Wang, X., Elling, A.A., Li, X., Li, N., Peng, Z., He, G., Sun, H., Qi, Y., Liu, X.S., y Deng, X.W. (2009). Genome-wide and organ-specific landscapes of epigenetic modifications and their relationships to mRNA and small RNA transcriptomes in maize. *Plant Cell* 21, 1053-1069.
- Waters MT, Wang P, Korkaric M, Capper RG, Saunders NJ, Langdale JA. (2009) *Plant Cell.* 21:1109-28.
- 50 Zhang, X, Shiu S, Cal A, Borevitz JO (2008) Global analysis of genetic, epigenetic and transcriptional polymorphisms in *Arabidopsis thaliana* using whole genome tiling arrays. *PLoS Genet* 4:e 1000032.
- Lista de secuencias
- 55 <110> Mackenzie, Sally De La Rose Santamaria, Roberto
- <120> PLANTAS CON RASGOS ÚTILES Y MÉTODOS RELACIONADOS
- <130> 46589-103289
- 60 <150> Documento US 61/540236
- <151> 28/09/2011
- <150> Documento US 61/481519
- 65 <151> 02/05/2011

ES 2 731 638 T3

<160> 52

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 3730
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

10 <400> 1

```

agaggactgt gagattgtga attgcatagt cgtcgtcttc tggcgggaaa agaagcccta      60
gaaaaagggt gaaagggtgaa aactctactt cttctctctc ttcttcttca gagtgtgaga      120
gagatgcatt ggattgctac cagaaacgcc gtcgtttcat tccc aaaatg gcggttcttc      180
ttccgctcct catatcgcac ttactcttcc ctcaaacctt cctccc aat tctacttaat      240
agaaggtact ctgaggggat atcttgtctc agagatggaa agtctttgaa aagaatcaca      300
acggcttcta agaaagtgaa gacgtcaagt gatgttctca ctgacaaaga tctctctcat      360
ttggtttggg ggaaggagag attgcagaca tgtaagaaac catctactct tcagcttatt      420
gaaaggctta tgtacaccaa tttacttggg ttggacccta gcttgaggaa tggaagtta      480
aaagatggaa acctcaactg ggagatgttg cagtttaagt caaggtttcc acgcgaagtt      540
ttgctctgca gagtaggaga attttatgag gctattggaa tagatgcttg tatacttggt      600
gaatatgctg gtctcaatcc ttttgggtgt cttcgatcag atagtattcc aaaggctggc      660
tgcccaatta tgaatcttcg acagactttg gatgacctga cacgcaatgg ttattcagtg      720
tgtattgtgg aggaagttca ggggccaaca ccagcacgct cccgtaaagg tcgatttatt      780
tcaggcatg cacatccagg aagtccttat gtatatgggc ttgtcgggtg tgaccatgat      840
cttgacttcc ctgatcctat gcctgttggt gggatatctc gttcagcaag ggggtattgt      900
atgatatcta ttttggagac tatgaaagca tattcgctag atgatggtct aacagaagaa      960
gccttagtta ccaagctccg cactcgtcgc tgatcatcct ttttcttaca tgcacgttg      1020
aggcacaatg catcagggac gtgccgctgg ggagagtttg ggaaggggg tctactctgg      1080
ggagaatgca gtagcaggaa ttttgaatgg tttgaaggag atactcttcc cgagctctta      1140
  
```

ES 2 731 638 T3

tcaagggtca aagatgttta tggctctgat gatgaagttt cctttagaaa tgtcaatgta 1200
ccttcaaaaa atcggccacg tccgttgcac ctgggaacgg ctacacaaat tggcgcctta 1260
cctactgaag gaataccttg tttgttgaag gtgttacttc catctacgtg cagtggctctg 1320
ccttctttgt atgttaggga tcttctctctg aacctcctg cttacgatat tgetctgaaa 1380
attcaagaaa cgtgcaagct catgagcaca gtaacatggt caattccaga gtttacctgc 1440
gtctcttctg ctaagcttgt gaagcttctt gagcaacggg aagccaacta cattgagttc 1500
tgtcgaataa aaaatgtgct tgatgatgta ttacatatgc atagacatgc tgagcttgtg 1560
gaaatcctga aattattgat ggatcctacc tgggtggcta ctggtttgaa aattgacttt 1620
gacacttttg tcaacgaatg tcattggcg tctgatataa ttggtgaaat gatctcttta 1680
gatgagaatg aaagtcacga gaatgtaagt aaatgtgaca atgtcccgaa cgaattcttt 1740
tatgatatgg agtcttcatg gcgaggtcgc gttaaggga ttcatataga ggaagaaatc 1800
actcaagtag aaaaatcagc tgaggcttta tctttagcag tagctgagga ttttcaccct 1860
attatatcaa gaattaaggc caccactgct tcacttggtg gcccgaaagg cgaaatcgca 1920
tatgcaagag agcatgagtc tgtttggttc aaggggaac ggtttacgcc atctatctgg 1980
gctggtactg caggggaaga ccaaataaaa cagctgaaac ctgccttaga ctcgaaagga 2040
aaaaagggtg gagaagaatg gtttacgacc ccaaagggtg aaattgcttt agtcagatac 2100
catgaagcta gtgagaatgc aaaagctcgg gtgttggaac tgttgccgca gttatccgtt 2160
aaattgcaaa caaaaataaa tgttcttctc tttgcatcta tgcttctggt catttcaaaa 2220
gcattatttt cccatgcttg tgaagggaga aggcgaaagt gggtttttcc aacgcttctc 2280
ggattcagtt tagatgaggg cgcaaaaoca ttagatggtg ccagtcgaat gaagctgaca 2340
ggcctgtcac cttattgggt tgatgtatct tctggaacgg ctgttcacaa taccggtgac 2400
atgcaatcac tgtttcttct aactggacct aacgggtggt gtaaatoagag ttigtctaga 2460
tcaatatgcg cagctgctct acttgggaatt tccggtttaa tggttccagc tgaatcagct 2520
tgtattctct actttgatc catcatgctt cacatgaaat catatgacag ccctgtagac 2580
ggaaaaagtt ctttccaggt agaaatgtcg gaaatacagat ctattgtaag ccaggctact 2640
tcgagaagcc tagtgcttat agatgagata tgccgagggg cagagacagc aaaaggcacc 2700
tgtatcgctg gtagtgtggt agagagtctt gacacaagtg gttgtttggg tattgtatct 2760
actcatctcc atggaatctt cagtttaacct cttacagcga aaaacatcac atataaagca 2820
atgggagccc aaaatgtcga agggcaaacc aagccaactt ggaattgac agatggagtc 2880
tgcagagaga gtcttgcggt tgaaacagct aagagggag gtgttcccg gtcagttatc 2940
caaagagctg aagctcttta cctctcggtc tatgcaaaag acgcatcagc tgaagttgtc 3000
aaacccgacc aatcataaac ttcatccaac aatgaccagc agatccaaaa accagtcagc 3060

ES 2 731 638 T3

tctgagagaa gtttgagaa ggacttagca aaagctatcg tcaaaatctg tgggaaaaag 3120
atgattgagc ctgaagcaat agaatgtctt tcaattgggtg ctcgtagagct tccacctcca 3180
tctacagttg gttcttcatg cgtgtatgtg atgCGGagac cGgataagag attgtacatt 3240
ggacagaccg atgatcttga aggacgaata cgtgcgcac c gagcaaagga aggactgcaa 3300
gggtcaagtt ttctatacct tatggttcaa ggtaagagca tggcttgtca gttagagact 3360
ctattgatta atcaactcca tgaacaaggc tactctctgg ctaacctagc cgatggaaag 3420
caccgtaatt tcggaacgtc ctcaagcttg agtacatcag acgtagtcag catcttatag 3480
tttgaacat tagctgtggt tgtagttgat catctctatg tgcaattgaa caagtcagtt 3540
tgctagaact agagtagatt actaagaaac catgccggtt ttcattttga gattttgcaa 3600
aacggcatgc agttcgggta agtcggatgc cgcaattacc aattttgggt cagtctgtgt 3660
aattgtcgtt tcataaatcc gattaacgtg tactttgaac aaaactcagc agtaaacttc 3720
tttattcatc 3730

<210> 2

<211> 1118

5 <212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 2

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

10

ES 2 731 638 T3

Leu Gln Phe Lys Ser Arg Phe Pro Arg Glu Val Leu Leu Cys Arg Val
 130 135 140

Gly Glu Phe Tyr Glu Ala Ile Gly Ile Asp Ala Cys Ile Leu Val Glu
 145 150 155 160

Tyr Ala Gly Leu Asn Pro Phe Gly Gly Leu Arg Ser Asp Ser Ile Pro
 165 170 175

Lys Ala Gly Cys Pro Ile Met Asn Leu Arg Gln Thr Leu Asp Asp Leu
 180 185 190

Thr Arg Asn Gly Tyr Ser Val Cys Ile Val Glu Glu Val Gln Gly Pro
 195 200 205

Thr Pro Ala Arg Ser Arg Lys Gly Arg Phe Ile Ser Gly His Ala His
 210 215 220

Pro Gly Ser Pro Tyr Val Tyr Gly Leu Val Gly Val Asp His Asp Leu
 225 230 235 240

Asp Phe Pro Asp Pro Met Pro Val Val Gly Ile Ser Arg Ser Ala Arg
 245 250 255

Gly Tyr Cys Met Ile Ser Ile Phe Glu Thr Met Lys Ala Tyr Ser Leu
 260 265 270

Asp Asp Gly Leu Thr Glu Glu Ala Leu Val Thr Lys Leu Arg Thr Arg
 275 280 285

Arg Cys His His Leu Phe Leu His Ala Ser Leu Arg His Asn Ala Ser
 290 295 300

Gly Thr Cys Arg Trp Gly Glu Phe Gly Glu Gly Gly Leu Leu Trp Gly
 305 310 315 320

Glu Cys Ser Ser Arg Asn Phe Glu Trp Phe Glu Gly Asp Thr Leu Ser
 325 330 335

Glu Leu Leu Ser Arg Val Lys Asp Val Tyr Gly Leu Asp Asp Glu Val
 340 345 350

Ser Phe Arg Asn Val Asn Val Pro Ser Lys Asn Arg Pro Arg Pro Leu
 355 360 365

His Leu Gly Thr Ala Thr Gln Ile Gly Ala Leu Pro Thr Glu Gly Ile

ES 2 731 638 T3

Glu Asp Gln Ile Lys Gln Leu Lys Pro Ala Leu Asp Ser Lys Gly Lys
 625 630 635 640
 Lys Val Gly Glu Glu Trp Phe Thr Thr Pro Lys Val Glu Ile Ala Leu
 645 650 655
 Val Arg Tyr His Glu Ala Ser Glu Asn Ala Lys Ala Arg Val Leu Glu
 660 665 670
 Leu Leu Arg Glu Leu Ser Val Lys Leu Gln Thr Lys Ile Asn Val Leu
 675 680 685
 Val Phe Ala Ser Met Leu Leu Val Ile Ser Lys Ala Leu Phe Ser His
 690 695 700
 Ala Cys Glu Gly Arg Arg Arg Lys Trp Val Phe Pro Thr Leu Val Gly
 705 710 715 720
 Phe Ser Leu Asp Glu Gly Ala Lys Pro Leu Asp Gly Ala Ser Arg Met
 725 730 735
 Lys Leu Thr Gly Leu Ser Pro Tyr Trp Phe Asp Val Ser Ser Gly Thr
 740 745 750
 Ala Val His Asn Thr Val Asp Met Gln Ser Leu Phe Leu Leu Thr Gly
 755 760 765
 Pro Asn Gly Gly Gly Lys Ser Ser Leu Leu Arg Ser Ile Cys Ala Ala
 770 775 780
 Ala Leu Leu Gly Ile Ser Gly Leu Met Val Pro Ala Glu Ser Ala Cys
 785 790 795 800
 Ile Pro His Phe Asp Ser Ile Met Leu His Met Lys Ser Tyr Asp Ser
 805 810 815
 Pro Val Asp Gly Lys Ser Ser Phe Gln Val Glu Met Ser Glu Ile Arg
 820 825 830
 Ser Ile Val Ser Gln Ala Thr Ser Arg Ser Leu Val Leu Ile Asp Glu
 835 840 845
 Ile Cys Arg Gly Thr Glu Thr Ala Lys Gly Thr Cys Ile Ala Gly Ser
 850 855 860
 Val Val Glu Ser Leu Asp Thr Ser Gly Cys Leu Gly Ile Val Ser Thr
 865 870 875 880

ES 2 731 638 T3

His Leu His Gly Ile Phe Ser Leu Pro Leu Thr Ala Lys Asn Ile Thr
 885 890 895

Tyr Lys Ala Met Gly Ala Glu Asn Val Glu Gly Gln Thr Lys Pro Thr
 900 905 910

Trp Lys Leu Thr Asp Gly Val Cys Arg Glu Ser Leu Ala Phe Glu Thr
 915 920 925

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

Leu Tyr Leu Ser Val Tyr Ala Lys Asp Ala Ser Ala Glu Val Val Lys
 945 950 955 960

Pro Asp Gln Ile Ile Thr Ser Ser Asn Asn Asp Gln Gln Ile Gln Lys
 965 970 975

Pro Val Ser Ser Glu Arg Ser Leu Glu Lys Asp Leu Ala Lys Ala Ile
 980 985 990

Val Lys Ile Cys Gly Lys Lys Met Ile Glu Pro Glu Ala Ile Glu Cys
 995 1000 1005

Leu Ser Ile Gly Ala Arg Glu Leu Pro Pro Pro Ser Thr Val Gly
 1010 1015 1020

Ser Ser Cys Val Tyr Val Met Arg Arg Pro Asp Lys Arg Leu Tyr
 1025 1030 1035

Ile Gly Gln Thr Asp Asp Leu Glu Gly Arg Ile Arg Ala His Arg
 1040 1045 1050

Ala Lys Glu Gly Leu Gln Gly Ser Ser Phe Leu Tyr Leu Met Val
 1055 1060 1065

Gln Gly Lys Ser Met Ala Cys Gln Leu Glu Thr Leu Leu Ile Asn
 1070 1075 1080

Gln Leu His Glu Gln Gly Tyr Ser Leu Ala Asn Leu Ala Asp Gly
 1085 1090 1095

Lys His Arg Asn Phe Gly Thr Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Asp
 1100 1105 1110

Val Val Ser Ile Leu
 1115

<210> 3
 <211> 3765
 5 <212> ADN
 <213> *Glycine max*

<400> 3

ES 2 731 638 T3

gtcagataca gagtccttcc ctccctcgtgt gtggactgtg gcgggaactc attttgctag 60
 tttgcttccct ctctctctct cgttcccatt caacgcaatg tacagggtag ccacaagaaa 120
 cgtcgcggtt ttcttccctc gttgctgttc cctcgcgcac tacactcctt ctctatttcc 180
 cattttcact tcattcgctc cctctcgttt ccttagaata aatggatgtg taaagaatgt 240
 gtcgagttat acggataaga aggtttcaag ggggagtagt agggccacca agaagcccaa 300
 aataccaaat aacgttttag atgataaaga ccttcctcac atactgtggt ggaaggagag 360
 gttgcaaatg tgcagaaagt tttcaactgt ccagttaatt gaaagacttg aattttctaa 420
 tttgcttggc ctgaattcca acttgaaaaa tggaagtctg aaggaaggaa cactcaactg 480
 ggaaatgttg caattcaagt caaaatttcc acgtcaagta ttgctttgca gagttgggga 540
 attctatgaa gcttggggaa tagatgcttg tattcttggt gaatatgtgg gtttaaatcc 600
 cattggtggt ctgcgatcag atagtatccc aagagctagt tgtcctgtcg tgaatcttgg 660
 gcgacttta gatgatctga caacaaatgg ttattcagtg tgcattgtgg aggaggctca 720
 gggcccaagt caagctcgat ccaggaaaacg tcgctttata tctgggcatg ctcatcctgg 780
 aaatccctat gtatatggac ttgctacagt tgatcatgat cttactttc cagaaccaat 840
 gcctgtagta ggaatatctc attctcgcgag gggttattgc attaatatgg tactagagac 900
 catgaagaca tattcttctg aagattgctt gacagaagaa gcagttgta cgaagcttgg 960
 tacttgccaa tatcattact tatttttgca tacatccttg agggggaatt cttgtggaac 1020
 ctgcaactgg ggagaatttg gtgagggagg gctattatgg ggagaatgta gttctagaca 1080
 ttttgattgg ttgatggca accctgtctc cgatcttttg gccaaagtaa aggaacttta 1140
 tagtattgat gatgaggta cctttcggaa cacaactgtg tcttcaggac atagggctcg 1200
 accattaact ctggaacat ctactcaaat tggtgccatt ccaacagaag gaataccttc 1260
 tttgttgaag gttttacttc catcaaattg caatggatta ccagtattgt acataagggga 1320
 acttcttttg aatcctcctt catatgagat tgcatccaaa attcaagcaa catgcaaact 1380
 tatgagcagt gtaacgtggt caattccaga atttaccatgt gtttcgtcag caaagcttgt 1440
 aaagctactt gaatggaggg aggtcaatca tatggaattt tgtagaataa agaatgtact 1500
 ggatgaaatt ttgcagatgt atagtacctc tgagctcaat gaaatattga aacatttaat 1560
 cgagcccaca tgggtggcaa ctgggttaga aattgacttt gaaaccttgg ttgcaggatg 1620
 tgagatcgca tctagtaaga ttgggtgaaat agtatctctg gatgatgaga atgatcagaa 1680

ES 2 731 638 T3

aatcaactcg ttctctttta ttctctacga attttttgag gatatggagt ctaaattggaa 1740
 aggtcgaata aaaagaatcc acatagatga tgtattcact gcagtgga aaagcagctga 1800
 ggccttacat atagcagtca ctgaagattt tgttctctgtt gtttctagaa taaaggctat 1860
 tgtagccct ctoggaggtc ctaagggaga aatatcttat gctcgggagc aagaagcagt 1920
 ttggttcaaa ggcaaacgct ttacaccgaa tttgtgggct ggtagccctg gagaggaaca 1980
 aattaacag cttaggcatg ctttagattc taaaggtaga aaggtagggg aggaatggtt 2040
 taccacacca aaggtcagag ctgcattaac aaggtacat gaagcaaat ccaaggcaaa 2100
 agaaagagt ttgaaattt taaggggact cgctgctgag ttgcaataca gtataaacat 2160
 tcttgtcttt tcttccatgt tgcttgttat tgccaaagct ttatttgctc atgcaagtga 2220
 agggagaaga aggagatggg tctttccac gcttgtagaa tcccatgggt ttgaggatgt 2280
 gaagtcattg gacaaaacc atgggatgaa gataagtgg ttattgcat attggtcca 2340
 catagcagaa ggtgttgc gtaatgatgt tgatagcaa tcattatttc tgttgacagg 2400
 accgaatggt ggtgggaaat caagtttct taggtcaatt tgtgctgctg cactacttg 2460
 gatatgtgga ctcatggttc ctgcagaatc agccctaatt ccttattttg actccatcac 2520
 gcttcatatg aagtcatatg atagtccagc tgataaaaag agttcctttc aggttgaaat 2580
 gtcagaactt cgatccatca ttggcggaac aaccaacagg agccttgta ttggtgatga 2640
 aatatgccga ggaacagaaa ctgcaaaagg gacttgcat gctgtagca tcattgaaac 2700
 ccttgatgga attgggtgct tgggtattgt atccactcac ttgcatgga tatttacttt 2760
 gccctaaac aaaaaaaca ctgtgcacaa agcaatgggc acaacatcca ttgatggaca 2820
 aataatgctt acatggaagt tgacagatgg agtttgtaa gaaagtctt cttttgaaac 2880
 ggctaagagg gaaggaatc ctgagcatat tgttagaaga gctgaatata tttatcagtt 2940
 ggtttatgct aaggaaatgc tttttgcaga aaatttcca aatgaagaaa agttttctac 3000
 ctgcatcaat gtaataat tgaatggaac acatctcat tcaaaaagg tcctatcagg 3060
 agctaatcaa atggaagttt tacgcgagga agttgagaga gctgtcactg tgatttgcca 3120
 ggatcatata aaggacctaa aatgcaaaa gattgcattg gagcttactg agataaaatg 3180
 tctcataatt ggtacaagg agctaccacc tccatcggtt gtaggttctt caagcgtcta 3240
 tgtgatgttc agaccagata agaaactcta tgtaggagag actgatgatc tcgagggagc 3300
 ggtccgaaga catcgattaa aggaaggaat gcatgatgca tcattccttt attttcttgt 3360
 cccaggtaaa agcttggcat gccaatgtga atctctgctc atcaaccaac tttctggcca 3420
 aggcttccaa ctgagcaata tagctgatgg taaacatagg aattttggca cttccaacct 3480
 gtatacataa ctagtctata gacattgata ttatctacct caatcgcgta tttttgcctc 3540
 ttttaaagtg ctcaaagact tcaatcatcg atgttaagtt taggaaacaa tgtctgcagc 3600
 atttttgtta gaattagttg ctgcagctgc atttatgtcc acatcttcaa gtgtggaat 3660
 tcttgttcat tagcttgtaa gtacaaaagt gtttgtgtac gtttggagtc ccgagagaat 3720
 atacaagtac aaatgaacaa atatattagt aatgaatgca ctaga 3765

5 <210> 4
 <211> 3642

ES 2 731 638 T3

<212> ADN
 <213> *Zea mays*

<400> 4

5
 ggcgactacc ccgagaaacg tgcgacggga acctccgcgg ttccccaagt tgcctcctt 60
 cactactctc ggcgcccggc acgcctgaaa aaccccaccc ctccctgccgc tccgcctctc 120
 ccatcaactc ccaagccctc cgccgcctcc cattccagcg tggacacgac gccactcgcc 180
 agcacggaga cgcgcgcctc gaagcactac tgcactagcc agccgctcgt cttccgcgcc 240
 ggcgccatgc accgggtgct cgtgagctcg cttgtggccg ccaagccgcg atggctgccc 300
 ctgcgcgact ccatcctccg ggcgcccgcg ccgcgctgct cccctcttcc cgtgctgatg 360
 ttcgatcgga ggccttggtc caagccaagg aaggtctcac gaggcatttc agtggcgtcc 420
 aggaaagcta acaaacaggg agaatactgt gatgaaagta tgctgtcgca tatcatgtgg 480
 tggaaagaga aatgggagag gtgcagaaaa ccatcatcca tacaattgac tcagaggctt 540
 gtgtattcaa atatattagg gttggatccg aatttaagaa acggaagctt gaaagatgga 600
 accctgaaca tggagatttt ggtattttaa tcaaaatttc ctccgtgaggt tctactttgc 660
 agagtaggag atttctatga agctatcggc tttgatgcct gtattctcgt agagcatgca 720
 ggcttaaate cttttggagg tttgcgttcc gacagtattc ctaaagctgg gtgtccagtc 780
 gtgaatttac ggcagacatt ggatgatttg actcgatgtg gttattccgt gtgcatagtc 840
 gaggaaattc aaggcccaac tcaagcccggt gctcggaaaa gtcgatttat ttctgggcat 900
 gcccatcctg gtagtcctta tgtatttggc cttgctgaag tagaccatga tgtagagttc 960
 cctgatccga tgcctgttgt tgggatttca cattctgcaa aagggttattg cttgatatct 1020
 gtgctagaga caatgaaaac ttattcagct gaggagggct taacagagga ggctattggt 1080
 actaagctcc gcatatgtcg ttatcaccat ctataccttc acaattcttt gaagaataat 1140
 tcttcagggc catcacgctg gggatgaattc ggtgaagggt ggctcttgtg gggagagtgc 1200
 agtgggaagt cctttgagtg gtttgacggt tcacctattc aagaactttt atgcaaggta 1260
 cgggaaatat atggccttga tgagaaaacg gtttttcgcg atgtcacctg ctcatggaa 1320
 ggcagggccc aacctcttca tcttgggact gctactcaaa ttggagtcac accaactgag 1380
 ggaataccga gtttgtaag aatggtgctt ccttcaaatt gtggcgggct tccatcaatg 1440

ES 2 731 638 T3

tatattagag atcttcttct taatcctcca tcatttgagg ttgcagcagc gatccaagag 1500
gcttgcaggc ttatgggcaa cataacctgc tccattcctg aatttacatg catatcagca 1560
gcaaagcttg tgaaactact tgagtcgaaa ggggtcaatc acattgaatt ttgtagaata 1620
aaaaatgtcc ttgatgagat tatgctcatg aacagggatg ctgagctttc tgcaatcctg 1680
catgaattac tggtagctgc ttctgtggct actggtttca aagttgaagc tgatatgcta 1740
atgaacggat gtagcattat ttcacaacga atagctgaag tgatttcttt aggtgttgaa 1800
agtgatcagg caataacttc attggaatat attccaaagg agttcttcaa tgatatggag 1860
tcactcttga agggcgcgct gaaaaggatc catgctgaag aagagtttgc aaatgttgat 1920
agggctgctg aggcattatc aattgcggtc attgaagatt ttatgccaat tatttcgagg 1980
gtgaaatctg tagtgtcttc gaatggaggt ttgaaaggag aaatcggtta tgcaaaagaa 2040
catgaagctg tttggtttaa aggaaagaga ttcataccaa atgtatgggc taacacacct 2100
ggtgagcagc aaataaaaca actgaagcct gcaattgatt caaaaggcag aaaggttggg 2160
gaggaatggt ttacaacaag caaagttgag aatgctttag ccaggtacca tgaagcttgt 2220
gataatgcaa gaaataaagt tcttgagctg ttgagaggcc tttctagtga attgcaggac 2280
aaaattaaca tacttgtctt ttgctcaaca ctgctcatca ttgcaaaagc actttttggt 2340
catgttagtg aggctcgaag aagaggttg atgcttctta ctatatctcc cttatcaaag 2400
gactgtgttg tggaggaaa ttcaagtgca atggatttag taggactatt tccttactgg 2460
cttgatgta atcaaggaaa tgcaatattg aatgatgtcc acatgcactc tttatttgtt 2520
cttactggcc caaatgggtg tggtaaatct agcatgttgc gatcagctctg tgcagctgtg 2580
cttcttggaa tatgtggcct gatggtaoct tcaacttcag ctgtaatccc acattttgat 2640
tccattatgc tgcatatgaa agcctatgat agcccagcag atgggaaaag ttcatttcag 2700
attgaaatgt cggagatacg tgctttagtc agccgagcta ctgctaggag tcttgttctg 2760
attgatgaaa tatgtagagg cacagaaact gcaaaaggaa catgtatagc tggtagcacc 2820
attgaaagac ttgataatgt tggctgccta ggcacatat caactcacct gcatgggatt 2880
ttcgacctgc ctctctcact tagcaacact gatttcaaag ctatgggaac tgaagtggtc 2940
gatggatgca ttcattccaac atggaaactg attgatggca tatgtagaga aagccttgct 3000
tttcaaacag caaggaggga aggcctgctt gacttgataa tcaccagggc tgaggagcta 3060
tatttgagta tgagtacaaa taacaagcag ggagcatcag tggcgcaaaa tgagcctcct 3120
aatggcagcc ccagtgtaaa tggcttgggt gaggagcctg aatctctgaa gaacagacta 3180
gaaatgctgc ctggtacctt tgagccgctg cggaaaggaag ttgagagtgc tgttactacg 3240
atgtgtaaga aaatactgtc ggaccttac aacaaaagta gcatcccaga actggtcgag 3300
gtggtctgcg ttgctgtagg tgctagagag caaccaccgc cttccactgt tggcagatct 3360
agcatctacg tgattatcag aagcgacaac aggcctctatg ttggacagac ggacgatctt 3420
ctggggcgct tgaacgccca cagatcgaag gaaggcatgc gggacgctac ggtattatac 3480
gtcttggctc ctggcaagag cgttgcctgc cagctggaaa cccttctcat aaaccagctc 3540
ccttcgaggg gcttcaagct catcaacaag gcagacggga agcacaggaa cttcgtata 3600
tctcgaatct ctggcgaggc agttgctact ggacggaact ag 3642

ES 2 731 638 T3

<211> 3373
 <212> ADN
 <213> *Lycopersicon esculentum*

5 <400> 5

atgtattggg ttacggcaaa aaacgtcgtc gtttcagttc cccgttggcg ttcactgtcc	60
cttttcctcc gtccaccact tcgccggcgt ttcttatctt tctctccaca tactctgtgc	120
cgagagcaga tacgttgcgt gaaggagcgg aagttttttg ccacaacggc aaaaaaactc	180
aaacaaccaa aaagtattcc agaggaaaa gactatgtta atattatgtg gtggaaagag	240
agaatggaat tcttgagaaa gccttcttcc gctcttctgg ctaagaggct tacatattgt	300
aacttgctgg gtgtggatcc gagtttgaga aatggaagtc ttaaagaggg aacacttaac	360
tcggagatgt tgcagttcaa gtcaaaatth ccacgtgaag ttttgctctg tagagtaggt	420
gatttttatg aagctattgg attcgatgct tgtattcttg tggaatatgc tggtttaaat	480
ccatttgggtg gcctgcactc agatagtata ccaaaagctg gttgtccagt tgtgaatcta	540
agacagacgc ttgatgatct cacacgtaat ggtttctctg tgtgcgtcgt ggaggaagtt	600
cagggcccaa ctcaagctcg tgctcgtaa agtcgattta tatcagggca tgcacatcca	660
ggcagtcctt atgtttttgg ccttgttgga gatgatcaag atcttgattt tccagaacca	720
atgcctggtt ttggaatata ccgttcagcg aaggggtatt gcattatctc tgtttacgag	780
actatgaaga cttactctgt ggaagatggc ctaactgaag aagccgtagt caccaaactt	840
cgtacttgtc gatgccatca tttttttttg cataattcat tgaagaaca ttcctcagga	900
acatcgcggt ggggagagtt tgggtgaaggt ggacttttgt ggggagaatg taatgctaga	960
cagcaggaat ggttggatgg caatcctatc gatgagcttt tgttcaaggt aaaagagctt	1020
tatggtctca atgatgacat tccattcaga aatgtcactg ttgtttcaga aaataggccc	1080
cgtcctttac accttggaac tgccacacaa attggtgcta ttccaaccga agggattcca	1140
tgtttgtaa aggtggtgct tctcctcat tgcagtggtc taccagtcct gtatattagg	1200
gatcttcttt taaatccacc agcctatgag atttcttcag acattcaaga ggcatgcaga	1260
cttatgatga gtgtcacatg ttcaattcct gattttacct gtatttcac tgcxaaagctg	1320
gtcaagctgc ttgagttgag ggaggcaaat cacgttgagt tctgcaaaat aaagagcatg	1380

ES 2 731 638 T3

gtcgaagaga tactgcagtt gtatagaaat tcagagcttc gtgctattgt agagttactg 1440
atggatccta cttgggtggc aactggggtg aaagttgatt ttgatacact agtaaatgaa 1500
tgtggaaaga tttctttag aatcagtgaa ataatatccg tacatggtga aaatgatcaa 1560
aagattagtt cctatcctat catcccaaat gatttctttg aagatatgga gttggttggg 1620
aaaggcogtg tcaagaggat ccatttggag gaagcatatg cagaagtaga aaaggctgcg 1680
gatgctttat ctttagccat aacagaagat ttcctaccta ttatttcaag aataagggcc 1740
acgatggccc cacttggagg aactaaaggg gagattttgt atgcccgta gcatggagct 1800
gtatggttta agggaaagag atttgtacca actggttggg ctggaaccgc tggagaagaa 1860
caaattaagc aactcagacc tgctctagat tcaaagggga agaaggttgg agaagaatgg 1920
ttcactacaa tgagggtgga agatgcaata gctaggtatc acgaggcaag tgctaaggca 1980
aagtcaaggg tcttgggaatt gctaagggga ctttcttctg aattactatc taagatcaat 2040
atccttatct ttgcatctgt cttgaatgtg atagcaaaat cattattttc tcatgtgagt 2100
gaaggaagaa gaagaaattg gattttccca acaatcacac aatttaacaa atgtcaggac 2160
acagaggcac ttaatggaac tgatggaatg aagataattg gtctatctcc ttattggttt 2220
gatgcagcac gagggactgg tgtacagaat acagtagata tgcagtccat gtttctttta 2280
acaggtccaa atggtggggg caaatcaagc ttgctgcggt cgttgtgtgc agctgcattg 2340
ctaggaatgt gtgggttcat ggttccagct gaatcagctg tcattcctca ttttgactca 2400
attatgctgc atatgaaatc atatgatagt cctggtgatg gaaaaagttc atttcagatt 2460
gaaatgtctg aaattcgtgc tctgattact ggtgccactt caagaagtct tgtacttata 2520
gatgaaatat gtcgaggaac agaaacagca aaaggacat gtattgctgg aagtgtcata 2580
gaaaccctgg acgaaattgg ctgtttggga attgtatcaa cccacttgca tggaatattt 2640
gatttaccoc tgaaaatcaa gaagaccgtg tataaagcaa tgggagctga atatgttgac 2700
ggtaaccaaa taccaacttg gaaactcatt gatgggatct gtaaagagag tctagcattt 2760
gaaacagctc agagagaagg aattccagaa atattaatcc aaagagcaga agaattgtat 2820
aattcagctt acgggaatca gataccaagg aagatagacc aaataagacc tctttgttca 2880
gatattgacc tcaatagcac agataacagt tctgaccaat taaatggtac aagacaaata 2940
gctttggatt ctagcacaaa gttaatgcat cgaatgggaa tttcaagcaa gaaacttgaa 3000
gatgctatct gtcttatctg tgagaagaag ttaattgagc tgtataaaat gaaaaatccg 3060
tcagaaatgc caatggtgaa ttgcttctt attgctgcca ggaacagcc ggctccatca 3120
acaattggtg cttcaagtgt ctatataatg ctaagacctg acaaaaagtt gtatgttggg 3180
cagactgatg atcttgaggg cagagtacgt gctcatcgct tgaaggaggg aatggaaaac 3240
gcgtcattcc tatatttctt agtctctggc aagagcatcg cctgccatt ggaaactctt 3300
ctaataaatc aacttccaa tcatggtttt cagctaacaa acgttgctga tggtaagcat 3360
cgtaattttg gca 3373

- 5 <210> 6
- <211> 3180
- <212> ADN
- <213> *Sorghum bicolor*

ES 2 731 638 T3

<400> 6

atgcaccggg tgctcgtgag ctccgctcgtg gccgccacgc cgcggtggct ccccctcgcc	60
gactccatcc tccggcgccg ccgcccgcgc tgctctctc ttcccatgct gctattcgac	120
cggagggctt ggtccaagcc aaggaaggtc tcacgaggca tctcagtggc gtctaggaaa	180
gctaacaaac agggagaata ttgtgatgaa agcatgctat cgcatatcat gtggtggaaa	240
gagaaaaatg agaagtgcag aaaacatca tccgtacaat tgactcagag gcttgtgtat	300
tcaaatatat tagggttgga tccaaatcta agaaatggaa gcttgaaaga tggaacctg	360
aacatggaga ttttgctatt taaatcaaaa tttcctcgtg aggttctact ttgcagagta	420
ggagacttct atgaagctat tggttttgat gcctgtattc tcgtagagca tgcaggctta	480
aatccttttg gaggtttgcg ttctgacagt atccctaaag ctgggtgtcc agtcgtgaat	540
ttacggcaga cattggatga tttgactcga tgtggttatt ctgtgtgcat agttgaggaa	600
attcaaggcc caacacaagc ccgttcccgg aaaagtogat ttatttctgg gcatgcccat	660
cctggtagtc cttatgtatt tggctttgct gaagtagacc atgatgtaga gttccctgat	720
ccgatgcctg ttgttgggat ttcacattct gcaaaagggt attgcttgat atctgtgcta	780
gagacaatga aaacttattc agctgaggag ggcttaacag aagaggctat tgttactaag	840
ctccgcatat gtcgttatca tcatctatac cttcacaatt ctttgaagaa taattcttca	900
gggacatcac gctggggatga attcggtgaa ggagggctct tgtggggaga gtgcagtggg	960
aagtcctttg agtggtttga tggtttacct attgaagaac ttttatgcaa ggtacgggaa	1020
atatatggcc ttgatgagaa aactgttttt cgcaatgtca ccgtctcatt ggaaggcagg	1080
ccccaacctc tttatcttgg aactgctact caaattggag tcataccaac tgagggaata	1140
ccgagtttgc taaaaatggc actcccttca agttgtggcg ggcttccatc aatgtatatt	1200
agagatcttc ttcttaatcc tccatcattt gatgttgccg cagcgggtcca agaggcttgc	1260
aggcttatgg ggagcataac ttgttctggt cctgaattta cttgcatatc acttgtgaag	1320
ctacttgagt ctaaagaggt caatcacatt gaattttgta gaataaaaaa tgtccttgat	1380
gagattatgc tcatgaacag gaatgctgag ctttctgcaa tcctgaacaa attgctggta	1440
cctggttctg tggctactgg tttgaaagtt gaagctgata tgctagtcac tgaagatttt	1500

5

ES 2 731 638 T3

atgccaatta tttcaagggg gaaatctgta gtgtcctcaa atggagggttc gaaaggagaa 1560
atctgttatg caaaagaaca tgaagctggt tggtttaaag gaaagcgatt cacaccaact 1620
gtatgggcta acacacctgg tgagcagcaa ataaaaaac tgaagcctgc aattgattog 1680
aaaggcagaa aggttgggga ggaatggttt acaacaagca aagttgagaa tgctttagcc 1740
aggtaccatg aagcttgtga taatgcaaga aataaagttg ttgagctggt gagagggtt 1800
tcaagtgaat tgcaggacaa aattaacata cttgtctttt gctcaacact gctcatcatt 1860
gcaaaagcac tttttgggtca tgtagtgag gctcggagaa gaggtggat gcttcctact 1920
atatttcctt tgcxaaagga ctgtgttca gaggaaagtt caaatgcaat ggatttagta 1980
ggactctttc cttactggct tgatgttaat caaggaaatg caatattgaa tgatgtccac 2040
atgcactctt tatttgttct tactggcca aatggtggtg gtaaacttag tatgttgcca 2100
tcagtctgtg cagctgctgct gcttgggaata tgtggcctga tggtagcttc aacttcagct 2160
gtaatccgc attttgattc cattatgctg catatgaaag cctacgatag cccagccgat 2220
gggaaaagtt catttcagat tgaaatgtcg gagatactg ctttagtcag ccgagctact 2280
gctaggagtc ttgtcctgat tgatgaaata tgtaggggca cagaaactgc aaaaggaacc 2340
tgtattgctg gtagcatcat cgaaaggctg gataatggtg gctgcctagg catcatatca 2400
actcacctgc atgggatttt tgacttgctt ctctcactca gcaactactga tttcaaagct 2460
atgggaactg aagtggctga cgggtgcatt catccaacat ggaaactgat ggatggcatc 2520
tgtagagaaa gccttgcttt tcaaacagcc aggagggag gcatgcctga gttcataatc 2580
agaagggtg aggagctata tttgactatg agtacaata acaagcagac cgcacatg 2640
gtccacaatg agcctcgtaa tgacagcccc agtgtaaatg gcttgggtga gaagcctgaa 2700
tatctgaaat acagactaga aattctgcct ggtacctttg agccgttgctg gagggaggtt 2760
gagagtgctg ttactatgat atgcaagaaa aaactggttg atctttaca taaaagtagc 2820
atcccagaac tggttgaggt ggtctgtgtt gctgtagggtg ctagagagca accaccact 2880
tccactgttg gcaggtctag catctatgtg attatcagaa gcgacaaca gctttatgtt 2940
ggacagacgg atgatcttct ggggcgctt cacgcccaca gatcgaagga aggcattgcag 3000
gatgctacga tattatacat cttggttcct ggcaagagcg ttgcctgcca gctggaacc 3060
cttctcataa atcagcttcc ttcgaggggc ttcaagctca tcaacaaggc agacggaaag 3120
cataggaact tcggtatatac togaatctct ggagaggcaa tcgccacca gctaaactaa 3180

<210> 7
<211> 3399
<212> ADN
<213> *Oryza sativa*

5

<400> 7

ES 2 731 638 T3

atggccattc agcggctgct cgcgagctcg ctcgtggccg ccacgccgcg gtggcttccc 60
 gtcgcgcgccg actcgtttct cgggcgcgcg caccgccctc gctgctcccc gctccccgcg 120
 ctgctattta acagagggtc ctggtctaaa ccaaggaaag tctcacgaag catttccatt 180
 gtgtctagga agatgaacaa acaaggagat ctctgtaatg aaggcatgct gccacatatt 240
 ctgtggtgga aagagaaaat ggagagggtc aggaaacccat catcaatgca attgactcag 300
 agacttgtgt attcaaatat tttaggattg gatccaactt taagaaatgg aagcttgaag 360
 gatggaagcc tgaacacgga aatgttgcaa ttcaaatcga agtttcctcg tgaagttcta 420
 ctttgcagag tgggagattt ctacgaggct gttgggtttg atgcatgtat ccttgtggag 480
 catgcaggct taaatccttt tggaggcttg cgttctgata gtattccaaa agctggatgt 540
 ccagtcatga atttgcggca gacattggat gatttgactc gatgtggtta ctctgtgtgc 600
 atagttgaag aaattcaagg cccaacccea gctcgtgcta ggaaaggccg atttatttct 660
 ggccatgcac atcctggtag tccttatgta tttggctctg ctgaagtaga ccatgatgtt 720
 gagttccctg atccaatgcc tgtagtggg atttcacgat ctgcaaaaagg ctattgcctg 780
 atttctgtgc tagagacaat gaaaacatat tcagctgagg agggcttaac agaggaagca 840
 gttgttacta agcttcgcat atgccgttat catcatctat accttcatag ttctttgagg 900
 aacaattctt caggcacatc acgctgggga gaatttggcg aagggtgggct attgtgggga 960
 gagtgcagtg gaaaatcttt tgagtggttt gatggtaatc ctattgaaga actgttatgc 1020
 aagtaaggg aaatatatgg gcttgaagag aagactgttt tccgtaatgt cagtgtctca 1080
 ttggaagggg ggcctcaacc cttgtatctt ggaacagcta ctcaaattgg ggtgatacca 1140
 actgagggaa taccagttt gctaaaaatt gttctccctc caaactttgg tggccttcca 1200
 tcattgtata ttagagatct tcttctaac cctccatctt ttgatgttgc atcatcagtt 1260
 caagaggctt gcaggcttat gggtagcata acttgctcga ttctgaatt tacatgcata 1320
 ccggcagcaa agcttgtgaa attactcgag tcaaaagagg ttaatcacat cgaatthtgt 1380
 agaataaaga atgtcctcga tgagggtgtt ttcatgggta gcaatgctga gctttctgct 1440
 atcctgaata aattgcttga tcctgcgcc atagttactg ggttcaaagt tgaagccgat 1500
 atactagtga atgaatgtag ctttatttca caacgtatag ctgaagtaat ctctttaggt 1560
 ggtgaaagtg accaggcaat aacttcatct gaatatattc cgaagagtt cttcaatgat 1620
 atggagtcat cttggaaggg acgtgtaaaa aggggtgatg ctgaagagga gttctcaaat 1680
 gttgatatag ctgctgaggc actgtcaaca gcggctcattg aagattttct gcccaattatt 1740
 tcaagagtaa aatctgtgat gtcctcaaat ggaagtctga agggagaaat cagttatgca 1800
 aaagagcatg aatctgtttg gtttaaggg aggcgattca caccaaatgt gtgggccaac 1860
 actcctggtg aactacagat aaagcaattg aagcctgcaa ttgactcaaa aggtagaaag 1920

ES 2 731 638 T3

gtcggagaag aatgggtcac cactatcaaa gttgagaatg ctttaaccag gtacatgaa 1980
gcttgtgata atgcaaaacg taaagttctt gagttgttga gaggactttc aagtgaattg 2040
caggacaaga ttaatgtcct tgtcttttgc tcaacgatgc tcatcataac aaaagcactt 2100
tttggcatg ttagtgaagg acgaagaagg ggttgggtgc ttctactat atctccctt 2160
tgtaaggata atgttacaga ggaaatctca agtgaatgg aattgtcagg aacttttct 2220
tactggcttg atactaacca agggaatgca atactgaatg atgtccatat gcactcttg 2280
tttattctta ctggtccaaa cgggtggtgtt aaatccagta tgctgagatc agtctgtgct 2340
gctgcattac ttggaatatg tggcctgatg gtgccagctg cttcagctgt catcccacat 2400
ttcgattcca tcatgctgca tatgaaagca tatgatagcc cagctgatgg taaaagtctg 2460
tttcagattg aaatgtcaga gatacgatct ttagtctgcc gagctacagc taggagtctt 2520
gttctaattg atgaaatatg taggggcaca gaaacagcaa aaggaacatg tatagctggt 2580
agcatcattg aaagactcga taatgttggc tgcataggca tcatatcaac tcatttgcatt 2640
ggcatttttg accttccact gtcactccac aatactgatt tcaaagctat ggggaaccgaa 2700
atcatcgata ggtgcattca gccaacatgg aaattaatgg atggcatctg tagagagagt 2760
cttgcttttc aaacagccag gaaagaaggt atgcctgact tgataattag aagagctgag 2820
gaactatatt tggctatgag cacaaacagc aagcagacat catcagctgt ccaccatgaa 2880
atatccatag ccaactctac tgtaaatagc ttggttgaga agcctaatta cctgagaaat 2940
ggactagagc ttcaatctgg ttcttccgga ttactaagaa aagaaattga gagtgttgtt 3000
accacaatat gcaagaagaa actgttgat ctctacaaca aaaggagcat ctcagaactg 3060
attgaggtgg tctgtgttgc tgtgggtgct agggagcaac cccaccttc aactgttggc 3120
aggtccagca tttatgtaat tatcagacgt gacagcaagc tctatattgg acagacggat 3180
gatcttggg gtcgacttag tgctcacaga tcgaaggaag gtatgcagga tgccacgata 3240
ttatatattt tggtacctgg gaagagcatt gcatgccaac tggaaactct tctcataaat 3300
cagctacctt tgaaaggttt caagctcatc aacaaggcag atggcaagca tcgaaatttc 3360
ggtatatctc ttgtcccagg agaggcaatt gccgcatag 3399

<210> 8

<211> 3381

5 <212> ADN

<213> *Brachipodium distachyon*

<400> 8

atgcagcggc ttctggcgag cacgatcgtg gccgccacgc cgcggttgct cccctcgcc 60
gactctatcg tccggcgccg ccgcccgcgc cgttccccgc tccccgtcct gctattccac 120
10 agatcattgt acaaaccaag gaaggtttca cgaggcatta caatggtgtc taataagggtg 180

ES 2 731 638 T3

aacaaacagg gagatctctg caatgaaggc atgctgtcac atattatgtg gtggaaagag	240
aaaatggaga gctgcaggaa accatcatct gtgcagttga ctcagagact tgtgtactct	300
aatatattag ggttggatcc aactttaagg aatggaagct taaaagatgg aaccctgaac	360
atggagatgt tacaatttaa atcaaagttt ccacgtgagg tcctactttg cagagtagga	420
gatttctatg aagccattgg gtttgatgcc tgcattcttg tagagcatgc aggcctaaat	480
ccttttgggg gcttgcgttc tgacagtatt ccaaaagctg gatgtccaat catgaatttg	540
cggcaaacat tggatgattt gactcggctc ggttattctg tgtgcatagt tgaggaaatt	600
caaggcccaa ctcaagcccg tgctcggaaa ggtcgattta tctctggcca tgcgcatcct	660
ggcagtcctt atgtatttgg tcttgctgaa gtagatcatg atcttgagtt tcctgaccca	720
atgcctgtag ttgggatttc acgctctgca aaaggctatt gcttgatttc tgtgctagag	780
acgatgaaaa cttattcagc tgaggagggc ctaacagaag aagctgtagt gactaagctg	840
cgcataatgcc gttatcatca tctatacctt cacagttctt tgaggaataa ttcttcaggg	900
acatcacgct ggggggaatt cggagagggg ggactcttgt ggggagagtg cagtggaaag	960
tgttttgaat gtttgatgg ttctcctatt gaggaacttt tatgcaaggt aagggagata	1020
tatgggctgg atgagaaaac taatttccgc aatgtcactg tctcattgga agggaggcct	1080
caacctttat atcttggaac tgctactcaa attggagtga taaaaacgga ggaattccc	1140
agtttactaa aaatgctact ccctccaaac tatggcgggc ttccatcaat gtatatcaga	1200
gatcttcttc ttaatcctcc atcttttgat gtcgctctg caattcagga ggcttcaggg	1260
cttatgggca gcataacttg ttcgattcct gaatttactt gcataccatc agcgaagctt	1320
gtgaaattac tcgagtcaaa agaggttaat cacattgaat tttgtagaat aaagaatgtc	1380
cttgatgaca ttatattaat gaatggaaac actgagcttt ctgctatcat ggacaaattg	1440
ctcgaacctg cttcgggtgt tactggtttg aaagttgatg ctgatatact aattagagaa	1500
tgtagcctta tctcacaacg tatagtgtaa gtcactctt taggtgggga aagcgatcag	1560
gcaataactt catcggaaata tattcccaag gagttcttta atgatatgga gtcacttgg	1620
aagggcgctg tgaaaagggt tcatgctgaa gaagagttca caaatgtcga tgtagctgct	1680
gaagcattat caaccgctg aactgaagat tttctgcca ttattgtaag agttaaatct	1740
gtgatatctt cacatggagg ttctaaaggg gaaatctctt atgcaaaaga acacgaagct	1800
gtttggttta aaggaagcg attcacacca aatgtctggg cgaacacacc tggatgacaa	1860
cagataaaac aactaaagcc tgcgattgat tcaaaaggta gaaaagttgg ggaggaatgg	1920
tttacaacaa tcaaagttga gaatgcttta gccaggatc atgaagcttg tgatagtgca	1980
aaaggcaaaag ttcttgagct gttgagaggt ctttcaagtg aattgcagga caagattaat	2040

ES 2 731 638 T3

atacttgtct tctgctcgac gctgctcatc atagcaaaag cacttttttg tcatgttagc 2100
gagggcttta gaaggggttg ggtgcttctc gccatatctc ccctatctaa ggactatagt 2160
actgaagaag gctcaagtga aatggattta ttgagactct ttccttactg gcttgacagt 2220
aatcaagga atgcaatact gaatgatgtc aatatgcact ctttgtttat tctgactggc 2280
ccaaatggtg gaggtaaatc cagtatgttg cgatcagtct gtgcagctgc attgcttggg 2340
atatgtggtc tgatggtgcc agctgcttca gctgtcatcc cacactttga ttccatcatg 2400
ctgcatatga aggcctatga tagcccagct gatgggaaaa gttcgtttca gattgaaatg 2460
tcagagatcc gatctttagt cagccgtgct actggtagga gtcttgttct cattgatgaa 2520
atatgtaggg gcaagaaac tgcaaaagga acttgatatag ctggtagcat catcgaaagg 2580
ctcgacgatg ttggtgcct aggcacata tcaaccatt tgcattggcat ttttgacttg 2640
cctctgtcac tcggcaatac tgatttcaa gctatgggaa cagaagttgt caatgggtgc 2700
attcagccaa catggagatt aatggatggt atctgtagag aaagccttgc ttttcaaaca 2760
gcaaggaagg aaggtatgcc tgacttgata attaaaagag cagaggagct atacagtact 2820
atgggcagaa gcaagacgtc atcaacagtc caccatggtc catccggtgc taagtctaaa 2880
gcaagtggat tggttgatat gcctgatggt ctgggaaatg gattagaact tccatctggt 2940
gcttttgcac tgctgcgaaa ggatgtcga ataatgtga ccgcaatat caaggataaa 3000
ttgttgatc tctacaaca aagaagcctc tcagagctgg ttgaggtggt ttgtgttact 3060
gtaggtgcta gggagcaacc gccaccttca actgttggca ggtccagcat ctacatagtt 3120
atcaggcgtg acaacaaget ctatggttga cagacggatg atcttgttgg ccgtcttgc 3180
gttcatagat ccaaggaagg tatgcagggt gccacaatat tatatatcgt ggttcctggc 3240
aagagcgttg cgtgccagct ggagacactt ctcataaacc agcttcctc gaaaggtttt 3300
aagctcacga acaaggcaga tggcaagcat cggaacttcg gcatgtctgt tatctctgga 3360
gaagccattg ctgcacactg a 3381

<210> 9
<211> 3520
5 <212> ADN
<213> *Vitis vinifera*

<400> 9

atgtactggc tgtcaaccaa aaacgtcgtc gtttcattcc ctgatteta ctctctogct 60
cttcttctcc gttcccctgc ctgcaatac acttcatttc gttcttctac acttctactc 120
caacagtttg agaagagccg atgtctcaac gaaaggaggg ttttgaagg agctggaaga 180
atgacaaaa atgttatagg attgcaaat gagctagatg aaaaggatct ttctcacata 240
10 atgtggtgga aggagaggat gcaaatgtgt aaaaagccgt ccaactgtcca ccttgttaaa 300

ES 2 731 638 T3

aggcttatat attccaatth gctaggagtg gatcctaact tgaaaaatgg gaatctaaaa 360
 gaaggaacgc tgaactggga gatggtgcag ttcaagtcaa agtttcctcg tgaagtttta 420
 ctctgcagag taggggattt ttatgaagcc atcgggaattg atgcttgtat tcttggtgaa 480
 tatgetggtt tgaatccttt tgggtggttg cgetcagaca gtataccaag agctggctgc 540
 ccagtcatga atctacgaca aactttggat gacctgacac gtagcgggta ttcagtttgc 600
 atagtggagg aagttcaggg tccaactcaa gctcgttctc gtaaaggctcg ttttatctct 660
 gggcatgcgc atccgggtag tccttatgta tttggacttg ttggggttga tcatgatctt 720
 gattttccag aaccaatgcc tgtagttgga atttctcgtt ctgcgaaggg ttattctata 780
 attttagtcc ttgagactat gaagacgttt tcagtagagg atggtctgac agaagaggct 840
 ttagttacca agcttcgcac ttgtcactac catcatttat tgctgcatac atctctgaga 900
 cgcaactcct caggtacttg tcggtgggga gaatttggtg agggaggact attatgggga 960
 gaatgtagtg ctagacactt tgaatggtt gaaggggatc ctgtatctca acttttgttt 1020
 aaggtaag agctctatgg ttttgatgat caagttacat ttagaaatgt cactgtgtct 1080
 tcagagaaaa gaccccgttc tttacacctt ggcacagcta cacaaattgg tgccatacca 1140
 acagagggca taccgtgttt gttaaagggtg ttgcttccat caaattgcac tggctacct 1200
 ctttgtatg ttagagatct tttctcaac cctcctgctt atgagattgc atccataatt 1260
 caagcaacat gcagactcat gaacaatgta acgtgctcga ttctgagtt tacttgtgtt 1320
 tcccctgcaa agcttgtgaa gctacttgag cttagggagg ctaatcatat tgagttctgc 1380
 agaataaaaa gtgtacttga tgaaatattg cagatgcata gaaactctga tcttaacaaa 1440
 atccttaaat tattgatgga tctacactgg gtggcaactg gattgaagat tgactttgac 1500
 acattggtga acgaatgtga atggatttca gctagaattg gtaaagtat ctttcttgat 1560
 ggtgaaaatg atcaaaagat aagttacat cctatcattc caaatgactt tttgaggac 1620
 atggaatctc cttggaaggg tcgtgtgaag aggatccatg tagaagaagc atttgctgaa 1680
 gtggaagag cagctgaggc attatcttta gctatctccg aagattttct acctattatt 1740
 tcaagaataa aagctaccac agccccactt ggagggtccaa aaggagaagt tgtatatgct 1800
 cgagagcatg aagctgtttg gttcaagga aaacgttttg caccagttgc atgggcaggt 1860
 actccagggg aagaacaaat taagcagctt agacctgcta tagattcaa aggtagaaag 1920
 gttggattgg aatggtttac cacagtgaag gtggaggatg cactaacaag gtaccatgag 1980
 gctggggaca aggcaaaagc aagggtcttg gaattgttga ggggacttct tgoggagtta 2040
 caaactaaaa ttaacatcct tatctttgct tccatgttgc ttgtcattgc aaaggcata 2100
 tttgctcatg tgagtgaagg gagaagaagg aaatgggttt tcccctctct thtagagttg 2160
 cataggtcta aggacatgga acctctggat ggagctaatt ggatgaagat aactggttta 2220

ES 2 731 638 T3

tcacatatt ggttgacgt ggcacaaggc agtgcgtgac ataatacagt tgatatgaaa 2280
 tcattgtttc ttttgacagg acctaattgg ggtggtaaat caagtttgct tcgatcaatt 2340
 tgtgcagccg cattaacttg aatatgtgga tttatggtgc ctgcagaatc ggccttgatt 2400
 cctcattttg attctattat gcttcacatg aaatcttatg atagcccagc tgatggaaaa 2460
 agttcatttc agattgaaat gtcagagatg cgatccataa tcaactggagc cacttcaaga 2520
 agcctggtgc tgatagatga aatctgccga ggaacagaaa cagcaaaggg gacatgtatt 2580
 gctggtagca tagttgaaac tcttgataag attggttgtc tgggtattgt atccactcac 2640
 ttgcattgta tttttacett gggactgaat actaagaatg ctatttgtaa agcaatggga 2700
 actgaatatg ttgatggcaa aacaaaaccg acctggaagt tgatagatgg aatctgtaga 2760
 gaaagccttg cctttgaaac agctcagaag gaggaattc ctgaaacaat tatccgaaga 2820
 gcagaagagc tgtatctttc aatccattca aaagacttaa ttacaggggg aactatttgt 2880
 cctaaaattg agtcaacaaa tgaaatggaa gtcttacata agaaagtga gaggcagtc 2940
 accattgttt gccaaaagaa gctgaaggag ctctataagc agaaaaacac gtcaaaactt 3000
 ccagagataa actgtgtggc cattttgccg ggggaacagc cgcgccatc aacaattggt 3060
 gcttcaagtg tgtatgtggt gtttagcact gataagaaac tttatggttg agagacagat 3120
 gatcttgaag gcagagtcgg tgcgcatcga tcaaaggaag gaatgcagaa ggcctcattc 3180
 ctttattttg tggcccagc gaagagcttg gcatgccaac tcgaaacgct tctcatcaac 3240
 cagctccctg tccaggggtt ccaactggtc aatagagctg atggtaaaca tcgaaatfff 3300
 ggcacattgg atcaactcgt ggaagtgtg accttgcac aatgagcctg cgtccttgc 3360
 caccattttt gtagaatggt tccatctttg aatatgtac ttgaatgaca aaaaccagat 3420
 gaaagtggct gcagcaattt tggttttttg atgtacggtg ctccacttgc attagtatta 3480
 tctacctgat gaaatatgca ttgatattgc ttgctctaca 3520

<210> 10
 <211> 3615
 <212> ADN
 <213> *Cucumis sativus*

<400> 10

atggaatat ccatctatgt cgatgtggca ttgtggcggg aagtatcggg aaccaagggt 60
 tttctgttcc ggcgacgacg agttacaaac accctcctca tttcaaacca aaacgcttta 120
 aaacttcaa tcacaacaag attgaagctc acaaaccatc cattttttatc caccgccatg 180
 tactggcggg caacacgaac cgttgtttct gcttccgggt ggcgttttct ggctcttttg 240
 attcgttcc ctccgcgtaa cttcacctca gttactcatt cgcggcatt tatagaaagg 300
 caacagcttg aaaagttgca ctggttgaaa agcagaaaag gttcaagagg aagcatcaaa 360

ES 2 731 638 T3

gctgctaaga agttaaagga taataatatt ctccaagaca ataagtttct ttctcacatt 420
ttatggtgga aagagacggt ggaatcatgc aagaagccgt catctgtcca gctggttaag 480
aggcttgact ttccaactt gctaggttta gatataaacc tgaaaaatgg gagtcttaaa 540
gaaggaactc ttaactgtga gattctacag ttcaaggcaa agtttcctcg agaagttttg 600
ctctgtagag ttggagatth ttatgaagca attggaatag atgcttgcat acttgtggaa 660
tatgctggtt taaatccttt tggaggtcag cgtatggata gtattcctaa agctggttgc 720
cccgttgga atcttcgtca aactttggat gatctgacac gcaatgggtt ctcaagtgtgc 780
atagtgaag aagttcaggg cccaattcaa gctcgttctc gcaaaggacg ttttatatct 840
gggcatgcac acccaggcag tcctatggt tttgggcttg tcggggttga tcacgatctt 900
gactttccag aaccgatgcc tgtgattgga atatctcgat ccgcaagggg ctattgcatg 960
agccttgca tagagacat gaagacatat tcatcagagg atggtttgac agaagaggcc 1020
ttagttacta aactgcgcac ttgtcaatac catcattat ttcttcacac gtcattaagg 1080
aacaactcct caggcacttg ccgctggggg gaatttggtg aggggtggccg gctatggggg 1140
gaatgtaatc ccagacatth tgagtgggtc gatggaaagc ctcttgataa tcttatttct 1200
aaggtaaag agctttatgg tcttgatgat gaagttacat ttagaaatgt tacaatatcg 1260
tcagaaaata ggcacatcc gttactcta ggaactgcaa cacagattgg tgccatacca 1320
acagagggaa taccttgttt gctgaagggt ttgcttccat ccaattgtgc tggccttct 1380
gcattgtata tgaggatct tcttctcaat cctcctgctt atgagactgc atcgactatt 1440
caagctatat gcaggcttat gagcaatgtc acatgtgcaa ttccagactt cacttgcttt 1500
ccccagcca agcttgtgaa gttattggaa acgagggagg cgaatcatat tgaattctgt 1560
agaatgaaga atgtacttga cgaaatatta caaatgcaca aaaattgcaa gctaaacaat 1620
atcctgaaat tgctgatgga tcttgcactc gtggcaactg ggttgaaaat tgactatgat 1680
acatttgtca acgaatgtga atggccttcc agtagagttg atgaaatgat ttttcttgg 1740
agtgaaagtg aaagtgatca gaaaatcagt tcttatccta ttattcctaa tggttttttc 1800
gaggacatgg aattttcttg gaaaggtcgt gtgaagagga ttcacattga agaacttgt 1860
acagaagttg aacgggcagc tgaagcactc tcccttgag ttactgaaga ttttgcctca 1920
atcatttcta gaatcagggc tactaatgca ccactaggag gtccaaggg agaaatatta 1980
tatgctcggg accatcaatc tgtctggttc aaaggaaaac ggtttgcacc atctgatgg 2040
gctggaagcc ctggagaagc agaaatata caactgaaac ctgctcttga ttcaaaggga 2100
aaaaaagttg gggaggagtg gttaccacg aagaaggtg aggattcttt aacaaggtac 2160
caagaggcca ataccaaagc aaaagcaaaa gtagtagatc tgctgagggg actttcttct 2220

ES 2 731 638 T3

gaattgttag ctaaaattaa cgtcctaata tttgcttcca tgctactcat aattgccaaag 2280
 gcgttatttg ctcattgtgag tgaagggagg aggaggaaat gggtttttcc cacccttgct 2340
 gcacccagtg ataggtccaa ggggaaagtt gcgatgaagc tggttggtct atctccctat 2400
 tggtttgatg ttgtcgaagg caatgctgtg cagaatacta ttgagatgga atcattatth 2460
 cttttgactg gtccaaatgg gggtgaaaa tctagtttgc ttcgatcgat ttgtgctgct 2520
 actttgcttg ggatatgtgg atttatggta ccggcagagt ccgccctgat tccccacttc 2580
 gactcaatta tgcttcatat gaaatctttt gatagtcttg ctgatggaaa aagttctttt 2640
 cagggtgaaa tgcagagat gagatccatt gtcaatagag taacggagag aagtcttgta 2700
 cttatcgatg aaatctgtcg tggaacagaa acagcaaaag gaacttgat tgccgggagc 2760
 attattgaag ctcttgataa agcaggttgt cttggcattg tctccactca cttgcatgga 2820
 atatttgatt tgcctttaga taccctaaac attgtgtaca aagcaatggg aactgtttct 2880
 gcggaaggac gcacggttcc cacttggaag ttgattagtg gaatatgtcg agagagcctt 2940
 gcctttgaaa cagcaaaagaa tgaaggaatc tctgaagcta taattcaaag ggctgaagat 3000
 ttgtatctct caaattatgc taaagaaggg atttcaggaa aagagacgac agatctgaac 3060
 tttttgttt cttctcatcc aagccttaat ggtaatggca ctggaaaatc caatctcaag 3120
 tcaaacggtg tgattgtaaa ggctgatcag caaaaaacag agacaactag caaacaggt 3180
 gtcttggtga agaaacttga gagggctatc acaaagatat gccaaaagaa gttgatagag 3240
 tttcatagag ataaaaacac attgacacct gctgaaatc aatgtgttct aattgatgca 3300
 agagagaagc cacctcatc aacaataggt gcttcgagcg tatatgtgat tcttagaccg 3360
 gatggcaaat tctatgttgg acagactgat gatctggatg gtagggcca atcacatcgt 3420
 ttaaaggaag gaatgcggga tgctgcatc ctttatctta tgggtgcctgg gaagagctta 3480
 gcttgccaac ttgaaactct tctcatcaat cgacttcttg atcacgggtt ccagctaact 3540
 aacgttgctg atggaaagca tcggaattht ggcacagcca atctcttatc cgacaatgtg 3600
 actgthtct catga 3615

<210> 11
 <211> 28
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> sintético

10 <400> 11
 cgcaggatc acgaggcaag tgctaagg 28

15 <210> 12
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> sintético

<400> 12
 atccccaac agccaatthc gtccaggatc cccaaacagc caatthctc cagg 54

ES 2 731 638 T3

<210> 13
 <211> 961
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 13
 gtacgcttct cttaaaaacc cagctctatt cgctgttag ggttttgtgt aaaatctacg 60
 atgcttacct gtaatcgatg gttactcgcg tattcacaaa ttctgatggt gtagtttgag 120
 tttagctagt gtctttcccc taataatgct ttgttggtat taaccctagt gacactggtc 180
 aagtcagatg cagatgagta cactagatth tacttgaatc gaggtttatg agatagttha 240
 gttcttcttc aaactttgat caccatgag gtagtttact ttctcctttg atggttgtaa 300
 ccaatggagc tctcgaattt actaattctg atgtgtaatt ctgttaatag acctagaaat 360
 gcattgtggg tgttgaatct ctcttgtttg caataagtga atgataatgg tggcttagtc 420
 agatggagat gatacatttt attttgcttt atagttgggt gtatgagaat gcttagttct 480
 tctgggagtg agtttagcac atgattatat atgagatagt ttactttagt tccctcttt 540
 atcattgtgg acctctcttg ttaacaaatc ctgaggctta attctgttat tagtgatagt 600
 atctgaagaa gtttagagttt agctgagctt taattatttt tttacctcga aatgctttgt 660
 tggaaccct cttgttagca agaactgagt gatacttgtc gagtcagatg cagatgatta 720
 gatttagcac atgaaagtca ctcttatctc tttccttgta aagaaaatct ctgatttttc 780
 acagaacagt taccgtgtgg cttcttgttt caacttctct tttagtctga ttgatctaat 840
 acaagtggc tctgctgta atgtttgggt tggtttctt tttctgcat catcttgttt 900
 agaatgcaat tatcaatcaa ctactgact ggtactatct acttgtgatg acttaatgca 960
 g 961

10 <210> 14
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> *Gossypium hirsutum*

15

<400> 14
 ggcacgaggt tgctattgct gcaaggaac agccacctcc atcaactatc ggtgcttctt 60
 gcgtatatgt catgttcaga cctgataaga aactatacat tggagagacg gatgatcttg 120
 atggtcgaat tcgcttgcct cgttcaaagg acgggatgga aaatgcttct ttcctatatt 180
 tcacagttcc agggaagagt atgctcgcc aactcgaac tcttctaate aaccaactct 240
 taagtcaagg ctccccgac gccaaacttg ctgacggtaa gcatcagaat tttggcacat 300
 ccagtctctc atttgacggc ataaccgtag cctaacgagt taaaatgtat atcaatcgt 360
 aatttatatc gaaattgaca tagaagtggc ggcagcaatt ttgcctttga tctcggttgc 420
 tccacttgct ttgtacatgc atcacccttt taaccaaggg taaagttttc tagtcataat 480
 ttaatagcat gtatctatta agtccatttt gaggtttata tgaatcaggt tttcateatt 540
 aattggtaa attctgttat tagctcctct actttactaa agttgtagat ttagttctta 600
 tactttaatt agattatttt tactctatac ttttcgaatg ataaaatttt agtcttcatt 660

20

<210> 15
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> sintético
 <400> 15
 10 ggttgaggag cctgaatctc tgaagaac 28
 <210> 16
 <211> 28
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintético
 20 <400> 16
 ctgccagag attcgagata taccgaag 28
 <210> 17
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintético
 30 <400> 17
 ttttaggaa ttattgagta ttattga 27
 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 40 <223> sintético
 <400> 18
 aaataaaaat catacccaca tccc 24
 45 <210> 19
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> sintético
 <400> 19
 55 tgtgaatta ttaagatatt taagat 26
 <210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> sintético
 <400> 20
 65 tcaaccaata aaaattacca tctac 25

<210> 21
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> sintético
 <400> 21
 10 taagttttt ttaagagttt gtattgtat 30
 <210> 22
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintético
 20 <400> 22
 taaaaataat caaacctaa cttac 25
 <210> 23
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintético
 30 <400> 23
 attgtttatt aaatgtttt tagtt 25
 <210> 24
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> sintético
 <400> 24
 ctaacaattc caaaaccct tatc 24
 45 <210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> sintético
 <400> 25
 55 ggtactcat ctggatctgt attg 24
 <210> 26
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> sintético
 <400> 26
 65 ggtgaggag cctgaatctc tgaac 25

ES 2 731 638 T3

<210> 27
 <211> 250
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5
 <400> 27
 cagttcccaa agcccttgtc aaacatcgtc caacacgtat caccactcga caacataaag 60
 acagacgggt caactacacc gcgctcgcgc ctcacctga aaatctcatc actctttagc 120
 aaacgcgaaa accccttatt aagtaacttt agtttccaat actcgaaacg cggcacgcgt 180
 gcgagtatct cgacctctaa ctogtatacg agctgaggaa catttagtaa acaataatct 240
 gcatccttag 250

10
 <210> 28
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

15
 <400> 28
 caattcccaa aacccttatt aaacatcatc caacacatat caccactcga caacataaaa 60
 acaaacaatt caactacacc aactcacac ctcaccttaa aaatctcatc attctttaac 120
 aaacacaaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcaaaaca caacacacat 180
 acaaatatct caacctctaa ctcatatata aactaaaaaa catttaataa acaa 234

20
 <210> 29
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

25
 <400> 29
 caattcccaa aacccttatt aaacatcatc caacacatat caccactcaa caacataaaa 60
 acaaacaatt caactacacc aactcacac ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac 120
 aaacacaaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcgaaaca cgacacacat 180
 acaaatatct caacctctaa ctcatatata aactaaaaaa catttaataa acaa 234

30
 <210> 30
 <211> 233
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

35
 <400> 30
 caattcccaa aacccttatt aaacatcatc caacacatat caccactcaa caacataaaa 60
 acaaacaatt caactacacc aactcacac ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac 120
 aaacacaaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcaaaaca caacacacat 180
 acaaatatct caacctctaa tcatatataa actaaaaaac atttaataaa caa 233

40
 <210> 31
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 31

ES 2 731 638 T3

caattcccaa aacccttatt aaacatcatc caacacatat caccactcga caacataaaa 60
 acaaacaatt caactacacc acattcacac ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac 120
 aaacacaaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcaaaaca caacacacat 180
 acaaatatct caacctctaa ctcatatata aactaaaaaa catttaataa acaa 234
 <210> 32
 <211> 234
 5 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 32
 caattcccag gacccttatt aaacatcatc caacacatat caccactcaa caacataaaa 60
 acaaacaatt caactacacc aactcacac ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac 120
 aaacacaaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcaaaaca caacacacat 180
 10 acaaatatct caacctctaa ctcatatata aactaaaaaa catttaataa acaa 234
 <210> 33
 <211> 234
 <212> ADN
 15 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 33
 caattcccaa aacccttatt aaacatcatc caacacatat caccactcga caacataaaa 60
 acaaacaatt caactacacc aactcacac ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac 120
 aaacacaaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcaaaaca caacacacat 180
 20 acaaatatct caacctctaa ctcatatata aactaaaaaa catttaataa acaa 234
 <210> 34
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (98)..(98)
 <223> n e s a, c, g o t
 30 <400> 34
 caattcccaa aacccttatt aaacatcatc caacacatat caccactcaa caacataaaa 60
 acaaacaatt caactacacc aactcacac ctcacctnaa aaatctcatc actctttaac 120
 aaacacaaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcaaaaca caacacacat 180
 acaaatatct caacctctaa ctcatatata aactaaaaaa catttaataa acaa 234
 35 <210> 35
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 40 <400> 35

ES 2 731 638 T3

	caattcccaa aaccottatc aaacatcatc caacacatat caccactcga caacataaaa	60
	acaaacaatt caactacacc aactcacac ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac	120
	aaacacgaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcaaaaca caacacacat	180
	acaaatatct caacctctaa ctcatatata aactaaaaaa catttaataa acaa	234
	<210> 36	
	<211> 234	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<400> 36	
	caattcccaa aaccottatc aaacatcatc caacacatat caccactcga caacataaaa	60
	acaaacaatt caactacacc aactcacac ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac	120
10	aaacacaaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcaaaaca caacacacat	180
	acaaatatct caacctctaa ctcatatata aactaaaaaa catttaataa acaa	234
	<210> 37	
15	<211> 234	
	<212> ADN	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<400> 37	
20	caattcccaa aaccottatc aaacatcatc caacacatat caccactcga caacataaaa	60
	acaaacaatt caactacacc aactcacac ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac	120
	aaacacaaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcaaaaca caacacacat	180
	acaaatatct caacctctaa ctcatatata aactaaaaaa catttaataa acaa	234
	<210> 38	
	<211> 234	
25	<212> ADN	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<400> 38	
	caattcccaa aaccottatc aaacatcatc caacacatat caccactcaa caacataaaa	60
	acaaacaatt caactacacc aactcacac ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac	120
	aaacacaaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcaaaaca caacacacat	180
30	acaaatatct caacctctaa ctcatatata aactaaaaaa catttaataa acaa	234
	<210> 39	
	<211> 234	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<400> 39	
	caattcccaa aaccottatc aaacatcatc caacacatat caccactcga caacataaaa	60
	acaaacaatt caactacacc aactcacac ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac	120
	aaacacaaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcaaaaca caacacacat	180
40	acaaatatct caacctctaa ctcatatata aactaaaaaa catttaataa acaa	234
	<210> 40	

ES 2 731 638 T3

<211> 234
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5 <400> 40
 caattcccaa aacccttatac aaacatcgtc caacacgtat caccactcga caacataaaa 60
 acaaacggtt caactacacc gcaactcgcgc ctcaccttaa aaatctcatc gctctttaac 120
 aaacacgaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcgaaacg cgacacgcgt 180
 acgaatatct cgacctctaa ctcgtatacg aactaaaaaaaa catttaataa acaa 234

10 <210> 41
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

15 <400> 41
 caattcccaa aacccttatac aaacatcgtc caacacgtat caccactcga caacataaaa 60
 acaaacgatt caactacacc gcaactcgcgc ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac 120
 aaacgcggaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcaaacg cgacacgcgt 180
 acaaatatct cgacctctaa ctcatatatcg aactaaaaaaaa catttaataa acaa 234

20 <210> 42
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 42
 caattcccaa aacccttatac aaacatcgtc caacacgtat caccactcga caacataaaa 60
 acaaacgatt caactacacc ggcctcgcgc ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac 120
 aaacgcgaaa accccttatt aaataactct aatttccaat actcgaaaca cgacacgcat 180
 25 acgaatatct caacctctaa ctcgtatacg aactaaaaaaaa catttaataa acaa 234

30 <210> 43
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 43
 caattcccaa aacccttatac aaacatcgtc caacacgtat caccactcga caacataaaa 60
 acaaacgatt caactacacc ggcctcgcgc ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac 120
 aaacacgaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcgaaacg cgacacgcgt 180
 35 acgaatatct cgacctctaa ctcgtatacg aactaaaaaaaa catttaataa acaa 234

40 <210> 44
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 44

ES 2 731 638 T3

	caattcccaa aacccttatac aaacatcgtc caacacatat caccactcga caacataaaa	60
	acaaacgatt caactacacc gogctcgcgc ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac	120
	aaacgcgaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcgaaacg cgacacacgt	180
	acgaatatct cgacctctaa ctogtatacg aactaaaaaaaa catttaataa acaa	234
	<210> 45	
	<211> 234	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<400> 45	
	caattcccaa aacccttatac aaacatcgtc caacacgatat caccactcga caacataaaa	60
	acaaacaatt caactacacc gogctcgcgc ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac	120
	aaacgcgaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcgaaaca cgacacgcgt	180
10	acgaatatct cgacctctaa ctogtatacg aactaaaaaaaa catttaataa acaa	234
	<210> 46	
	<211> 234	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<400> 46	
	caattcccaa aacccttatac aaacatcgtc caacacgatat caccactcga caacataaaa	60
	acaaacgatt caactacacc gogctcgcgc ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac	120
	aaacgcgaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcgaaacg cgacacacgt	180
20	acaaatatct cgacctctaa ctogtatacg aactaaaaaaaa catttaataa acaa	234
	<210> 47	
	<211> 234	
	<212> ADN	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
25	<400> 47	
	caattcccaa aacccttatac aaacatcgtc caacacgatat caccactcga caacataaaa	60
	acaaacgatt caactacacc gogctcgcgc ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac	120
	aaacgcgaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcgaaacg cgacacacgt	180
	acgaatatct cgacctctaa ctcatatacg aactaaaaaaaa catttaataa acaa	234
30	<210> 48	
	<211> 234	
	<212> ADN	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
35	<400> 48	
	caattcccaa aacccttatac aaacatcgtc caacacgatat caccactcga caacataaaa	60
	acaaacgatt caactacacc gogctcgcgc ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac	120
	aaacgcgaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcgaaacg cgacacacgt	180
	acgaatatct cgacctctaa ctogtatacg aactaaaaaaaa catttaataa acaa	234

ES 2 731 638 T3

<210> 49
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 49
 caattcccaa aacccttatac aaacatcgtc caacacatat caccactcga caacataaaa 60
 acaaacgatt caactacacc ggcctcgcgc ctcaccttaa aaatctcatc actccttgac 120
 aaacacaaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcaaaacg cgacacgcgt 180
 acgaatatct caacctctaa ctogtatacg aactaaaaaa catttaataa acaa 234

10 <210> 50
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

15

<400> 50
 caattcccaa aacccttatac aaacatcgtc caacacgtat caccactcga caacataaaa 60
 acaaacgatt caactacacc gcaactcgcgc ctcaccttaa aaatctcatc actctttaac 120
 aaacgcgaaa accccttatt aaataacttt aatttccaat actcgaaacg cgacacgcgt 180
 acgaatatct cgacctctaa ctcatataca aactaaaaaa catttaataa acaa 234

20 <210> 51
 <211> 3369
 <212> ADN
 <213> *Brassica rapa*

25

<400> 51
 atgcactgga ttgccaccag aaacgcgcgc gtttcgctcc ctagatggcg ttccttcgcc 60
 ttcctcttc cctcgcatt tcgcacccac tcttcctca aaccctcccc acttcttcta 120
 cttaatataa ggtactctga gaggagatac tgtttaggag atggaaagtc tgtgaaagga 180
 atcactacgg cttcttctaa gaaagttaag accaagtcta ctgatgttct cactgacaaa 240
 gatctctctc atttgctctg gtggaaggag agattgcaga catgtaagaa accatctact 300
 cttcaactta tcgaaaggct tatgtacacc aatctacttg gtttgacc cagcttgagg 360
 aatggaagtc ttaaagacgg aaacctcaac tgggagatgt tgcagtttaa gtcaaggttt 420
 ccacgtgaag ttttgctctg cagagttgga gacttctatg aggctattgg aatagatgct 480
 tgtatactcg ttgaatatgc tggtttaaat ccttttggtg gtcttcgctc agatagtgtt 540
 ccaaaggctg gctgccaggt tgtgaatctt agacaaactt tggatgacct aacacgcaat 600
 ggtttttcag tgtgtattgt ggaagaaatt caggggcaaa caccagcacg ttctcgtaaa 660
 ggtcgtattca tttcagggca tgcacatcca ggaagtctt atgtctatgg gctcgttggt 720
 gttgaccatg atcttgactt tccggagcct atgcctgtgg ttgggatatc tcgttcagca 780
 aggggctact gtatgatatac tatcttcgag actatgaaag catattcact agatgatggt 840
 ctaacagaag aagctctggt caccaagctc cgcaccogtc gctgtcatca tcttttctta 900
 catgcatcat tgagacacaa tgcacagga acatgcoggt ggggagagtt tggagaaggg 960

ES 2 731 638 T3

ggtctcctct ggggagaatg tagtggcaga aatdddgaat ggdddgaagg agatactctt 1020
 tccgagctct taacaaaggt cagagatggt tatggdcttg atgatgaagt ttcctttaga 1080
 aatgtcaatg tacctttaga aaaccggcca cgtcctttgc atcttggaac ggctacacaa 1140
 attggtgcct tacctactga aggaatacct tgtttgttga aggtgctact tccatctacg 1200
 tgcagtggcc tgccttcttt gtatctccgg gatcttcttc taaacctcc tgettatgat 1260
 attgctctga aaatccaaga aacgtgcaag ctcatgagca caataacatg ctcagttccg 1320
 gagttacct gtgtttcatc tgctaagctt gtgaagcttc ttgaacagcg ggaagccaac 1380
 tacattgagt tctgccggat aaaaaatgtg cttgatgaag tattacacat gcacagacat 1440
 cctgagcttg tggaaactact gaagttattg atggaacctc cttgggtggc tactggtttg 1500
 aagattgact ttgaaacttt tgtcaatgaa tgtcattggg cttctgattc aattggtgaa 1560
 atgatctcat tagatgacga tgaaagtcat cagaacgtta gtaaattgtc taatgtcccg 1620
 aacgagttct tttacgatat ggagcttcca tggcgtggtc gcgttaaggg aatccatata 1680
 gaggaagaaa tcacacaagt ggccaaatcg gcagaggtt tatctttagc ggtaactgaa 1740
 gatttccacc ctattatata aagaatcaag gctatggctg catcacttgg tggctcaaag 1800
 ggagaaattg tgtatgcaaa agaacatgag tctgtttggt tcaaagggaa acggtttacc 1860
 ccatctgtat ggggtggtac tgctgggaa gaacaaatta aacagctgaa acctgctttt 1920
 gactccaaag ggaaaaaggt tggagaagaa tggtttacia ctcaaaaggt ggaaactgct 1980
 ttagtcagat atcatgaagc tagtgagaac gcaaatgccc gggctcttga gcttttgagg 2040
 gaattatctg ctaaaacttca aacaaaaata aacgttcttg tatttgcata tatgcttctc 2100
 gtcattgcaa aagcattatt ttctcatgct tgtgaaggga gaagacgaaa gtgggttttt 2160
 ccaactcttg ttggtttcag tacagatgag gccgcaaatc cattagatgg tggtgccact 2220
 cgaatgaagc tgactgggct atcaccttat tggtttgatg tagcttctgg aactgctgtt 2280
 cacaatacgg tcgacatgca atcactgttt cttctaaccg gacctaacgg tggtggtaaa 2340
 tcaagtttgc tcagatcgat atgcgcagct gctttgcttg gaatctgtgg ttttatggtt 2400
 ccagctgaat cagcttatat cctcacttc gattccatca tgettcatat gaaatcttat 2460
 gacagtcctg tagatgggaa gagttctttt caggtggaaa tgtcggagat acggtctatt 2520
 gtaagccagg ctacttcaag aagcctagtg cttatagatg agatctgcag agggacagag 2580
 acagctaaag gcacatgat tgctggtagt gtgatcgaga gtcttgacgc aagtggttgc 2640
 ttgggtattg tgtctacaca totccatgga atottcgatt tgcctcttac ggccaaaaac 2700
 gtcacgtata aagcaatggg agcagagaat gtggaagggc aaacaaaacc aacatggaaa 2760
 ctgacagatg gagtttgcag agagagtctt gcgtttgaaa cagetaagag agaaggtgtt 2820
 ccggagacaa ttatccaaag agccgaagct ctttacatct ccgtttatgc caaagacgca 2880

ES 2 731 638 T3

tcgtttgggg ttgtcaggcc aaacaaaacg gagacttcat cggacaatga gatcagcaaa 2940
ccagtcaggt ctgagagaag cttggagaag gacttggcaa aagctatcct taagatttgt 3000
gggataaaga tgaatgagcc tgtaggttta gaatgtcttt caataggtgc tcgagagctt 3060
ccacctccat ctacagttgg ttcacatgc gtgtatgtga tgaagagacc agataagaga 3120
ttgtacattg gacagacgga tgatcttgaa ggaagaatac gtgcgcatag ggcaaaggaa 3180
ggactgcaag ggtcaagttt cctatacctt gtggtacaag gtaagagtat ggcttgcag 3240
ctagagacc ttttgattaa ccagctccat gagcaaggct actctctagc taacttagcc 3300
gatggaaagc accgcaattt tgggacgtca tcaagcttga ctgcgtcaga tgtagtcagt 3360
atctcctag 3369

<210> 52
<211> 3768
5 <212> ADN
<213> *Triticum aestivum*

<220>
10 <221> misc_feature
<222> (3557)..(3557)
<223> n e s a, c, g o t

<400> 52

actcagatta gaaatgctga gagagcctta cctggtaaaa atgaagatac ctcaaatgag 60
cagccaagtg catcttcccc tgtacggtac aacggcaaat atagcagagg aactgtgtta 120
tttgcagaac atagcacgga taccactccg ccacaggagc cactgaagt tcttgcaagg 180
tcttccacag atgaatttgt taaagcaagc acgctgttcc ctgaacttgg ttcagatcaa 240
actctgcttc aagagtgtcc gaagaagtta tcctcagagt gccccagcaa ccagtacgtt 300
caagctaatt cagtgtttga agcatttgat gtacaaactc cgtcccagga tccgttaaag 360
agaatcttt ctgggccttt tcatggagca gatacacctt taccagagta tcgttcatat 420
ccaattcctt tgcagcatcc atcgaaaaat ttgtcatcgg gctcttctag tgggtgaatac 480
cttagagcag tgacaccgct tggacttgat tcgaatgata ctcccacagc aaaacactca 540
aagaagctat tctctgggtc ttcagaccat tcatacatta aagcaactaa tttgtttcog 600
gaatttgatt caaatggaac tccgctgcag aaccactcga ataagttctc agtatctatg 660
aatggtgaagc atattggagc agctgctaca ctgtttccag aacttgattc tgttcttctg 720
aaaccagaaa ctccagtgac acgagcagtg gctcctcgcg ggaagagagt tcaacaggat 780
caacgcatga ctgccaataa cagccagtct cctttgtggg gttcaaataa gaaggtgaaa 840
tcagctcatt gttctccacc tgggaaaatg gttcatgatg aaatggctga aagtgcacgt 900
15 agtaaatttg aatggctgaa tcctttgaat atcagggatg caaataaaag gcggccagat 960

ES 2 731 638 T3

gaccacttt atgacaagag aactcttttt attccacctg atgcaactgag aaagatgtca 1020
acatctcaaa agcaatactg gtctattaag tgcaaatata tggatgttct cctcttcttc 1080
aaagtgggga aatthttatga gctctatgaa gtagatgctg agatcggcca aaaggaactt 1140
gattggaaaa tgactattag tggggttga aatgcccagc aggttggtat ttcagagagt 1200
gggattgacg atgctgttga aaagctthta gctcggggat ataaagttgg aaggatagaa 1260
caaatggaat ctgcagcaca ggcgaaatct agaggaccaa attcagttat cgaagaaag 1320
ttagctcatg tatccacacc gtcaactgca gctgacagca atatagggcc tgatgctgtt 1380
catcttcttg cattgaaaga ggttactcta gcttctaata gttctcggct ctacggattt 1440
gctthttctag attatgctgc acttaaaatc tgggttggtt cacttcaaga tgatgattcg 1500
tctgcagctt tgggggcttt gctggtgcag gthttcccga gggagataat ctatgaatcc 1560
tcaggcctct caagagaaag tcgtaaatca atgataaaat atgcctcagc aggctctgtg 1620
aaaatgcaac tgaccccaact acctgggaca gatttctctg atgcctcaca aattcaaatg 1680
ctagtacatt ctaaaggata cthtaaaagca tcaacagatt cttggttatc tgcattggat 1740
tattcagtga atcgagatgc agttatctth gcacttggtg gacttattgg tcatttgact 1800
agacttatgc tagacgatgc tctaaaaaat ggggaagtct taccttcaa tgtgtaccaa 1860
acttgthtaa ggatggatgg tcagactctt gtgaacctgg agatthttcgg caataactth 1920
gatgtggct catcaggtac tctgtacaag cacctcaatc actgcataac cgcactcggc 1980
aagcggctth taagaagatg gatatgcat ccactaaaag atgtcgatgc tataaataga 2040
aggcttgatg ttgttgaggg thtcatccag cattgtgggg taggctctat tacacttht 2100
tatctccgga aaattcctga ccttgagagg ttacttgggc gaatcagatc tactgttggg 2160
ctaacatctg ctgtcctgtt gcctthttgtt ggtgaaaaga tattaaagag gggattaaa 2220
atgthttgca tgcttatcaa ggcctccgg gthtgaattg acttattaag tgccttgcgt 2280
agagatgacc atggcatccc agcgtgtca aatcagttg atattccaac cctgagttct 2340
cttgatgaat tagttcatca gthtgaggag gatatacaca atgactthtga acagtaccag 2400
gatcatgata tcaaagacgg tgatgctacc accttgctta atttagtga acatthttgt 2460
ggaaaagcta ccgaatggtc thtggtaatc aatgccatca gcaactgttga tgccttagg 2520
tcctthtgca caatggcatt gtcactatth ggcacctgt gcagacctg tattctgtt 2580
aaagacaaat cgcctatact tcggatgaag ggtctatggc atccatagc thttgcagaa 2640
agtggaactg ggcttgatcc aaacgattt gctcttggcc aggatttctc ggtcataat 2700
cgctthtcat tgttgttgac tggthcaaat atgggaggaa aatctacaat aatgcgcgct 2760
acctgcttgg ctatcgtgct tgcccagctt ggctgttatg tcccctgcat atcatgtgaa 2820

ES 2 731 638 T3

ttgacccttg	cagactccat	ctttacacgg	ctagggcga	cggatcggat	tatgtctgga	2880
gaaagtactt	ttcttgctga	atgtagtgag	actgcatctg	ttcttcagaa	tgcaactgag	2940
gattctcttg	tcttgcttga	tgaacttggc	agaggaacta	gcacatttga	tgatacggc	3000
attgcatatg	cagtattccg	ccacctggtg	gaacaggtgc	gatgccgtct	gctctttgcc	3060
accactacc	accctctcac	caaggagttc	gcctcccacc	cccacgtgag	cctccagcac	3120
atggcctgca	tgctgaggcc	aaggagcggc	ggcaacggcg	agatggagct	caccttcctc	3180
taccgtcttg	tgctagggcg	ctctccggag	agctacggcc	tgcaggtcgc	cacgatggcg	3240
gggatcccaa	agtccatagt	ggagaaggcg	gcggtcgcgg	gcgagatgat	gaagtcgagg	3300
atcgacagga	acttcaggtc	gagcgaaggc	cgagcggagt	tctccaccct	ccacgaggac	3360
tggctgcaga	cgatcctggc	gatcggcggc	gtcaaggacg	cgcacctgga	cgaggacacc	3420
atggacacga	tgttctgcgt	cgcccaggag	ctcaagtctc	atctcaggaa	aggaggaagc	3480
tgagcgtctga	gaagtcgcca	cgggtaatta	tgcgtaggcac	cattagatgc	aggtagtctg	3540
aaggaggaag	atgagcncgg	agaaagtcgc	cgctcaccat	taatcatcag	tgttttaatc	3600
cgtcccagtc	gacggccttg	tatatagtta	cctcgcggtt	gtaatcacgc	aagcgcacct	3660
gggcctgagt	tcactctgaac	tgtcaaaaac	ttcatctcgt	agtttgtaat	cacatgcaca	3720
ttcctagtga	ttagtcgaga	gtttcaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa		3768

REIVINDICACIONES

1.- Una planta que presenta un rasgo útil obtenido mediante un método que comprende las etapas de

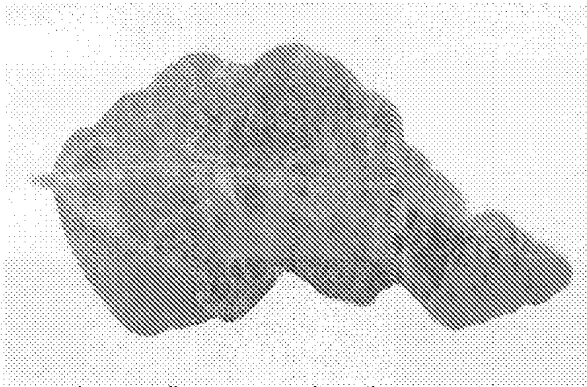
- 5 a. suprimir la expresión de un(os) gen(es) MSH1 en una primera planta o célula vegetal parental en las que se consigue dicha supresión: (I) transformando la planta o célula vegetal con un transgén que puede suprimir la expresión de MSH1; (II) introduciendo una mutación de pérdida de función en un gen MSH1 endógeno mediante: (i) la recombinación de homólogos y sustitución de la secuencia MSH1 de tipo silvestre residente en el cromosoma con una secuencia de sustitución msh1 con la(s) mutación/mutaciones de pérdida de función; (ii) la unión de extremos no homólogos y sustitución de la secuencia MSH1 de tipo silvestre residente en el cromosoma con una secuencia de sustitución msh1 con la(s) mutación/mutaciones de pérdida de función; (iii) una combinación de unión de extremos no homólogos y recombinación de homólogos y sustitución de la secuencia MSH1 de tipo silvestre residente en el cromosoma con una secuencia de sustitución msh1 con la(s) mutación/mutaciones de pérdida de función; o (iv) la introducción de una mutación en un gen MSH1 endógeno con una meganucleasa o nucleasa con dedos de cinc; (III) mutagénesis química seguida de examen de alto rendimiento para identificar plantas que comprenden mutaciones puntuales u otras mutaciones en un gen MSH1 endógeno; o (IV) introduciendo un ácido nucleico que proporciona supresión de MSH1 en la célula vegetal;
- 10
- 15
- 20 b. recuperar plantas de progenie de la planta o célula vegetal parental de la etapa (a) en la que está restaurada la función MSH1; y
- c. seleccionar una línea de plantas de progenie que presenta uno o más rasgos útiles de las plantas de progenie recuperadas de la etapa (b), o un cruce de las mismas, siendo dichos rasgos hereditarios, reversibles y provocados por uno o más loci cromosómicos alterados en el núcleo de las células vegetales de progenie, habiendo experimentado dichos loci cromosómicos alterados un cambio epigenético, habiéndose inducido dichos loci cromosómicos alterados mediante la supresión de MSH1, y seleccionándose dichos rasgos del grupo que consiste en rendimiento mejorado, resistencia al estrés biótico y resistencia al estrés abiótico, siendo en particular dicho rasgo un rendimiento vegetal mejorado;
- 25
- 30

presentando dicha planta de la línea de plantas de progenie seleccionada una mejora en dicho rasgo en relación con una planta parental que no se había sometido a supresión de la expresión de MSH1 sino que era isogénica de otro modo con respecto a dicha primera planta o célula vegetal parental, y comprendiendo la planta los loci cromosómicos alterados asociados con el rasgo.

- 35 2.- La planta según la reivindicación 1, en la que dicho rasgo está asociado con la metilación de ADN cromosómico de uno o más loci cromosómicos alterados en el núcleo de las células vegetales de progenie.
- 40 3.- La planta según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la supresión de MSH1 en dicha primera planta o célula vegetal parental se consigue con un transgén seleccionado del grupo de transgenes que suprimen la expresión de MSH1 produciendo un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un microARN (miARN), un ARN sentido cosupresor y/o un ARN antisentido.
- 45 4.- La planta según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha planta es una planta de cultivo, particularmente una planta de cultivo seleccionada del grupo que consiste en maíz, soja, algodón, colza, trigo, arroz, tomate, tabaco, mijo, patata y sorgo.
- 50 5.- La planta según la reivindicación 4, en la que dicha planta de cultivo es sorgo.
- 6.- La planta según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho rasgo es un rendimiento vegetal mejorado.
- 55 7.- Simiente obtenida a partir de la planta de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la simiente o una planta obtenida a partir de la misma presenta la mejora en dicho rasgo y en la que la simiente comprende los loci cromosómicos alterados o mutados asociados con el rasgo.
- 8.- La simiente según la reivindicación 7, en la que dicho rasgo es un rendimiento vegetal mejorado.
- 60 9.- Un método para identificar en una planta uno o más loci cromosómicos alterados que han experimentado un cambio epigenético hereditario y reversible que puede conferir un rasgo útil, en el que dicho rasgo se selecciona del grupo que consiste en rendimiento mejorado, resistencia al estrés biótico y resistencia al estrés abiótico, en particular en el que dicho rasgo es un rendimiento vegetal mejorado, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - a) comparar una o más regiones cromosómicas en una planta de referencia que no presenta dicho rasgo útil con una o más regiones cromosómicas correspondientes en una planta de prueba que sí presenta dicho
- 65

rasgo útil, expresando dicha planta de prueba MSH1 y habiéndose obtenido a partir de una planta o célula vegetal parental en la que se ha suprimido MSH1;

- 5 b) opcionalmente aislar una planta o planta de progenie que comprende dicho locus cromosómico alterado u obtener un ácido nucleico asociado con dicho locus cromosómico alterado;
- 10 c) y seleccionar uno o más loci cromosómicos alterados presentes en dicha planta de prueba que están ausentes en dicha planta de referencia y que están asociados con dicho rasgo útil, habiéndose inducido los loci cromosómicos alterados mediante la expresión de MSH1 y estando en el núcleo de la planta de prueba células, especialmente comprendiendo dichos loci cromosómicos alterados un estado de metilación de ADN cromosómico, una modificación postraduccional de una proteína histona asociada con un locus cromosómico, o cualquier combinación de los mismos.



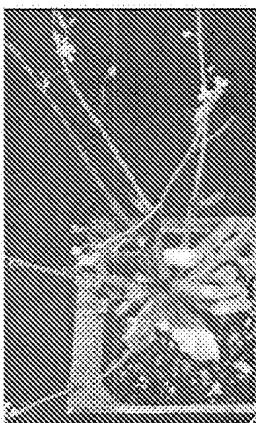
Morfología folicular



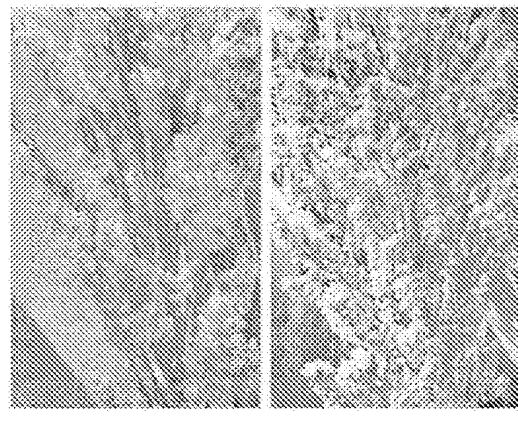
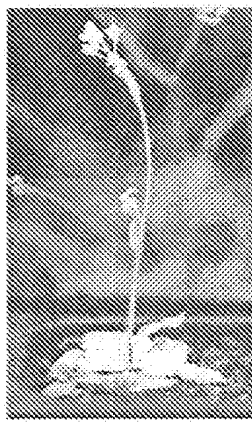
Variegación



Enanismo



Tolerancia a la luz alta



Esterilidad masculina

FIGURA 1

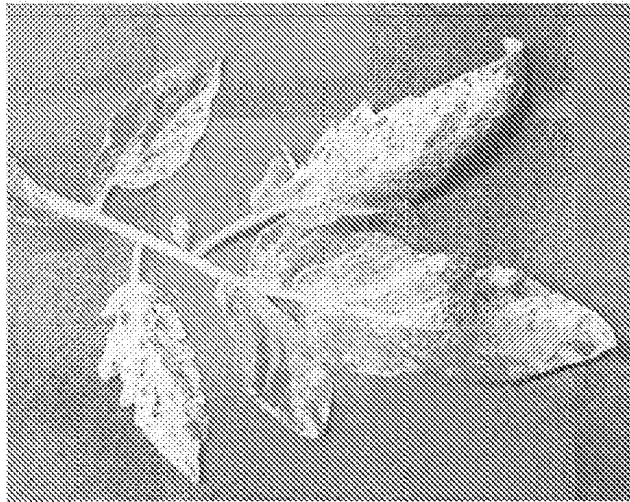
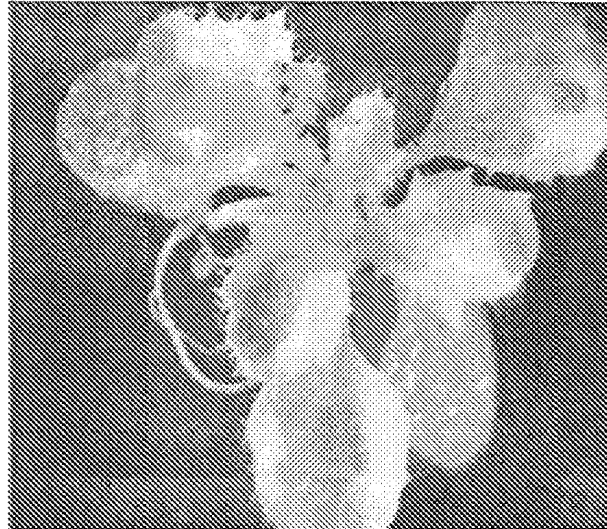


FIGURA 2

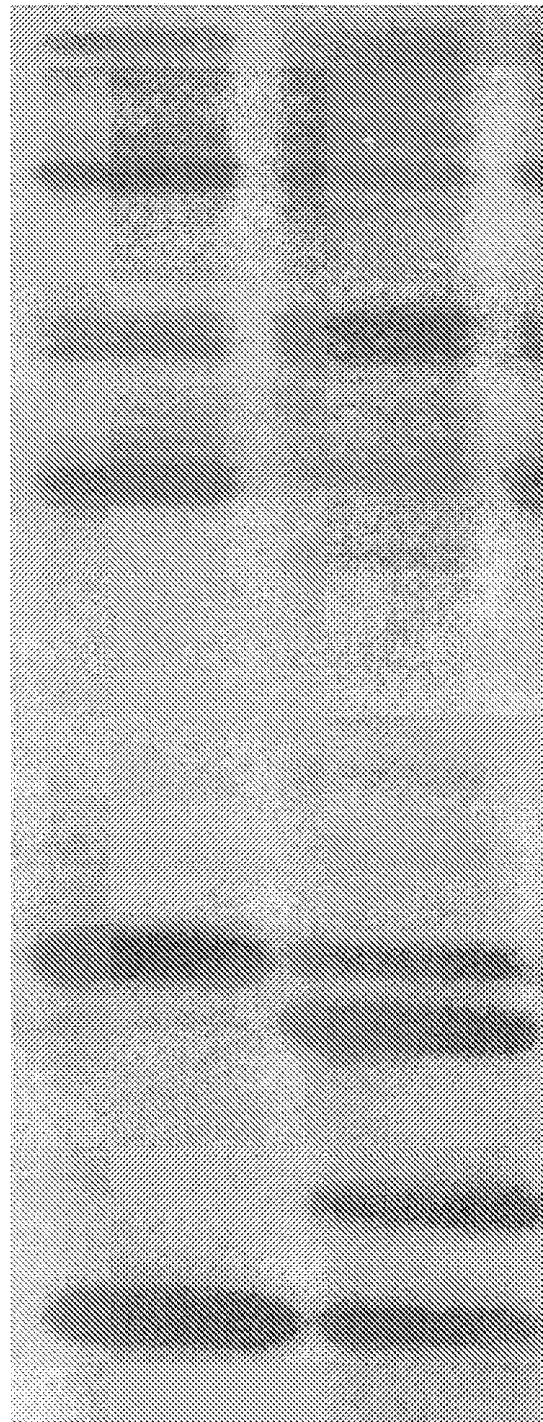


Sorgo



Tomate

FIGURA 3



Col-0

msh1

FIGURA 4

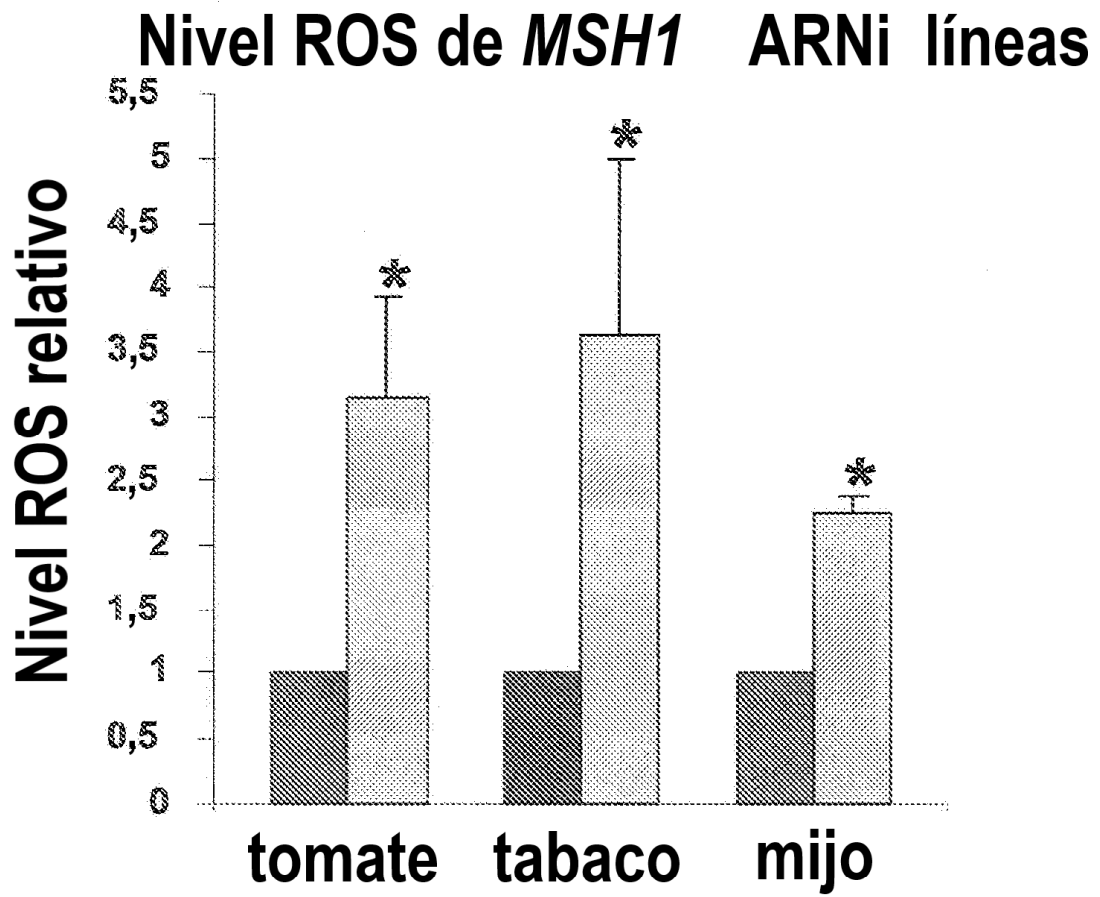


FIGURA 5

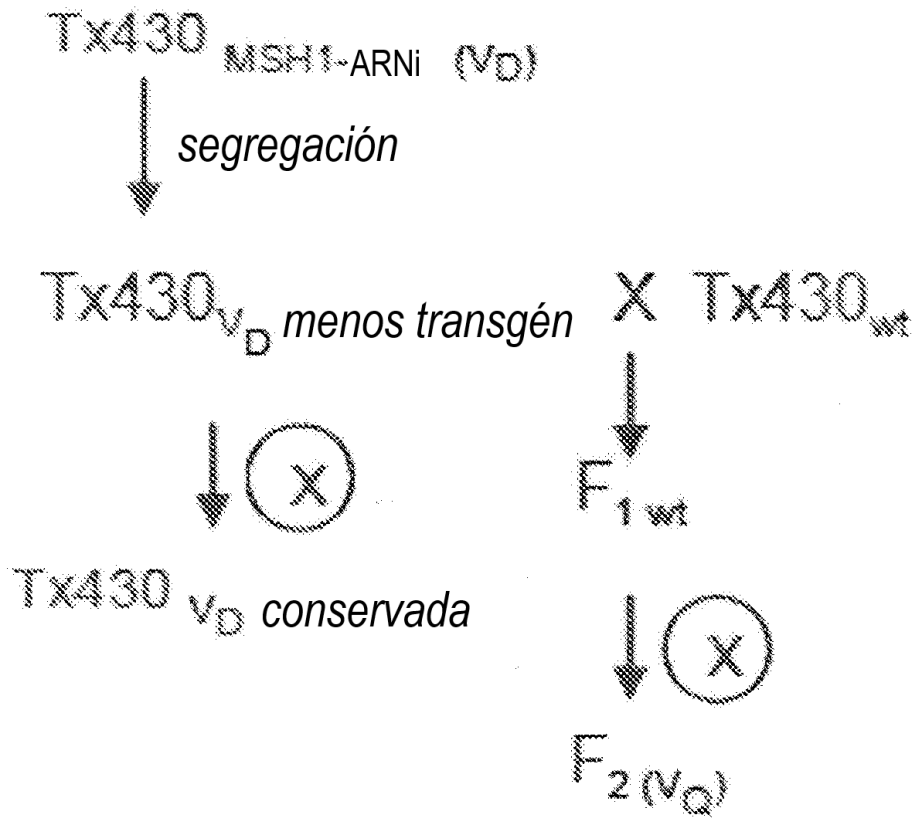
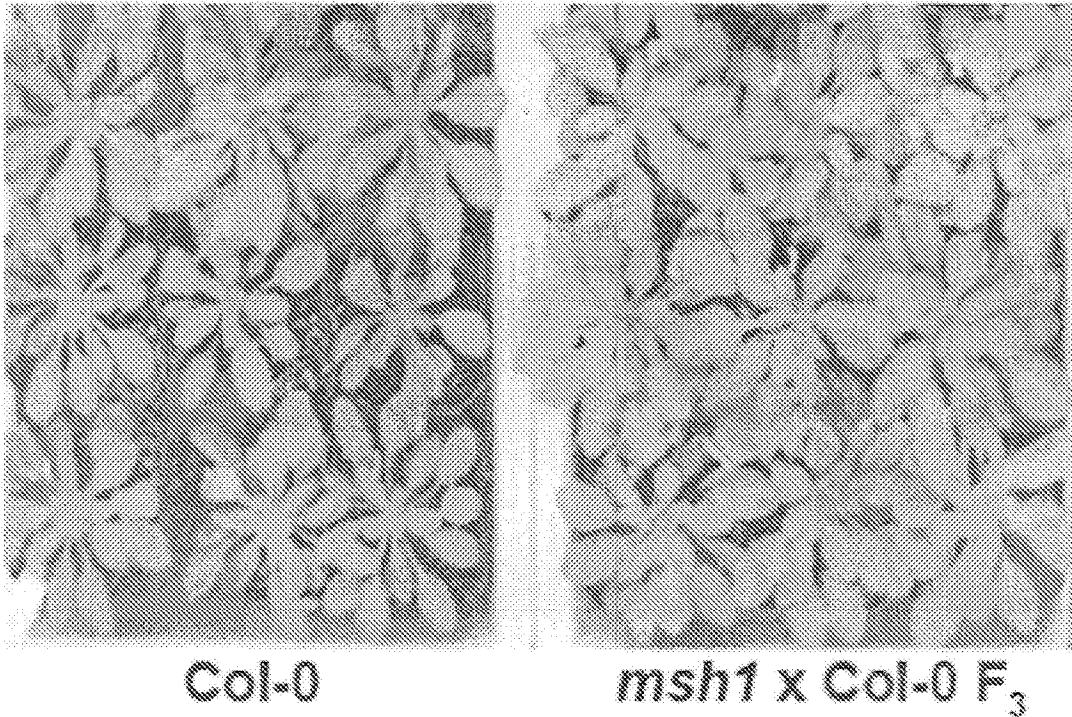


FIGURA 6



Col-0 (padre de tipo silvestre)	<i>msh1</i> x Col-0 F₃ (progenie positiva para MSH1)	
4,9	6,3	Biomasa fresca (g)
2,2	2,9	Diámetro de base (mm)
1,6	2,0	Diámetro de tallo (mm)

FIGURA 7

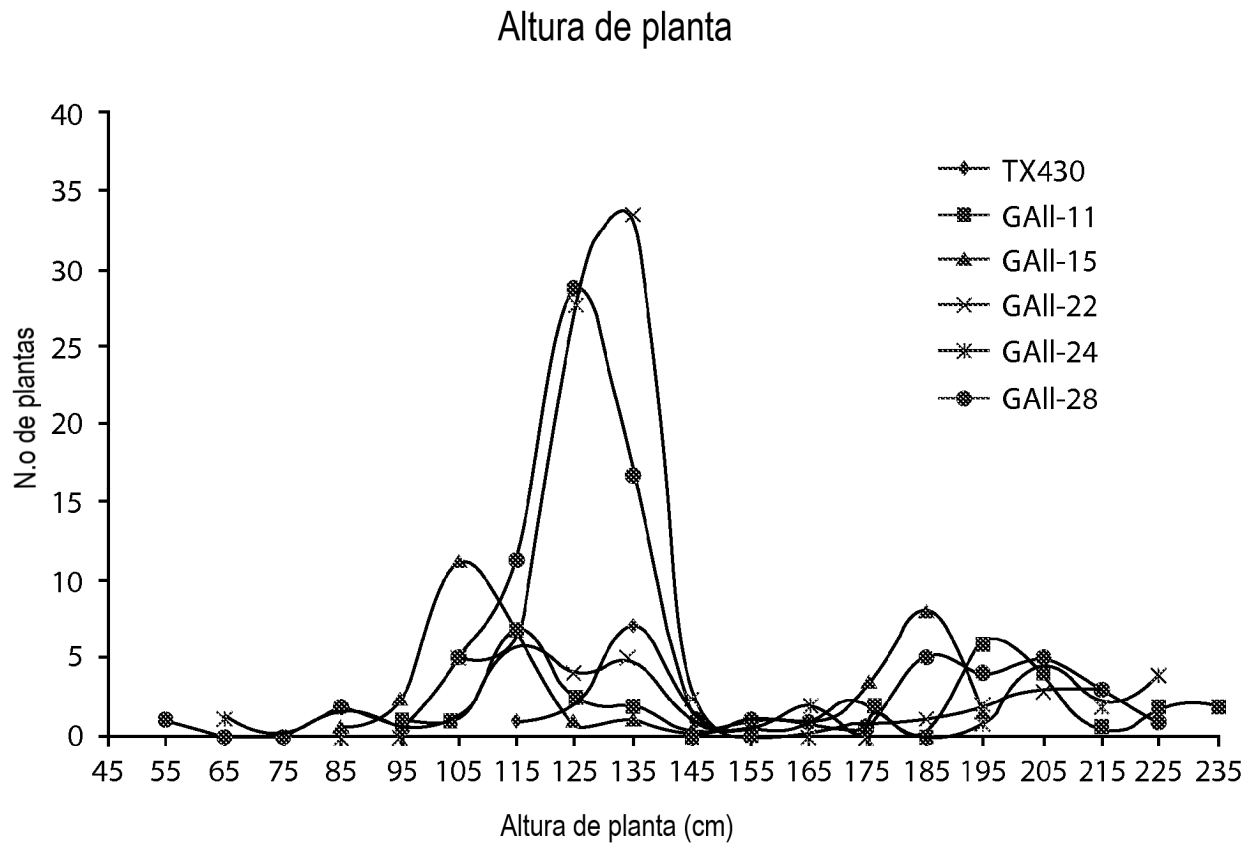


FIG. 8

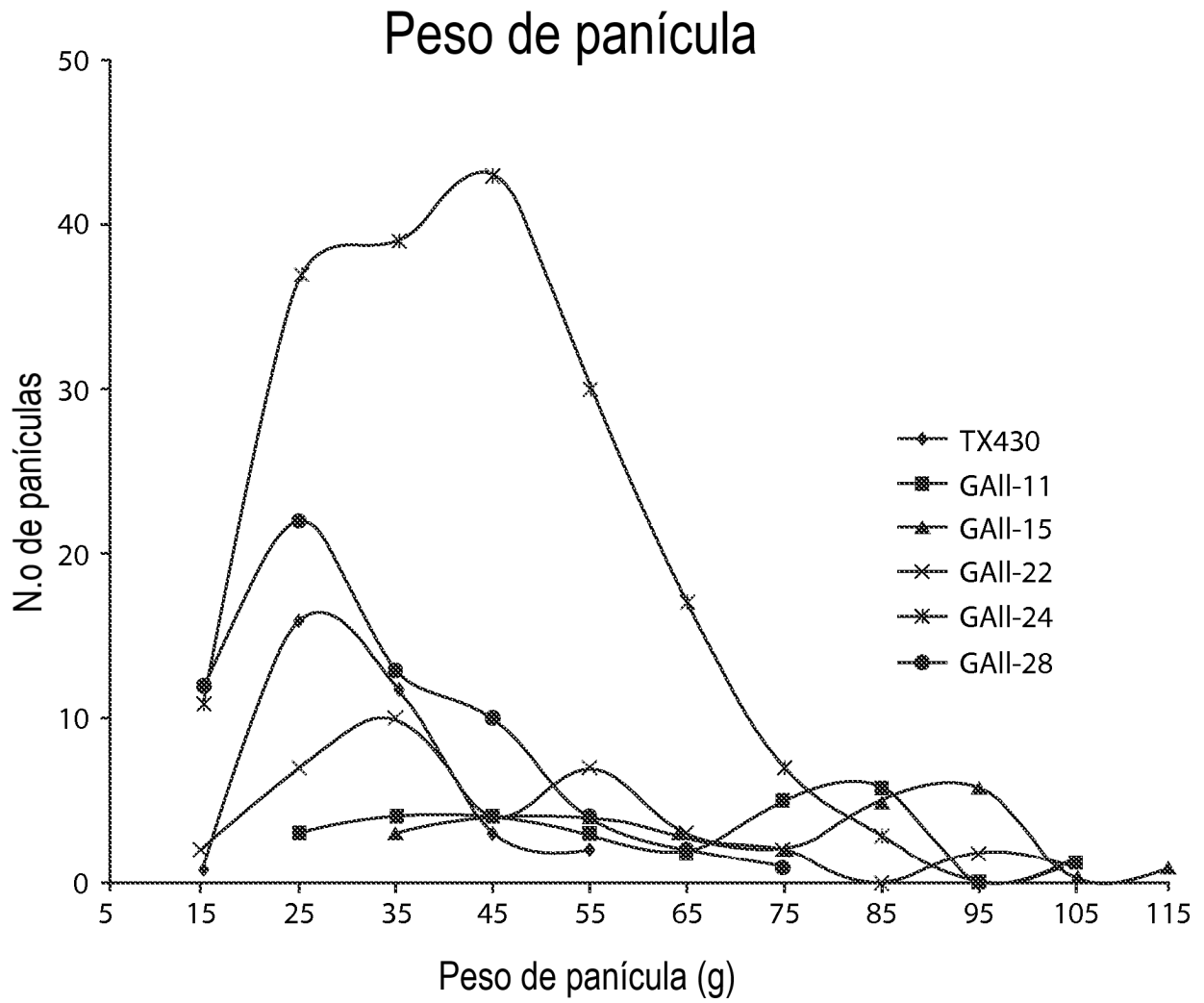


FIG. 9

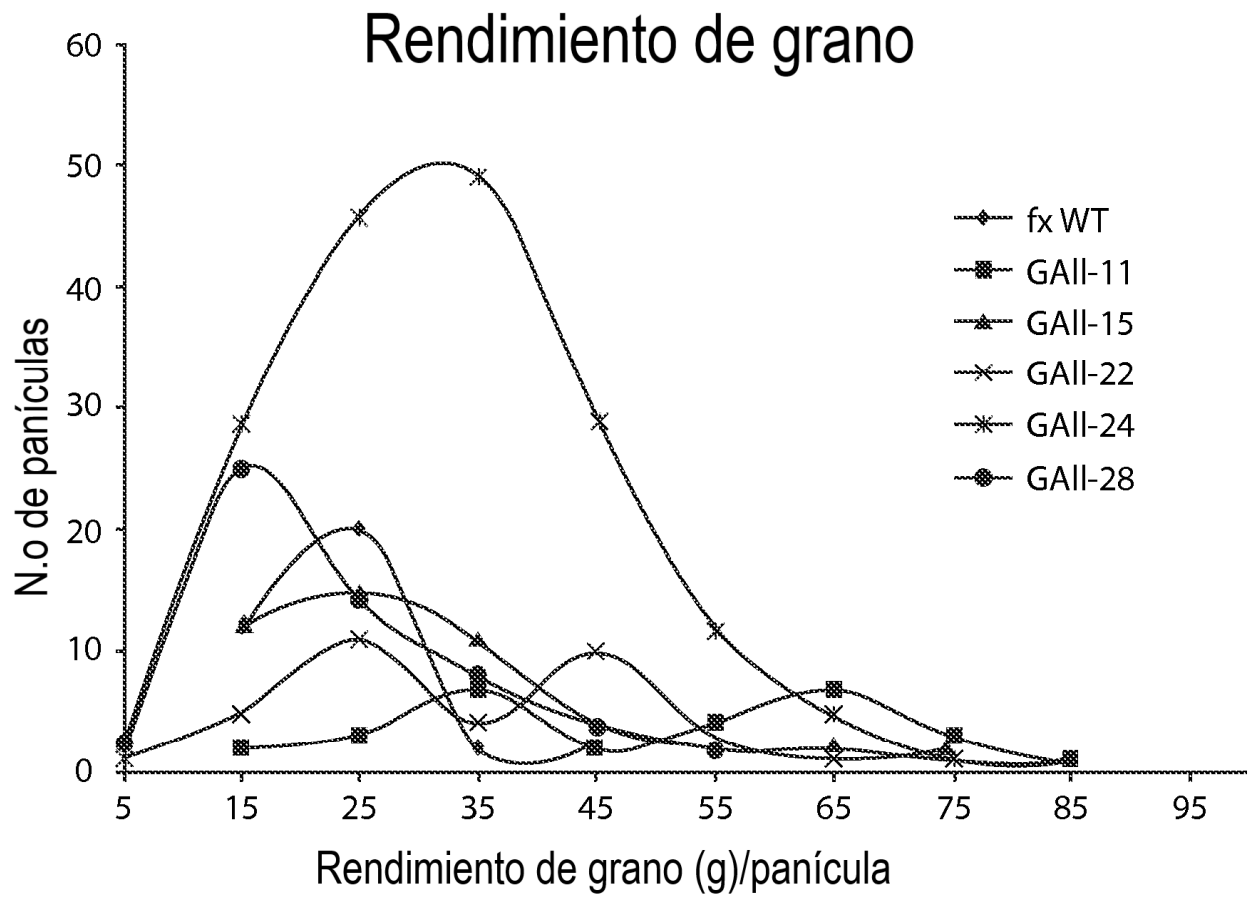
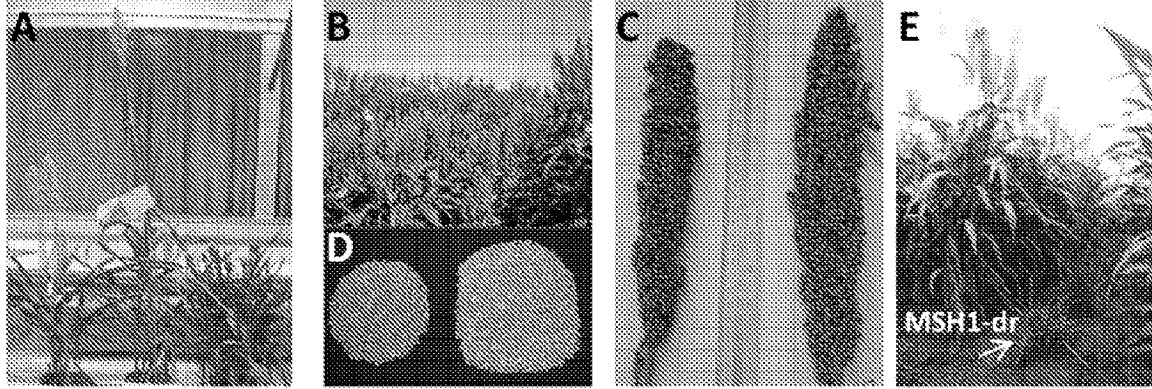


FIG. 10

Sorghum Tx430 \rightarrow Tx430-MSH1-ARNi $\begin{cases} \rightarrow$ MSH1-Tdr \\ \rightarrow MSH1-dr x Tx430 \rightarrow MSH1-epiF1 \rightarrow MSH1-epiF2



Tx430 F1 MSH1-dr

Arabidopsis Col-0 *msh1* x MSH1 \rightarrow AtMSH1-epiF1 \rightarrow AtMSH1-epiF2

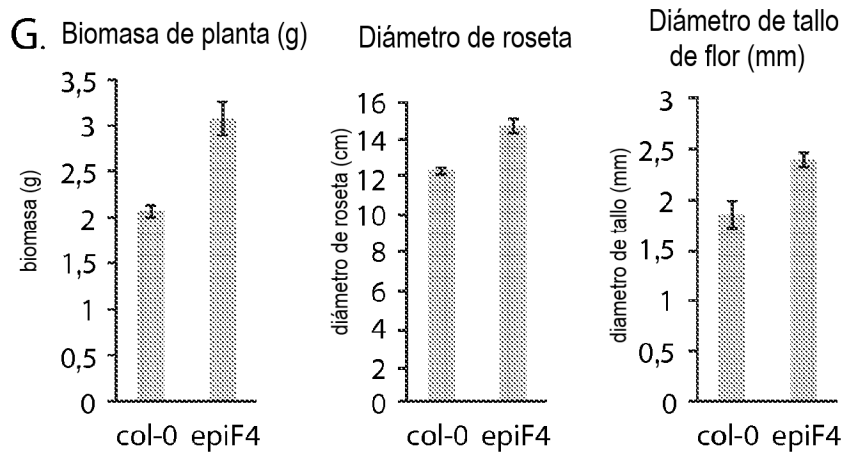
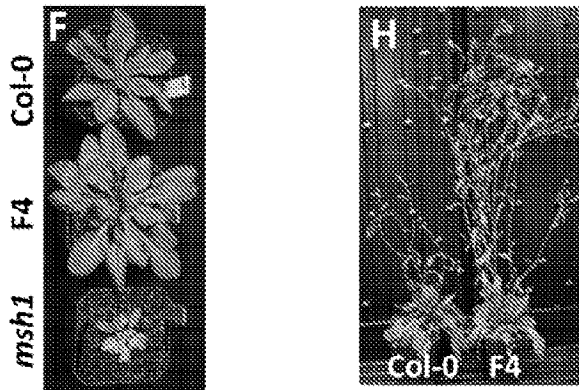


FIG. 11 A, B, C, D, E, F, G, H

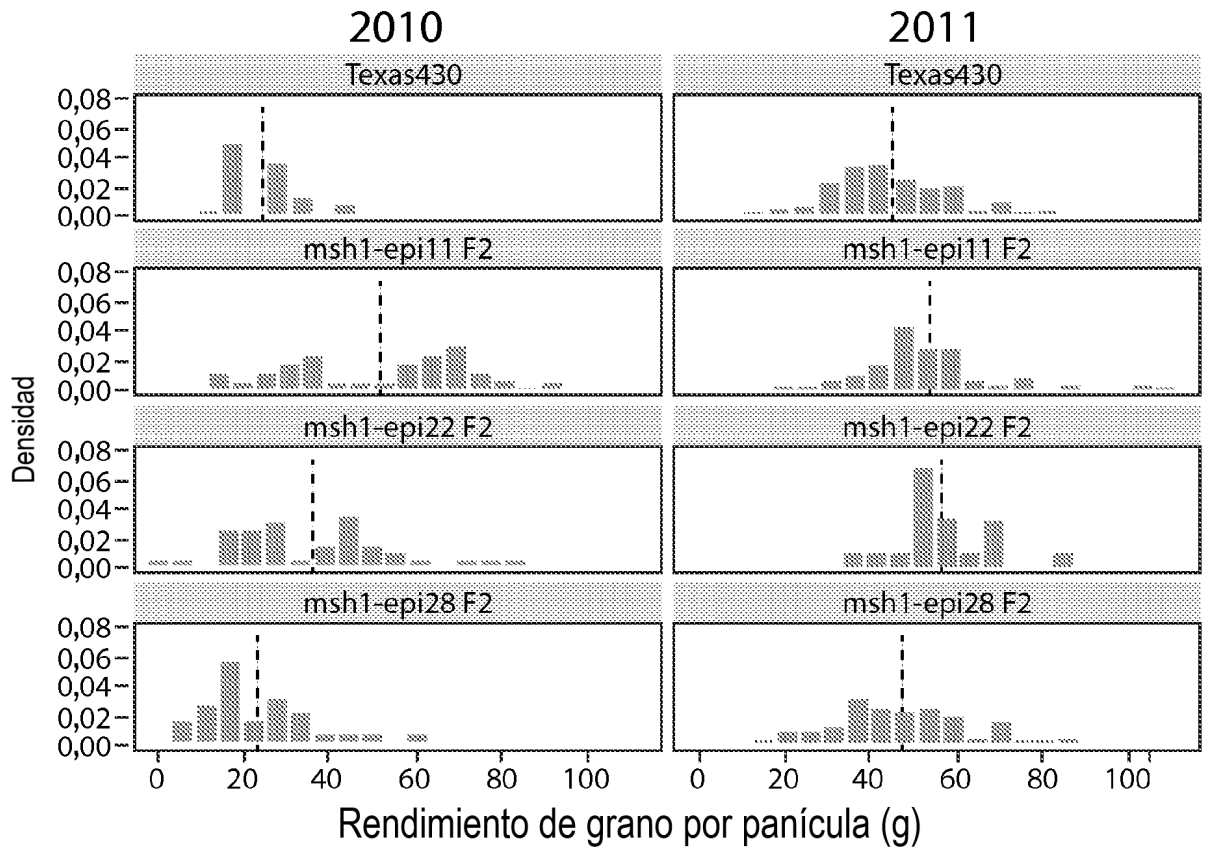
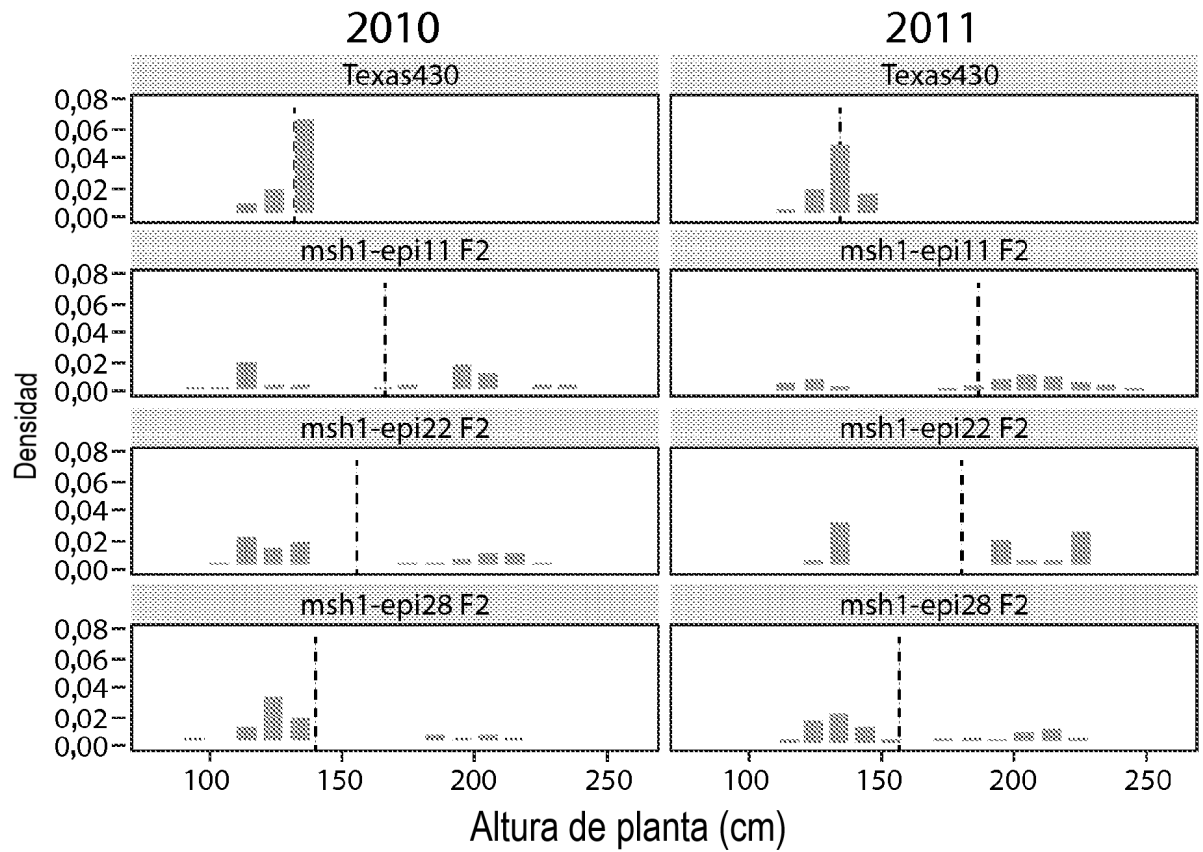


FIG. 12

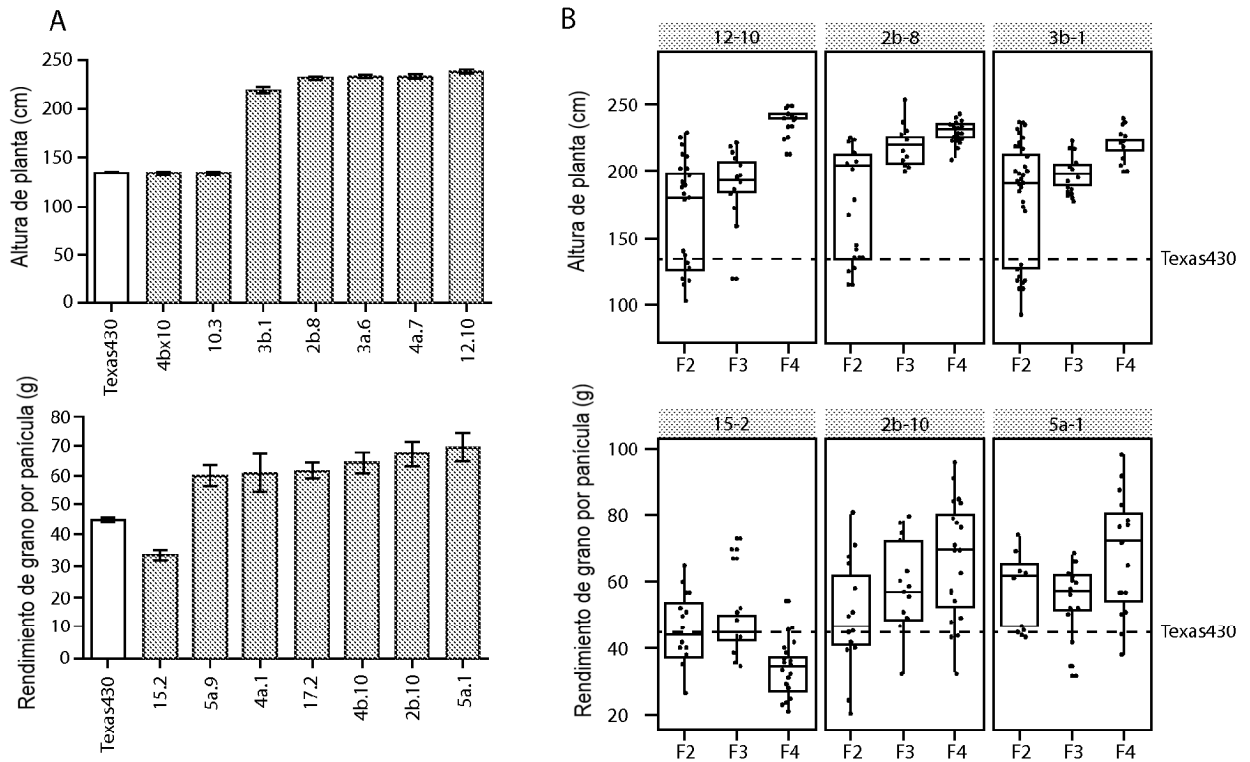
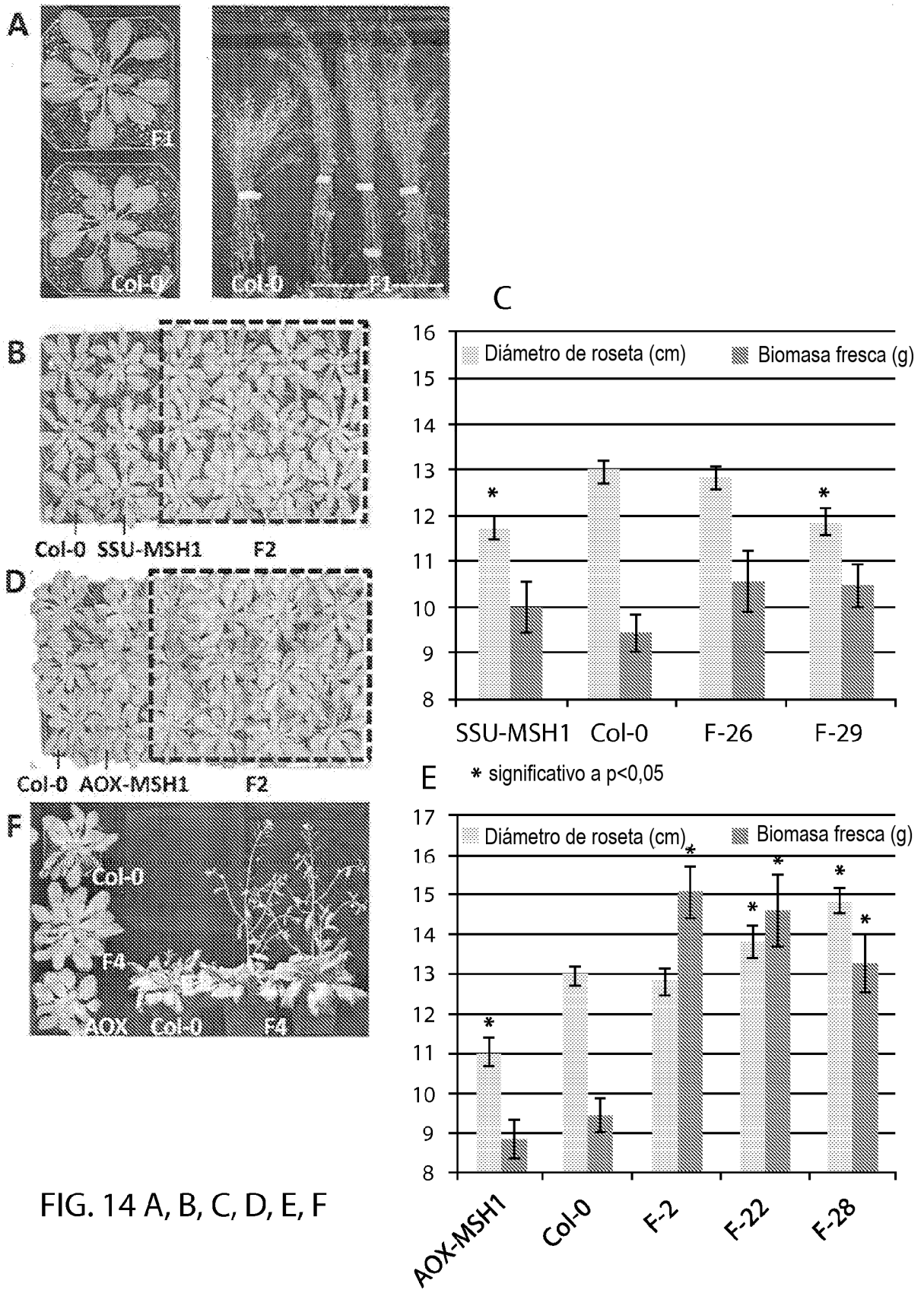


FIG. 13 A, B



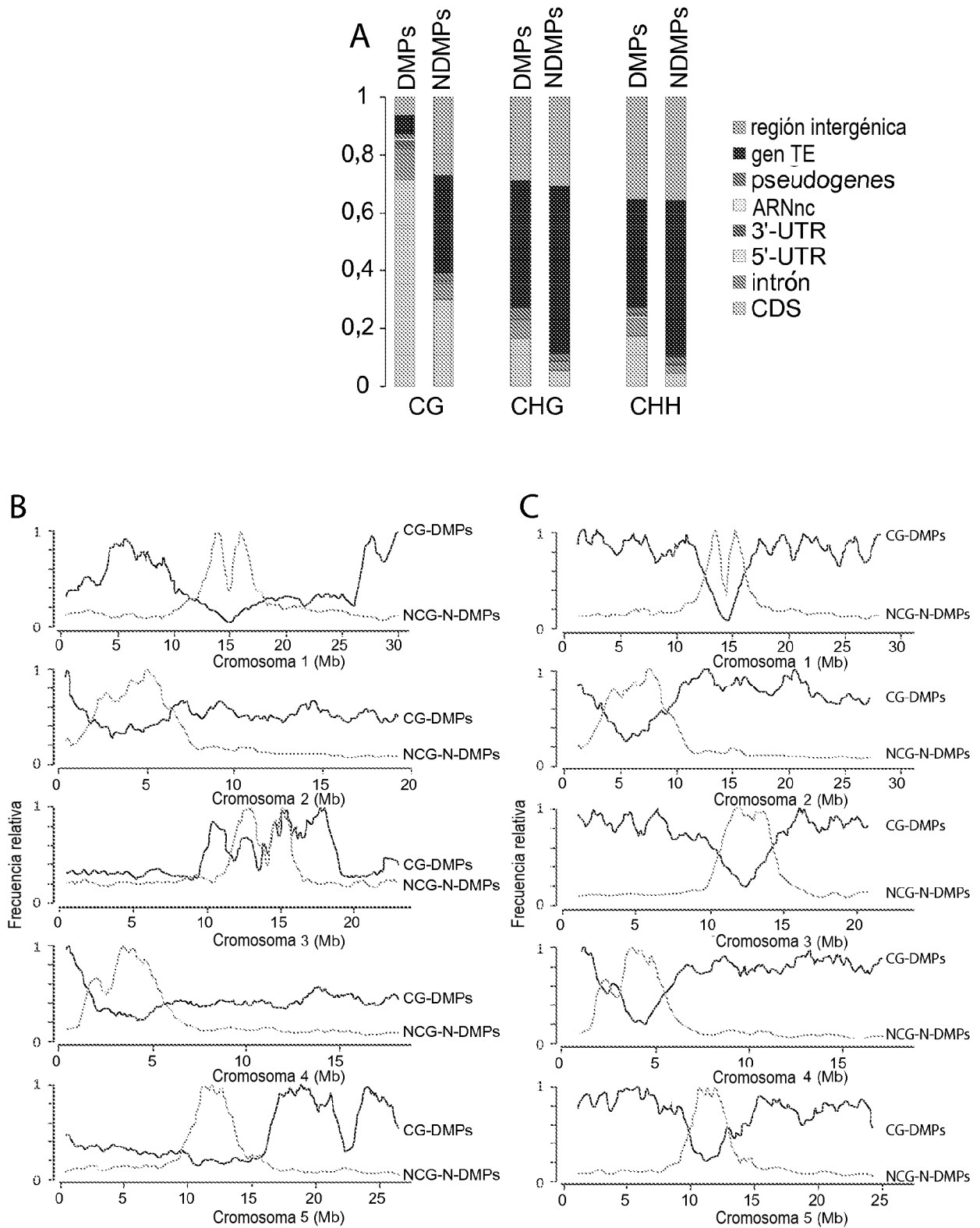


FIG. 15 A, B, C



FIGURA 16

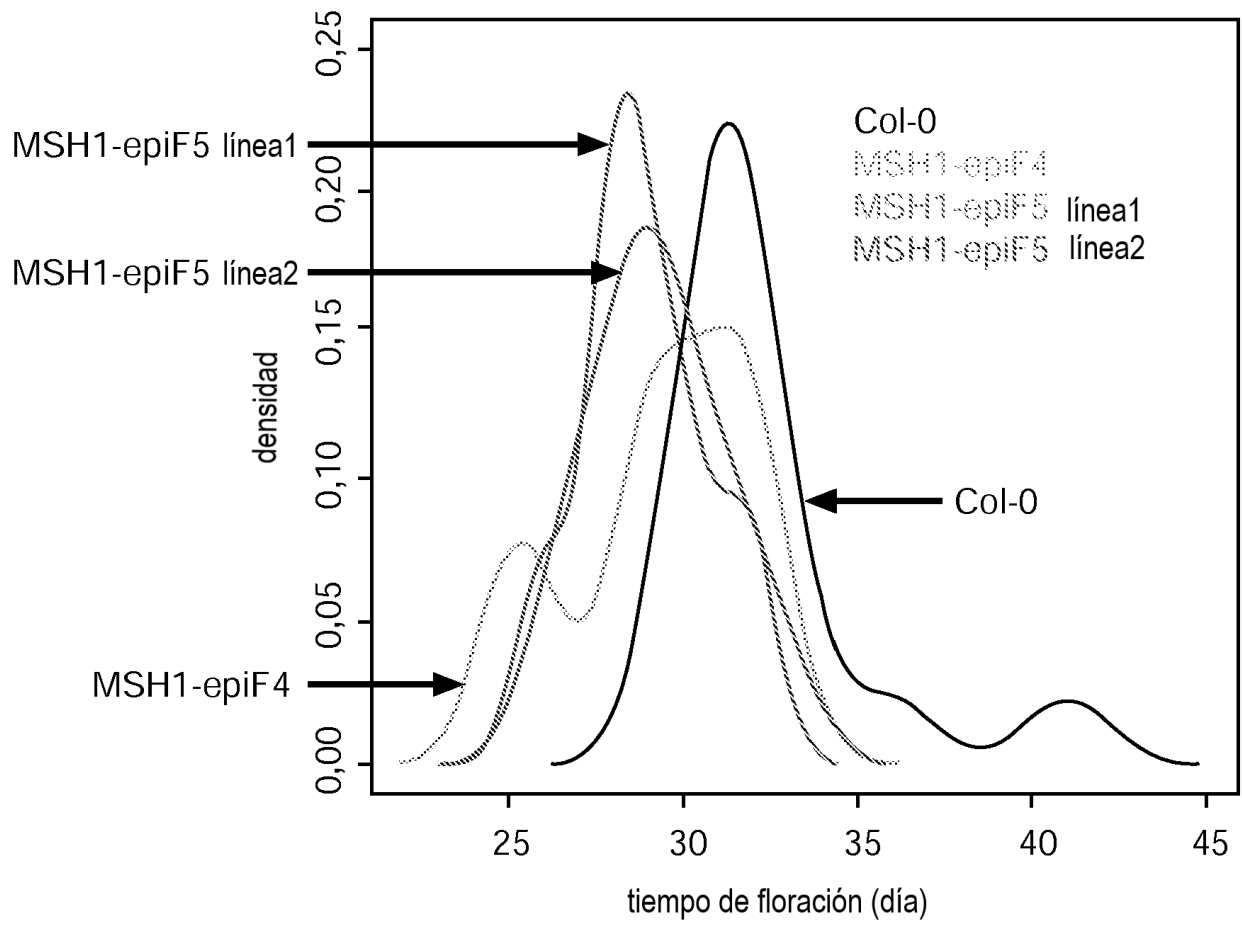


FIG. 17

ES 2 731 638 T3

A T3G27150	CAGTTCCCAAAGCCCTTGTCAAACA TCGTCCAAACACGTATCACCACCTCGA	59
Co10-MIR2-2	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCATCCAAACACATATCACCACCTCGA	83
Co10-MIR2-3	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCATCCAAACACATATCACCACCTCAA	83
Co10-MIR2-4	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCATCCAAACACATATCACCACCTCAA	83
Co10-MIR2-5	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCATCCAAACACATATCACCACCTCGA	83
Co10-MIR2-6	CAATTGCCAGGACCCCTTATCAAACATCATCCAAACACATATCACCACCTCAA	80
Co10-MIR2-10	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCATCCAAACACATATCACCACCTCGA	83
Co10-MIR2-11	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCATCCAAACACATATCACCACCTCAA	83
Co10-MIR2-12	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCATCCAAACACATATCACCACCTCGA	83
Co10-MIR2-26	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCATCCAAACACATATCACCACCTCGA	83
Co10-MIR2-27	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCATCCAAACACATATCACCACCTCGA	83
Co10-MIR2-28	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCATCCAAACACATATCACCACCTCAA	83
Co10-MIR2-29	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCATCCAAACACATATCACCACCTCGA	83
F3-Mir2-1	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCGTCCAAACACGTATCACCACCTCGA	100
F3-Mir2-2	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCGTCCAAACACGTATCACCACCTCGA	83
F3-Mir2-4	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCGTCCAAACACGTATCACCACCTCGA	83
F3-Mir2-5	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCGTCCAAACACGTATCACCACCTCGA	99
F3-Mir2-7	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCGTCCAAACACATATCACCACCTCGA	99
F3-Mir2-11	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCGTCCAAACACGTATCACCACCTCGA	99
F3-Mir2-12	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCGTCCAAACACGTATCACCACCTCGA	99
F3-Mir2-15	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCGTCCAAACACGTATCACCACCTCGA	83
F3-Mir2-18	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCGTCCAAACACGTATCACCACCTCGA	99
F3-Mir2-27	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCGTCCAAACACATATCACCACCTCGA	83
F3-Mir2-28	CAATTGCCAAAAACCCCTTATCAAACATCGTCCAAACACGTATCACCACCTCGA	83
A T3G27150	CAACA TAAAGACA GACGGTTCAACTACACC GCGCTCGCGCCTCA CCTTGA	109
Co10-MIR2-2	CAACATAAAAAACAAACAAATTCAACTACACCACACTCACACCTCACCTTAA	133
Co10-MIR2-3	CAACATAAAAAACAAACAAATTCAACTACACCACACTCACACCTCACCTTAA	133
Co10-MIR2-4	CAACATAAAAAACAAACAAATTCAACTACACCACACTCACACCTCACCTTAA	133
Co10-MIR2-5	CAACATAAAAAACAAACAAATTCAACTACACCACACTCACACCTCACCTTAA	133
Co10-MIR2-6	CAACATAAAAAACAAACAAATTCAACTACACCACACTCACACCTCACCTTAA	130
Co10-MIR2-10	CAACATAAAAAACAAACAAATTCAACTACACCACACTCACACCTCACCTTAA	133
Co10-MIR2-11	CAACATAAAAAACAAACAAATTCAACTACACCACACTCACACCTCACCTNAA	133
Co10-MIR2-12	CAACATAAAAAACAAACAAATTCAACTACACCACACTCACACCTCACCTTAA	133
Co10-MIR2-26	CAACATAAAAAACAAACAAATTCAACTACACCACACTCACACCTCACCTTAA	133
Co10-MIR2-27	CAACATAAAAAACAAACAAATTCAACTACACCACACTCACACCTCACCTTAA	133
Co10-MIR2-28	CAACATAAAAAACAAACAAATTCAACTACACCACACTCACACCTCACCTTAA	133
Co10-MIR2-29	CAACATAAAAAACAAACAAATTCAACTACACCACACTCACACCTCACCTTAA	133
F3-Mir2-1	CAACATAAAAAACAAACGGTTCAACTACACCACACTCGCGCCTCACCTTAA	150
F3-Mir2-2	CAACATAAAAAACAAACGGATTCAACTACACCACACTCGCGCCTCACCTTAA	133
F3-Mir2-4	CAACATAAAAAACAAACGGATTCAACTACACCACACTCGCGCCTCACCTTAA	133
F3-Mir2-5	CAACATAAAAAACAAACGGATTCAACTACACCACACTCGCGCCTCACCTTAA	149
F3-Mir2-7	CAACATAAAAAACAAACGGATTCAACTACACCACACTCGCGCCTCACCTTAA	149
F3-Mir2-11	CAACATAAAAAACAAACGAATTCAACTACACCACACTCGCGCCTCACCTTAA	149
F3-Mir2-12	CAACATAAAAAACAAACGGATTCAACTACACCACACTCGCGCCTCACCTTAA	149
F3-Mir2-15	CAACATAAAAAACAAACGGATTCAACTACACCACACTCGCGCCTCACCTTAA	133
F3-Mir2-18	CAACATAAAAAACAAACGGATTCAACTACACCACACTCGCGCCTCACCTTAA	149
F3-Mir2-27	CAACATAAAAAACAAACGGATTCAACTACACCACACTCGCGCCTCACCTTAA	133
F3-Mir2-28	CAACATAAAAAACAAACGGATTCAACTACACCACACTCGCGCCTCACCTTAA	133

FIG. 18A

A T3G27150	AAA TCTCA TCA CTCTTTAGCAAAC GCGAAAACCCCTTA TTAAGTAACTTT	159
Co10-MIR2-2	AAATCTCATCA TTCTTTAACAAAC AC AAAAAACCCCTTATTAAA TAACTTT	183
Co10-MIR2-3	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC AC AAAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	183
Co10-MIR2-4	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC AC AAAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	183
Co10-MIR2-5	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC AC AAAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	183
Co10-MIR2-8	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC AC AAAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	180
Co10-MIR2-10	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC AC AAAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	183
Co10-MIR2-11	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC AC AAAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	183
Co10-MIR2-12	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC ACGAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	183
Co10-MIR2-26	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC AC AAAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	183
Co10-MIR2-27	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC AC AAAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	183
Co10-MIR2-28	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC AC AAAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	183
Co10-MIR2-29	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC AC AAAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	183
F3-Mir2-1	AAATCTCATCGCTCTTTAACAAAC ACGAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	200
F3-Mir2-2	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC GCGGAAAACCCCTTATTAAA TAACTTT	183
F3-Mir2-4	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC GCGGAAAACCCCTTATTAAATAACTCT	183
F3-Mir2-5	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC ACGAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	199
F3-Mir2-7	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC GCGGAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	199
F3-Mir2-11	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC GCGGAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	199
F3-Mir2-12	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC GCGGAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	199
F3-Mir2-15	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC GCGGAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	183
F3-Mir2-16	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC GCGGAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	199
F3-Mir2-27	AAATCTCATCA CTCTTTGACAAAC ACAAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	183
F3-Mir2-28	AAATCTCATCA CTCTTTAA CAAAC GCGGAAAACCCCTTATTAAATAACTTT	183
A T3G27150	AGTTTCCAA TACTCGAAAC GCGGGCACGCGTGCGAGTA TCTCGACCTCTAA	209
Co10-MIR2-2	AATTTCCAATACTC AAAAC AC AACACAC ATAC AAATATCTC AACCTCTAA	233
Co10-MIR2-3	AATTTCCAATACTCGAAAC ACGACACAC ATAC AAATATCTC AACCTCTAA	233
Co10-MIR2-4	AATTTCCAATACTC AAAAC AC AACACAC ATAC AAATATCTC AACCTCTAA	233
Co10-MIR2-5	AATTTCCAATACTC AAAAC AC AACACAC ATAC AAATATCTC AACCTCTAA	233
Co10-MIR2-6	AATTTCCAATACTC AAAAC AC AACACAC ATAC AAATATCTC AACCTCTAA	230
Co10-MIR2-10	AATTTCCAATACTC AAAAC AC AACACAC ATAC AAATATCTC AACCTCTAA	233
Co10-MIR2-11	AATTTCCAATACTC AAAAC AC AACACAC ATAC AAATATCTC AACCTCTAA	233
Co10-MIR2-12	AATTTCCAATACTC AAAAC AC AACACAC ATAC AAATATCTC AACCTCTAA	233
Co10-MIR2-26	AATTTCCAATACTC AAAAC AC AACACAC ATAC AAATATCTC AACCTCTAA	233
Co10-MIR2-27	AATTTCCAATACTC AAAAC AC AACACAC ATAC AAATATCTC AACCTCTAA	233
Co10-MIR2-28	AATTTCCAATACTC AAAAC AC AACACAC ATAC AAATATCTC AACCTCTAA	233
Co10-MIR2-29	AATTTCCAATACTC AAAAC AC AACACAC ATAC AAATATCTC AACCTCTAA	233
F3-Mir2-1	AATTTCCAATACTCGAAAC GCGGACACGCGTACGAATATCTCGACCTCTAA	250
F3-Mir2-2	AATTTCCAATACTC AAAAC GCGGACACGCGTAC AAATATCTCGACCTCTAA	233
F3-Mir2-4	AATTTCCAATACTCGAAAC ACGACACGCA TACGAATATCTC AACCTCTAA	233
F3-Mir2-5	AATTTCCAATACTCGAAAC GCGGACACGCGTACGAATATCTCGACCTCTAA	249
F3-Mir2-7	AATTTCCAATACTCGAAAC GCGGACACGCGTACGAATATCTCGACCTCTAA	249
F3-Mir2-11	AATTTCCAATACTCGAAAC ACGACACGCGTACGAATATCTCGACCTCTAA	249
F3-Mir2-12	AATTTCCAATACTCGAAAC GCGGACACGCGTAC AAATA TCTCGACCTCTAA	249
F3-Mir2-15	AATTTCCAATACTCGAAAC GCGGACACGCGTACGAATATCTCGACCTCTAA	233
F3-Mir2-16	AATTTCCAATACTCGAAAC GCGGACACGCGTACGAATATCTCGACCTCTAA	249
F3-Mir2-27	AATTTCCAATACTC AAAAC GCGGACACGCGTACGAATATCTC AACCTCTAA	233
F3-Mir2-28	AATTTCCAATACTCGAAAC GCGGACACGCGTACGAATATCTCGACCTCTAA	233

FIG. 18B

ES 2 731 638 T3

A T3G27150	CTCGTATACGAGCTGAGGAACA TTTAGTAAACAATAA TCTGCA TCC TTAG	259
Co10-MIR2-2	CTC <u>A</u> TATAC <u>A</u> AACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267
Co10-MIR2-3	CTC <u>A</u> TATAC <u>A</u> AACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267
Co10-MIR2-4	CTC <u>A</u> TATAC <u>A</u> AACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267
Co10-MIR2-5	CTC <u>A</u> TATAC <u>A</u> AACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267
Co10-MIR2-6	CTC <u>A</u> TATAC <u>A</u> AACTAAAAAACATTTAATAAACAA	264
Co10-MIR2-10	CTC <u>A</u> TATAC <u>A</u> AACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267
Co10-MIR2-11	CTC <u>A</u> TATAC <u>A</u> AACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267
Co10-MIR2-12	CTC <u>A</u> TATAC <u>A</u> AACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267
Co10-MIR2-28	CTC <u>A</u> TATAC <u>A</u> AACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267
Co10-MIR2-27	CTC <u>A</u> TATAC <u>A</u> AACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267
Co10-MIR2-28	CTC <u>A</u> TATAC <u>A</u> AACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267
Co10-MIR2-29	CTC <u>A</u> TATAC <u>A</u> AACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267
F3-Mir2-1	CTCGTATACGAACTAAAAAACATTTAATAAACAA	284
F3-Mir2-2	CTC <u>A</u> TATACGAACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267
F3-Mir2-4	CTCGTATACGAACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267
F3-Mir2-5	CTCGTATACGAACTAAAAAACATTTAATAAACAA	283
F3-Mir2-7	CTCGTATACGAACTAAAAAACATTTAATAAACAA	283
F3-Mir2-11	CTCGTATACGAACTAAAAAACATTTAATAAACAA	283
F3-Mir2-12	CTCGTATACGAACTAAAAAACATTTAATAAACAA	283
F3-Mir2-15	CTC <u>A</u> TATACGAACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267
F3-Mir2-16	CTCGTATACGAACTAAAAAACATTTAATAAACAA	283
F3-Mir2-27	CTCGTATACGAACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267
F3-Mir2-18	CTC <u>A</u> TATAC <u>A</u> AACTAAAAAACATTTAATAAACAA	267

FIG. 18C