



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 244**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05716957 .5**
96 Fecha de presentación : **08.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1723243**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2006**

54 Título: **Plantas que tienen un mayor rendimiento de semillas y método para lograrlo.**

30 Prioridad: **10.03.2004 EP 04100991**
16.03.2004 US 553418 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2010

73 Titular/es: **CROPDESIGN N.V.**
Technologiepark 3
9052 Zwijnaarde-Gent, BE

72 Inventor/es: **Frankard, Valerie**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 348 244 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).

PLANTAS QUE TIENEN UN MAYOR RENDIMIENTO DE SEMILLAS Y MÉTODO PARA LOGRARLO

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se relaciona en general con el campo de la biología molecular y también con un método para mejorar el rendimiento de semillas de una planta con relación a aquel de las correspondientes plantas de tipo silvestre. Más específicamente, la presente invención se relaciona con un método para mejorar el rendimiento de semillas, por medio de la introducción en una planta de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3, cuyo ácido nucleico está bajo el control de un promotor preferencialmente expresado en la zona de expansión de la célula de brotes. La presente invención también se relaciona con plantas que comprenden una ciclina D3 aislada de ácido nucleico bajo el control de un promotor preferiblemente expresado en la zona de expansión de la célula de brotes, cuyas plantas han mejorado el rendimiento de semillas con relación a las correspondientes plantas de tipo silvestre. La invención también se relaciona con construcciones para uso en los métodos de acuerdo con la invención.

15 La población mundial siempre en crecimiento y la disminución de la oferta de tierras cultivables disponibles para la agricultura estimulan la investigación agrícola hacia el mejoramiento de la eficiencia de la misma. Un medio convencional para mejoras en los cultivos y en la horticultura utiliza técnicas selectivas de reproducción para identificar plantas que tienen características deseables. Sin embargo, tales técnicas selectivas de reproducción tienen varios inconvenientes, a saber, que estas técnicas son típicamente de mano de obra intensiva y resultan en plantas que contienen a menudo componentes genéticos heterogéneos que no siempre pueden resultar en el paso del rasgo deseable de las plantas madre. La ingeniería genética de las plantas implica el aislamiento y manipulación de material genético (típicamente en la forma de ADN o ARN) y la posterior introducción de ese material genético en una planta. Tal tecnología tiene la capacidad de entregar cultivos o plantas que tienen diferentes rasgos agronómicos u hortícolas económicos mejorados. Se produce un rasgo de interés económico particular. Normalmente se define el rendimiento como la producción mensurable de valor económico de un cultivo. Esto puede definirse en términos de cantidad y/o calidad. El rendimiento depende directamente de diferentes factores, por ejemplo, el número y el tamaño de los órganos, arquitectura de la planta (por ejemplo, el número de ramas), la producción de semillas y más. El desarrollo de raíces, el consumo de nutrientes y la tolerancia al estrés son también factores importantes en la determinación del rendimiento. El rendimiento del cultivo puede incrementarse optimizando uno de los factores anteriormente mencionados, que puede lograrse modificando los mecanismos inherentes de crecimiento de una planta.

35 Los mecanismos inherentes de crecimiento de una planta residen en una secuencia altamente ordenada de eventos colectivamente conocidos como el “ciclo celular”. La progresión a través del ciclo celular es fundamental para el crecimiento y desarrollo de todos los organismos multicelulares y es crucial para la proliferación celular. Los componentes principales del ciclo celular están altamente conservados en levadura, mamíferos, y plantas. El ciclo celular se divide típicamente en las siguientes fases secuenciales: G0- G1 - S - G2 - M. La replicación o la síntesis del ADN generalmente tienen lugar durante la fase S (“S” es por la síntesis de ADN) y la segregación mitótica de los cromosomas ocurre durante la fase M (la “M” es por mitosis), con la intervención de fases de crecimiento, G1 (durante la cual las crecen las células antes de la replicación del ADN) y G2 (un período después de la replicación del ADN durante el cual se prepara la célula para la división). La división celular se completa después de citocinesis, la última etapa de la fase M. Las células que han salido del ciclo

celular y que se han vuelto inactivas se dice que están en la fase G0. Las células en esta fase pueden ser estimuladas para reingresar al ciclo celular en la fase G1. La “G” en G1, G2 y G0 significa “crecimiento”. La terminación del proceso del ciclo celular permite que cada célula hija durante la división celular reciba una copia completa del genoma de los padres.

- 5 La división celular se controla por dos eventos principales del ciclo celular, a saber, la iniciación de la síntesis del ADN y la iniciación de la mitosis. Cada transición a cada uno de estos eventos clave es controlada por un punto de control representado por complejos específicos de proteína (involucrados en la replicación y división del ADN). La expresión de los genes necesarios para la síntesis de ADN en el límite de G1/S es regulada por la familia E2F de factores de transcripción en mamíferos y células
- 10 vegetales (La Thangue, 1994; Muller y colaboradores, 2001; De Veylder y colaboradores, 2002). La entrada en el ciclo celular es regulada/activada por un complejo E2F/Rb que integra señales y permite la activación de la transcripción de genes del ciclo celular. La transición entre las diferentes fases del ciclo celular, y por lo tanto el progreso a través del ciclo celular, es conducido por la formación y activación de diferentes proteína serina/treonina quinasas, generalmente denominadas como quinasas
- 15 dependientes de la ciclina (CDK). Un prerrequisito para la actividad de estas quinasas es la asociación física con una ciclina específica, siendo el momento de la activación muy dependiente de la expresión de la ciclina. El enlazamiento de ciclina induce cambios conformacionales en el lóbulo N-terminal de la CDK de asociación y contribuye a la localización y especificidad del sustrato del complejo. Las CDK monoméricas se activan cuando están asociadas con ciclinas y por lo tanto tienen actividad de
- 20 quinasa. Los niveles de proteína ciclina fluctúan en el ciclo celular y por lo tanto representan un factor principal en la determinación del momento de activación de la CDK. La activación periódica de estos complejos que contienen ciclinas y CDK durante el ciclo celular media la regulación temporal de las transiciones del ciclo celular (puntos de control).

- 25 Las ciclinas pueden agruparse en ciclinas mitóticas (denominadas ciclinas de tipo A y B en eucariotas superiores y las CLB en levadura en ciernes) y ciclinas específicas de G1 (denominadas ciclinas tipo D en mamíferos y las CLN en levadura en ciernes). Las ciclinas tipo H regulan la actividad de las CAK (quinasas que activan CDK). Todos los cuatro tipos de ciclinas conocidos en las plantas fueron identificadas principalmente por analogía con sus contrapartes humanas. En *Arabidopsis*, se han descrito diez ciclinas de tipo A, nueve de tipo B, diez de tipo D y una de tipo H
- 30 (Vandepoele y colaboradores, 2002).

Las 10 ciclinas de tipo D se subdividen en siete subclases, D1 hasta D7, lo cual refleja su carencia de gran similitud de secuencia entre sí, lo cual contrasta con las ciclinas de tipo A y de tipo B.

- 35 Únicamente las subclases D3 y D4 tienen diferentes miembros, tres y dos respectivamente. Se ha propuesto previamente la redundancia de las ciclinas de tipo D3 como una explicación para la incapacidad de observar fenotipos mutantes por la desactivación de una ciclina tipo D3 única (Swaminathan y colaboradores, 2000). Las dos ciclinas de tipo D3 están enlazadas a través de una duplicación parcial reciente, que sugiere que estas son funcionalmente redundantes. Se podría mantener una hipótesis similar para las ciclinas de tipo D4, ya que dos de las tres están localizadas en
- 40 un bloque duplicado.

- Una divergencia mucho mayor observada para ciclinas de tipo D comparada con ciclinas de tipo A y B puede reflejar el presunto papel de las ciclinas de tipo D en la integración de señales de desarrollo y señales ambientales en el ciclo celular. Por ejemplo, se ha observado que las ciclinas de tipo D3 responden a hormonas de las plantas, tales como citoquinas y brasinoesteroides, mientras que
- 45 CYCD2 y CYCD4 se activan más temprano en G1 y reaccionan a la disponibilidad de azúcar (para su

revisión, ver Stals e Inzé, 2001).

Se reportó la sobreexpresión del gen CYCD2;1 en tabaco para incrementar la división celular e incrementar el ritmo de crecimiento total de la planta sin alteraciones morfológicas (Cockcroft y colaboradores, 2000).

5 Se reportó la sobreexpresión en *Arabidopsis* del gen CYCD3;1 bajo el control de un promotor 35S del CaMV para producir plantas con cotiledones agrandados, un tamaño final de la planta dramáticamente reducido y desarrollo distorsionado. A nivel celular, las células son empujadas de G1, provocando divisiones celulares ectópicas tanto en regiones meristemáticas como en regiones en las cuales la división celular normalmente está ausente o limitada. Este incremento en el número de
10 células está acoplado con una disminución en el tamaño celular (Dewitte y colaboradores, 2003).

La habilidad para influenciar en forma más precisa el ciclo celular de una planta, y por lo tanto para modificar en forma más precisa diferentes características de crecimiento de una planta, tendría muchas aplicaciones en áreas tales como el mejoramiento de cultivos, reproducción de plantas, en la producción de plantas ornamentales, arboricultura, horticultura, silvicultura, la producción de
15 algas para uso en biorreactores (para la producción biotecnológica de sustancias tales como compuestos farmacéuticos, anticuerpos, o vacunas, o para la bioconversión de desechos orgánicos) y otras áreas.

Un objetivo de la presente invención es superar algunos de los problemas asociados con la expresión del estado del arte de ciclina D3 en plantas.

20 Se ha encontrado ahora que la introducción en una planta de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 bajo el control de un promotor capaz de expresar preferencialmente al ácido nucleico en la zona de expansión celular de brotes produce plantas que tienen mayor rendimiento de semillas. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para mejorar el rendimiento de semillas en una planta, que comprende la introducción en una planta de un ácido
25 nucleico que codifica una ciclina D3 bajo el control de un promotor capaz de expresar preferencialmente al ácido nucleico en la zona de expansión celular de los brotes.

El término “mayor productividad” como se lo define aquí pretende significar un incremento en uno o más de los siguientes, cada uno con relación a las correspondientes plantas de tipos silvestre: (i) mayor biomasa (peso) de una o más partes aéreas (cosechables) de una planta; (ii) mayor
30 productividad total de semillas, que puede resultar de un incremento en la biomasa de las semillas (peso de las semillas) y que puede ser un incremento en el peso de las semillas por planta o con base en una semilla individual, y cuyo incremento en el peso de la semilla puede ser debido a dimensiones alteradas de la semilla, tales como la longitud y/o el ancho de la semilla y/o el área de la semilla; (iii) mayor número de semillas (llenas); (iv) mayor tamaño de la semilla, que puede influenciar también la
35 composición de las semillas; (v) mayor volumen de las semillas, que puede influenciar también la composición de las semillas; (vi) mayor índice de cosecha, que se expresa como la proporción del rendimiento de las partes cosechables, tal como semillas, sobre la biomasa total; y (vii) mayor peso de mil granos (TKW), que se extrapola a partir del número de semillas llenas contabilizadas y su peso total. Un mayor TKW puede resultar de un mayor tamaño de la semilla y/o densidad de la semilla.

40 Tomando al maíz como ejemplo, una mayor productividad puede manifestarse como uno o más de los siguiente: un incremento en el número de plantas por hectárea o por acre, un incremento en el número de espigas por planta, un incremento en el número de hileras, en el número de granos por hilera, en el peso del grano, en el peso de mil granos, en la longitud/diámetro de las espigas, entre otros. Tomando al arroz como ejemplo, una mayor productividad puede manifestarse como un
45 incremento en uno o más de los siguiente: en número de plantas por hectárea o por acre, en el número

de panículas por planta, en el número de espiguillas por panícula, en el número de flores por panícula, un incremento en la tasa de llenado de la semillas, un incremento en el peso de mil granos, entre otros. Un incremento en la productividad puede resultar también en una arquitectura modificada, o puede ocurrir como resultado de una arquitectura modificada.

5 De acuerdo con una característica preferida de la presente invención, el desempeño de los métodos de la invención da como resultado plantas que tienen mayor productividad de semillas que se manifiesta al menos por medio de: mayor número total de semillas, mayor número de semillas (llenas), mayor peso de las semillas y mayor índice de cosecha, cada uno con relación a las correspondientes plantas de tipo silvestre. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se
10 provee un método para incrementar la productividad de una planta, particularmente rendimiento de semilla, cuyo método comprende la introducción en una planta de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 bajo el control de un promotor capaz de expresar preferencialmente al ácido nucleico en la zona de expansión celular de los brotes.

15 La realización de los métodos de la invención produce mayor rendimiento de semilla en plantas ya sea que la planta (a la cual se le ha introducido un gen para la ciclina D3 bajo el control de un promotor capaz de expresar preferencialmente al ácido nucleico en la zona de expansión celular de los brotes) esté bajo condiciones sin estrés o que la planta esté expuesta a diferentes estreses comparado con las plantas de control. Las plantas responden típicamente a la exposición al estrés creciendo más lentamente. En condiciones de estrés severo, la planta puede incluso detener
20 completamente su crecimiento. Por otro lado, se define aquí el estrés suave como cualquier tipo de estrés al cual se expone una planta que no da como resultado la cesación completa de crecimiento por parte de la planta. Debido a los avances en las prácticas agrícolas (irrigación, fertilización, tratamientos con pesticidas) no se encuentran regularmente estreses severos en plantas de cosecha cultivadas. En consecuencia, el crecimiento comprometido inducido por un estrés suave es a menudo
25 una característica indeseable para la agricultura. Los estreses suaves son los estreses típicos a los cuales puede estar expuesta una planta. Estos estreses pueden ser los estreses bióticos y/o abióticos de cada día (ambientales) a los cuales está expuesta una planta. Los estreses abióticos o ambientales típicos incluyen estreses por temperatura causados por calentamiento atípico o temperaturas frías/de congelación; estrés por salinidad; estrés por agua (sequía o agua excesiva). Los estreses abióticos
30 pueden ser causados también por compuestos químicos. Los estreses bióticos son típicamente aquellos estreses causados por patógenos, tales como bacterias, virus, hongos e insectos.

Más convenientemente, los métodos pueden ser practicados sobre cualquier planta.

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

40 Las plantas que son particularmente útiles en los métodos de la invención incluyen todas las plantas que pertenecen a la superfamilia de Viridiplantae, en particular plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, incluyendo forraje o leguminosas forrajeras, plantas ornamentales, cultivos alimenticios, árboles, o arbustos seleccionados de la lista que comprende *Acacia* spp., *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Aesculus* spp., *Agathis australis*, *Albizia amara*, *Alsophila tricolor*, *Andropogon* spp.,
45 *Arachis* spp., *Areca catechu*, *Astelia fragrans*, *Astragalus cicer*, *Baikiaea plurijuga*, *Betula* spp.,

Brassica spp., *Bruguiera gymnorrhiza*, *Burkea africana*, *Butea frondosa*, *Cadaba farinosa*, *Calliandra* spp., *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Capsicum* spp., *Cassia* spp., *Centroema pubescens*, *Chaenomeles* spp., *Cinnamomum cassia*, *Coffea arabica*, *Colophospermum mopane*, *Coronilla varia*, *Cotoneaster serotina*, *Crataegus* spp., *Cucumis* spp., *Cupressus* spp., *Cyathea dealbeta*, *Cydonia oblonga*, *Cryptomeria japonica*, *Cymbopogon* spp., *Cynthea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Dalbergia monetaria*, *Davallia divaricata*, *Desmodium* spp., *Dicksonia squarosa*.

Diheteropogon amplectens, *Dioclea* spp., *Dolichos* spp., *Dorycnium rectum*, *Echinochloa pyramidalis*, *Ehretia* spp., *Eleusine coracana*, *Eragrostis* spp., *Erythrina* spp., *Eucalyptus* spp., *Euclea schimperi*, *Eulalia villosa*, *Fagopyrum* spp., *Feijoa sellowiana*, *Fragaria* spp., *Flemingia* spp., *Freycinetia banksii*, *Geranium thunbergii*, *Ginkgo biloba*, *Glycine javanica*, *Gliricidia* spp., *Gossypium hirsutum*, *Grevillea* spp., *Guibourtia coleosperma*, *Hedysarum* spp., *Hemarthia altissima*, *Heteropogon contortus*, *Hordeum vulgare*, *Hyparrhenia rufa*, *Hypericum erectum*, *Hyperthelia dissoluta*, *Indigo incamata*, *Iris* spp., *Leptarrhena pyrolifolia*, *Lespedeza* spp., *Lettuca* spp., *Leucaena leucocephala*, *Loudetia simplex*, *Lotonus bainesii*, *Lotus* spp., *Macrotyloma axillare*, *Malus* spp., *Manihot esculenta*, *Medicago sativa*, *Metasequoia glyptostroboides*, *Musa sapientum*, *Nicotianum* spp., *Onobrychis* spp., *Omithopus* spp., *Oryza* spp., *Peltophorum africanum*, *Pennisetum* spp., *Persea gratissima*, *Petunia* spp., *Phaseolus* spp., *Phoenix canariensis*, *Phormium cookianum*, *Photinia* spp., *Picea glauca*, *Pinus* spp., *Pisum sativum*, *Podocarpus totara*, *Pogonarthria fleckii*, *Pogonarthria squarrosa*, *Populus* spp., *Prosopis cineraria*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pterolobium stellatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Rhaphiolepis umbellata*, *Rhopalostylis sapida*, *Rhus natalensis*, *Ribes grossularia*, *Ribes* spp., *Robinia pseudoacacia*, *Rosa* spp., *Rubus* spp., *Salix* spp., *Schyzachyrium sanguineum*, *Sciadopitys verticillata*, *Sequoia sempervirens*, *Sequoiadendron giganteum*, *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Sporobolus fimbriatus*, *Stiburus alopecuroides*, *Stylosanthes humilis*, *Tadehagi* spp., *Taxodium distichum*, *Themeda triandra*, *Trifolium* spp., *Triticum* spp., *Tsuga heterophylla*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vitis vinifera*, *Watsonia pyramidata*, *Zantedeschia aethiopica*, *Zea mays*, amaranto, alcachofa, espárragos, brócoli, coles de Bruselas, col, canola, zanahoria, coliflor, apio, col rizada, lino, col verde, lentejas, colza, quimbombó, cebolla, patata, arroz, soja, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, tomate, calabaza, té y algas, entre otros. De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, la planta es una planta de cultivo tal como soja, girasol, canola, alfalfa, colza, algodón, tomate, patata o tabaco. Preferiblemente además, la planta es una planta monocotiledónea, tal como caña de azúcar. Más preferiblemente, la planta es un cereal, tal como arroz, maíz, trigo, cebada, mijo, centeno, avena o sorgo.

Una ciclina D3 puede ser identificada utilizando diferentes métodos. Por ejemplo, se puede abrir la secuencia de la proteína pregunta (por ejemplo, utilizando parámetros por defecto de rompimiento para la penalización de una apertura de un hueco y la penalización por extensión de un hueco) contra una base de datos de secuencias traducidas de ácido nucleico de *Arabidopsis*. En el caso donde la secuencia pregunta es una ciclina D3, el primer acierto del rompimiento resultará ser una ciclina D3 de *Arabidopsis*. Otro método para la identificación de una ciclina D3 es por medio de la alineación de la secuencia pregunta con secuencias de proteína ciclina D3, utilizando por ejemplo el programa AlignX de Vector NTI Suite (InforMax, Bethesda, MD). Se pueden llevar a cabo por lo tanto alineaciones múltiples con una penalización por apertura de hueco de 10 y una extensión de hueco de 0,01. Puede ser necesaria también una edición manual menor de la alineación con el propósito de posicionar mejor algunas regiones conservadas. Si la secuencia pregunta es una ciclina D3, se alineará con las secuencias conocidas de ciclina D3.

Una “ciclina D3” como la definida aquí se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos que,

cuando se la utiliza en la construcción de una ciclina o árbol filogenético de ciclina D, tal como aquella descrita en la Fig. 1, cae dentro de un grupo que incluye las ciclinas D3 (y no otras ciclinas de tipo D, tales como ciclina D1, D2, D4, D5, D6 y D7). La referencia que se hace aquí a un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 es para un ácido nucleico que codifica un aminoácido de ciclina D3 como se definió anteriormente.

Una persona capacitada en el arte podría determinar fácilmente si cualquier secuencia de aminoácidos en cuestión cae dentro de la definición anteriormente mencionada utilizando técnicas y software conocidos para la elaboración de tal árbol filogenético, tal como un paquete GCG, EBI o CLUSTAL, utilizando parámetros por defecto. Después de la construcción de tal árbol filogenético, se considerará que las secuencias que se agrupan en el grupo de la ciclina D3, caen dentro de la definición de una “ciclina D3”. Los ácidos nucleicos que codifican tales secuencias serán útiles en la realización de los métodos de la invención.

Las ciclinas D3 tienen típicamente la habilidad de enlazarse y activar las CDK y Rb de la planta. Además, las ciclinas D3 pueden incluir una o más y preferiblemente todas de lo siguiente: (i) una caja de ciclina; (ii) un motivo LxCxE más o menos dentro de los primeros 40 aminoácidos (que es característico de la mayoría de las ciclinas D); y (iii) una o más y preferiblemente todas las regiones conservadas identificadas por las cajas mostradas en la Figura 2 (como se muestra en la Figura 2, se permite una falta de coincidencia dentro de las cajas).

Los ejemplos de ácidos nucleico que codifican las ciclinas D3 caen bajo la definición anteriormente mencionada de una ciclina D3 se presentan en la Tabla 1 a continuación. Los ácidos nucleicos que codifican ciclina D3 mostrados en la tabla pueden ser útiles en la realización de los métodos de la invención, es decir, para obtener plantas que tienen un mayor rendimiento de semillas con relación a las correspondientes plantas de tipo silvestre por medio de la introducción y expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos bajo el control de un promotor capaz de expresar preferencialmente los ácidos nucleicos en la zona de expansión celular de un brote. El ácido nucleico que codifica una ciclina D3 es preferiblemente el ácido nucleico representado por la SEQ ID NO: 1 o es una variante funcional de la SEQ ID NO: 1, como se describe aquí a continuación.

Tabla 1: Ejemplos de ácidos nucleico que codifican ciclina D3

Nombre	Número de acceso del ácido nucleico en el NCBI	Fuente
Antma_cycD3a	AJ250397	Antirrhinum majus
Antma_cycD3b	AJ250398	Antirrhinum majus
Arath_CYCD3_1	NM_119579.2	Arabidopsis thaliana
Arath_CYCD3_2	NM_126126.2	Arabidopsis thaliana
Arath_CYCD3_3	NM_114867.2	Arabidopsis thaliana
Como Eupes_cycD3	AY340588	Euphorbia esula
Eupes_cycD3;1	AY340589	Euphorbia esula
Helan_cycD3	AY033440	Helianthus annuus
Heltu_cycD3	AY063461	Helianthus tuberosus
Lagsi_cycD3;1	AF519810	Lagenaria siceraria
Lagsi_cycD3;2	AF519811	Lagenaria siceraria
Lyces_cycD3	AJ002588	Lycopersicum esculentum
Lyces_cycD3;2	AJ002589	Lycopersicum esculentum

(continuación)

Nombre	Número de acceso del ácido nucleico en el NCBI	Fuente
Lyces_cycD3,3	AJ002590	Lycopersicum esculentum
Medsa_cycD3	X88864	Medicago sativa
Nicta_cycD3;1	AJ011893	Nicotiana tabacum
Nicta_cycD3;2	AJ011894	Nicotiana tabacum
Nicta_cycD3;3	AB015222	Nicotiana tabacum
Como Orysa_cycD3	AK103499.1	Oryza sativa
Pissa_CycD3	AB008188	Pisum sativum
Popal_cycD3	AY230139	Populus alba
Poptr_cycD3	AF181993	Populus tremula x Populus tremuloides

De acuerdo con la invención, está prevista una expresión mejorada o aumentada del ácido nucleico para la ciclina D3 en brotes. Los métodos para obtener una expresión mejorada o aumentada de genes o productos génicos están bien documentados en el arte e incluyen, por ejemplo, sobreexpresión manejada por promotores, el uso de mejoradores de la transcripción o mejoradores de la traducción.

El ácido nucleico que codifica una ciclina D3 está operativamente enlazado a un promotor capaz de expresar preferencialmente el ácido nucleico en la zona de expansión celular de brotes. Un ejemplo de tal promotor es un promotor que tiene un perfil de expresión comparable al del promotor de beta expansina. Debe ser claro que la aplicabilidad de la presente invención no está restringida a la ciclina D3 representada por la SEQ ID NO: 1, ni la aplicabilidad de la invención está restringida al uso del promotor de beta expansina en los métodos de la invención.

El ácido nucleico que codifica una ciclina D3 se puede derivar de cualquier fuente. El gen/ácido nucleico que codifica una ciclina D3 puede ser aislado de una fuente microbiana, tal como levadura u hongo, o de una fuente vegetal, alga o animal (incluida humana). Este ácido nucleico puede ser modificado a partir de su forma nativa en composición y/o ambiente genómico a través de manipulación humana deliberada. El ácido nucleico es preferiblemente un ácido nucleico homólogo, es decir, un ácido nucleico obtenido de una planta, ya sea de la misma especie de planta en la cual va a ser introducido o de una especie diferente de planta. El ácido nucleico puede ser aislado de una especie dicotiledónea, preferiblemente de la familia *Brassicaceae*, más preferiblemente de *Arabidopsis thaliana*. Más preferiblemente, la ciclina D3 aislada de *Arabidopsis thaliana* es una ciclina de tipo D3, tal como una ciclina D3;1, una ciclina D3;2 o una ciclina D3;3. Lo más preferible, la ciclina D3 es ciclina D3;3 de *Arabidopsis thaliana*, particularmente la secuencia de ácido nucleico como la representada por la SEQ ID NO: 1 la secuencia de aminoácidos como la representada por la SEQ ID NO: 2.

La secuencia representada por la SEQ ID NO: 1 describe una ciclina D3;3 de *Arabidopsis thaliana*, siendo la SEQ ID NO: 2 la correspondiente secuencia de aminoácidos. Convenientemente, la aplicabilidad de la presente invención no está restringida a l uso de una ciclina D3;3 de *Arabidopsis* como la representada por la SEQ ID NO: 1. Los métodos de acuerdo con la presente invención pueden ser practicados también utilizando variantes funcionales de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 o utilizando variantes funcionales del péptido codificado. Especialmente útiles en los métodos de la invención son las variantes funcionales del ácido nucleico representado por la SEQ ID NO: 1 o variantes funcionales del aminoácido representado por la SEQ ID NO: 2.

El término “variante funcional” como se define aquí es una ciclina D3 que retiene la habilidad para enlazar y activar una CDK de una planta (ver por ejemplo Healy y colaboradores. (2001, J. Biol. Chem. 276(10): 7041 - 7047)). Las variantes funcionales en la mayoría de los casos también complementarán a los mutantes de levadura eficientes de las CLN (el término para ciclinas tipo D en levadura), ver por ejemplo, Swaminathan y colaboradores. (2000, Plant Phys 124: 1658 - 1667), particularmente la página 1663. La variante funcional es una ciclina D3 en el sentido de que es una secuencia de aminoácidos que, cuando se la utiliza en la construcción de una ciclina o un árbol filogenético de ciclina D, tal como el descrito en la Fig. 1, cae dentro de un grupo que incluye ciclinas D3 (y no otras ciclinas tipo D, tales como la ciclina D1, D2, D4, D5, D6 y D7). La referencia que se hace aquí a un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 es para un ácido nucleico que codifica un aminoácido de ciclina D3 como se definió anteriormente. Además, la variante funcional puede incluir uno o más y preferiblemente todo de lo siguiente: (i) una caja de ciclina; (ii) un motivo LxCxE más o menos dentro de los primeros 40 aminoácidos (que es característico de la mayoría de las ciclinas D); y (iii) una o más y preferiblemente todas las regiones conservadas identificadas por las cajas mostradas en la Figura 2 (como se muestra en la Figura 2, se permite una falta de coincidencia dentro de las cajas). Además, una persona capacitada en el arte puede determinar también fácilmente si una ciclina D3 particular es una variante funcional (en el sentido de si es capaz de mejorar el rendimiento de semillas de la planta) simplemente sustituyendo la secuencia descrita en la sección de Ejemplos más adelante con la variante que va a ser probada como funcional.

El ácido nucleico adecuado de la variante funcional y las secuencias de aminoácidos útiles en la realización de los métodos de acuerdo con la invención, incluyen:

- (i) Porciones de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3, preferiblemente una porción de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 como la representada por la secuencia de la SEQ ID NO: 1;
- (ii) Variantes alternativas de empalme de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3, preferiblemente una variante alternativa de empalme de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 como el representado por la secuencia de la SEQ ID NO: 1;
- (iii) Variantes alélicas de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3, preferiblemente una variante alélica de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 como la representada por la secuencia de la SEQ ID NO: 1; y

Homólogos, derivados y fragmentos activos de una secuencia de aminoácidos de ciclina D3, preferiblemente una ciclina D3 como la representada por la secuencia de la SEQ ID NO: 2.

Será claro para una persona capacitada en el arte que el uso de una secuencia de ADN que codifica una ciclina D3 de longitud completa no sería un prerrequisito para llevar a cabo los métodos de acuerdo con la invención. Os métodos de acuerdo con la invención pueden ser practicados convenientemente utilizando porciones funcionales de un ácido nucleico/ADN que codifica una ciclina D3, particularmente una porción funcional de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 como el representado por la SEQ ID NO: 1. Una porción se refiere a una pieza de ADN derivada o preparada a partir de una molécula original de ADN (más grande). Una porción puede ser preparada, por ejemplo, haciendo una o más supresiones, por ejemplo, a la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 utilizando técnicas bien conocidas en el arte.

Por lo tanto, de acuerdo con la invención, se proporciona un método para mejorar el rendimiento de semillas de una planta, que comprende la introducción en una planta de una porción funcional de un ácido nucleico como el representado por la SEQ ID NO: 1, cuya porción funcional está bajo el control de un promotor capaz de expresar preferencialmente la porción funcional en la

zona de expansión celular de los brotes.

Otra variante funcional útil en los métodos de la invención es una variante alternativa de empalme de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3, particularmente una variante alternativa de empalme de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 como la representada por la secuencia de la SEQ ID NO: 1. El término “variante alternativa de empalme” como se lo utiliza aquí abarca a las variantes de una secuencia de ácido nucleico en la cual los intrones y/o los exones seleccionados han sido cortados, reemplazados o añadidos. Tales variantes serán aquellas en las cuales la actividad biológica de la proteína permanece inalterada, lo cual puede lograrse reteniendo selectivamente segmentos funcionales de la proteína. Tales variantes de empalme pueden ser encontradas en la naturaleza o pueden ser elaboradas por el hombre. Los métodos para elaborar tales variantes de empalme son bien conocidos en el arte.

Por lo tanto, la invención también proporciona un método para mejorar el rendimiento de semillas en las plantas, que comprende la introducción en una planta de una variante alternativa de empalme de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3, particularmente una variante alternativa de empalme de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 como la representada por la SEQ ID NO: 1, cuya variante alternativa de empalme está bajo el control de un promotor capaz de expresar preferencialmente la variante de empale en la zona de expansión celular de los brotes.

Otra variante útil en los métodos de la invención es una variante alélica de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3, particularmente una variante alélica de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 como la representada por la secuencia de la SEQ ID NO: 1. En la naturaleza existen variantes alélicas y está incluido dentro de los métodos de la presente invención el uso de estos alelos naturales. Las variantes alélicas abarcan Polimorfismos de Nucleótidos Individuales (SNP), así como Polimorfismos de Inserción/Supresión Pequeña (INDEL). El tamaño de los INDEL es usualmente menor a 100 pb. Los SNP y los INDEL forman el conjunto más grande de variantes de secuencia de cadenas polimórficas de ocurrencia natural de la mayoría de los organismos.

Por lo tanto, la invención también proporciona un método para mejorar el rendimiento de semillas en las plantas, que comprende la introducción en una planta de una variante alélica de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3, particularmente una variante alélica de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 como la representada por la SEQ ID NO: 1, cuya variante alélica está bajo el control de un promotor capaz de expresar preferencialmente la variante alélica en la zona de expansión celular de los brotes.

Más convenientemente, los métodos de acuerdo con la presente invención pueden ser también practicados utilizando homólogos, derivados, o fragmentos activos de una ciclina D3, preferiblemente utilizando homólogos, derivados o fragmentos activos de una ciclina D3 como la representada por la SEQ ID NO: 2. Los ácidos nucleicos que codifican homólogos, derivados o fragmentos activos de un aminoácido como los representados por la SEQ ID NO: 2 pueden ser fácilmente determinados utilizando técnicas rutinarias bien conocidas por las personas capacitadas en el arte.

Los “homólogos” de una proteína abarcan péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que tienen sustituciones, supresiones y/o inserciones de aminoácidos con relación a la proteína no modificada en cuestión y que tienen actividad biológica y funcional similar a la proteína no modificada de la cual se derivan. Para producir tales homólogos, se pueden reemplazar los aminoácidos de la proteína por otros aminoácidos que tienen propiedades similares (tales como hidrofobicidad, hidrofiliidad, antigenicidad, propensión a formar o a romper estructuras de hélice α o estructuras de lámina β). Las tablas de sustitución conservadora son bien conocidas en el arte (ver por

ejemplo Creighton (1984) Proteins. W.H. Freeman and Company).

Los homólogos útiles en el método de acuerdo con la invención son aquellos que caen bajo la definición de una variante funcional, es decir, que tienen la habilidad para enlazar y activar una CDK de una planta y que es una ciclina D3, como se definió aquí anteriormente. Adicionalmente, se pueden
 5 caracterizar los homólogos en términos de tener en orden creciente de preferencia al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos como la representada por la SEQ ID NO: 2 (ver la Fig. 3 que ilustra que las ciclinas D3 tienen un bajo porcentaje de identidad entre sí, pero sin embargo un 30% de
 10 identidad con la SEQ ID NO: 2 es suficiente para identificar otras ciclinas D3). Además, el homólogo puede incluir uno o más y preferencialmente todo de lo siguiente: (i) una caja de ciclina; (ii) un motivo LxCxE más o menos dentro de los primeros 40 aminoácidos (que es característico de la mayoría de las ciclinas D); y (iii) una o más y preferiblemente todas las regiones conservadas identificadas por las cajas mostradas en la Figura 2 (como se muestra en la Figura 2, se permite una
 15 falta de coincidencia dentro de las cajas).

También abarcados por el término “homólogos” están dos formas especiales de homología, que incluyen secuencias ortólogas y secuencias parálogas, que abarcan conceptos evolucionarios utilizados para describir relaciones ancestrales de genes. El término “parálogos” se relaciona con duplicaciones de genes dentro del genoma de una especie que conduce a genes parálogos. El término
 20 “ortólogos” se relaciona con genes homólogos en diferentes organismos debido a una relación ancestral.

Ortólogos, por ejemplo, en especies de plantas monocotiledóneas pueden encontrarse fácilmente llevando a cabo la así llamada búsqueda recíproca por explosión. Esto puede hacerse por medio de una primera explosión que implica explotar la secuencia en cuestión (por ejemplo, la SEQ
 25 ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2) contra cualquier base de datos de secuencia, tal como la base de datos NCBI que se encuentra públicamente disponible y que puede ser encontrada en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Si se buscaran ortólogos en el arroz, se explotaría la secuencia en cuestión, por ejemplo, contra los 28.469 clones de ADNc de longitud completa de *Oryza sativa* Nipponbare disponibles en NCBI. Se pueden utilizar BLASTn cuando se parte de nucleótidos o TBLASTX cuando se parte de la proteína, con valores estándar por defecto (expectativa 10, alineación
 30 50). Se pueden filtrar los resultados de la explosión. Se explotan nuevamente las secuencias de longitud completa ya sea de los resultados filtrados o de los resultados no filtrados (segunda explosión) contra la secuencia en cuestión (SEQ ID NO: 1 ó 2). Se comparan luego los resultados de la primera y segunda explosiones. En el caso de familias grandes, se utiliza ClustalW seguido por un árbol vecino de unión para ayudar a visualizar el agrupamiento.

Un homólogo puede estar en la forma de una “variante de sustitución” de una proteína, es decir, donde se ha removido al menos un residuo en una secuencia de aminoácidos y se ha insertado en su lugar un residuo diferente. Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de residuos
 35 individuales, pero pueden agruparse dependiendo de restricciones funcionales colocadas sobre el polipéptido; las inserciones serán usualmente aproximadamente del orden de 1 a 10 residuos aminoácidos, y las supresiones estarán en el rango aproximadamente de 1 a 20 residuos. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos incluyen sustituciones conservadoras de
 40 aminoácidos.

Un homólogo puede estar también en la forma de una “variante de inserción” de una proteína, es decir en donde se introducen uno o más residuos aminoácidos en un sitio predeterminado
 45 en una proteína. Las inserciones pueden incluir fusiones en el terminal amino y/o en el terminal

carboxilo así como inserciones dentro de la secuencia de múltiples aminoácidos o de aminoácidos individuales. Generalmente, las inserciones dentro de la secuencia de aminoácidos serán más pequeñas que las fusiones del terminal amino o del terminal carboxilo, aproximadamente del orden de 1 a 10 residuos. Los ejemplos de proteínas o péptidos de fusión del terminal amino o del terminal carboxilo incluyen al dominio de enlazamiento o al dominio de activación de un activador transcripcional como el utilizado en el sistema híbrido doble de levadura, proteínas de recubrimiento de fago, etiqueta de (histidina)₆, etiqueta de glutatona S-transferasa, proteína A, proteína para enlazamiento de maltosa, dihidrofolato reductasa, epítipo de Tag 100, epítipo de c-myc, epítipo de FLAG®, lacZ, CMP (péptido para enlazamiento de calmodulina), epítipo de HA, epítipo de proteína C y epítipo de VSV.

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

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

Los “derivados” incluyen péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que pueden incluir sustituciones, supresiones o adiciones de residuos aminoácidos de ocurrencia natural y no natural comparado con la secuencia de aminoácidos de una forma de ocurrencia natural de la proteína, por ejemplo, como se presenta en la SEQ ID NO: 2). Los “derivados” de una proteína abarcan péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que pueden incluir residuos aminoácidos alterados, glicosilados, acilados de ocurrencia natural o no natural comparado con la secuencia de aminoácidos de una forma de ocurrencia natural del polipéptido. Un derivado puede incluir también uno o más sustituyentes no aminoácidos comparado con la secuencia de aminoácidos de la cual se deriva, por ejemplo una molécula reportera u otro ligando, enlazado en forma covalente o no covalente a la secuencia de aminoácidos, tal como una molécula reportera que se enlaza para facilitar su detección, y residuos de aminoácidos de ocurrencia no natural con relación a la secuencia de aminoácidos de una proteína de ocurrencia natural.

Los “fragmentos activos” de una proteína ciclina D3 abarcan al menos cinco residuos aminoácidos contiguos de una proteína, cuyos residuos retienen una actividad biológica y/o funcional similar a la de la proteína de ocurrencia natural. En cualquier caso, “homólogos, derivados y fragmentos activos” son aquellos que caen bajo la definición de “variante funcional” como se definió aquí anteriormente.

Los métodos para la búsqueda e identificación de homólogos de ciclina D3 estarían dentro del campo de conocimiento de una persona capacitada en el arte. Los métodos para la alineación de secuencias para comparación son conocidos en el arte; tales métodos incluyen GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, ALIGN X (a partir del vector NTI) y TFASTA. GAP utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch, (J. Mol. Biol. 48: 443 - 453, 1970) para hallar la alineación de dos secuencias completas que maximicen el número de coincidencias y minimice el número de huecos. El algoritmo de BLAST calcula el porcentaje de identidad de secuencia y realiza un análisis estadístico de la

similitud entre las dos secuencias. El software para llevar a cabo el análisis por BLAST está públicamente disponible a través del National Centre for Biotechnology Information. Los homólogos adecuados para uso en los métodos de la invención, es decir aquellos que tienen al menos 30% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, pueden ser identificados tomando secuencias de proteína ciclina D3 de longitud completa y utilizando un generador de similitud/identidad de matriz, tal como MatGAT (Matrix Global Alignment Tool) que calcula la similitud e identidad entre cada par de secuencias e un conjunto dado de datos sin requerir de alineación previa de los datos. El programa realiza una serie de alineaciones por pares utilizando el algoritmo de alineación global de Myers y Miller (con una penalización por apertura de hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2). Este calcula entonces la similitud y la identidad utilizando, por ejemplo, Blosum 60 como matriz de puntuación, y luego coloca los resultados en una matriz de distancia.

Por lo tanto, la invención también proporciona un método para mejorar el rendimiento de semillas en una planta, que comprende la introducción en una planta de un ácido nucleico que codifica un homólogo, derivado o fragmento activo de una ciclina D3, tal como un homólogo, derivado o fragmento activo de una ciclina D3 como el representado por la SEQ ID NO: 2, cuyo homólogo, derivado o fragmento activo está bajo el control de un promotor capaz de expresar preferencialmente al ácido nucleico en la zona de expansión celular de los brotes.

Las construcciones genéticas y los vectores facilitan la introducción y/o expresión de las secuencias de nucleótidos utilizadas en los métodos de acuerdo con la invención.

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

- (i) un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 o una variante funcional del mismo, preferiblemente un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 como el representado por la SEQ ID NO: 1 o una variante funcional del mismo (como se definió aquí anteriormente), cuyo ácido nucleico codifica un polipéptido ciclina D3 o una variante funcional del mismo, preferiblemente un polipéptido ciclina D3 como el representado por la SEQ ID NO: 2 o una variante funcional del mismo;
- (ii) un promotor capaz de expresar preferencialmente al ácido nucleico de (i) en brotes, particularmente en la zona de expansión celular de brotes vegetativos (aéreos); y opcionalmente
- (iii) una secuencia de terminación de la transcripción.

Las construcciones útiles en los métodos de acuerdo con la presente invención pueden ser construidas utilizando tecnología de ADN recombinante bien conocida por las personas capacitadas en el arte. Las construcciones génicas pueden ser insertadas en vectores, que pueden estar comercialmente disponibles, adecuadas para la transformación en plantas y adecuadas para la expresión del gen de interés en las células transformadas.

Las plantas se transforman con un vector que contiene la secuencia de interés (es decir, un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 o una variante funcional de la misma (como se definió aquí anteriormente), por ejemplo un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 como el representado por la SEQ ID NO: 1 o una variante funcional del mismo (como se definió aquí anteriormente)). La secuencia de interés está operativamente enlazada a un promotor capaz de expresar preferencialmente la secuencia de interés en los brotes. Los términos “elemento regulador”, “secuencia de control” y “promotor” son todos utilizados aquí en forma intercambiable y se deben tomar en un contexto amplio para referirse a secuencias reguladoras de ácido nucleico capaces de efectuar la expresión de las secuencias a las cuales están ligadas. Abarcados por los términos anteriormente mencionados están las

secuencias reguladoras de la transcripción derivadas de un gen genómico eucariota clásico (incluida la caja TATA que es requerida para una iniciación precisa de la transcripción, con o sin una secuencia de caja CCAAT) y elementos reguladores adicionales (es decir, secuencias activadoras secuencia arriba, reforzadores y silenciadores) que alteran la expresión génica en respuesta a estímulos externos y/o de desarrollo, o en una forma específica para el tejido. También está incluida dentro del término una secuencia reguladora de la transcripción de un gen procariota clásico, en cuyo caso puede incluir una secuencia de caja -35 y/o secuencias reguladoras de la transcripción de caja -10. El término “elemento regulador” también abarca una molécula sintética de fusión o derivada que confiere, activa o refuerza la expresión de una molécula de ácido nucleico en una célula, tejido u órgano.

5 El término “operativamente enlazado” como se lo utiliza aquí se refiere a un enlace funcional entre la secuencia promotora y el gen de interés, de tal manera que la secuencia promotora es capaz de iniciar la transcripción del gen de interés.

10 El ácido nucleico que codifica una ciclina D3 o una variante funcional del mismo, tal como un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 tal como el representado por la SEQ ID NO: 1 o una variante funcional del mismo, está operativamente enlazado a un promotor capaz de expresar preferencialmente al ácido nucleico en la zona de expansión celular de los brotes. Preferiblemente, el promotor capaz de expresar preferencialmente al ácido nucleico en la zona de expansión celular de los brotes tiene un perfil de expresión comparable a un promotor de beta expansina, por ejemplo como se muestra en la Fig. 5. Una persona capacitada en el arte será capaz de identificar fácilmente promotores que tienen un perfil de expresión comparable a un promotor de beta expansina utilizando técnicas de rutina. Más específicamente, el promotor capaz de expresar preferencialmente al ácido nucleico en la zona de expansión celular de un brote, es capaz de dirigir la expresión particularmente en brotes vegetativos (aéreos). Más preferiblemente, el promotor capaz de expresar preferencialmente al ácido nucleico en los brotes es el promotor de beta expansina (SEQ ID NO: 3).

15 Opcionalmente, se pueden utilizar también una o más secuencias terminadoras en la construcción introducida en una planta. El término “terminador” abarca una secuencia de control que es una secuencia de ADN al extremo de una unidad transcripcional que señala el procesamiento y poliadenilación 3' de un transcripto primario y terminación de la transcripción. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir reforzadores transcripcionales así como de traducción. Aquellos capacitados en el arte serán conscientes de secuencias reforzadoras y terminadoras que pueden ser adecuadas para ser utilizadas en la realización de la invención. Tales secuencias serían conocidas o pueden ser fácilmente obtenidas por una persona capacitada en el arte.

20 Las construcciones genéticas pueden incluir además un origen de secuencia de replicación que es requerido para el mantenimiento y/o replicación en un tipo específico de célula. Un ejemplo es cuando se requiere que una construcción genética sea mantenida en una célula bacteriana como un elemento genético episomal (por ejemplo, molécula de plásmido o de cósmido). Los orígenes preferidos de replicación incluyen, pero no se limitan al f1-ori y colE1.

25 La construcción genética puede incluir opcionalmente un gen marcador seleccionable. Como se lo utiliza aquí, el término “gen marcador seleccionable” incluye cualquier gen que confiere un fenotipo sobre una célula en la cual se expresa para facilitar la identificación y/o selección de células que son transfectadas o transformadas con una construcción de ácido nucleico de interés. Los marcadores adecuados se pueden seleccionar de marcadores que confieren resistencia antibiótica o herbicida, que introducen un nuevo rasgo metabólico o que permiten selección visual. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen genes que confieren resistencia a antibióticos (tales como nptII que fosforila neomicina y kanamicina, o hpt, higromicina de fosforilación), a herbicidas

(por ejemplo bar que proporciona resistencia a Basta; aroA o gox que proporcionan resistencia contra glifosato), o genes que proporcionan un rasgo metabólico (tal como manA que le permite a las plantas utilizar manosa como única fuente de carbono). Los genes marcadores visuales resultan en la formación de color (por ejemplo β -glucuronidasa, GUS), luminiscencia (tal como luciferasa) o fluorescencia (Proteína Fluorescente Verde, GFP, y derivados de la misma).

La presente invención también abarca plantas obtenibles por medio de los métodos de acuerdo con la presente invención. La presente invención por lo tanto proporciona plantas obtenibles por medio del método de acuerdo con la presente invención, las cuales incluyen un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 o variante funcional del mismo operativamente enlazado a un promotor capaz de expresar preferencialmente al ácido nucleico en la zona de expansión celular de un brote.

La invención también proporciona un método para la producción de plantas transgénicas que tienen un rendimiento mejorado, que comprende la introducción en una planta de un ácido nucleico que codifica ciclina D3 o una variante funcional del mismo, particularmente un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 como el representado por la SEQ ID NO: 1 o una variante funcional del mismo (como se definió aquí anteriormente), cuyo ácido nucleico está operativamente enlazado a un promotor capaz de expresar preferencialmente al ácido nucleico en la zona de expansión celular de un brote.

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

- (i) introducir en una planta o célula de una planta un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 o una variante funcional del mismo, preferiblemente un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 como el representado por la SEQ ID NO: 1 o una variante funcional del mismo, cuyo ácido nucleico o variante funcional del mismo codifica un polipéptido ciclina D3 o una variante funcional del mismo, cuyo polipéptido es preferiblemente como el representado por la SEQ ID NO: 2 o es una variante funcional del mismo y cuyo ácido nucleico o variante funcional del mismo está bajo el control de un promotor capaz de expresar preferencialmente al ácido nucleico en brotes, particularmente en la zona de expansión celular de brotes vegetativos (aéreos);
- (ii) cultivar la célula de la planta bajo condiciones que promuevan la regeneración y crecimiento de una planta madura.

El ácido nucleico o la variante funcional pueden ser introducidos directamente en una célula de una planta o en la misma planta (incluida la introducción en un tejido, órgano o cualquier otra parte de una planta). De acuerdo con una característica de la presente invención, se introduce preferiblemente el ácido nucleico en una planta por medio de transformación.

El término "introducción en una planta" se refiere principalmente a la transformación de una planta con el ácido nucleico particular en cuestión (un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 o una variante funcional del mismo), sin embargo el término también se refiere a otros métodos que resultan en la introducción en una planta del ácido nucleico particular en cuestión, tal como técnicas de reproducción. Las técnicas de reproducción son bien conocidas por personas capacitadas en el arte.

El término "transformación" como se lo menciona aquí abarca la transferencia de un polinucleótido exógeno en una célula huésped, con independencia del método utilizado para transferencia. El tejido de la planta capaz de propagación clonal posterior, ya sea por organogénesis o por embriogénesis, puede ser transformado con una construcción genética de la presente invención y una planta entera regenerada a partir de allí. El tejido particular escogido variará dependiendo de los

sistemas de propagación clonal disponibles para, y mejor adecuados para la especie particular que está siendo transformada. Los ejemplos de tejidos objetivo incluyen discos de hojas, polen, embriones, cotiledones, hipocotiledones, megagametofitos, tejido de callo, tejido meristemático existente (por ejemplo, meristemo apical, yemas auxiliares, y meristemas de la raíz), y tejido de meristemo inducido (por ejemplo, meristemo de cotiledón y meristemo de hipocotiledón). El polinucleótido puede ser introducido en forma transitoria o estable en una célula huésped y puede ser mantenido en forma no integrada, por ejemplo, como un plásmido. Alternativamente, puede ser integrado en el genoma huésped. Se puede utilizar luego la célula de la planta transformada resultante para regenerar una planta transformada en una forma conocida por las personas capacitadas en el arte.

La transformación de una especie vegetal es ahora una técnica bastante rutinaria. Convenientemente, se puede utilizar cualquiera de los diferentes métodos de transformación para introducir el gen de interés en un ancestro adecuado de la célula. Los métodos de transformación incluyen el uso de liposomas, electroporación, productos químicos que incrementan la aceptación de ADN libre, inyección del ADN directamente dentro de la planta, bombardeo con pistola de partículas, transformación utilizando virus o polen y microinyección. Se pueden seleccionar los métodos a partir del método con calcio/polietilén glicol para protoplastos (Krens y colaboradores (1982) *Nature* 296, 72 - 74; Negrutiu y colaboradores, June 1987, *Plant Mol. Biol.* 8, 363 - 373); electroporación de protoplastos (Shillito R. D. y colaboradores, 1985 *Bio/Technol* 3, 1099 - 1102); microinyección dentro del material vegetal (Crossway A. y colaboradores, 1986, *Mol. Gen. Genet.* 202, 179 - 185); bombardeo de partículas recubiertas con ADN o ARN (Klein T. M. y colaboradores, 1987, *Nature* 327, 70); Infección (no integradora) con virus y similares. Las plantas de arroz transgénico que expresan un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 o variante funcional del mismo son preferiblemente producidas por medio de la transformación mediada por *Agrobacterium* utilizando cualquiera de los métodos bien conocidos para la transformación de arroz, tal como se describe en cualquiera de los siguientes documentos: solicitud de publicada de patente europea EP 1198985 A1, Aldemita y Hodges (*Planta* 199, 612 - 617, 1996); Chan y colaboradores (*Plant Mol. Biol.* 22 (3) 491 - 506, 1993), Hiei y colaboradores (*Plant J.* 6 (2) 271 - 282, 1994), cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia como si estuvieran expuestas en su totalidad. En el caso de la transformación del maíz, el método preferido es como el descrito ya sea por Ishida y colaboradores (*Nat. Biotechnol.* 1996 Jun; 14 (6); 745 - 50) o Frame y colaboradores (*Plant Physiol.* 2002 May, 129 (1); 13 - 22), cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia como si estuvieran expuestas en su totalidad.

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

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

Las plantas transformadas generadas se pueden propagar por medio de una variedad de medios, tales como por medio de propagación clónica o por medio de técnicas clásicas de reproducción. Por ejemplo, una primera generación de plantas transformadas (o T1) puede ser autofecundada para producir transformantes homocigotos de segunda generación (o T2), y las plantas

T2 se pueden propagar adicionalmente a través de técnicas clásicas de reproducción.

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

Los métodos de acuerdo con la invención pueden ser llevados a cabo también sin la introducción de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 o variante funcional del mismo en una planta. Esto se puede lograr por medio de la introducción de una modificación genética, preferiblemente en el lugar de un gen que codifica una ciclina D3, para permitir la expresión del gen preferencialmente en brotes. El lugar de un gen, como se lo define aquí se entiende como una región genómica que incluye al gen de interés y 10 KB secuencia arriba o secuencia debajo de la región de codificación.

Se puede introducir la modificación genética, por ejemplo, por medio de uno (o más) de los siguientes métodos: activación de T-ADN, TILLING, mutagénesis, recombinación homóloga o, como se discutió aquí anteriormente, por medio de la introducción y expresión en una planta (célula) de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 o una variante funcional del mismo, estando el ácido nucleico bajo el control de un promotor capaz de expresar preferencialmente ese ácido nucleico en brotes.

La activación del T-ADN etiquetado (Hayashi y colaboradores, Science (1992) 1350 - 1353) involucran la inserción de T-ADN que usualmente contiene un promotor (puede ser también un reforzador de la traducción o un intrón), en la región genómica del gen de interés o 10 KB secuencia arriba o secuencia debajo de la región de codificación de un gen en una configuración tal que el promotor dirija la expresión del gen objetivo. Típicamente, la regulación de la expresión del gen objetivo por su promotor natural se rompe, y el gen cae bajo el control del promotor recientemente introducido. El promotor está típicamente embebido en un T-ADN. Este T-ADN es insertado en el genoma de la planta, por ejemplo, a través de inserción de *Agrobacterium* y conduce a la sobreexpresión de genes cerca al T-ADN insertado. Las plantas transgénicas resultantes muestran fenotipos dominantes debido a la sobreexpresión de genes cerca al promotor introducido. Con el propósito de lograr un mayor rendimiento, el promotor que es introducido sería cualquier promotor capaz de expresarse preferencialmente en brotes.

Se puede introducir también una modificación genética en el lugar de un gen/ácido nucleico que codifica una ciclina D3 utilizando la técnica de TILLING (Targeted Induced Local Lesions IN Genomes: Lesiones Locales Inducidas Dirigidas en Genomas). Esta es una tecnología de mutagénesis útil para generar y/o identificar, y para eventualmente aislar variantes de mutagénesis de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 capaz de exhibir actividad biológica de ciclina D3. TILLING también permite la selección de plantas que portan tales variantes mutantes. Estas variantes mutantes pueden exhibir incluso mayor actividad de ciclina D3 que aquella exhibida por el gen en su forma natural. TILLING combina mutagénesis de alta densidad con métodos de selección de alto rendimiento. Las etapas típicamente seguidas en TILLING son: (a) mutagénesis EMS (Redei y Koncz, 1992; Feldmann y colaboradores, 1994; Lightner y Caspar 1998); (b) preparación y reunión del ADN de individuos; (c) amplificación por PCR de una región de interés; (d) desnaturalización e hibridación para permitir la formación de heterodúplex; (e) DHPLC, donde la presencia de un heterodúplex en un fondo común se detectada como un pico extra en el cromatograma; (f) identificación del mutante individual; y (g) secuenciación del producto PCR mutante. Los métodos para TILLING son bien

conocidos en el arte (McCallum Nat. Biotechnol.; 2000 Apr, 18 (49), 455 - 57, revisado por Stemple 2004 (TILLING- a high-throughput harvest for functional genomics. Nat. Rev. Genet. 2004 Feb; 5(2); 145 - 50)).

5 La mutagénesis puede ser usada para generar variantes de ácidos nucleico que codifican ciclina D3. Los métodos para generar variantes mutantes son bien conocidos en el estado del arte.

La activación de T-ADN, TILLING y la mutagénesis dirigida al sitio son ejemplos de tecnologías que permiten la generación de nuevos alelos y variantes de ciclina D3.

10 La recombinación homóloga permite la introducción en un genoma de ácido nucleico seleccionado en una posición definida seleccionada. La recombinación homóloga es una tecnología estándar usada rutinariamente en ciencias biológicas para organismos inferiores tales como levadura o musgo *Physcomitrella*. Los métodos para llevar a cabo la recombinación homóloga en plantas han sido descritos no solamente para plantas modelo (Offringa y colaboradores. Extrachromosomal homologous recombination and gene targeting in plant cells after Agrobacterium-mediated transformation. 1990 EMBO J. 1990 Oct; 9 (10): 3077 - 84) sino también para plantas de cultivo, por ejemplo arroz (Terada R, Urawa H, Inagaki Y, Tsugane K, Iida S. Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. Nat Biotechnol. 2002. Iida and Terada: A tale of two integrations, transgene and T-DNA: gene targeting by homologous recombination in rice. Curr Opin Biotechnol. 2004 Apr; 15 (2): 132 - 8). El ácido nucleico que será dirigido (que puede ser un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 o una variante del mismo como se definió aquí anteriormente) no requiere ser dirigido al sitio de un gen que codifica una ciclina D3, pero puede ser introducido, por ejemplo, en regiones de alta expresión. El ácido nucleico que va a ser dirigido puede ser un alelo mejorado utilizado para reemplazar el gen endógeno o puede ser introducido además al gen endógeno.

20 La presente invención claramente se extiende a cualquier célula vegetal o planta producida por cualquiera de los métodos descritos aquí, y a todas las partes de la planta y propágulos de la misma. La presente invención se extiende además para abarcar la progenie de una célula primaria transformada o transfectada, tejido, órgano o planta completa que ha sido producida por cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, siendo el único requisito que la progenie exhiba el mismo genotipo y/o fenotipo característico(s) como aquellos producidos en los progenitores por medio de los métodos de acuerdo con la invención. La invención también incluye células huésped que contienen una molécula aislada de ácido nucleico que codifica una ciclina D3 operativamente enlazada a un promotor capaz de expresar al ácido nucleico en la zona de expansión celular de un brote. Las células huésped preferidas de acuerdo con la invención son células vegetales. La invención también se extiende a las partes cosechables de una planta tales como, pero sin limitarse a, semillas, hojas, frutos, flores, cultivos de tallos, rizomas, tubérculos y bulbos.

35 La presente invención también abarca el uso de ácidos nucleicos que codifican las ciclinas D3 y el uso de polipéptidos ciclina D3.

Uno de tales usos desde luego se relaciona con el uso de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3, operativamente enlazado a un promotor capaz de expresar preferencialmente al ácido nucleico en brotes, en mejorar el rendimiento de semillas de las plantas, en particular en incrementar el número total de semillas, incrementar el número de semillas (llenas), incrementar el peso de las semillas e incrementar el índice de cosecha, entre otros. El ácido nucleico que codifica una ciclina D3 o una variante funcional del mismo son como se definió aquí anteriormente. Se prefiere un ácido nucleico como el representado por la SEQ ID NO: 1, o una variante funcional del mismo como se definió aquí anteriormente.

45 Los ácidos nucleico que codifican ciclinas D3 y polipéptidos ciclina D3 pueden encontrar uso

también en programas de reproducción. La ciclina D3 puede ser un ácido nucleico como el representado por la SEQ ID NO: 1, o una variante funcional del mismo como se definió aquí anteriormente; o la ciclina D3 puede ser un aminoácido como el representado por la SEQ ID NO: 2 o una variante funcional del mismo como se definió aquí anteriormente. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica una ciclina D3 o una parte del mismo puede estar sobre un cromosoma (o una parte del mismo), preferiblemente junto con uno o más miembros relacionados de la familia. En un ejemplo de tal programa de reproducción, se identifica un marcador que puede estar genéticamente enlazado a un ácido nucleico que codifica una proteína ciclina D3 en una planta, cuyo gen puede ser un gen que codifica a la misma proteína ciclina D3 o cualquier otro gen que puede influenciar directa o indirectamente la expresión de un gen que codifica una proteína ciclina D3 y/o la actividad de la misma proteína ciclina D3. Este marcador de ADN puede ser utilizado luego en programas de reproducción para seleccionar plantas que tienen un mayor rendimiento con relación a las correspondientes plantas de tipo silvestre.

Las variantes alélicas de una ciclina D3 pueden ser utilizadas también en programas convencionales de reproducción tal como la reproducción asistida por un marcador. Tales programas de reproducción algunas veces requieren la introducción de variantes alélicas en las plantas por medio de tratamiento mutagénico de una planta. Un método mutagénico adecuado es la mutagénesis EMS. La identificación de variantes alélicas tiene lugar, por ejemplo, por medio de PCR. Esta es seguida por una etapa de selección para selección de variantes alélicas superiores de la secuencia en cuestión y que producen mayor rendimiento de semillas en una planta con relación a las correspondientes plantas de tipo silvestre. La selección se lleva a cabo típicamente monitoreando el rendimiento de semillas en las plantas que contienen diferentes variantes alélicas de la secuencia en cuestión, por ejemplo, diferentes variantes alélicas de la SEQ ID NO: 1. El monitoreo del rendimiento se puede hacer en un invernadero o en el campo. Otras etapas opcionales incluyen el cruzamiento de plantas, en el cual se identificó la variante alélica superior, con otra planta. Esto se podría utilizar, por ejemplo, para hacer una combinación de rasgos fenotípicos interesantes.

Los ácidos nucleicos que codifican las ciclinas D3 y polipéptidos ciclina D3 pueden encontrar uso también como reguladores de crecimiento. La ciclina D3 puede ser un ácido nucleico como el representado por la SEQ ID NO: 1, o una variante funcional del mismo como se definió aquí anteriormente; o la ciclina D3 puede ser un aminoácido como el representado por la SEQ ID NO: 2 o una variante funcional del mismo como se definió aquí anteriormente. Ya que estas ciclinas D3 son útiles en el mejoramiento del rendimiento de semillas en las plantas, las ciclinas D3 serían también útiles reguladores de crecimiento, tal como herbicidas o estimuladores de crecimiento. La presente invención por lo tanto, proporciona una composición que contiene una ciclina D3, junto con un portador, diluyente o excipiente adecuado, para uso como un regulador del crecimiento.

Los métodos de acuerdo con la presente invención resultan en plantas que tienen mayor rendimiento de semillas, como se describió aquí anteriormente. Estas características de crecimiento convenientes pueden ser combinadas también con otras características económicamente ventajosas, tales como características adicionales de mejoramiento de la productividad, tolerancia a diferentes estreses, características que modifican diferentes rasgos arquitectónicos y/o rasgos bioquímicos y/o fisiológicos.

Descripción de las figuras

Se describirá ahora la presente invención con referencia a las siguientes figuras en las cuales: La **Fig. 1** es una alineación múltiple preparada utilizando ClustalW y valores por defecto, seguido por el computo del árbol de distancia promedio. Se muestra la agrupación de la ciclina D3.

La **Fig. 2** es una alineación de secuencias conocidas de proteína ciclina D3. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa AlignX de Vector NTI Suite (InforMax, Bethesda, MD). Se hicieron múltiples alineaciones con una penalización por apertura de hueco de 10 y una extensión de hueco de 0,01. Se llevó a cabo también una edición manual menor donde fue necesario para mejorar la posición de algunas regiones conservadas. La línea mostrada indica la separación de las ciclinas D3 de las otras ciclinas D. Se metieron en cajones una cantidad de motivos específicos para las ciclinas D3.

La **Fig. 3** es una matriz idéntica/similar preparada utilizando MatGAT (Matrix Global Alignment Tool) que calcula la similitud e identidad entre cada par de secuencias en un conjunto dado de datos sin requerir de una alineación previa de los datos. El programa realiza una serie de alineaciones por pares utilizando el algoritmo de alineación global de Myers y Miller (con una penalización por apertura de hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2). Este calcula entonces la similitud y la identidad utilizando, por ejemplo, Blosum 60 como matriz de puntuación, y luego coloca los resultados en una matriz de distancia. Se muestra la similitud de la secuencia en la mitad inferior de la línea divisoria y se muestra la identificación de la secuencia en la mitad superior de la línea divisoria. La secuencia de la SEQ ID NO: 2 es indicada como el número 5 en la matriz. Las secuencias que tienen al menos una identidad de secuencia del 30% con la secuencia de la SEQ ID NO: 2 abarcan las ciclinas D3.

La **Fig. 4** es un vector binario para la expresión en *Oryza sativa* del gen CiclinaD3;3 de *Arabidopsis thaliana* bajo el control del promotor de beta expansina.

La **Fig. 5** muestra fotografías de la expresión de GUS dirigida por un promotor de beta expansina. La fotografía de la “planta C” es un GUS de la planta de arroz colorado cuando había alcanzado un tamaño de aproximadamente 5 cm. La fotografía de la “planta B” es un GUS de la planta de arroz colorado cuando había alcanzado un tamaño de aproximadamente 10 cm. Los promotores con perfiles de expresión comparables pueden ser útiles también en los métodos de la invención.

La **Fig. 6** detalla ejemplos de secuencias útiles en la realización de los métodos de acuerdo con la presente invención.

Ejemplos

Se describirá ahora la presente invención con referencia a los siguientes ejemplos, que son únicamente para propósitos de ilustración.

Manipulación de ADN: a menos que se establezca otra cosa, se llevan a cabo las técnicas de ADN recombinante de acuerdo a protocolos estándar descritos en (Sambrook (2001) Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, New York) o en los Volúmenes 1 y 2 de Ausubel y colaboradores (1994), Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols. Los materiales y métodos estándar para trabajo molecular en plantas están descritos en Plant Molecular Biology Labfax (1993) por R. D. D. Croy, publicado por BIOS Scientific Publications Ltd (RU) y Blackwell Scientific Publications (RU).

Ejemplo 1: Clonación Génica

Se amplificó Ciclina D3;3 de *Arabidopsis* (referencia interna CDS0018) por medio de PCR utilizando como molde una biblioteca de ADNc de plantas de semillero de *Arabidopsis thaliana* (Invitrogen, Paisley, RU). Después de la transcripción inversa del ARN extraído de las plantas de semillero, se clonaron los ADNc en pCMV Sport 6.0. El tamaño promedio del inserto del banco era de 1,5 kb y el número original de clones era de $1,59 \times 10^7$ cfu. Se determinó que el título original era de $9,6 \times 10^5$ cfu/ml después de la primera amplificación de 6×10^{11} cfu/ml. Después de la extracción del plásmido, se utilizaron 200 ng del molde en una mezcla de PCR de 50 μ l. Se utilizaron iniciadores

prm0360 (sentido, codón de inicio en negrilla, sitio AttB1 en itálicas: 5' GGGGACAAGTTTGTACA AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCTTTAGAAGAGGAGGA 3') y prm0361 (inverso, complementario, codón de inicio en negrilla, sitio AttB2 en itálicas: 5' GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGTTTAGCGAGGACTACTATAAGCA 3'), que incluye los sitios AttB para recombina-
 5 Gateway, para amplificación por PCR. Se llevó a cabo la PCR utilizando Hifi Taq ADN polimerasa en condiciones estándar. Se amplificó y purificó un fragmento PCR de 1086 pb utilizando también métodos estándar. Se llevó a cabo entonces la primera etapa del procedimiento Gateway, la reacción BP, durante la cual el fragmento PCR se recombina *in vivo* con el plásmido pDONR201 para producir, de acuerdo con la terminología Gateway®, un “clon de entrada”, p0443.
 10 Se adquirió el plásmido pDONR201 a Invitrogen, como parte de la tecnología Gateway®.

Ejemplo 2: Construcción del Vector

Se utilizó posteriormente el clon de entrada p0443 en una reacción LR con p3169, un vector de destinación utilizado para transformación de *Oryza sativa*. Este vector contiene como elementos funcionales dentro de los bordes del T-ADN: un marcador seleccionable de una planta; un marcador
 15 cribable de una planta; y un casete Gateway destinado a recombina-*in vivo* con la secuencia de interés ya clonada en el clon de entrada. Se localizó un promotor de beta expansina para expresión en la zona de expansión de los brotes vegetativos (aéreos) secuencia arriba de este casete Gateway.

Después de la etapa de recombina-*LR*, se transformó el vector de expresión resultante (ver Figura 4) en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium* y posteriormente en plantas de *Oryza sativa*.
 20 Se les permitió a las plantas de arroz transformadas crecer y luego fueron examinadas para los parámetros descritos en el Ejemplo 3.

Ejemplo 3: Evaluación y Resultados

Aproximadamente se generaron de 15 a 20 transformantes independientes de arroz T0. Se transfirieron los transformantes primarios desde las cámaras de cultivo de tejidos hasta un invernadero
 25 para crecimiento y cosecha de semillas T1. 5 eventos, de los cuales se retuvo la progenie T1 segregada 3:1 por la presencia/ausencia del transgén. Para cada uno de estos eventos, se seleccionaron aproximadamente 10 plantas de semillero T1 que contenían al transgén (hetero y homocigotos), y aproximadamente 10 plantas de semillero T1 que carecían del transgén (nulicigotos), por medio de monitoreo visual de la expresión del marcador. Se evaluaron adicionalmente los mejores eventos T1
 30 en la generación T2 siguiendo el mismo procedimiento que para la generación T1, pero con más individuos por evento.

Análisis estadístico: prueba t y prueba F

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

3.1 Mediciones de crecimiento vegetativo:

Se transfirieron las plantas T1 seleccionadas (aproximadamente 10 con el transgén y aproximadamente 10 sin el transgén) a un invernadero. Cada planta recibió una etiqueta con un código
 45 de barras único para relacionar sin ambigüedades los datos del fenotipo con la planta correspondiente.

Se cultivaron las plantas T1 seleccionadas sobre tierra en macetas de 10 cm de diámetro bajo las siguientes características ambientales: período de luz = 11,5 h, intensidad de la luz = 30.000 lux o más, temperatura durante el día = 28°C o superior, temperatura durante la noche = 22°C, humedad relativa = 60 - 70%. Se cultivaron las plantas transgénicas y los correspondientes nulicigotos uno al lado del otro en posiciones aleatorias. A partir de la etapa de cultivo hasta la etapa de maduración, se transfirieron varias veces las plantas a través de una cámara digital para toma de imágenes y se las fotografió. Se tomaron cada vez imágenes digitales puntuales (2048 x 1536 pixeles, 16 millones de colores) de cada planta al menos a partir de seis ángulos diferentes. Se derivaron los parámetros descritos más abajo en una forma automatizada a partir de todas las imágenes digitales de todas las plantas, utilizando un software para análisis de imágenes.

3.1.1 Área de la planta por encima del suelo

Se determinó el área de la planta por encima del suelo haciendo un recuento del número total de pixeles de las partes de la planta por encima del suelo discriminadas de las que están por debajo del suelo. Se promedió este valor para las fotografías tomadas al mismo tiempo desde los diferentes ángulos y se los convirtió a un valor físico de superficie expresado en mm cuadrados por medio de calibración. Los experimentos muestran que el área de la planta por encima del suelo medida de esta manera se correlaciona con la biomasa de las partes de la planta por encima del suelo. Los resultados de la evaluación de T1 y T2 se presentan en la Tabla 1 a continuación. Se muestra la diferencia de porcentaje entre plantas transgénicas y los correspondientes nulicigotos. El valor p de la prueba F fue significativo tanto en la evaluación de T1 como de T2 indicando un efecto total de la presencia del transgén sobre el área por encima del suelo.

Tabla 1: Área por encima del suelo

Área por encima del suelo		
	Diferencia en %	Valor P
T1 Total	15	0,001
T2 Total	18	0,0003

3.2 Mediciones de parámetros relacionados con la semilla

Se cosecharon, las panículas primarias maduras, se las empacó en bolsas, marcadas con un código de barras y luego secadas durante tres días en el horno a 37°C. Se trillaron luego las panículas y se recolectaron y contaron todas las semillas. Se separaron las vainas llenas de las vacías utilizando un dispositivo de soplado de aire. Se descartaron las vainas vacías y se contó nuevamente la fracción restante. Se pesaron las vainas llenas sobre una balanza analítica. Este procedimiento produjo el conjunto de parámetros relacionados con las semillas que se describe más adelante.

3.2.1 Número total de semillas

Se midió el número total de semillas por planta contando el número de vainas cosechadas de una planta. En la Tabla 2 a continuación se muestran los resultados de las evaluaciones de T1 y T2. Se muestra la diferencia en porcentaje entre las plantas transgénicas y los correspondientes nulicigotos. El valor p de la prueba F fue significativo tanto en la evaluación de T1 como de T2 indicando que la presencia del transgén tiene un efecto significativo sobre el número total de semillas producidas.

Tabla 2: Número Total de Semillas

Número Total de Semillas		
	Diferencia en %	Valor P
T1 Total	27	0,0039
T2 Total	19	0,0096

3.2.2 Número de semillas llenas

Se determinó el número de semillas llenas contando el número de vainas llenas que quedó después de la etapa de separación. En la Tabla 3 a continuación se muestran los resultados de las evaluaciones de T1 y T2. Se muestra la diferencia en porcentaje entre las plantas transgénicas y los correspondientes nulicigotos. El valor p de la prueba F fue significativo tanto en la evaluación de T1 como de T2 indicando que la presencia del transgén incrementa significativamente el número de semillas llenas producidas.

Tabla 3: Número de Semillas Llenas

Número total de semillas llenas		
	Diferencia en %	Valor P
T1 Total	52	0,0002
T2 Total	35	0,0007

3.2.3 Peso total de la semilla

Se midió el rendimiento total de semillas pesando todas las vainas llenas cosechadas de una planta. En la Tabla 4 a continuación se muestran los resultados de las evaluaciones de T1 y T2. Se muestra la diferencia en porcentaje entre las plantas transgénicas y los correspondientes nulicigotos. El valor p de la prueba F fue significativo tanto en la evaluación de T1 como de T2 indicando que la presencia del transgén incrementa significativamente el peso de las semillas.

Tabla 4: Peso Total de las Semillas

Peso Total de las Semillas		
	Diferencia en %	Valor P
T1 Total	42	0,0017
T2 Total	38	0,0005

3.2.4 Índice de cosecha de las plantas

El índice de cosecha en la presente invención se define como la relación entre el rendimiento total de semillas y el área por encima del suelo (mm^2), multiplicado por un factor 10^6 . En la Tabla 5 a continuación se muestran los resultados de la evaluación de T1 y T2. Se muestra la diferencia en porcentaje entre las plantas transgénicas y los correspondientes nulicigotos. El valor p de la prueba F fue significativo tanto en la evaluación de T1 como de T2 indicando que la presencia del transgén incrementa significativamente el índice de cosecha.

Tabla 5: Índice de Cosecha

Índice de cosecha		
	Diferencia en %	Valor P
T1 Total	28	0,0022
T2 Total	20	0,0086

Ejemplo 4: Datos comparativos de pOleosina::ciclina D3;3

Se produjeron y evaluaron las plantas que contienen la construcción anterior utilizando los mismos procedimientos descritos anteriormente para pBeta-expansina::ciclina D3;3. Los resultados de la evaluación de T1 se muestran en las tablas 6 a 8 a continuación. Se muestra la diferencia en porcentaje entre las plantas transgénicas y los correspondientes nulicigotos en cada una de las tablas. También se muestra el valor p de la prueba F.

Tabla 6: Área por encima del suelo

Área por encima del suelo		
	Diferencia en %	Valor P
T1 Total	-12	0,0083

El valor p de la prueba F fue significativo indicando que la expresión del transgén dirigida por este promotor disminuye significativamente el área por encima del suelo.

5

Tabla 7: Peso Total de la Semilla

Peso Total de la Semilla		
	Diferencia en %	Valor P
T1 Total	-15	0,0858

Los resultados muestran que el peso total de las semillas de las plantas transgénicas fue menor que el peso total de las semillas de los correspondientes nulicigotos.

Tabla 8: Número de Semillas Llenas

Número de Semillas Llenas		
	Diferencia en %	Valor P
T1 Total	-17	0,0572

Los resultados muestran que el número de semillas llenas de las plantas transgénicas fue menor que el número semillas llenas de los correspondientes nulicigotos.

10

Ejemplo 5: Expresión de GUS dirigida por el promotor de beta expansina

Se clonó el promotor de beta-expansina en el plásmido de entrada pDONR201 del sistema Gateway™ (Life Technologies) utilizando la "reacción de recombinación BP". La identidad y la composición de pares de bases del inserto clonado se confirmaron por medio de secuenciación y adicionalmente, se analizó el plásmido resultante a través de digestiones de restricción.

15

Con el propósito de clonar al promotor en frente de un gen reportero, se utilizó posteriormente cada clon de entrada en una "reacción de recombinación LR " (Gateway™) con un vector de destinación. Este vector de destinación fue diseñado para enlazar operativamente al promotor con el gen beta-glucuronidasa (GUS) de *Escherichia coli* a través de la sustitución del casete de recombinación Gateway en frente del gen GUS. Los vectores reporteros resultantes, que incluyen al promotor operativamente enlazado con GUS son posteriormente transformados en la cepa LBA4044 de *Agrobacterium* y posteriormente en pantas de arroz utilizando técnicas estándar de transformación.

20

Se generaron plantas transgénicas de arroz a partir de células transformadas. El crecimiento de la planta se llevó a cabo bajo condiciones normales.

25

Las plantas o partes de las plantas que iban a ser analizadas fueron cubiertas con acetona fría sobre hielo al 90% y se incubó durante 30 min a 4 °C. Después de 3 lavadas de 5 min con amortiguador Tris [15,76 g de Trizma HCl (Sigma T3253) + 2.922 g de NaCl en 1 litro de agua bidestilada, ajustado a pH 7,0 con NaOH], se cubrió el material por medio de una solución de Tris/ferricianato/X-Gluc [9,8 ml de amortiguador Tris + 0,2 ml de patrón de ferricianato (0,33 g de ferricianato de potasio (Sigma P3667) en 10 ml de amortiguador Tris)+ 0,2 ml de patrón de X-Gluc (26,1 mg de X-Gluc (Europa Bioproducts ML 113A) en 500 µl de DMSO)]. Se aplicó una infiltración al vacío durante 15 a 30 minutos. Las plantas o partes de las plantas fueron incubadas hasta por 16 horas a 37 °C hasta que se hizo visible el desarrollo de color azul. Se lavaron las muestras 3 veces

30

durante 5 minutos con amortiguador Tris. Se extrajo la clorofila en series de etanol al 50%, 70% y 90% (cada vez durante 30 minutos).

LISTADO DE SECUENCIA

- <110> CropDesign N.V.
 - 5 <120> Plantas que tienen un mayor rendimiento de semillas y método para lograrlo
 - <130> CD-111-PCT
 - <150> EP 04100991.1
 - <151> 2004-03-10
 - <150> US 60/553.418
 - 10 <151> 2004-03-16
 - <160> 5
 - <170> PatentIn versión 3.3
 - <210> 1
 - <211> 1086
 - 15 <212> ADN
 - <213> Arabidopsis thaliana
 - <400> 1
- ```

atggccttag aagaggagga agagagtcaa aacgcaccgt tttgtgttct tgatggtctt 60
ttctgtgagg aagagagtga gtttcacgaa caagtagatt tgtgcgacga gagtgttgaa 120
aagtttcctt ttttaaactc gggtttctct gatcatgata tgttgtggga tgatgatgag 180
ttatcaactt tgatttcgaa acaagaaccg tgtctttatg acgaaatctt agatgatgag 240
tttctggttt tgtgtcgtga aaaggctctt gattggattt ttaaagtgaa atctcattat 300
gggtttaaatt cattgacggc tcttttagct gtttaattact tcgatagggt tattacaagc 360
aggaagtttc agacagataa gccatggatg tctcagctta ctgctttggc ttgtctgtct 420
ttagctgcta aggttgaaga gatccgtgtt ccttttctct tagattttca agtggaaagaa 480
gcaagatag tctttgaagc taagactata cagagaatgg agcttcttgt tctgtctact 540
cttgactgga ggatgcatcc tgtgactcca atctcgtttt tcgatcacat tattcgacga 600
tacagcttta aatctcatca tcaattggag ttcttgagta gatgtgaatc tttattactc 660
tccattattc ctgattcgag atttctgagt tttagtcctt ctgtgttagc cactgcaata 720
atggtctctg ttattagaga tttgaagatg tgtgacgaaag ctgtatacca atctcagctc 780
atgactctac tcaaagttga ttcggagaag gtaaataaat gctatgagtt agtgtagac 840
cacagtccaa gcaagaaaag gatgatgaat tggatgcaac aaccgctag tccgatcggg 900
gtgtttgatg cgtcattcag ttctgatagc tcgaatgagt cgtgggttgt gtctgcttct 960
gcttcagtggt cgtcttcacc atcttcagag cctttgctca agaggagaag agtgcaagag 1020
cagcagatga ggctatcttc aataaaccca atgtttttcg atgtgcttag tagtagtctc 1080
cgctaa 1086

```

- 20 <210> 2
- <211> 361
- <212> PRT
- <213> Arabidopsis thaliana
- 25 <400> 2

```

Met Ala Leu Glu Glu Glu Glu Ser Gln Asn Ala Pro Phe Cys Val
1 5 10 15

Leu Asp Gly Leu Phe Cys Glu Glu Glu Ser Glu Phe His Glu Gln Val
 20 25 30

Asp Leu Cys Asp Glu Ser Val Glu Lys Phe Pro Phe Leu Asn Leu Gly
 35 40 45

```

25

Leu Ser Asp His Asp Met Leu Trp Asp Asp Asp Glu Leu Ser Thr Leu  
 50 55 60  
 Ile Ser Lys Gln Glu Pro Cys Leu Tyr Asp Glu Ile Leu Asp Asp Glu  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Val Leu Cys Arg Glu Lys Ala Leu Asp Trp Ile Phe Lys Val  
 85 90 95  
 Lys Ser His Tyr Gly Phe Asn Ser Leu Thr Ala Leu Leu Ala Val Asn  
 100 105 110  
 Tyr Phe Asp Arg Phe Ile Thr Ser Arg Lys Phe Gln Thr Asp Lys Pro  
 115 120 125  
 Trp Met Ser Gln Leu Thr Ala Leu Ala Cys Leu Ser Leu Ala Ala Lys  
 130 135 140  
 Val Glu Glu Ile Arg Val Pro Phe Leu Leu Asp Phe Gln Val Glu Glu  
 145 150 155 160  
 Ala Arg Tyr Val Phe Glu Ala Lys Thr Ile Gln Arg Met Glu Leu Leu  
 165 170 175  
 Val Leu Ser Thr Leu Asp Trp Arg Met His Pro Val Thr Pro Ile Ser  
 180 185 190  
 Phe Phe Asp His Ile Ile Arg Arg Tyr Ser Phe Lys Ser His His Gln  
 195 200 205  
 Leu Glu Phe Leu Ser Arg Cys Glu Ser Leu Leu Leu Ser Ile Ile Pro  
 210 215 220  
 Asp Ser Arg Phe Leu Ser Phe Ser Pro Ser Val Leu Ala Thr Ala Ile  
 225 230 235 240  
 Met Val Ser Val Ile Arg Asp Leu Lys Met Cys Asp Glu Ala Val Tyr  
 245 250 255  
 Gln Ser Gln Leu Met Thr Leu Leu Lys Val Asp Ser Glu Lys Val Asn  
 260 265 270  
 Lys Cys Tyr Glu Leu Val Leu Asp His Ser Pro Ser Lys Lys Arg Met  
 275 280 285  
 Met Asn Trp Met Gln Gln Pro Ala Ser Pro Ile Gly Val Phe Asp Ala  
 290 295 300  
 Ser Phe Ser Ser Asp Ser Ser Asn Glu Ser Trp Val Val Ser Ala Ser  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Val Ser Ser Ser Pro Ser Ser Glu Pro Leu Leu Lys Arg Arg  
 325 330 335  
 Arg Val Gln Glu Gln Gln Met Arg Leu Ser Ser Ile Asn Arg Met Phe  
 340 345 350  
 Phe Asp Val Leu Ser Ser Ser Pro Arg  
 355 360

- <210> 3
- <211> 1243
- <212> ADN
- <213> Oryza sativa
- 5 <400> 3

```

aaaaccaccg agggacctga tctgcaccgg ttttgatagt tgagggaccc gttgtgtctg 60
gttttccgat cgagggacga aaatcggatt cggtgtaaag ttaagggacc tcagatgaac 120
ttattccgga gcatgattgg gaagggagga cataaggccc atgtcgcgat tgtttggacg 180
gtccagatct ccagatcact cagcaggatc ggccgcggtc gcgtagcacc cgcggtttga 240
ttcggcttcc cgcaaggcgg cggccggtgg ccgtgccgcc gtagcttccg ccggaagcga 300
gcacgccgcc gccgccgacc cggctctgcg tttgcaccgc ctgacgcgcy atacatcggg 360
atagatagct actactctct ccgtttcaca atgtaaatca ttctactatt ttccacattc 420
atattgatgt taatgaatat agacatata atctatttag attcattaac atcaatatga 480
atgtaggaaa tgctagaatg acttacattg tgaattgtga aatggacgaa gtacctacga 540
tggatggatg caggatcatg aaagaattaa tgcaagatcg tatctgccgc atgcaaaatc 600
ttactaattg cgctgcatat atgcatgaca gcctgcatgc gggcgtgtaa gcgtgttcat 660
ccattaggaa gtaaccttgt cattacttat accagtacta catactatat agtattgatt 720
tcatgagcaa atctacaaaa ctggaagca ataaggaata cgggactgga aaagactcaa 780
cattaatcac caaatatttc gccttctcca gcagaatata tatctctcca tcttgatcac 840
tgtacacact gacagtgtac gcataaacgc agcagccagc ttaactgtcg tctcaccgtc 900
gcacactggc cttccatctc aggctagctt tctcagccac ccatcgtaca tgtcaactcg 960
gcgcgcgcac aggcacaaat tacgtacaaa acgcatgacc aaatcaaaac caccggagaa 1020
gaatcgctcc cgcgcgcggc ggccgcgcgc acgtacgaat gcacgcacgc acgccaacc 1080
ccacgacacg atcgcgcgcg acgccggcga caccggccat ccaccgcgcg cctcacctcg 1140
ccgactataa atacgtaggc atctgcttga tcttgtcatc catctcacca ccaaaaaaaaa 1200
aggaaaaaaa acaaaaaaac accaaagccaa ataaaagcga caa

```

- <210> 4
- 10 <211> 54
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> iniciador prm0360

15 <400> 4  
ggggacaagt ttgtacaaa aagcaggctt cacaatggct ttagaagagg agga 54

- <210> 5
- <211> 51
- <212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> iniciador prm0361

<400> 5  
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt tagcgaggac tactataagc a 51

25

30

**Reivindicaciones**

1. Método para incrementar el rendimiento de semillas en una planta, que comprende la introducción en una planta de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 bajo el control de un promotor capaz de expresar preferencialmente a dicho ácido nucleico en la zona de expansión celular de un brote.
2. Método de acuerdo a la reivindicación 1, en donde dicho mayor rendimiento de semillas se selecciona del grupo que consiste de (i) mayor biomasa de las semillas; (ii) mayor número de semillas (llenas); (iii) mayor tamaño de las semillas; (iv) mayor volumen de las semillas; (v) mayor índice de cosecha; y (vi) mayor peso de mil granos.
3. Método de acuerdo a la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho ácido nucleico que codifica una ciclina D3 es obtenido de una planta.
4. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha ciclina D3 incluye uno o más y preferiblemente todo de lo siguiente: (i) una caja de ciclina; (ii) un motivo LxCxE más o menos dentro de los primeros 40 aminoácidos; y (iii) una o más y preferiblemente todas las regiones conservadas identificadas por las cajas mostradas en la Figura 2 (se permite una falta de coincidencia dentro de las cajas).
5. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha ciclina D3 es codificada por cualquiera de los ácidos nucleico enlistados en la Tabla 1.
6. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha ciclina D3 es un homólogo que tiene en orden creciente de preferencia al menos 80%, 85%, 90%, 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos como la representada por la SEQ ID NO: 2.
7. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha ciclina D3 es como la representada por la SEQ ID NO: 2.
8. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende la introducción en una planta de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3, cuyo ácido nucleico se selecciona de:
  - (i) porciones de un ácido nucleico que codifican una ciclina D3;
  - (ii) variantes alternativas de empalme de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3;
  - y
  - (iii) variantes alélicas de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3; yen donde dichas porciones, las variantes alternativas de empalme, y las variantes alélicas de un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 son capaces de enlazarse y activar una CDK de una planta.
9. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho promotor capaz de expresar preferencialmente a dicho ácido nucleico en la zona de expansión celular de un brote tiene un perfil comparable de expresión con un promotor de beta-expansina.
10. Método para la producción de una planta transgénica que tiene mayor rendimiento de semilla con relación a las correspondientes plantas de tipo silvestre, cuyo método comprende:
  - (i) introducir en una planta o célula de una planta un ácido nucleico que codifica una ciclina D3, preferiblemente un ácido nucleico que codifica una ciclina D3 como el representado por la SEQ ID NO: 1, cuyo ácido nucleico codifica un polipéptido ciclina D3, cuyo polipéptido es preferiblemente como el representado por la SEQ ID NO: 2 y cuyo ácido nucleico está operativamente enlazado a un promotor capaz de expresar preferencialmente a dicho ácido nucleico en la zona de expansión celular de

un brote;

(ii) cultivar la célula de la planta bajo condiciones que promuevan la regeneración y crecimiento de una planta madura.

5 **11.** Método de acuerdo a la reivindicación 10, en donde dicho mayor rendimiento de semillas se selecciona de uno o más de lo siguiente: (i) mayor biomasa de las semillas; (ii) mayor número de semillas (llenas); (iii) mayor tamaño de las semillas; (iv) mayor volumen de las semillas; (v) mayor índice de cosecha; y (vi) mayor peso de mil granos.

10 **12.** El uso de un ácido nucleico aislado que codifica una ciclina D3 operativamente enlazado a un promotor capaz de expresar preferencialmente a dicho ácido nucleico en la zona de expansión celular de un brote, en el incremento del rendimiento de semilla.

**13.** El uso de acuerdo a la reivindicación 12, en donde dicho rendimiento de semilla incluye a uno o más de: (i) mayor biomasa de las semillas; (ii) mayor número de semillas (llenas); (iii) mayor tamaño de las semillas; (iv) mayor volumen de las semillas; (v) mayor índice de cosecha; y (vi) mayor peso de mil granos.

15 **14.** El uso de acuerdo a la reivindicación 12 ó 13, en donde dicho ácido nucleico que codifica una ciclina D3 es un ácido nucleico como el representado por la SEQ ID NO: 1, o en donde dicha ciclina D3 es un aminoácido como el representado por la SEQ ID NO: 2.

20

25

30

35

40

45

“Siguen 11 páginas de dibujos”

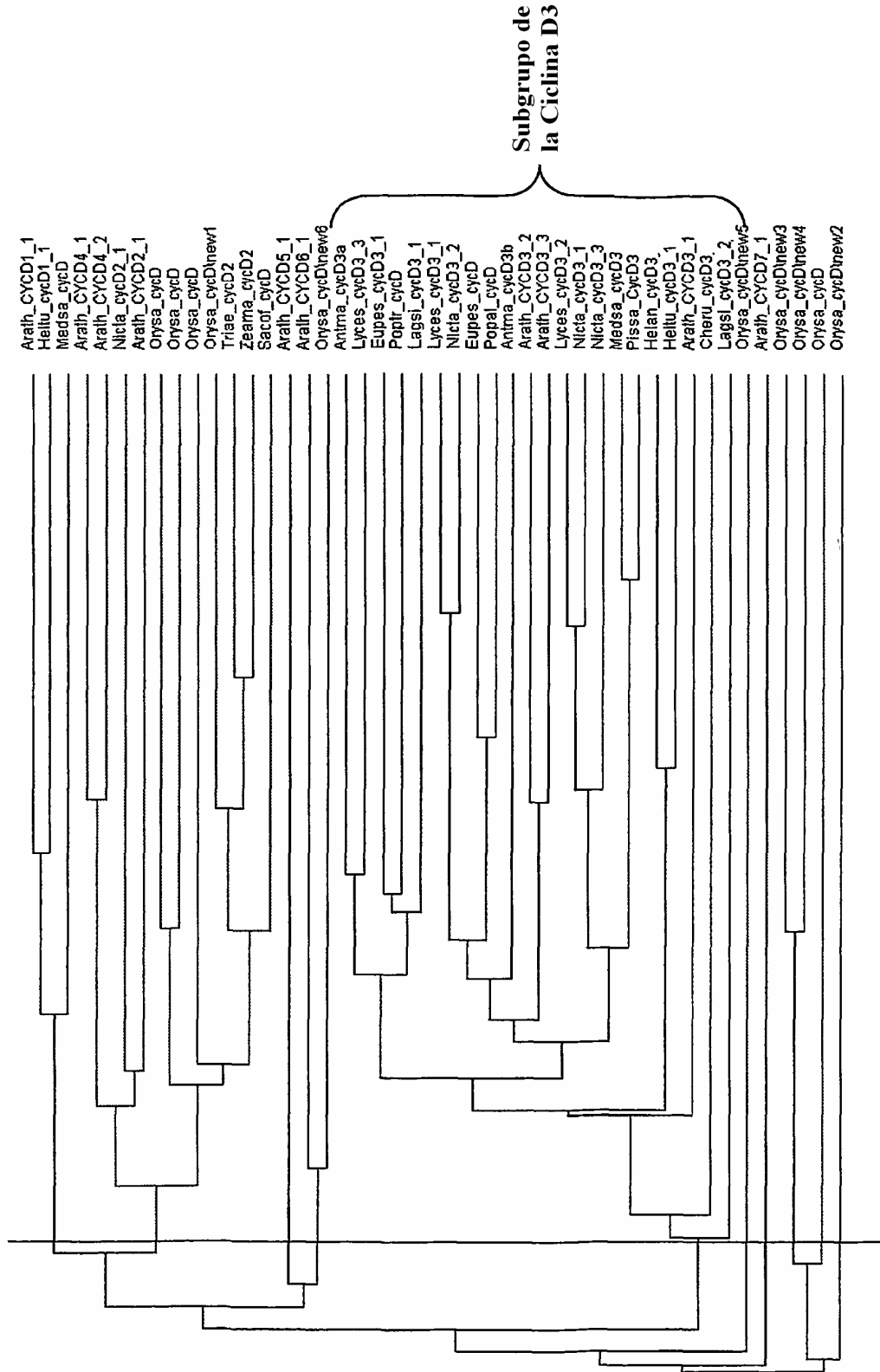


FIGURA 1







caja relacionada con CycD3

|                         |       |                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Antma_cycD3a            | (226) | ...CIGVQDQ...INIGIN...D...EL...C...Q...ATSVHFQSG...                                                                                             | 400 |
| Antma_cycD3b            | (240) | ...CDAREQNEVTVRIS...TDD...Y...TEVINNQSVIILGH...                                                                                                 |     |
| Arath_CYCD3_1           | (226) | ...FDLISQTNLIGL...NIT...K...D...LCLVDRICLQIQIOSS...                                                                                             |     |
| Arath_CYCD3_2           | (235) | ...CDEYFQSO...T...TK...NO...NE...E...L...H...N...F...                                                                                           |     |
| Arath_CYCD3_3           | (225) | ...CDEAVQSO...T...H...R...D...S...N...K...E...L...P...H...S...                                                                                  |     |
| Como Eupes_cycD3        | (221) | ...F...S...O...M...O...L...D...M...K...N...L...N...C...L...S...G...Q...D...Q...                                                                 |     |
| Heitu_cycD3:1           | (232) | ...P...N...C...D...K...S...O...L...D...I...K...T...I...B...D...I...N...E...                                                                     |     |
| Medea_cycD3             | (249) | ...D...N...G...V...D...K...N...Q...L...N...K...S...D...E...N...A...L...H...T...N...A...N...Y...G...                                             |     |
| Nicta_cycD3:1           | (242) | ...C...N...S...V...D...Q...N...O...L...G...I...K...N...N...N...E...F...S...V...C...S...K...P...I...S...                                         |     |
| Nicta_cycD3:3           | (227) | ...C...N...A...D...Q...N...O...L...E...V...N...S...N...D...E...T...V...S...N...S...I...S...                                                     |     |
| Pissa_cycD3             | (244) | ...D...N...G...V...D...K...N...Q...L...S...I...K...N...D...E...N...A...L...V...T...N...E...N...N...Y...G...                                     |     |
| Popal_cycD3             | (237) | ...R...N...O...I...Q...T...O...V...A...K...T...E...D...E...N...E...F...I...L...O...P...S...Q...N...O...R...                                     |     |
| Cheru_cycD3             | (230) | ...W...S...I...E...H...O...N...D...M...N...T...K...T...V...E...D...N...E...F...O...V...S...N...E...K...                                         |     |
| Eupes_cycD3:1           | (223) | ...S...L...G...D...E...Y...T...O...G...I...C...I...D...N...E...B...E...I...L...G...S...R...Y...G...N...Q...S...                                 |     |
| Helan_cycD3             | (215) | ...T...N...S...I...G...Y...K...S...O...L...D...I...K...T...R...H...N...E...K...M...L...S...Y...D...                                             |     |
| Lagsi_cycD3:1           | (224) | ...T...L...S...V...E...Q...S...O...L...N...I...C...I...D...G...I...E...C...K...S...N...A...R...R...N...G...H...O...F...K...                     |     |
| Lagsi_cycD3:2           | (240) | ...N...P...L...E...E...Q...D...I...N...A...K...I...N...G...V...E...C...K...M...A...K...I...K...G...S...                                         |     |
| Lyces_cycD3:1           | (229) | ...S...N...A...R...E...Q...N...O...V...S...T...R...Y...F...I...P...E...E...D...I...L...M...D...T...A...C...Y...K...L...C...Q...S...             |     |
| Lyces_cycD3:2           | (237) | ...C...N...A...D...Q...N...O...L...G...I...K...N...N...N...E...F...S...V...S...K...P...I...T...S...                                             |     |
| Lyces_cycD3:3           | (221) | ...C...I...G...K...Q...D...L...G...I...G...V...L...E...G...R...O...V...A...G...N...I...D...F...G...S...                                         |     |
| Nicta_cycD3:2           | (230) | ...C...N...A...E...Q...N...O...V...T...K...I...K...O...B...F...E...E...D...L...L...M...G...T...S...G...N...I...C...O...S...                     |     |
| Orysa_cycD3             | (219) | ...G...G...D...D...A...E...L...A...I...D...A...E...D...E...M...A...N...I...S...E...A...A...A...A...G...G...I...V...G...E...                     |     |
| Podtr_cycD3             | (242) | ...S...I...A...R...E...Y...K...S...O...L...S...I...G...I...D...I...D...E...L...S...K...E...L...S...F...A...L...D...H...E...K...I...A...S...     |     |
| Arath_CYCD1_1           | (221) | ...S...V...N...P...H...E...S...P...E...T...M...C...D...G...E...S...S...V...N...P...H...E...S...P...E...T...M...C...D...G...E...S...             |     |
| Arath_CYCD2_1           | (234) | ...E...C...D...E...K...A...S...S...I...Y...V...I...O...K...A...L...A...R...K...A...L...T...G...E...E...N...                                     |     |
| Arath_CYCD4_1           | (218) | ...V...H...E...D...N...S...F...S...P...L...E...S...L...O...K...I...G...E...E...S...D...G...                                                     |     |
| Arath_CYCD4_2           | (209) | ...E...H...E...D...K...S...F...S...S...F...S...S...E...L...V...E...V...K...S...I...L...O...K...                                                 |     |
| Arath_CYCD5_1           | (214) | ...I...Q...F...P...C...S...N...R...N...O...C...T...Y...N...D...E...M...A...E...K...A...Q...R...D...I...V...G...                                 |     |
| Arath_CYCD6_1           | (197) | ...K...V...C...R...E...S...I...N...L...F...E...O...N...H...I...V...I...V...D...G...M...K...N...R...D...I...D...H...Q...                         |     |
| Heitu_cycD1:1           | (212) | ...L...I...N...A...D...H...-...A...E...S...W...C...D...G...E...S...S...I...K...A...Q...S...P...K...I...                                         |     |
| Nicta_cycD2:1           | (235) | ...K...D...I...D...K...A...M...P...-...C...F...T...H...I...D...G...T...O...V...E...L...Q...D...U...T...                                         |     |
| Orysa_cycD5:como la 3   | (233) | ...N...L...D...E...L...K...S...V...G...S...L...W...Q...E...D...T...G...H...M...S...N...K...M...I...Q...E...D...R...                             |     |
| Trisea_cycD2            | (239) | ...R...S...S...V...E...R...A...-...A...S...S...C...R...Y...D...I...L...R...H...E...N...O...                                                     |     |
| Zeama_cycD2             | (241) | ...R...S...S...V...E...R...A...-...A...S...S...C...R...Y...D...I...L...R...H...E...N...O...                                                     |     |
| Medea_cycD1             | (229) | ...F...V...N...P...E...H...-...F...V...N...P...E...H...-...F...V...N...P...E...H...-...F...V...N...P...E...H...                                 |     |
| Orysa_cycD2/4 como la 4 | (242) | ...A...A...E...S...H...N...-...A...A...E...S...H...N...-...A...A...E...S...H...N...-...A...A...E...S...H...N...                                 |     |
| Orysa_cycD2/4 como la 1 | (249) | ...T...G...V...E...E...D...I...-...A...E...A...T...H...L...G...L...Q...E...A...Q...B...H...Y...S...M...A...T...I...N...V...Q...P...A...S...T... |     |
| Orysa_cycD2/4 como la 2 | (234) | ...F...N...S...A...I...G...E...S...-...E...E...F...V...N...-...A...T...E...N...F...V...L...V...K...I...R...                                     |     |
| Orysa_cycD2/4 como la 3 | (229) | ...V...S...I...D...H...G...T...I...V...S...P...R...C...I...D...E...N...I...L...R...O...D...I...S...                                             |     |
| Orysa_cycD1             | (222) | ...E...A...L...E...S...K...M...S...G...S...P...S...P...I...D...L...I...F...A...S...A...L...L...S...Q...P...T...                                 |     |
| Orysa_cycD5 como la 1   | (250) | ...E...A...L...E...S...K...M...S...G...S...P...S...P...I...D...L...I...F...A...S...A...L...L...S...Q...P...T...                                 |     |
| Orysa_cycD5 como la 2   | (200) | ...A...H...I...G...E...A...G...A...A...C...P...F...I...N...S...I...Q...R...E...G...V...A...A...A...C...G...V...                                 |     |
| Orysa_cycD6             | (246) | ...D...S...S...V...L...E...V...-...A...T...C...R...E...L...I...C...E...M...Q...                                                                 |     |
| Sacof_cycD2/4 como      | (301) | ...V...Y...L...V...L...I...K...E...R...V...C...Y...L...I...E...                                                                                 |     |
| Consenso                |       |                                                                                                                                                 |     |

FIGURA 2 (continuación)



|                   | IDENTIDAD |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                   | 1         | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   |
| blosum60          | 1         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 1. Antma_cycD3a   | 50.5      | 42.5 | 42.9 | 46   | 49   | 44.7 | 47.6 | 49.2 | 46.7 | 46.9 | 48.9 | 39.3 | 52.1 | 40.6 | 53.2 | 40.3 | 48.6 | 49.5 | 57.7 | 46.4 | 56.2 |      |
| 2. Antma_cycD3b   | 68.4      |      | 43   | 44.3 | 45.7 | 51.6 | 41.1 | 46.9 | 48.6 | 46.4 | 46.5 | 52.5 | 38.9 | 43.7 | 36.7 | 45.4 | 38.7 | 55.2 | 47.3 | 44.7 | 55.5 | 49.1 |
| 3. Araith_CYCD3_1 | 59.8      | 62.2 |      | 46.5 | 44.2 | 47.6 | 44.1 | 50.5 | 51.3 | 52.2 | 48.5 | 47.7 | 35.1 | 42.7 | 40.2 | 41.9 | 37.9 | 46.4 | 50   | 43.7 | 44.6 | 46.3 |
| 4. Araith_CYCD3_2 | 59.1      | 65.4 | 65.7 | 67.9 | 54.4 | 44.1 | 44.1 | 49.7 | 50.7 | 43.3 | 54.6 | 36.4 | 41.6 | 38.9 | 42.9 | 33.9 | 50   | 48.3 | 40.6 | 51.6 | 43.2 |      |
| 5. Araith_CYCD3_3 | 63.2      | 67   | 63   | 80.1 |      | 52.9 | 41.8 | 43.6 | 48.4 | 51.5 | 43.3 | 52   | 36.3 | 44.7 | 36   | 45.7 | 36   | 46.4 | 47   | 43   | 47.6 | 43.9 |
| 6. Eupes_cycD     | 67.6      | 69   | 64.4 | 72.5 | 72   |      | 48.5 | 51.2 | 55.2 | 55.8 | 49.4 | 70.1 | 38.1 | 47.1 | 42.5 | 49.3 | 39.7 | 55.6 | 55.1 | 45   | 56   | 48.2 |
| 7. Heltu_cycD3;1  | 62.7      | 61.2 | 65.2 | 65.7 | 62.3 | 70.6 |      | 48.6 | 51.2 | 53.1 | 46.8 | 46.6 | 33.8 | 42.2 | 67.4 | 45.8 | 41   | 44.7 | 52.3 | 41.6 | 43.7 | 45.9 |
| 8. Medsa_cycD3    | 64.8      | 64   | 67.4 | 63.5 | 63.7 | 68.1 | 66.3 |      | 60.7 | 56.1 | 85.4 | 53.4 | 38.2 | 50   | 42.1 | 49.6 | 40.6 | 48.5 | 57.8 | 47.1 | 47.7 | 51.3 |
| 9. Nicta_cycD3;1  | 64.1      | 68.1 | 69.7 | 70   | 67.6 | 72.7 | 68.1 | 72.5 |      | 69.6 | 57.3 | 57.7 | 38.9 | 48.1 | 43.1 | 47.1 | 40.8 | 50.3 | 79.5 | 47.4 | 50   | 51.7 |
| 10. Nicta_cycD3;3 | 64.7      | 67.4 | 71.8 | 71.2 | 69.8 | 74.7 | 71.2 | 71.8 | 84.2 |      | 55.7 | 57.5 | 38.8 | 47.3 | 43.4 | 49.3 | 39.1 | 49.6 | 68.4 | 47.3 | 51.2 | 51.4 |
| 11. Pissa_CycD3   | 61.7      | 62.8 | 67.4 | 61.2 | 61.7 | 66.9 | 64.3 | 91.7 | 72.7 | 72.1 | 53.1 | 36   | 49   | 39.7 | 48.8 | 40.9 | 46.9 | 54.8 | 47.8 | 48.2 | 51.3 |      |
| 12. Popal_cycD    | 65        | 70.9 | 66.5 | 71.7 | 72.2 | 80.1 | 64.4 | 67.1 | 73.2 | 73.9 | 66.9 |      | 39.9 | 49.7 | 38.7 | 52.5 | 38.8 | 56.1 | 55.9 | 45.5 | 56.4 | 50.4 |
| 13. Cheru_cycD3   | 60.6      | 60.1 | 56.9 | 55   | 59   | 58.9 | 55.7 | 54.4 | 58.4 | 55.4 | 55.5 | 59.6 |      | 37.2 | 33.7 | 36.7 | 32   | 38.1 | 39.6 | 37.2 | 36.2 | 36.9 |
| 14. Eupes_cycD3;1 | 72.6      | 63.4 | 63.8 | 63.5 | 63.7 | 66.5 | 65.5 | 64.8 | 66.2 | 67.1 | 64.6 | 64.7 | 59.1 |      | 38.5 | 56.9 | 38.3 | 46.8 | 48.6 | 49.7 | 45.1 | 56.9 |
| 15. Helan_cycD3   | 58.6      | 55.7 | 57.4 | 55.9 | 53.2 | 62.3 | 75.6 | 59.3 | 60.3 | 61.4 | 58.6 | 56.9 | 54.8 | 58.9 |      | 40.5 | 36.9 | 39.4 | 45.4 | 39.4 | 39.3 | 41.6 |
| 16. Lagsi_cycD3;1 | 69.9      | 64.3 | 61.7 | 61.9 | 62.6 | 66.2 | 66.1 | 64   | 65.1 | 66.6 | 63.5 | 65.5 | 56   | 74.1 | 59.4 |      | 40.6 | 49.7 | 49.2 | 48   | 48.1 | 53.6 |
| 17. Lagsi_cycD3;2 | 60        | 57.4 | 59.2 | 54.5 | 56.8 | 59.7 | 60.3 | 60.9 | 63.4 | 58.9 | 60.7 | 58.7 | 51.3 | 60.3 | 53.4 | 57.9 |      | 37.5 | 41.8 | 39.9 | 38.2 | 39.9 |
| 18. Lyces_cycD3;1 | 66.6      | 72.3 | 65.2 | 70   | 67.9 | 73.3 | 65.5 | 67.1 | 67.8 | 70.4 | 65.9 | 72.8 | 55.7 | 65.5 | 56.8 | 68   | 60.3 |      | 49.5 | 44.7 | 81.9 | 50.4 |
| 19. Lyces_cycD3;2 | 64.6      | 65.9 | 66   | 69.8 | 67.3 | 72.5 | 70.1 | 69.9 | 87.4 | 81   | 68.5 | 70.6 | 58.5 | 67   | 61.8 | 67   | 61.3 | 69   | 45.3 | 50.7 | 50.3 |      |
| 20. Lyces_cycD3;3 | 71.1      | 63.2 | 60.9 | 58   | 60.9 | 63.4 | 58.5 | 61.7 | 62.7 | 63   | 62.5 | 61.7 | 54.2 | 68   | 56   | 65.6 | 57.6 | 64.6 | 59.9 | 42.9 | 52.8 |      |
| 21. Nicta_cycD3;2 | 63.5      | 73   | 65.7 | 71.9 | 68.4 | 72.8 | 65.4 | 66.6 | 69.2 | 72.8 | 66.9 | 72.2 | 54.2 | 64.3 | 56.1 | 65.1 | 60.3 | 88.6 | 69.2 | 62.4 | 49.7 |      |
| 22. Poptr_cycD    | 69.1      | 67.6 | 68.6 | 64.1 | 62.5 | 66.8 | 64.4 | 69.7 | 70.7 | 70.7 | 69.3 | 68.4 | 56.4 | 75   | 58.2 | 71.3 | 63.4 | 67.6 | 67.6 | 67.6 | 67.6 |      |

SIMILITUD

FIGURA 3

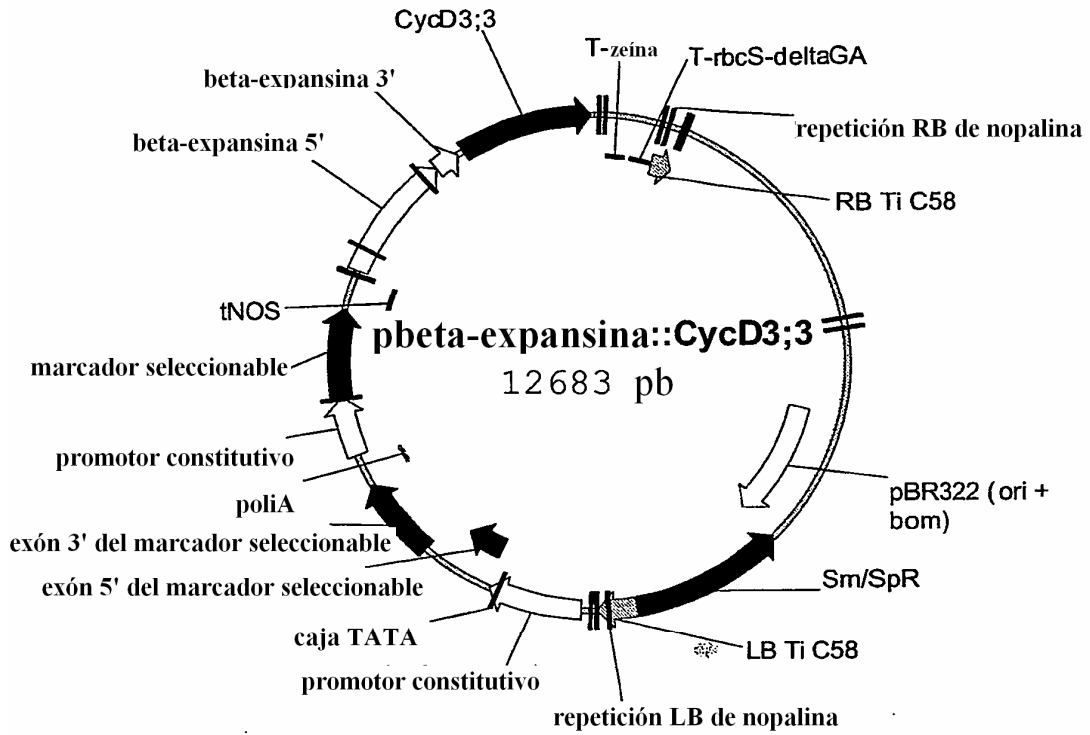
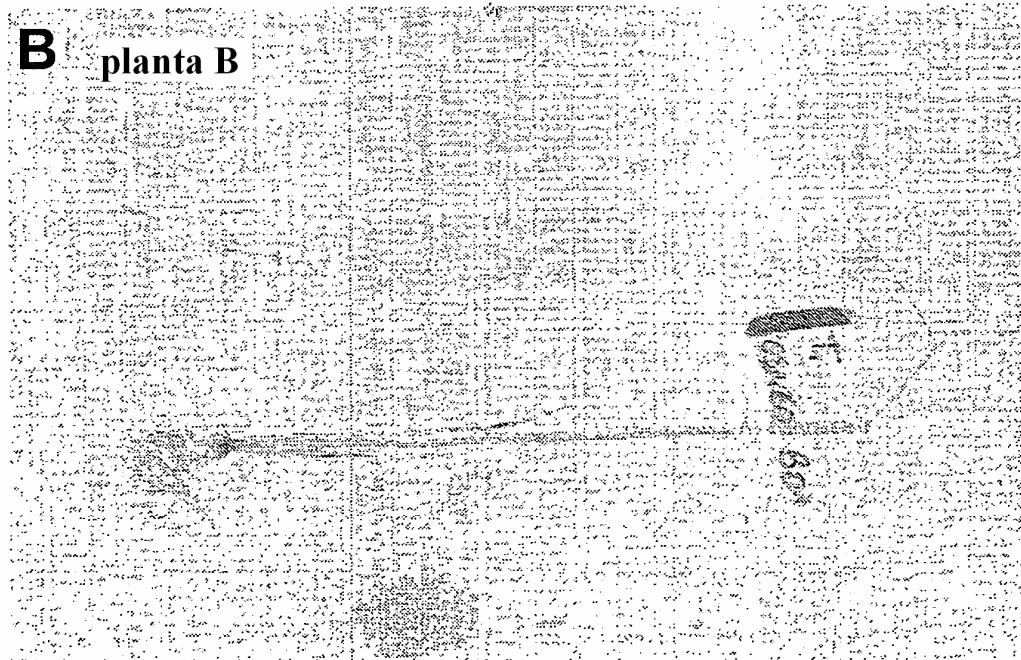
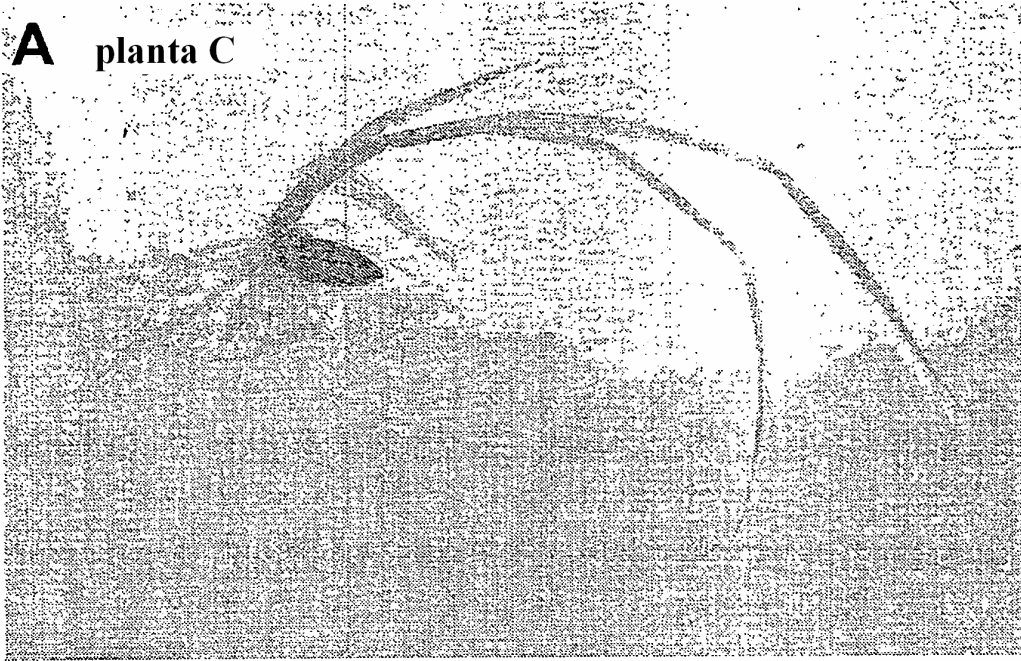


FIGURA 4



**FIGURA 5**

**SEQ ID NO: 1 ADNc de ciclina D3;3**

atggctttagaagaggaggaagagagtcaaaaacgcaccgttttgtgttcttgatggctct  
 tttctgtgaggaagagagtgagtttcacgaacaagtagatttggtgacgagagtggtg  
 aaaagtttccttttttaaatctgggtttgtctgatcatgatatggtgtgggatgatgat  
 gagttatcaactttgatttcgaaacaagaaccgtgtctttatgacgaaatcttagatga  
 tgagtttctggtttgtgtcgtgaaaaggctcttgattggatttttaagtgaaatctc  
 attatgggtttaattcattgacggctcttttagctgttaattacttcgataggtttatt  
 acaagcaggaagtttcagacagataagccatggatgtctcagcttactgctttggcttg  
 tctgtcttttagctgctaaggttgaagagatccgtgttctctttctcttagattttcaag  
 tggagaagcaagatatgtctttgaagctaagactatacagagaatggagcttcttggt  
 ctgtctactcttgactggaggatgcatcctgtgactccaatctcgtttttcgatcacat  
 tattcgacgatacagctttaaatctcatcatcaattggagttcttgagttagatgtgaat  
 ctttattactctccattattcctgattcgagatttctgagttttagtcttctgtgta  
 gccactgcaataatgggtctctgttattagagatttgaagatgtgtgacgaagctgata  
 ccaatctcagctcatgactctactcaaagttgatccggagaaggtaataaatgctatg  
 agttagtgttagaccacagtccaagcaagaaaaggatgatgaattggatgcaacaacc  
 gctagtccgatcgggtgtgtttgatgctcattcagttctgatagctcgaatgagtcgtg  
 ggttgtgtctgcttctgcttcagtgctcgtcttcacatcttcagagcctttgctcaaga  
 ggagaagagtgcaagagcagcagatgaggctatcttcaataaaccgaatgtttttcgat  
 gtgcttagtagtagtctcctcgtaa

**SEQ ID NO: 2 proteína ciclina D3;3**

MALEEEEEESQNAPFCVLDGLFCEEESEFHEQVDLpCDESVEKFPFLNLGLSDHDMLWDDD  
 ELSTLISKQEPCLYDEILDDEFLLVLCREKALDWIFKVKSHYGFNSLTALLAVNYFDRFI  
 TSRKFQTDKPWMSQLTALACLSLAAKVEEIRVPFLDFQVEEARYVFEAKTIQRMELLV  
 LSTLDWRMHPVTPISFFDHIIRRYSFKSHHQLEFLSRCELLLLSIIPDSRFLSFSPSVL  
 ATAIMVSVIRDLKMCDEAVYQSQLMTLLKVDSEKVNKCYELVLDHSPSKKRMMNWMQQP  
 ASPIGVFDASFSSDSSNESWVVSASASVSSSPSSEPLLKRRRVQEQMRLSSINRMFFD  
 VLSSSPR

**FIGURA 6**

**SEQ ID NO 3: promotor de beta-expansina de *Oryza sativa***

aaaaccaccgagggacctgatctgcaccgggttttgatagttgagggaccggttgtgtct  
 ggttttccgatcgagggacgaaaatcggattcgggtgtaaagttaagggacctcagatga  
 acttattccgggagcatgattgggaagggaggacataaggcccatgtcgcatgtgtttgg  
 acggtccagatctccagatcactcagcaggatcggccgcggttcgcgtagcaccgcggt  
 ttgattcggcttcccgcaaggcggcggccgggtggccgtgccgcgtagcttccgcccga  
 agcgagcacgccgcgcccgcgaccggctctgcgtttgcaccgccttgcacgcgatac  
 atcgggatagatagctactactctctccggttcacaatgtaaatacttctactattttc  
 cacattcatattgatgttaatgaatatagacatatatatctatttagattcattaacat  
 caatatgaatgtaggaaatgctagaatgacttacattgtgaattgtgaaatggacgaag  
 tacctacgatggatggatgcaggatcatgaaagaattaatgcaagatcgtatctgccgc  
 atgcaaaatcttactaattgcgctgcatatatgcatgacagcctgcatgccccggtgta  
 agcgtgttcatccattaggaagtaaccttgtcattacttataccagtactacatactat  
 atagtattgatttcatgagcaaatctacaaaactggaaagcaataaggaatacgggact  
 ggaaaagactcaacattaatcaccaaatatctcgccttctccagcagaatatatatctc  
 tccatcttgatcactgtacacactgacagtgtagcataaacgcagcagccagcttaac  
 tgcgtctcaccgtcgcacactggccttccatctcaggctagctttctcagccacccat  
 cgtacatgtcaactcggcgcgcgcacagggcacaattacgtacaaaacgcatgacccaaa  
 tcaaaaccaccggagaagaatcgctccgcgcgcggcggcggcgcgcacgtacgaatgc  
 acgcacgcacgcccacccccacgacacgatcgcgcgcgcacgcccggcgcacaccggccatc  
 caccgcgcctcacctcgcgactataaatacgtaggcatctgcttgatcttgtcatc  
 catctcaccaccaaaaaaaaaaggaaaaaaaaacaaaacacaccaagccaaataaaagcg  
 acaa

**SEQ ID NO 4: iniciador prm0360**

ggggacaagtttgtacaaaaagcaggcttcacaatggctttagaagaggagga

**SEQ ID NO 5: iniciador prm0361**

ggggaccactttgtacaagaagctgggttagcgaggactactataagca

**FIGURA 6 (continuación)**

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

5

**Documentos de patente citados en la descripción**

- EP 1198985 A1 [0067]
- EP 04100991 A [0109]
- US 60553418 B [0109]

10

**Literatura citada en la descripción que no es de patente:**

- **Healy y colaboradores.** J. Biol. Chem., 2001, vol. 276 (10), 7041 - 7047 [0030]
- **Swaminathan y colaboradores.** Plant Phys, 2000, vol. 124, 1658 - 1667 [0030]
- 15 • **Creighton.** Proteins. W.H. Freeman and Company, 1984 [0040]
- **Needleman ; Wunsch.** J. Mol. Biol., 1970, vol. 48, 443 - 453 [0050]
- **Krens, F.A. y colaboradores.** Nature, 1982, vol. 296, 72 - 74 [0067]
- **Negrutiu I. y colaboradores.** Plant Mol. Biol., June 1987, vol. 8, 363 - 373 [0067]
- **Shillito R.D. y colaboradores.** Bio/Technol, 1985, vol. 3, 1099 - 1102 [0067]
- 20 • **Crossway A. y colaboradores.** Mol. Gen Genet, 1986, vol. 202, 179 - 185 [0067]
- **Klein T.M. y colaboradores.** Nature, 1987, vol. 327, 70 [0067]
- **Aldemita ; Hodges.** Planta, 1996, vol. 199, 612 - 617 [0067]
- **Chan y colaboradores.** Plant Mol. Biol., 1993, vol. 22 (3), 491 - 506 [0067]
- **Hiei y colaboradores.** Plant J., 1994, vol. 6 (2), 271 - 282 [0067]
- 25 • **Ishida y colaboradores.** Nat. Biotechnol., June 1996, vol. 14 (6), 745 - 50 [0067]
- **Frame.** Plant Physiol., May 2002, vol. 129 (1), 13 - 22 [0067]
- **Hayashi y colaboradores.** Science, 1992, 1350 - 1353 [0074]
- **McCallum.** Nat Biotechnol, April 2000, vol. 18 (4), 455 - 7 [0075]
- **Stemple.** TILLING-a high-throughput harvest for functional genomics. Nat Rev Genet., February
- 30 2004, vol. 5 (2), 145 - 50 [0075]
- **Offringa y colaboradores.** Extrachromosomal homologous recombination and gene targeting in plant cells after Agrobacterium-mediated transformation. EMBO J., October 1990, vol. 9 (10), 3077 - 84 [0078]
- **Terada R ; Urawa H ; Inagaki Y ; Tsugane K ; Iida S.** Efficient gene targeting by homologous
- 35 recombination in rice. Nat Biotechnol., 2002 [0078]
- **Terada.** A tale of two integrations, transgene and T-DNA: gene targeting by homologous recombination in rice. Curr Opin Biotechnol., April 2004, vol. 15 (2), 132 - 8 [0078]
- **Sambrook.** Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0088]
- 40 • **Ausubel y colaboradores.** Current Protocols in Molecular Biology. 1994, vol. 1, 2 [0088]
- Standard materials and methods for plant molecular work are described in Plant Molecular Biology Labfase. **R.D.D. Croy.** Current Protocols. BIOS Scientific Publications Ltd (UK) and Blackwell Scientific Publications, 1993 [0088]

45