

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 927 268**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12Q 1/6895** (2008.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

**A01H 5/10** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2016 PCT/EP2016/078920**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2017 WO17089601**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2016 E 16804741 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2022 EP 3380618**

54 Título: **Planta resistente al frío**

30 Prioridad:

**27.11.2015 EP 15196721**

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

**03.11.2022**

73 Titular/es:

**KWS SAAT SE & CO. KGAA (100.0%)  
Grimsehlstraße 31  
37574 Einbeck, DE**

72 Inventor/es:

**OUZUNOVA, MILENA;  
PRESTERL, THOMAS;  
KNAAK, CARSTEN;  
SCHEUERMANN, DANIELA;  
URBANY, CLAUDE;  
WESTHOFF, PETER;  
PESTSOVA, ELENA y  
ERNST, KARIN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 927 268 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Planta resistente al frío

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la modificación de plantas mediante métodos de biología molecular y tecnología de marcadores y la ingeniería genética. Se refiere a una nueva planta resistente al frío, en particular a una planta de maíz, así como a la identificación y caracterización molecular y al uso de genes y marcadores de un intervalo cromosómico de 25,7 kb, que contiene un locus de resistencia al enfriamiento/frío en las líneas de maíz. Otro aspecto de la invención se refiere al desarrollo de marcadores moleculares para potenciar el cultivo, en particular para evitar la fijación de un «barrido selectivo» en una región con una tasa de recombinación baja.

Antecedentes de la invención

15 El término «frío» se refiere a temperaturas en las que la planta de maíz puede sobrevivir, sin embargo el crecimiento se ve afectado o incluso significativamente afectado. La temperatura óptima de crecimiento para la germinación de las semillas de maíz y el desarrollo de plantas de maíz es de entre 21 y 27 °C (Greaves JA (1996) Improving suboptimal temperature tolerance in maize the search for variation. J Exp Bot 47: 307-323, 1996).

20 Por lo tanto, el estrés ya ocurre a temperaturas inferiores a 20 °C, que es una temperatura típica que se mide durante la temporada de siembra en el norte de Europa. El estrés por frío moderado con fotosíntesis reducida en la luz y crecimiento reducido se da entre 12 y 17 °C, y el estrés por frío severo ocurre junto con el estrés de agua inducido por frío, un tipo de estrés seco, en la luz, entre 2 y 10 °C (Marocco A., Lorenzoni C and Fracheboud Y, 2005. Chilling stress in maize. Maydica, 50: 571-580).

30 El estrés por frío se asocia o con la fotoinhibición y el estrés oxidativo en la luz o con cambios en la expresión génica en la oscuridad (resumido en Marocco et al., 2005). La fase más sensible es la fase heterótrofa (siembra hasta la tercera hoja), pero el estrés por frío también afecta la fase autótrofa temprana (Bhosale et al., 2007. Chilling Tolerance of Central European Maize Lines and their Factorial Crosses, Annals of Botany 100: 1315-1321). La exposición prolongada a temperaturas más bajas conduce a una lesión irreversible de las células y los tejidos (Greaves, 1996) y a la consiguiente reducción del crecimiento y el rendimiento.

35 El crecimiento temprano y vigoroso de las plantas se considera un indicador importante de rendimientos altos y estables, por ejemplo, en el maíz, en particular en el clima frío del centro y norte de Europa. Adicionalmente, las variedades de maíz con un mejor crecimiento temprano vegetal conducen a una mejor cobertura del suelo y ayudan por lo tanto a reducir la erosión y la lixiviación de nitratos al comienzo de la fase de crecimiento.

40 Ya se han realizado varias investigaciones de QTL (locus de rasgo cuantitativo) para identificar la resistencia genética al frío en el maíz. La mayoría de los estudios analizaron plantas de maíz cultivadas en cámaras de crecimiento en condiciones óptimas (25/22 °C) y subóptimas (15/13 °C). Se midieron parámetros como la eficiencia cuántica del fotosistema II, la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II, la fluorescencia clorofílica, el contenido de clorofila de la tercera hoja (SPAD), el área de la hoja y el peso seco de la plántula (Fracheboud, Y., et al. «Identification of quantitative trait loci for cold-tolerance of photosynthesis in maize (Zea mays L.)». Journal of experimental botany 45 53.376 (2002): 1967-1977; Fracheboud, Y., et al. «Genetic analysis of cold-tolerance of photosynthesis in maize». Plant molecular biology 56.2 (2004): 241-253; Hund, A., et al. «QTL controlling root and shoot traits of maize seedlings under cold stress». Theoretical and applied genetics 109.3 (2004): 618-629; Hund, Andreas, et al. «Cold tolerance of the photosynthetic apparatus: pleiotropic relationship between photosynthetic performance and specific leaf area of maize seedlings». Molecular Breeding 16.4 (2005): 321-331; Guerra-Peraza, Orlene, et al. «Temperature at night affects the genetic control of acclimation to cold in maize seedlings. » Maydica 56.4 (2012)), sin embargo, en todos estos experimentos, no se ha documentado ningún QTL similar al QTL descrito y clonado aquí en el cromosoma 4. Leipner et al. (QTL studies reveal little relevance of chilling-related seedling traits for yield in maize. Theor Appl Genet (2008) 116: 555-562) informó sobre un experimento de mapeo QTL en la fase de floración y cosecha en un experimento de campo con dos siembras cronológicamente diferentes. Los parámetros medidos fueron tiempo de 50 floración, altura de la planta, peso de la materia seca de la paja y las mazorcas, y los autores compararon sus QTL identificados con los QTL que se identificaron mediante experimentos de cámara de crecimiento en la fase de germinación, según lo descrito por Jompuk et al. (Mapping of quantitative trait loci associated with chilling tolerance in maize (Zea mays L.) seedlings grown under field conditions. Journal of experimental botany, 2005, 56. Jg., núm. 414, págs. 1153-1163). Solo pocos QTL comunes fueron detectados. Leipner et al. concluyeron que la resistencia al frío de las plántulas no parece tener un efecto significativo en el rendimiento.

60 Jompuk et al. (2005) determinaron el intercambio de carbono y la fluorescencia de clorofila, la eficiencia cuántica operativa del fotosistema II, la coloración verde de la tercera hoja (SPAD), la superficie de la tercera hoja y la masa seca de la plántula en la misma población, y mapearon un QTL para el índice SPAD en siembra temprana y la eficiencia cuántica operativa del fotosistema II en el cromosoma 4 a 31,1 Mb, que está aproximadamente a 6 Mb del QTL de la presente invención en la posición 37 Mb.

Usando marcadores SSR, Presterl et al. 2007 («Quantitative trait loci for early plant vigour of maize grown in chilly environments». *Theoretical and Applied Genetics* 114.6 (2007): 1059-1070) mapearon en el cromosoma 4 un QTL de 4 cM, el cual, sin embargo, comprende un tamaño físico de aproximadamente 155 Mb, lo que representa no menos del 7 % del genoma total en el maíz. Si bien se informa de un estudio de mapeo fino continuado en Baliashvili en 2011 [mapeo fino de un QTL (locus de rasgo cuantitativo) para la resistencia al frío en el cromosoma 4 en el maíz y su caracterización molecular y fenotípica Universidad y Biblioteca Estatal de la Universidad Heinrich Heine de Düsseldorf, 2011], ni los marcadores ni ninguna otra información de secuencia se divulgan en ese caso.

Un estudio de QTL realizado recientemente fue publicado por Rodríguez et al (Effects of selection for color intensity on antioxidant capacity in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica*, 2013, 193. Jg., núm. 3, págs. 339-345). La descendencia de un cruce de maíz Flint y maíz Dent se evaluó bajo condiciones controladas, donde la línea de maíz Dent reaccionó sensiblemente a temperaturas bajas y mostró una reducción drástica del contenido de clorofila. Las temperaturas de control se ajustaron a 25/20 °C y las temperaturas frías a 14/8 °C. Los parámetros que se midieron fueron el número de plantas sobrevivientes en condiciones de control y frío, el peso seco de la plántula en condiciones de control, el rendimiento cuántico del fotosistema II en condiciones de control y el contenido total de antocianinas. Si bien cuatro de cada 10 regiones QTL detectadas se solaparon con el QTL que mapearon Presterl et al en 2007 en el cromosoma 4, no se realizaron más investigaciones en lo que se refiere a las bases genéticas, como por ejemplo el mapeo fino de las regiones o la identificación de genes candidatos.

En principio, en este tipo de investigaciones, la norma es que mediante el análisis de un origen parental de alelos en marcadores que flanquean un locus diana, se pueden seleccionar individuos con un segmento cromosómico donante corto intacto alrededor del gen diana y así reducir el «arrastré por ligamiento». Sin embargo, Stam y Zeven (The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers bred by backcrossing. *Euphytica*, 1981, 30. Jg. núm. 2, págs. 227-238), mostraron que la longitud esperada de un segmento de cromosoma donante acoplado a un gen diana es de 32 cM en un cromosoma de 100 cM, incluso después de seis generaciones de retrocruzamiento y combinado con la selección del gen diana. Se pueden encontrar ejemplos de propiedades genéticamente codificadas negativas que permanecen acopladas a un gen diana bajo selección (Zeven, AC; Knott, DR; Johnson, R. Investigation of linkage drag in near isogenic lines of wheat by testing for seedling reaction to races of stem rust, leaf rust and yellow rust. *Euphytica*, 1983, 32. Jg., núm. 2, págs. 319-327).

En principio, la resistencia al frío es una característica importante en el desarrollo posterior de los cultivos. De esta manera, para otros tipos de cultivos, ya se conocen genes transmisores de resistencia al frío. Así lo describen Ma et al. (en: *COLD1 confers chilling tolerance in rice*. *Cell*. 2015 Mar 12; 160 (6): 1209-21), por ejemplo, el QTL *COLD1* en arroz. La sobreexpresión de *COLD1* (JAP) aumenta significativamente la resistencia al frío. *COLD1* codifica para un regulador de la cascada de señales de la proteína G.

Igualmente, también se describe un SNP en *COLD1*, llamado SNP2. Del mismo modo, la resistencia al frío también se considera un objetivo importante para el cultivo de maíz para ensilado, granos y uso energético en numerosas regiones productoras de maíz, en particular en las zonas frías del centro y norte de Europa, pero también en el sur de Europa, donde a los agricultores les gustaría sembrar plantas de maíz más temprano, para aprovechar mejor la humedad del invierno que se encuentra en el suelo. La detección y caracterización de genes transmisores de resistencia al frío y la puesta a disposición de nuevos marcadores para la resistencia al frío en plantas en general y particularmente en plantas agrícolas, así como la puesta a disposición de plantas con un aumento de la resistencia al frío, sin que estas plantas presenten además otras desventajas agronómicas o de cultivo, es por consiguiente de particular interés y un objetivo de esta invención. Otros aspectos serán evidentes para el experto cuando estudie la siguiente descripción y ejemplos.

En un primer aspecto de la presente solicitud se proporciona un ácido nucleico que presenta una secuencia de ácido nucleico, seleccionada del grupo que consiste en a) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con una de las SEQ ID NO 29, 3, 7, 11, 15, 25 o 35, o un fragmento funcional de la misma, b) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de a), c) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % o preferentemente al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de a) o b), d) una secuencia de ácido nucleico, que se deriva de acuerdo con el código genético degenerado de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con a), b) o c), e) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con a), b) o c) en condiciones estrictas, f) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO 30, 4, 8, 12, 16 o 26 o un homólogo, análogo u ortólogo de las mismas, o g) una secuencia de ácido nucleico que codifica para uno o más ARN, capaz/capaces de hibridarse al menos parcialmente consigo mismo o entre sí y así formar una parte de doble cadena, donde dicha secuencia de ácido nucleico coincide en al menos 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25, preferentemente al menos 30, 32, 34, 36, 38 o 40, de manera particularmente preferente al menos 50, 60, 70, 80, 90 o 100, o de manera particularmente más preferente al menos 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 o 1000 nucleótidos consecutivos con una de las secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 27, 17, 19, 5, 7, 23 o 25, (ii) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de i), (iii) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % o preferentemente al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de (i) o (ii), (iv) una secuencia de ácido nucleico que se deriva según el código genético degenerado de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i), (ii) o (iii), (v) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida

con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i), (ii) o (iii) en condiciones estrictas, (vi) una secuencia de ácido nucleico que es responsable de una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 28, 18, 20, 6, 8, 24 o 26, o un homólogo, análogo u ortólogo del mismo, o (vii) una secuencia de ácido nucleico en orientación antisentido a una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i) a (vi).

5 La presente invención es el resultado de los esfuerzos de los inventores para identificar y localizar con precisión un locus marcador cuantitativo de resistencia al frío (quantitative trait locus (QTL)) en el cromosoma 4 del maíz, clonar y secuenciar este QTL e identificar el/los gen(es) responsable(s) del fenotipo de resistencia al frío. La región identificada de un total de 25,7 kb (genotipo donante) se estudió de forma molecular y se identificaron genes candidatos adecuados  
10 (véase la figura 1). La validación funcional realizada comprendió la

identificación de mutantes de Tilling y estudios de expresión génica. Como resultado, la resistencia al frío identificada solo se puede utilizar desde el punto de vista de la reproducción y la ingeniería genética. En el curso de los trabajos de mapeo y mapeo fino, se desarrollaron marcadores moleculares especiales que se pueden utilizar para el diagnóstico para la selección de plantas con una mayor resistencia al frío. Además, los marcadores desarrollados  
15 también se pueden utilizar para cruzar de manera selectiva la fuente genética de mayor resistencia al frío en el material genético ya existente (por ejemplo, variedades existentes, líneas elitistas, etc.) y al mismo tiempo mantener baja la longitud de la introgresión generada. Por tanto, por primera vez es posible transmitir la característica de resistencia al frío sin implicar una amplia zona genética de la región del centrómero del cromosoma 4 del donante. Esto es  
20 particularmente ventajoso, dado que se ha observado que esta zona genética está fuertemente fijada y por tanto, solo permite un nivel muy bajo de diversidad genética y frecuencia de recombinación. Implicar este campo genético, que representa más del 5 % del genoma total del maíz, reduciría drásticamente la posibilidad de continuar cultivando variedades con esta importante característica agronómica. Por tanto, la presente invención permite por primera vez, de manera ventajosa, la utilización reproductiva de la característica de resistencia al frío identificada y al mismo tiempo  
25 reduce a un mínimo la pérdida de diversidad genética (barrido selectivo).

Como resultado de los análisis realizados en el marco de la invención, también se pudo encontrar una correlación significativa de marcadores fenotípicos de resistencia al frío con la región entre los marcadores ma59778s31 y ma59778119 (véase, por ejemplo, la figura 2). Encontrar un QTL en el cromosoma 4 dentro del grupo Dent que  
30 explique el 35 % de la varianza fenotípica para la resistencia al frío es un recurso crucial para el uso reproductivo.

Debido a la baja tasa de recombinación y la ubicación pericentromérica del QTL, fue particularmente difícil limitar la zona causal al intervalo estrecho y, en lugar de un medio cromosoma de 122 MB, en el que se transmitieron otras características negativas y que habrían conducido a una pérdida de diversidad genética, cruzar solo unos pocos kb  
35 en la reproducción. Con el conocimiento de los fundamentos genéticos de la característica de resistencia al frío, ahora es posible también su uso exclusivo, al evitar cualquier arrastre por ligamiento y la reducción de la diversidad genética.

En la región alrededor de dicho QTL, se pudieron identificar varios elementos funcionales, o genes, mediante comparaciones entre las diferentes plantas y comparaciones posteriores de bases de datos (véanse ejemplos),  
40 que en consecuencia están implicados en la resistencia al frío, ya sea solos o en combinación. Las tablas siguientes 1a, 1b y 1c los enumeran.

## ES 2 927 268 T3

Tabla 1a: Elementos genéticos y genes en la región diana de 25,7 kb (genotipo TH; marco de lectura ORF (open reading frame), como se identificó; SL: línea sensible; TH: línea resistente).

| SEQ ID NO: | Denominación | Posición (SL) | Anotación   |
|------------|--------------|---------------|---|
| 29         | ORF TH-09    | 88663         | Proteína ácida reactiva a la auxina (SAUR31)                    |
| 3          | ORF TH-01    | 61977         | Retrotransposón de la proteína Gag                              |
| 7          | ORF TH-02    | 63012         | Transposón Sb07g001920 de <i>sorgo bicolor</i>                  |
| 11         | ORF TH-03    | 65848         | Transposón Sb07g001880 de <i>sorgo bicolor</i>                  |
| 15         | ORF TH-04    | 70255         | Transposón Sb07g001880 de <i>sorgo bicolor</i>                  |
| 25         | ORF TH-08    | 80491         | Transposón Sb07g001900 de <i>sorgo bicolor</i>                  |
| SEQ ID NO: | Denominación | Posición (SL) | Anotación   |
| 35         | ORF TH-11    | 79716         | Poliproteína putativa, <i>Oryza sativa</i> ssp. <i>japonica</i> |
|            | Región TH-12 |               | Transposón Sb07g001920 de <i>sorgo bicolor</i>                  |

Tabla 1b: Elementos genéticos y genes en la región diana de 25,7 kb, que no están presentes en el genotipo TH o que presentan en el genotipo TH una expresión modificada, preferiblemente reducida (marco de lectura ORF (open reading frame) como se identificó; SL: línea sensible; TH: línea resistente).

| SEQ ID NO: | Denominación | Posición (SL) | Anotación   |
|------------|--------------|---------------|---|
| 17         | ORF SL-05    | 71918         | Elemento transponible, posible proteína no caracterizada, <i>Oryza sativa subsp. Japonica</i>           |
| 19         | ORF SL-06    | 74307         | Retrotransposón, posible proteína no caracterizada OSJNBb0006B22.8, <i>Oryza sativa subsp. japonica</i> |
| 7          | ORF TH-02    | 63012         | Transposón Sb07g001920 de <i>sorgo bicolor</i>  |
| 25         | ORF TH-08    | 80491         | Transposón Sb07g001900 de <i>sorgo bicolor</i>  |
| 29         | ORF TH-09    | 88663         | Proteína ácida reactiva a la auxina (SAUR31)  |

Tabla 1c: Elementos genéticos y genes en la región diana de 25,7 kb (genotipo SL; marco de lectura ORF (open reading frame), como se identificó; SL: línea sensible; TH: línea resistente).

| SEQ ID NO: | Denominación | Posición (SL) | Anotación   |
|------------|--------------|---------------|---|
| 27         | ORF SL-09    | 88663         | Proteína ácida reactiva a la auxina (SAUR31)  |
| 1          | ORF SL-01    | 61977         | Retrotransposón de la proteína Gag  |
| 5          | ORF SL-02    | 63012         | Transposón Sb07g001920 de <i>sorgo bicolor</i>  |
| 9          | ORF SL-03    | 65848         | Transposón Sb07g001880 de <i>sorgo bicolor</i>  |
| 13         | ORF SL-04    | 70255         | Transposón Sb07g001880 de <i>sorgo bicolor</i>  |
| 17         | ORF SL-05    | 71918         | Elemento transponible, posible  |
|            |              |               | proteína no caracterizada, <i>Oryza sativa subsp. Japonica</i>  |
| 19         | ORF SL-06    | 74307         | Retrotransposón, posible proteína no caracterizada OSJNBb0006B22.8, <i>Oryza sativa subsp. japonica</i> |
| 23         | ORF SL-08    | 80491         | Transposón Sb07g001900 de <i>sorgo bicolor</i>  |
| 27         | ORF SL-09    | 88663         | Proteína ácida reactiva a la auxina (SAUR31)  |
|            | Región SL-11 | 79716         | Poliproteína putativa, <i>Oryza sativa ssp. japonica</i>  |
| 21         | ORF SL-12    |               | Transposón Sb07g001920 de <i>sorgo bicolor</i>  |

De particular interés en el marco de la presente invención y por consiguiente preferibles son ORF-09 (SAUR31), ORF-08 y ORF-02, que mostraron diferente expresión entre las líneas SL y TH (véase la tabla 1b). Por ejemplo, bajo estrés por frío, la tasa de expresión de ORF-09 fue mayor en las líneas sensibles al frío (SL) que en las líneas resistentes al frío (TH) y disminuyó con el tiempo.

Datos de análisis del gen ORF-09 o de la anotación correspondiente SAUR31 de acuerdo con SEQ ID NO: 27 (secuencia de nucleótidos del genotipo SL), SEQ ID NO: 29 (secuencia de nucleótidos del genotipo TH) y SEQ ID NO: 31 (secuencia de nucleótidos de la línea de referencia del genoma del maíz B73) permitieron un posicionamiento único de SAUR31 dentro de una sección en el cromosoma 4 entre los marcadores ma59778s31 y ma59778119, preferiblemente entre ma59778s32 y ma59778119, mediante análisis de marcadores y la evaluación de las frecuencias de recombinación en las diferentes líneas SL, TH y B73 (figura 1). En este caso, Acid31 es un gen que codifica la proteína de respuesta a la auxina del mismo nombre (véase SEQ ID NO: 28, 30 y 32). Los genes SAUR son conocidos por estar involucrados en la expansión celular, la transducción de señal mediada por auxina y el desarrollo del meristemo de la raíz, y también son reguladores positivos de la senescencia foliar (Xu, N.; Hagen, G; Guilfoyle, T. Multiple auxin response modules in the soybean SAUR 15A promoter. *Plant Science*, 1997, 126. Jg., núm. 2, págs. 193-201; Jain, M; Tyagi, AK; Khurana, JP. Genome-wide analysis, evolutionary expansion, and expression of early auxin-responsive SAUR gene family in rice (*Oryza sativa*). *Genomics*, 2006, 88. Jg., núm. 3, págs 360-371; Jain, M; Khurana, JP. Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. *Febs Journal*, 2009, 276. Jg., núm. 11, págs. 3148-3162; Spartz, AK, et al. The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion. *The Plant Journal*, 2012, 70. Jg., núm. 6, págs. 978-990; Hou et al. SAUR36, a small auxin up RNA gene, is implied in the promotion of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 2013, 161. Jg., núm. 2, págs. 1002-1009). Los genes SAUR son genes primarios de respuesta a la auxina que participan en el flujo de señales de la auxina (Chen et al. Jun. Small auxin upregulated RNA (SAUR) gene family in maize: Identification, evolution, and its phylogenetic comparison with *Arabidopsis*, rice, and *Sorghum*. *Journal of integrative plant biology*, 2014, 56. Jg., núm. 2, págs. 133-150). Se pueden dividir en diferentes grupos y hasta ahora se han encontrado en *A. thaliana*, arroz y soja en diferentes funciones. En el maíz, se identificaron 79 genes putativos ácidos en el genoma B73 (Chen et al. Small auxin upregulated RNA (SAUR) gene family in maize: Identification, evolution, and its phylogenetic comparison with *Arabidopsis*, rice, and *sorghum*. *Journal of integrative plant biology*, 2014, 56. Jg., núm. 2, págs. 133-150). El gen candidato ORF-09 se mencionó como ZmSAUR37, sin embargo, la importancia en la transmisión de la resistencia al frío no se ha descrito previamente y es bastante sorprendente. En los estudios en los que se basa la invención, se observó una expresión de SAUR31 de intensidad diferente en las líneas sensibles (SL) en comparación con las líneas resistentes (TH) durante el estrés por frío (tabla 1b). La secuencia del promotor mostró un alto número de polimorfismos entre las líneas estudiadas, mientras que la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada se mantuvo prácticamente sin cambios.

La presente solicitud divulga, además, la puesta a disposición de un casete de expresión que comprende un ácido

nucleico con una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en a) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con una de las SEQ ID NO 29, 3, 7, 11, 15, 25 o 35, o un fragmento funcional de la misma, b) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de a), c) una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 80 %, 85 %, 90 % o 95 % o, preferentemente, al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de a) o b), d) una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con a), b) o c) según el código genético degenerado, e) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con a), b) o c) en condiciones estrictas, f) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO 30, 4, 8, 12, 16 o 26 o un homólogo, análogo u ortólogo de la misma, o g) una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más ARN capaz/capaces de hibridarse al menos parcialmente consigo mismo o entre sí y formar así una parte de doble cadena, donde dicha secuencia de ácido nucleico coincide en al menos 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25, preferentemente al menos 30, 32, 34, 36, 38 o 40, de manera particularmente preferente al menos 50, 60, 70, 80, 90 o 100, o de manera particularmente más preferentemente al menos 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 o 1000 nucleótidos consecutivos con una de las secuencias de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 27, 17, 19, 5, 7, 23 o 25, (ii) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de i), (iii) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % o preferentemente al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de (i) o (ii), (iv) una secuencia de ácido nucleico que se deriva según el código genético degenerado de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i), (ii) o (iii), (v) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i), (ii) o (iii) bajo condiciones estrictas, (vi) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 28, 18, 20, 6, 8, 24 o 26, o un homólogo, análogo u ortólogo del mismo, o (vii) una secuencia de ácido nucleico en orientación antisentido a una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i) a (vi).

Un ácido nucleico o casete de expresión es preferiblemente adecuado, después de la transcripción o después de la expresión en una planta, para transmitir la propiedad de una resistencia al frío o aumentar la resistencia al frío de la planta.

En principio, los casetes de expresión, su estructura y sus componentes son conocidos por el experto y se describen en la literatura (Sambrook et al. 2001, *Molecular cloning: a laboratory manual* (3-volume set) (vol. 999). Cold Spring Harbor, New York: Cold spring harbor laboratory press). Dichos casetes consisten al menos en un gen que se debe expresar y un promotor vinculado operativamente al mismo. Dichos promotores pueden ser capaces de transmitir la expresión transgénica de determinados genes específicos de desarrollo de plantas o de tejidos, como por ejemplo en el documento WO 2003/006660 o WO 2000/026388. Por ejemplo, el documento DE 10 2005 021365 describe un casete de expresión específico para flores. Además, puede estar contenida al menos una secuencia de terminador funcional en células u organismos vegetales (por ejemplo, como en el documento WO 2003/008596). Además, en el casete de expresión pueden estar contenidos uno o varios genes de resistencia, que permiten una selección de células transformadas o transfectadas con éxito. El experto también conoce por el estado de la técnica varios genes de resistencia (marcadores de selección) adecuados para la selección (Miki, B; McHugh, S. *Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety*. *Journal of Biotechnology*, vol. 2004, 107, Jg., núm. 3, págs. 193-232). Estos pueden comprender, por ejemplo, una resistencia a la kanamicina, a la estreptomycinina o a la ampicilina. Los casetes de expresión pueden estar presentes como ácido nucleico lineal o en un vector o plásmido.

En un modo de realización del casete de expresión de la presente solicitud, el ácido nucleico descrito anteriormente está vinculado operativamente a un promotor constitutivo como, por ejemplo, el promotor 35S (Odell, JT; Nagy, F; Chua, NH. *Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S Promotor*. 1985, documento US 5.352.605 A), un promotor que puede inducir frío/fríaldad, como por ejemplo BN115 (documento US 5.847.102 A) o un promotor, como por ejemplo p63 (documento EP 2 116 606 B1), que es en particular activo en el desarrollo temprano de plantas o en tejidos jóvenes de plantas, donde se entiende por desarrollo temprano las primeras 12 semanas tras la germinación, particularmente las primeras 8 semanas tras la germinación y en particular las primeras 4 semanas tras la germinación.

En un modo de realización preferido de la presente solicitud, el casete de expresión comprende un ácido nucleico que presenta una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en a) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO 29, o un fragmento funcional de la misma, b) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de a), c) una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 80 %, 85 %, 90 % o 95 % o, preferentemente, al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de a) o b), d) una secuencia de ácido nucleico que, según el código genético degenerado, se deriva de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con a), b) o c), e) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con a), b) o c) en condiciones estrictas, o f) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO 30 o un homólogo, análogo u ortólogo de la misma, preferiblemente vinculada a un promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 33, o con una variante alélica o una forma modificada de un promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 34, donde la variante alélica o la forma modificada produce una tasa de expresión o altura de expresión como el promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33. Una variante alélica o una forma modificada del promotor significa un promotor que causa una tasa de expresión o una altura de expresión reducida de más del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 % o 50 % en comparación con la tasa de expresión o la altura de expresión

causada por el promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 34. Una tasa de expresión o altura de expresión comparable significa que la variante alélica o la forma modificada del promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 34, presenta sustancialmente una tasa de expresión o altura de expresión que difiere en más del 20 %, 18 %, 16 %, 14 % o 12 %, preferentemente no más del 10 %, 9 %, 8 %, 7 % o 6 %, o de manera particularmente preferente no más del 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0 % de la tasa de expresión o la altura de expresión del promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33.

Además, la presente solicitud también divulga un promotor sensible al estrés por frío, que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 33 o 34 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 33 o 34 o una secuencia de nucleótidos que hibrida con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 33 o 34, así como un casete de expresión que comprende el promotor que responde al estrés por frío, un vector que comprende el promotor que responde al estrés por frío o el casete de expresión que comprende el promotor que responde al estrés por frío como transgén, el casete de expresión que comprende el promotor que responde al estrés por frío, o el vector que comprende el promotor que responde al estrés por frío o el casete de expresión que comprende el promotor que responde al estrés por frío.

En otro modo de realización preferente de la presente solicitud, el casete de expresión comprende un ácido nucleico que presenta una secuencia de nucleótidos que codifica para uno o varios ARN, capaz/capaces al menos parcialmente de hibridarse consigo mismo o entre sí y así formar una parte de doble cadena, donde dicha secuencia de ácido nucleico coincide en al menos 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25, preferentemente al menos 30, 32, 34, 36, 38 o 40, de manera particularmente preferente al menos 50, 60, 70, 80, 90 o 100, o de manera particularmente más preferente al menos 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 o 1000 nucleótidos consecutivos, con una de las secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con una de las SEQ NO: 27, (ii) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de i), una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % o preferentemente al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de (i) o (ii), (iv) una secuencia de ácido nucleico que se deriva según el código genético degenerado de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i), (ii) o (iii), (v) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i), (ii) o (iii) en condiciones estrictas, (vi) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 28 o un homólogo, análogo u ortólogo de la misma, o (vii) una secuencia de ácido nucleico en orientación antisentido a una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i) a (vi).

En otro aspecto, la presente solicitud describe un vector que comprende el ácido nucleico descrito anteriormente o el casete de expresión descrito anteriormente. El vector puede ser un plásmido, un cósmido, un fago o un vector de expresión, un vector de transformación, un vector lanzadera o un vector de clonación, puede ser de cadena doble o simple, lineal o circular, o puede transformar un huésped procarionta o eucariota, ya sea por integración en su genoma o de forma extracromosómica. Preferentemente, el ácido nucleico o casete de expresión descrito anteriormente está vinculado operativamente a un vector con una o varias secuencias reguladoras que permiten la transcripción y opcionalmente la expresión en una célula huésped procarionta o eucariota. Una secuencia reguladora, preferiblemente ADN, puede ser homóloga o heteróloga al ácido nucleico. Por ejemplo, el ácido nucleico está bajo el control de un promotor o terminador adecuado. Los promotores adecuados pueden ser promotores que se inducen constitutivamente (por ejemplo: el 35S, promotor del «Cauliflower mosaic virus» (Odell et al. 1985), particularmente adecuados son aquellos promotores que son específicos de tejido, específicos de estrés (por ejemplo, que responden al frío, BN115 (documento US 5.847.102 A)) o específicos de desarrollo (por ejemplo: promotores específicos de floración, por ejemplo, región promotora del gen GTCHS1; Kobayashi, H et al. Flower-specific gene expression directed by the promoter of a chalcone synthase gene from *Gentiana triflora* in *Petunia hybrida*. *Plant Science*, 1998, 131. Jg., núm. 2, págs. 173-180). Los promotores adecuados también pueden ser promotores sintéticos o quiméricos, que no están presentes en la naturaleza, están compuestos por varios elementos y contienen un promotor mínimo, así como presentar corriente arriba del promotor mínimo al menos un elemento regulador en cis, que sirve como punto de unión para factores de transcripción especiales. Los promotores quiméricos se pueden concebir de acuerdo con las especificidades deseadas y se inducen o reprimen mediante diferentes factores. Ejemplos de dichos promotores se pueden encontrar en Gurr & Rushton (Gurr, SJ; Rushton, PJ. Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? *TRENDS in Biotechnology*, vol. 2005, 23. Jg., núm. 6, págs 275-282) o Venter (Synthetic promoters: genetic control through cis engineering. *Trends in Plant Science*, 2007, 12. Jg., núm. 3, págs. 118-124). Un terminador adecuado es, por ejemplo, el terminador nos (Depicker, A, Stachel, S, Dhaese, P, Zambryski, P and Goodman, H (1982) *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 561-575).

Adicionalmente a los vectores descritos anteriormente, la presente solicitud también divulga un procedimiento que comprende la introducción de un vector descrito en una célula huésped. El vector se puede introducir por ejemplo, mediante conjugación, movilización, transformación biológica, transformación mediada por agrobacterias, transfección, transducción, infiltración por vacío o electroporación. Dichos procedimientos, así como procedimientos para la preparación de vectores descritos, son conocidos por el experto (Sambrook et al. 2001, *Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)* (Vol. 999). Cold Spring Harbor, New York: Cold spring harbor laboratory press).

En otro aspecto, la presente solicitud describe una célula huésped que comprende el ácido nucleico descrito anteriormente, el casete de expresión o el vector. Una célula huésped en el sentido de la presente solicitud puede ser una célula procariota (por ejemplo, bacteriana) o eucariota (por ejemplo, una célula vegetal o una célula de levadura).

5 La célula huésped es preferiblemente una agrobacteria, como la *Agrobacterium tumefaciens* o la *Agrobacterium rhizogenes* o una célula vegetal que comprende el ácido nucleico descrito anteriormente, el casete de expresión o el vector. El experto conoce tanto numerosos métodos, como la conjugación o la electroporación, con los que puede introducir el ácido nucleico, el casete de expresión o el vector antes descrito en una agrobacteria, como también métodos, como diversos procedimientos de transformación (transformación biolística, transformación mediada por

10 agrobacterias), con los que puede introducir el ácido nucleico, el casete de expresión o el vector antes descrito en una célula vegetal (Sambrook et al. 2001).

En otro aspecto, la presente solicitud describe una célula vegetal transgénica que comprende el ácido nucleico descrito anteriormente como transgénico o el casete de expresión o el vector, y una planta transgénica o una parte de la misma que comprende la célula vegetal transgénica. Una célula de planta o planta transgénica de este tipo es, por ejemplo,

15 una célula de planta o planta que está transformada, preferiblemente estable, con el ácido nucleico descrito anteriormente, con el casete de expresión o con el vector. Una planta o célula transgénica presenta preferiblemente una resistencia al frío recién mediada o un aumento de la resistencia al frío en comparación con una planta natural, de tipo isogénica, sin embargo no transformada con el ácido nucleico descrito anteriormente, con el

20 casete de expresión o con el vector, preferiblemente de forma estable.

En una forma de realización preferida de la planta transgénica, el ácido nucleico se vincula operativamente a una o varias secuencias reguladoras que permiten la transcripción y opcionalmente la expresión en la célula de la planta.

25 Una secuencia reguladora, preferiblemente ADN, puede ser homóloga o heteróloga al ácido nucleico descrito anteriormente. La construcción total a partir del ácido nucleico y la(s) secuencia(s) reguladora(s) pueden representar, por tanto, el transgén en forma de casete de expresión. Una parte de una planta puede ser una semilla fertilizada o no fertilizada, un embrión, un polen, un tejido, un órgano o una célula vegetal, donde la semilla fertilizada o no fertilizada, el embrión o el polen se producen en la planta transgénica y en cuyo genoma se integra el ácido nucleico descrito

30 anteriormente como un transgén o el casete de expresión o el vector. Del mismo modo, la presente solicitud también divulga una descendencia de la planta transgénica en cuyo genoma está integrado el ácido nucleico descrito anteriormente como transgén, el casete de expresión o el vector, y que tiene una resistencia al frío mediada o un aumento de la resistencia al frío en comparación con una planta natural que es isogénica aunque no transformada con el ácido nucleico descrito anteriormente, con el casete de expresión o con el vector, preferiblemente de forma estable.

35

Una resistencia al frío recién mediada o aumentada se puede determinar específicamente de la especie y experimentalmente. En este caso, se ofrece un análisis de imagen foliar, que comprende sustancialmente las siguientes etapas de procedimiento: a) cultivar las plantas de dos a cuatro semanas en condiciones no estresantes con respecto a la temperatura exterior; b) exponer las plantas a un estrés por frío significativo durante un período de

40 al menos una semana; c) realizar nuevamente una fase de regeneración en condiciones no estresantes durante un período de al menos una semana; y d) medir la pérdida de follaje en una o más hojas, cuyo crecimiento haya tenido lugar durante el período de aplicación de estrés por frío. A modo de ejemplo, esto se describe a continuación para el maíz (*Zea mays*): Las plantas se cultivan durante dos semanas en condiciones óptimas (sin estrés) en el invernadero a 25 °C (temperatura diurna) o 22 °C (temperatura nocturna). A continuación, se traslada durante una semana a una cámara climática con 8 °C o 6 °C. Sigue una fase de regeneración de una semana en el invernadero a 25 °C o 22 °C.

45 A continuación, se examinó preferiblemente la cuarta o quinta hoja en cuanto a su color. En este caso, un valor de 100 % representa la preservación completa del color de la hoja verde y un valor de 0 % representa una coloración amarilla completa (clorosis). Por tanto, en el marco de la presente invención, se pudo demostrar que la variante TH era superior a la variante SL en la preservación de la clorofila bajo estrés por frío (véase la tabla 5). En total, se midieron valores de 10 % a 85 % de hojas verdes. La pérdida de follaje de las variantes TH se redujo en un 19 % hasta un 75 % en comparación con las variantes SL, es decir, la resistencia al frío aumentó significativamente. Por tanto, el término resistencia al frío significa —sin limitarse a ello— una reducción de la pérdida de clorofila bajo estrés por frío en un 5

50 %, 10 %, 15 %, 20 %, preferentemente en un 30 %, 40 % o 50 %, de manera particularmente preferente en un 60 %, 70 %, 80 % o 90 % medido con el análisis de imagen foliar descrito anteriormente.

55

De forma alternativa, la resistencia al frío recién transmitida o aumentada en una planta también se puede cuantificar midiendo la altura de la planta en el momento de iniciar el crecimiento del estiramiento en el área del tallo. Para ello, las plantas resistentes al frío y sensibles se cultivan en condiciones de estrés por frío en pruebas comparativas. En el marco de la presente invención, se ha podido mostrar de este modo que, por ejemplo, la variante TH del maíz aumentó

60 la longitud de la planta en aproximadamente un 35 %, lo que en términos absolutos representó aproximadamente 21 cm adicionales en comparación con la variante SL sensible. Por tanto, el término resistencia al frío también puede significar que una planta con resistencia al frío recién transferida o aumentada presenta un aumento de altura de planta de al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % en comparación con una planta de control en el momento de iniciar el crecimiento del estiramiento.

65

Otro aspecto se describe como un procedimiento para producir una planta resistente al frío. Un procedimiento de este

tipo comprende las etapas siguientes: A) mutagénesis de las células vegetales o de partes de una planta y posterior regeneración de plantas a partir de las células vegetales mutagenizadas o partes mutagenizadas o mutagénesis de plantas, y B) identificación de una planta de A) que en una secuencia endógena de ADN, es idéntica a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 27, 17, 19, 5, 7, 23 o 25, (ii) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de i), (iii) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % o preferentemente al menos 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a una secuencia de (i) o (ii), (iv) una secuencia de ácido nucleico que se deriva según el código genético degenerado de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i), (ii) o (iii), (v) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i), (ii) o (iii) bajo condiciones estrictas, (vi) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 28, 18, 20, 6, 8, 24 o 26, o un homólogo, análogo u ortólogo de la misma, o presenta en una secuencia reguladora de la secuencia de ADN endógeno al menos una mutación que provoca un cambio en la tasa de transcripción o expresión o en el nivel de transcripción o expresión de la secuencia de ADN endógeno en la planta identificada en comparación con una planta natural no mutagenizada o un cambio en la actividad o estabilidad de una proteína o polipéptido codificado por la secuencia de ADN endógeno en la planta identificada en comparación con una planta natural no mutagenizada. Preferentemente, la al menos una mutación provoca que la planta identificada se vuelva resistente al frío o que aumente una resistencia al frío ya existente.

Preferentemente, la secuencia de ADN endógeno de la etapa B) codifica para una proteína sensible a la auxina o una proteína ácida, de manera particularmente preferente para la proteína SAUR31 de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 28 o 30 o un homólogo análogo u ortólogo de la misma. Preferentemente, la secuencia reguladora de la secuencia de ADN endógena de la etapa B) es un promotor o una parte del mismo. El promotor es de manera particularmente preferente un promotor de acuerdo con la SEQ ID NO: 34 o un promotor que presenta una identidad de al menos el 80 %, 85 % o 90 %, preferentemente de al menos el 92 %, 94 %, 96 % o 98 % o de manera particularmente preferente de al menos el 98,5 %, 99 %, 99,5 % o 99,8 % con el promotor de acuerdo con la SEQ ID NO: 34. Un ejemplo de una forma mutada potencial de una secuencia reguladora de una secuencia de ADN endógena es el promotor de acuerdo con la SEQ ID NO: 33.

Una mutación significa una modificación a nivel del ADN, es decir, un cambio en la genética y/o la epigenética. Por ejemplo, un cambio en la genética puede ser el intercambio de al menos una nucleobase en la secuencia endógena de ADN o en una secuencia reguladora de la secuencia endógena de ADN. Si un intercambio de nucleobases de este tipo tiene lugar, por ejemplo, en un promotor, esto puede conducir a una actividad modificada del promotor, ya que, por ejemplo, los elementos reguladores en cis se modifican de modo que la afinidad de un factor de transcripción con el elemento regulador en cis mutante se modifica en comparación con el promotor natural, de modo que la actividad del promotor con el elemento regulador en cis mutante aumenta o disminuye, dependiendo de si el factor de transcripción es un represor o un inductor, o si la afinidad del factor de transcripción con el elemento regulador en cis mutante se fortalece o debilita. Si un intercambio de nucleobase de este tipo tiene lugar, por ejemplo, en una región codificante de la secuencia de ADN endógena, esto puede conducir a un intercambio de aminoácidos en la proteína codificada, lo que puede provocar un cambio en la actividad o estabilidad de la proteína en comparación con la proteína natural. Otro ejemplo de una modificación de la genética es la delección de nucleótidos en la secuencia reguladora y/o la secuencia de ADN endógeno, así como la adición de nucleótidos en la secuencia reguladora y/o la secuencia de ADN endógeno. Un ejemplo de regulación de genes por inserción de nucleótidos mediante mutagénesis transposónica en el maíz lo muestra Das & Martienssen (Das, Lekha, and Robert Martienssen. «Site-selected trans-*poson* mutagenesis at the *hcf106* locus in maize». *The Plant Cell* 7.3 (1995): 287-294.). Una modificación de la epigenética puede tener lugar, por ejemplo, mediante un patrón de metilación modificado del ADN.

El experto sabe cómo se puede lograr una mutación en el sentido de la solicitud mediante el proceso de una mutagénesis en la etapa A) del procedimiento para producir una planta resistente al frío. La mutagénesis incluye en este caso tanto la mutagénesis convencional como la mutagénesis específica del lugar o la «edición del genoma». En la mutagénesis convencional, la modificación no se realiza específicamente a nivel de ADN. La célula vegetal o la planta está expuesta a condiciones mutagénicas, como por ejemplo, TILLING por irradiación de luz ultravioleta o la utilización de sustancias químicas (Till, Bradley J., et al. «Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING». *BMC Plant Biology* 4.1 (2004): 12.). Otro método de mutagénesis al azar es la mutagénesis con la ayuda de un transposón. Una amplia colección de mutantes está disponible gratuitamente a través del proyecto UniformMU. La colección y el método se describen en McCarty et al. (McCarty, Donald R., et al. «Steady-state transposon mutagenesis in inbred maize». *The Plant Journal* 44.1 (2005): 52-61.). La mutagénesis específica del sitio permite la introducción de modificaciones a nivel de ADN dirigidas a lugares predefinidos del ADN. Para ello se pueden usar, por ejemplo, TALENS (documentos WO 2010/079430, WO 2011/072246), meganucleasas (Silva, George, et al. «Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: Hotwire and challenges for gene therapy». *Current gene therapy* 11.1 (2011): 11), Homing-Endonucleases (Stoddard, Barry L. «Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification». *Structure* 19.1 (2011): 7-15.), Zinkfingernucleasas (Lloyd, Alan, et al. «Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in Arabidopsis». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.6 (2005): 2232-2237.) o un sistema CRISPR/Cas (Gaj, Thomas, Charles A. Gersbach, y Carlos F. Barbas. «ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering». *Trends in biotechnology* 31.7 (2013): 397-405). Preferiblemente, la mutación se realiza en todas las copias o alelos o en todos los homólogos de las correspondientes secuencias endógenas de ADN. Típicamente, esto significa al menos

dos cambios con respecto a un organismo diploide como por ejemplo *Zea mays*.

La identificación de una planta en la etapa B) se puede realizar, por ejemplo, con la ayuda de marcadores moleculares o sondas. Las sondas de ADN son, por ejemplo, cebadores o pares de cebadores que se pueden utilizar en una reacción PCR. Por ejemplo, los mutantes de Tilling se pueden detectar o identificar mediante la secuenciación del gen diana en una población de Tilling u otros métodos que detectan acoplamientos incorrectos en el ADN, como por ejemplo, análisis del punto de fusión o utilización de nucleasas específicas de acoplamiento incorrecto. Para ello, la presente solicitud incluye igualmente cebadores/pares de cebadores que se pueden utilizar, como por ejemplo cebadores para detectar SAUR31 o una forma mutada del promotor de SAUR31. Además, los mutantes producidos por transposones se pueden detectar utilizando cebadores específicos de transposones y cebadores específicos de genes diana en la PCR en toda la población y la secuenciación posterior de los productos de PCR. En la presente solicitud también se divulgan cebadores de este tipo. Los cambios en la tasa de expresión o altura de expresión se pueden determinar, por ejemplo, con RT-PCR en tejidos vegetales, el cambio en la estabilidad, por ejemplo, investigando los sitios de unión a la ubiquitina y las predicciones sobre cambios en la estructura terciaria. Además, también son adecuadas la expresión recombinante de las proteínas naturales y de las proteínas naturales correspondientes y las pruebas de actividad bioquímica posteriores. El experto conoce por el estado de la técnica otros medios y procedimientos que puede usar para identificar una planta o una célula de planta en la etapa B).

La presente solicitud también describe marcadores moleculares que detectan la presencia o ausencia de una mutación en la secuencia endógena de ADN o en una secuencia reguladora de la secuencia endógena de ADN. Por ejemplo, dichos marcadores se basan en un SNP y son específicos de la mutación (ejemplos: KASPar o marcador TaqMan).

La presente solicitud también divulga una planta que se puede producir o se produce con el procedimiento anterior, o una parte de esta planta, donde una parte de una planta puede ser una semilla fertilizada o no fertilizada, un embrión, un polen, un tejido, un órgano o una célula vegetal, donde la semilla fertilizada o no fertilizada, el embrión o el polen se producen en la planta transgénica y en cuyo genoma está presente al menos una mutación. Asimismo, la presente solicitud describe también un descendiente de la planta que presenta la al menos una mutación y es resistente al frío.

Además, la presente solicitud se refiere también a un procedimiento para el aislamiento de un ácido nucleico, que transmite o aumenta la resistencia al frío en una planta o célula vegetal, que comprende las siguientes etapas:

A) producción de una planta de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente o puesta a disposición de una planta o de una célula de una planta, que se puede producir o se produce mediante el procedimiento descrito anteriormente, y B) aislamiento de un ácido nucleico, que comprende la secuencia endógena de ADN con la al menos una mutación, del genoma de la planta o de la célula vegetal de A). El aislamiento del ácido nucleico en la etapa B) se puede realizar mediante extracción CTAB o a través de columnas de unión al ADN, la detección de la mutación mediante secuenciación o marcadores moleculares, tales como marcadores basados en SNP Kaspar o TaqMan, o en mutantes de inserción o delección mediante marcadores basados en polimorfismos de longitud.

La presente solicitud describe también un ácido nucleico obtenido mediante el procedimiento de aislamiento descrito anteriormente o que se puede obtener mediante el procedimiento de aislamiento descrito anteriormente, así como un casete de expresión o un vector que comprende el ácido nucleico aislado.

Otro aspecto de la presente solicitud es un procedimiento para producir una planta transgénica resistente al frío. El procedimiento puede comprender las siguientes etapas: A) Proporcionar el ácido nucleico o casete de expresión descrito anteriormente, o proporcionar el vector descrito anteriormente, B) Transformar, preferiblemente de manera estable, al menos una célula vegetal mediante la introducción de ácido nucleico, casete de expresión o vector de A), C) Regenerar plantas transgénicas a partir de la al menos una célula vegetal transformada de B), y D) Identificar una planta transgénica, resistente al frío a partir de C). El procedimiento para producir la planta transgénica resistente al frío, incluye también proporcionar dos o más del ácido nucleico descrito anteriormente, opcionalmente también diferentes modos de realización del ácido nucleico descrito anteriormente y opcionalmente en uno o más casetes de expresión o vectores, y la transformación de células vegetales mediante la introducción de los dos o más ácidos nucleicos. Además del ácido nucleico descrito anteriormente, se sabe que se pueden usar uno o más ácidos nucleicos adicionales, para transferir o aumentar la resistencia al frío (por ejemplo, el documento WO 2002/048378 A2, WO 2008/148298 A1) como transgén.

En una forma de realización preferente del procedimiento de producción, una planta identificada en D) presenta preferiblemente un patrón de expresión modificado en comparación con una planta natural que se ha regenerado, por ejemplo, a partir de una célula vegetal isogénica no transformada, caracterizada por que, debido al silenciamiento génico postranscripcional, la tasa de expresión o la altura de expresión de una secuencia endógena de ADN se reduce a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 27, 17, 19, 5, 7, 23 o 25, (ii) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de i), (iii) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % o preferentemente al menos 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a una secuencia de (i) o (ii), (iv) una secuencia de ácido nucleico que se deriva según el código genético degenerado de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i), (ii) o (iii), (v) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo

con (i), (ii) o (iii) bajo condiciones estrictas, (vi) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 28, 18, 20, 6, 8, 24 o 26, o un homólogo, análogo u ortólogo de la misma.

La presente solicitud se refiere también a una planta transgénica resistente al frío, que se puede producir o se produce con el procedimiento mencionado, o a una parte de esta planta, donde una parte de una planta puede ser una semilla fertilizada o no fertilizada, un embrión, un polen, un tejido, un órgano o una célula vegetal, donde se genera la semilla fertilizada o no fertilizada, el embrión o el polen en la planta transgénica y en su genoma se integra como transgénico el ácido nucleico de acuerdo con la invención, el casete de expresión o el vector. Asimismo, la presente invención también incluye un descendiente de la planta transgénica que es resistente al frío.

En otro aspecto, la presente solicitud se refiere a un procedimiento para transferir o aumentar la resistencia al frío en una célula vegetal o una planta. Un procedimiento de este tipo puede comprender las siguientes etapas: A) Transformar, preferiblemente transformar de forma estable, preferiblemente al menos una célula vegetal mediante la introducción del ácido nucleico o casete de expresión descrito anteriormente, o del vector descrito anteriormente, de manera opcional B) Regenerar plantas transgénicas a partir de la al menos una célula vegetal transformada a partir de A). El procedimiento para producir la planta transgénica resistente al frío incluye también la transformación de dos o más de los ácidos nucleicos descritos anteriormente, también opcionalmente diferentes formas de realización de los ácidos nucleicos y de manera opcional de uno o más casetes de expresión o vectores descritos anteriormente. En una forma de realización preferente del procedimiento, transformar en la etapa A) conduce a una célula vegetal o planta que, en comparación con una célula vegetal natural, que es, por ejemplo, una célula vegetal isogénica no transformada, o con una planta que se ha regenerado, por ejemplo, a partir de una célula vegetal isogénica no transformada, presenta preferiblemente un patrón de expresión modificado, caracterizado por que, debido al silenciamiento génico postranscripcional, la tasa de expresión o la altura de expresión de una secuencia endógena de ADN se reduce a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 27, 17, 19, 5, 7, 23 o 25, (ii) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de i), (iii) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % o preferentemente al menos 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a una secuencia de (i) o (ii), (iv) una secuencia de ácido nucleico que se deriva según el código genético degenerado de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i), (ii) o (iii), (v) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i), (ii) o (iii) bajo condiciones estrictas, (vi) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 28, 18, 20, 6, 8, 24 o 26, o un homólogo, análogo u ortólogo de la misma.

Además, en un aspecto alternativo, la solicitud también divulga el uso del ácido nucleico descrito anteriormente, del casete de expresión o del vector en un procedimiento para la producción de una célula vegetal o planta transgénica resistente al frío, o en un procedimiento para la transferencia o aumento de la resistencia al frío en una célula vegetal o planta.

En otro aspecto, la presente solicitud describe un agente para la aplicación externa en plantas. Este agente se proporciona para uso externo en plantas. Contiene ARN de doble cadena, donde una cadena de este ARN presenta una secuencia de ácido nucleico que coincide en al menos 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25, preferentemente al menos 30, 32, 34, 36, 38 o 40, de manera particularmente preferente al menos 50, 60, 70, 80, 90 o 100, o de manera particularmente más preferente al menos 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 o 1000 nucleótidos consecutivos con una de las secuencias de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 27, 17, 19, 5, 7, 23 o 25, (ii) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de i), (iii) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % o preferentemente al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de (i) o (ii), (iv) una secuencia de ácido nucleico que se deriva según el código genético degenerado de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i), (ii) o (iii), (v) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i), (ii) o (iii) bajo condiciones estrictas, (vi) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 28, 18, 20, 6, 8, 24 o 26, o un homólogo, análogo u ortólogo del mismo, o (vii) una secuencia de ácido nucleico en orientación antisentido a una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con (i) a (vi). El ARN de doble cadena para la preparación del agente se puede producir *in vitro* mediante métodos conocidos por el experto. Por ejemplo, la síntesis del ARN de doble cadena puede tener lugar de forma sintética, con lo que el ARN se forma directamente *in vitro*. El ARN de doble cadena también se puede sintetizar a partir de un ADN de doble cadena a través de la formación de una transcripción de ARNm, que luego forma, por ejemplo, una estructura tallo-bucle.

El agente descrito anteriormente se puede utilizar como mezcla en una envoltura de semillas o en el desarrollo temprano mediante pulverización en forma de *spray*. Además, el agente también se puede utilizar mezclándolo con el sustrato de cultivo antes o después de la germinación de las plantas. En cualquier caso, el agente es adecuado para transferir resistencia al frío en una célula de semilla o planta, o en la semilla o planta en sí misma, o para aumentar la resistencia al frío. En la aplicación para el tratamiento previo de la semilla, el agente se puede combinar primero con una sustancia portadora y aplicarse a la semilla en una combinación que comprende el ARN de doble cadena y la sustancia portadora, donde la sustancia portadora tiene, por ejemplo, un efecto estabilizador del ARN. Como estabilizadores de ARN se pueden utilizar, por ejemplo, liposomas, que encapsulan las moléculas de ARN.

Además, la presente solicitud también divulga un procedimiento para transmitir o aumentar la resistencia al frío en una célula vegetal o una planta, que comprende la etapa de la aplicación externa del agente descrito anteriormente. Preferiblemente, el agente se mezcla con la envoltura de la semilla o con la película de la semilla o se rocía directamente sobre la semilla o la planta. La presente solicitud describe también el uso del agente descrito anteriormente para transferir o aumentar la resistencia al frío en una célula vegetal o una planta.

En un aspecto, el objetivo subyacente a la invención se resuelve proporcionando una planta de maíz resistente al frío o una parte de la misma que comprende un primer intervalo cromosómico de un donante en el cromosoma 4 entre las posiciones de marcador ma59778s31 y ma59778119, que presenta un ácido nucleico endógeno transmisor de resistencia al frío, donde el ácido nucleico transmisor de resistencia al frío comprende una secuencia de ácido nucleico, seleccionada del grupo que consiste en a) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con una de las SEQ ID NO 29, b) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos 98 %, 99 % o 99,5 % a una secuencia de a), c) una secuencia de ácido nucleico, que según el código genético degenerado, se deriva de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con a), d) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO 30, donde en la posición de marcador ma59778s31 hay una T, en una posición de marcador ma59778s32 una T, en una posición de marcador ma59778119 una C, en una posición de marcador ma52594s01 una A y en una posición de marcador ma20205s01 una G, o donde en una posición de marcador ma59778s31 hay una C, en una posición de marcador ma59778s32 una T, en una posición de marcador ma59778119 una C y en una posición de marcador ma52594s01 una A; y donde las posiciones de los marcadores con referencia a la línea de maíz B73 AGPv2 son las siguientes: ma59778s31 = 37263172 bp, ma59778s32 = 37296672 bp, ma59778119 = 37297901 bp, ma52594s01 = 58033711 bp y ma20205s01 = 156.998.152 bp. En un ejemplo de realización preferente, el intervalo cromosómico en el cromosoma 4, que presenta un ácido nucleico transmisor de resistencia al frío, es un intervalo entre las posiciones de marcador ma59778s32 y ma59778119 y/o el ácido nucleico transmisor de resistencia al frío comprende una secuencia de ácido nucleico, seleccionada del grupo que consiste en a) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO 29, b) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos 98 %, 99 % o 99,5 % a una secuencia de a), c) una secuencia de ácido nucleico que se deriva según el código genético degenerado de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con a), o d) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO 30, preferiblemente la secuencia de ácido nucleico está vinculada a un promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33, o con una variante alélica o una forma modificada de un promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 34, donde la variante alélica o la forma modificada produce una tasa de expresión o altura de expresión como el promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33. Una variante alélica o una forma modificada del promotor significa un promotor que causa una tasa de expresión o una altura de expresión reducida en más del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 % o 50 % en comparación con la tasa de expresión o la altura de expresión generado por el promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 34. Una tasa de expresión o altura de expresión comparable significa que la variante alélica o la forma modificada del promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 34, presenta sustancialmente una tasa de expresión o altura de expresión que difiere en más del 20 %, 18 %, 16 %, 14 % o 12 %, preferentemente no más del 10 %, 9 %, 8 %, 7 % o 6 %, o de manera particularmente preferente no más del 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0 % de la tasa de expresión o la altura de expresión del promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33.

Además, la presencia del al menos un intervalo cromosómico que no proviene del donante en la zona del cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01, significa que, por ejemplo, debido a uno o varios eventos de recombinación en el proceso de cruce con una planta de maíz que no es portadora de los intervalos de donante, se ha sustituido un intervalo de donante correspondiente o intervalos de donante correspondientes por el al menos un intervalo cromosómico, que no proviene del donante. Dicho de otro modo, el intervalo cromosómico que proviene originalmente del donante, flanqueado por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01, está acortado o truncado en donantes.

De forma alternativa, la biotecnología moderna pone a disposición del experto otras herramientas que permiten una ingeniería precisa del genoma: Los enfoques de ingeniería genética, con cuya ayuda las secciones de donante específicas se pueden reemplazar por secciones no donantes y de esta forma se puede reducir o eliminar un «barrido selectivo» en un genoma vegetal, comprenden el uso de nucleasas TALE (TALEN) o nucleasas de dedo de zinc (ZFN), así como sistemas CRISPR/Cas, que se describen, entre otros, a modo de ejemplo, en la solicitud de patente alemana DE 10 2013 014 637 para la eliminación de secuencias de nucleótidos que soportan arrastre de enlace del genoma de maíz (híbrido) resistente a *Helminthosporium turcicum*; véase el documento DE 10 2013 014 637 en las páginas 13 y 14 en los párrafos hasta y las referencias citadas en el mismo. Estas técnicas, que también se describen en la solicitud de patente internacional WO 2014/104878, se pueden usar de manera equivalente en la preparación de las plantas de acuerdo con la presente invención.

La presente invención también incluye además una combinación de la técnica de cultivo convencional y la biotecnología moderna. Así, por ejemplo, con ayuda de estos nuevos enfoques de edición del genoma, se pueden generar «puntos calientes» recombinantes en una planta, que tienen lugar en lugares adecuados para favorecer directamente el intercambio de secciones donantes en la zona en el cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01 por secciones no donantes. Para ello, la presente invención pone a disposición

del experto la información necesaria sobre la localización del «barrido selectivo», así como de la posición del/de los ácido(s) nucleico(s) transmisor(es) de resistencia al frío.

5 En un ejemplo de realización preferente, la planta presenta en la zona del cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01 al menos otro intervalo cromosómico del mismo donante y al menos un intervalo cromosómico que no proviene del donante, donde el al menos otro intervalo cromosómico del mismo donante representa menos del 90 %, menos del 80 %, menos del 70 %, preferentemente menos del 60 %, menos del 50 %, menos del 40 %, o de manera particularmente preferente menos del 30 %, menos del 20 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 2 % o menos del 1 % de la zona en el cromosoma 4 flanqueado por las posiciones de marcador  
10 ma59778119 y ma20205s01, o donde el al menos un intervalo cromosómico que no proviene del donante, representa más del 5 %, más del 10 %, más del 20 %, más del 30 %, preferentemente más del 40 %, más del 50 %, más del 60 %, o de manera particularmente preferente más del 70 %, más del 80 %, más del 90 %, más del 95 %, más del 98 %, o más del 99 % de la zona en el cromosoma 4 flanqueado por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01.

15 En otro ejemplo de realización preferente, la planta presenta en la zona en el cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01 al menos otro intervalo cromosómico del mismo donante y al menos un intervalo cromosómico que no proviene del donante, donde el al menos otro intervalo cromosómico del mismo donante representa menos de 100 Mb, menos de 90 Mb, menos de 80 Mb, preferentemente menos de 70 Mb, menos de 60 Mb, menos de 50 Mb, o de manera particularmente preferente menos de 40 Mb, menos de 30 Mb, menos  
20 de 20 Mb, menos de 15 Mb, menos de 10 Mb o menos de 5 Mb de la zona en el cromosoma 4 flanqueado por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01, o donde el al menos un intervalo cromosómico que no proviene del donante, representa más de 5 Mb, más de 10 Mb, más de 15 Mb, más de 20 Mb, preferentemente más de 30 Mb, más de 40 Mb, más de 50 Mb, o de manera particularmente preferente más de 60 Mb, más de 70 Mb, más de 80 Mb, más de 90 Mb o más de 100 Mb de la zona en el cromosoma 4 flanqueado por las posiciones de marcador  
25 ma59778119 y ma20205s01.

En una forma de realización particularmente preferente, la planta presenta en la zona del cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01 un intervalo cromosómico del mismo donante desde la posición de marcador ma59778119 hasta ma52594s01 y un intervalo cromosómico que no proviene del donante,  
30 desde ma52594s01 hasta ma20205s01.

En otra forma de realización, la zona en el cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01 está caracterizada por que presenta al menos en parte una frecuencia de alelos elevada.

35 Preferiblemente, el intervalo cromosómico entre las posiciones de marcador ma59778s31 y ma59778119 y el intervalo cromosómico entre las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01 está localizado en el cromosoma 4 en el genoma del maíz. El intervalo cromosómico entre las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01 puede contener el centrómero del cromosoma 4.

40 En un ejemplo preferente, el intervalo cromosómico, que presenta un ácido nucleico transmisor de resistencia al frío, es un intervalo cromosómico entre las posiciones de marcador ma59778s32 y ma59778119. En otro ejemplo de realización preferente, el intervalo cromosómico entre las posiciones de marcador ma59778s31 y ma59778119 comprende un intervalo cromosómico flanqueado por posiciones de marcador ma59778s32 y ma59778119. Preferiblemente, el intervalo cromosómico entre las posiciones de marcador ma59778s31 y ma59778119, así como el  
45 ácido nucleico transmisor de resistencia al frío contenido en el mismo, proviene de una línea de maíz del grupo Dent o es característico del grupo Dent, es decir, el experto es capaz de identificar claramente la sección cromosómica como procedente del grupo Dent, por ejemplo, con ayuda de marcadores moleculares.

Una selección de genes con efectos fuertes o intervalos cromosómicos que contengan un gen con efecto fuerte, como  
50 en el intervalo genómico o QTL transmisor de resistencia al frío descrito anteriormente (en particular el gen identificado SAUR31) conduce a un cambio en las frecuencias alélicas. Dependiendo del grado de recombinación y de la intensidad de selección, esta modificación de la frecuencia de alelos no solo afecta a la zona adyacente al gen o al intervalo, sino también a las regiones cromosómicas cercanas. Esto puede conducir a una diversidad genética limitada llamada «barrido selectivo». Para un experto en el campo del cultivo de plantas, este «barrido selectivo» es extraordinariamente  
55 desventajoso, ya que el material vegetal generado ya no puede desplegar su potencial original durante el procesamiento posterior del cultivo. El empobrecimiento genético hace que el enfoque clásico del cultivo de la nueva recombinación y la selección sea inútil. Esto se ilustra en la figura 5. La imagen muestra una diversidad genética significativamente reducida en el grupo de genes Dent en comparación con el grupo de genes Flint en la zona del QTL transmisor de resistencia al frío, que comprende, por ejemplo, el gen AUR31. Todos los ORF del QTL que se  
60 encuentran en este documento y los genes correspondientes provienen del grupo de genes Dent. El cruce incontrolado del QTL transmisor de resistencia al frío en otro fondo genético (por ejemplo, el grupo Flint) también conduciría a una disminución drástica en las frecuencias alélicas en este grupo. En el marco de la invención se hizo evidente que el entrecruzamiento del intervalo cromosómico entre las posiciones de marcador ma59778s31 y ma59778119, que  
65 presenta un ácido nucleico transmisor de resistencia al frío, conduciría en cualquier caso, sin contramedidas adecuadas, a una clara reducción de la frecuencia alélica en el cromosoma 4. La transferencia del QTL identificado o del ácido nucleico transmisor de la resistencia al frío identificado sin una reducción de la diversidad del material de

cultivo planteó un enorme desafío y, en última instancia, se pudo abordar mediante un mapeo fino de la zona basado en marcadores muy costoso. En este contexto, también se requirió la identificación de los polimorfismos de nucleótido único (SNPs; secuencia de SNPs = haplotipo) en el intervalo cromosómico y zonas adyacentes. Sin embargo, mediante la identificación del haplotipo TH equipado con una mayor resistencia al frío y el desarrollo de nuevos marcadores, de acuerdo con la invención, fue posible de forma sorprendente, mediante la aplicación de marcadores moleculares recientemente desarrollados para una selección asistida por marcadores, cruzar el intervalo cromosómico correspondiente descrito anteriormente con el ácido nucleico transmisor de resistencia al frío dentro de un intervalo fuertemente delimitado. Las plantas generadas de esta manera mostraron una mayor resistencia al frío y al mismo tiempo, conservaron en gran medida la diversidad genética. De líneas de cultivo conocidas, como B73, por ejemplo, no se pudo deducir una solución al problema del barrido selectivo debido a la diferente estructura de la región.

Un aumento de la frecuencia alélica «al menos en partes» significa, por ejemplo, que la zona en el cromosoma 4, flanqueada por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01, presenta en un intervalo de al menos 5 megabases (Mb), al menos 10 Mb, al menos 15 Mb, al menos 20 Mb o al menos 25 Mb, preferentemente al menos 30 Mb, al menos 40 Mb, al menos 50 Mb o al menos 60 Mb, o de manera particularmente preferente al menos 70 Mb, al menos 80 Mb, al menos 90 Mb o al menos 100 Mb, un aumento de la frecuencia de alelos. Además, un aumento de la frecuencia alélica «al menos en partes» puede significar que la zona en el cromosoma 4, flanqueada por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01 en una zona de al menos 1 Mb, al menos 2 Mb, al menos 3 Mb, al menos 4 Mb o al menos 5 Mb, preferentemente al menos 10 Mb, al menos 15 Mb, al menos 20 Mb o al menos 25 Mb, o de manera particularmente preferente al menos 30 Mb, al menos 35 Mb, al menos 40 Mb o al menos 50 Mb a ambos lados del centrómero preferentemente del cromosoma 4, presenta un aumento de la frecuencia alélica.

Un «aumento de la frecuencia alélica» significa, por ejemplo, una desviación de la frecuencia alélica de 0,5 en no más de 0,4, 0,375 o 0,35, preferentemente no más de 0,325, 0,3 o 0,275, o de forma particularmente preferente no más de 0,25. Además, un «aumento de la frecuencia alélica» también puede significar que la frecuencia alélica no es inferior a 0,1, 0,125 o 0,15, preferentemente no inferior a 0,175, 0,2 o 0,225, o de manera particularmente preferente no inferior a 0,25. Además, un «aumento de la frecuencia alélica» puede significar que al menos el 10 %, 15 % o 20 %, preferentemente el 25 %, 30 % o 40 % o de manera particularmente preferente el 45 % o 50 % de una sección cromosómica proviene del grupo Flint. Por el contrario, una «baja frecuencia alélica» significa una desviación de la frecuencia alélica de 0,5 a más de 0,4 o 0,425. Además, una «frecuencia alélica baja» también puede significar que la frecuencia alélica es inferior a 0,1 o 0,075. Además, una «frecuencia alélica baja» también puede significar que menos del 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % de una sección cromosómica proviene del grupo Flint. En el contexto de la presente invención, un «aumento de la frecuencia alélica» también puede significar que el intervalo cromosómico que debe presentar el aumento de la frecuencia alélica, preferentemente proximal o distal al ácido nucleico transmisor de resistencia al frío, está truncado o acortado, por ejemplo, en al menos 5 megabases (Mb), al menos 10 Mb, al menos 15 Mb, al menos 20 Mb o al menos 25 Mb, preferentemente al menos 30 Mb, al menos 40 Mb, al menos 50 Mb o al menos 60 Mb, o de manera particularmente preferente al menos 70 Mb, al menos 80 Mb, al menos 90 Mb o al menos 100 Mb.

En otro aspecto, la presente solicitud divulga marcadores moleculares que son adecuados para distinguir entre un haplotipo resistente al frío y un haplotipo sensible al frío en un intervalo cromosómico flanqueado por las posiciones de marcador ma59778s31 y ma20205s01 o por las posiciones de marcador ma59778s31 y ma52594s01 o por las posiciones de marcador ma59778s31 y ma59778119. Preferentemente, el haplotipo resistente al frío corresponde a la línea TH con un haplotipo de acuerdo con la tabla 2, y/o el haplotipo sensible al frío a la línea SL con un haplotipo de acuerdo con la tabla 2. En el caso de un marcador molecular de la presente invención puede tratarse, por ejemplo, de un marcador molecular, que es adecuado en una de las posiciones de marcador ma59778s31, ma59778s32, ma59778119, ma52594s01 y ma20205s01 para distinguir entre un haplotipo resistente al frío y un haplotipo sensible al frío. Un marcador molecular puede ser un oligonucleótido, en particular un oligonucleótido cebador, o se puede presentar en forma aislada. En una forma de realización particularmente preferente, el marcador molecular de la presente invención solo o en combinación con otros marcadores moleculares, es adecuado para detectar el ácido nucleico transmisor de resistencia al frío. Además, la presente solicitud describe el uso de al menos uno de los marcadores moleculares de la presente invención para identificar o seleccionar una planta de maíz resistente al frío de acuerdo con la invención o una parte de la misma.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para identificar una planta de maíz resistente al frío o partes de la misma descritas anteriormente de acuerdo con la invención, que comprende las etapas A) aislar el ADN del genoma de una planta de maíz, y B) detectar los alelos en las posiciones de marcador ma59778s31, ma59778s32 y ma59778119, que es de diagnóstico para el ácido nucleico transmisor de resistencia al frío, en un intervalo cromosómico flanqueado por las posiciones de marcador ma59778s31 y ma59778119, donde en la posición de marcador ma59778s31 hay una T, en la posición de marcador ma59778s32 una T y en la posición de marcador ma59778119 una C, o donde en la posición de marcador ma59778s31 hay una C, en la posición de marcador ma59778s32 una T y en la posición de marcador ma59778119 una C, opcionalmente ampliada por una etapa C) detección de al menos un intervalo cromosómico que no proviene del donante, o de una

frecuencia alélica aumentada al menos en partes en un intervalo cromosómico flanqueado por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01 o por las posiciones de marcador ma59778119 y ma52594s01.

Preferiblemente, el alelo de la etapa B) se encuentra en un intervalo cromosómico flanqueado por las posiciones de marcador ma59778s31 y ma59778119 o ma59778s32 y ma59778119. En una forma de realización particularmente preferente, el alelo de la etapa B) es de diagnóstico para el ácido nucleico transmisor de resistencia al frío. Diagnóstico significa que el alelo está directamente en el ácido nucleico transmisor de resistencia al frío o es el ácido nucleico transmisor de resistencia al frío, o está estrechamente acoplado al ácido nucleico transmisor de resistencia al frío.

En otra forma de realización particularmente preferente, en la etapa B) se detecta adicionalmente a un primer alelo también un segundo alelo, donde el uno de los alelos y el segundo alelo representan posiciones de marcador que flanquean un intervalo cromosómico que comprende el ácido nucleico transmisor de resistencia al frío. En este caso se encuentra preferentemente el primer alelo distal al ácido nucleico transmisor de resistencia al frío, preferentemente en un intervalo cromosómico entre ma11840s01 y ma59778s31 o ma11840s01 y ma59778s32, y el segundo alelo proximal al ácido nucleico transmisor de resistencia al frío, preferentemente en un intervalo cromosómico entre ma59778119 y ma20205s01 o ma59778119 y ma52594s01.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para la selección de una planta de maíz resistente al frío de acuerdo con la invención o partes de la misma descrita anteriormente, que comprende el procedimiento descrito anteriormente para la identificación de una planta de maíz resistente al frío de acuerdo con la invención o partes de la misma descrita anteriormente, ampliado con otra etapa de la selección de la planta de maíz resistente al frío o partes de la misma en base a las pruebas de la etapa B) y opcionalmente de la etapa C).

Otro aspecto describe un procedimiento para la producción de una planta de maíz de acuerdo con la invención, que comprende una primera etapa del cruzamiento de dos plantas de maíz, donde una planta de maíz es una planta de maíz resistente al frío que comprende un primer intervalo cromosómico entre las posiciones de marcador ma59778s31 y ma59778119, que presenta un ácido nucleico transmisor de resistencia al frío, y otro intervalo cromosómico flanqueado por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01, que proviene al menos en partes del mismo donante que el primer intervalo cromosómico, y/o al menos en partes presenta una frecuencia alélica baja, y como segunda etapa el procedimiento descrito anteriormente para la selección de una planta de maíz resistente al frío de acuerdo con la invención de los descendientes del cruzamiento de la primera etapa. Preferiblemente, el ácido nucleico transmisor de resistencia al frío comprende una o varias secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en a) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con una de las SEQ ID NO 29, 3, 7, 11, 15, 25 o 35, b) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos 98 %, 99 % o 99,5 % a una secuencia de a) o b), c) una secuencia de ácido nucleico que se deriva según el código genético degenerado de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con a), d) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO 30, 4, 8, 12, 16 o 26 o un homólogo, análogo u ortólogo de la misma. En un ejemplo de realización preferente, el intervalo cromosómico en el cromosoma 4, que presenta un ácido nucleico transmisor de resistencia al frío, es un intervalo entre las posiciones de marcador ma59778s32 y ma59778119 y/o el ácido nucleico transmisor de resistencia al frío comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en a) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO 29, b) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 98 %, 99 % o 99,5 % idéntica a una secuencia de a), c) una secuencia de ácido nucleico que, según el código genético degenerado, se deriva de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con a), o d) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO 30 o un homólogo, análogo u ortólogo de la misma, preferentemente la secuencia de ácido nucleico está operativamente vinculada a un promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33, o con una variante alélica o una forma modificada de un promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 34, donde la variante alélica o la forma modificada produce una tasa de expresión o altura de expresión como el promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33. Una variante alélica o una forma modificada del promotor significa un promotor que causa una tasa de expresión o una altura de expresión reducida en más del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 % o 50 % en comparación con la tasa de expresión o la altura de expresión generado por el promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 34. Una tasa de expresión o altura de expresión comparable significa que la variante alélica o la forma modificada del promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 34, presenta sustancialmente una tasa de expresión o altura de expresión que difiere en más del 20 %, 18 %, 16 %, 14 % o 12 %, preferentemente no más del 10 %, 9 %, 8 %, 7 % o 6 %, o de manera particularmente preferente no más del 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0 % de la tasa de expresión o la altura de expresión del promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33.

Un aspecto adicional de la presente solicitud divulga un procedimiento para aumentar el rendimiento de plantas o plantas de maíz, que comprende el cultivo de plantas transgénicas resistentes al frío descritas anteriormente, plantas mutantes resistentes al frío o plantas de maíz resistentes al frío de acuerdo con la invención, así como la cosecha de un aumento del rendimiento. Las plantas en crecimiento disponen de un aumento de la resistencia al frío, que les permite crecer más rápidamente en anchuras moderadas durante una fase de estrés por frío que una planta de genotipos comparables que no contiene ácido nucleico de acuerdo con la invención en su genoma. Esto conduce a que, en el momento de la cosecha, las plantas transgénicas resistentes al frío descritas anteriormente, las plantas mutantes resistentes al frío o las plantas de maíz resistentes al frío de acuerdo con la invención presenten un aumento del rendimiento.

En otro aspecto adicional, la presente solicitud describe un procedimiento para reducir el uso de herbicidas en el cultivo

de plantas o plantas de maíz, en particular durante el desarrollo temprano de las plantas o plantas de maíz, que comprende el cultivo de plantas transgénicas resistentes al frío descritas anteriormente, plantas mutantes resistentes al frío o plantas de maíz resistentes al frío de acuerdo con la invención. Las plantas en crecimiento disponen de un aumento de la resistencia al frío, que les permite crecer más rápidamente en anchuras moderadas durante una fase de estrés por frío que una planta de genotipos comparables que no contiene ácido nucleico de acuerdo con la invención en su genoma. Como resultado, las plantas son competitivas frente a las malezas en crecimiento/vegetación extraña. Preferiblemente, las plantas cultivadas disponen adicionalmente resistencia a los herbicidas.

Algunos de los términos usados en esta solicitud se explican con más detalle a continuación:

Por «hibridar» o «hibridación» se entiende un proceso en el que una molécula de ácido nucleico de una sola cadena se adhiere a una cadena de ácido nucleico en gran medida complementaria, es decir, entra en apareamiento de bases. Los procedimientos estándar para la hibridación se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. 2001. Preferiblemente se entiende por ello, que al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 % o el 85 %, de manera particularmente preferente el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de las bases de la molécula de ácido nucleico entran en un apareamiento de bases con la cadena de ácido nucleico en su mayor parte complementaria. La posibilidad de una acumulación de este tipo depende de la astringencia de las condiciones de hibridación. El término «astringencia» se refiere a las condiciones de hibridación. Una astringencia alta se da cuando el apareamiento de bases es difícil, una astringencia baja se da cuando el apareamiento de bases es más fácil. La astringencia de las condiciones de hibridación depende, por ejemplo, de la concentración de sal o fuerza iónica y de la temperatura. En general, la astringencia se puede aumentar aumentando la temperatura y/o disminuyendo el contenido de sal. Por «condiciones de hibridación astringentes» se entienden aquellas condiciones en las que la hibridación tiene lugar predominantemente solo entre moléculas de ácido nucleico homólogas. En este sentido, el término «condiciones de hibridación» se refiere no solo a las condiciones que prevalecen en la acumulación real de los ácidos nucleicos, sino también a las condiciones que prevalecen en las etapas de lavado posteriores. Las condiciones de hibridación astringentes son, por ejemplo, condiciones en las que hibridan predominantemente solo aquellas moléculas de ácido nucleico que presentan al menos 70 %, preferiblemente al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia. Condiciones de hibridación astringentes son, por ejemplo: Hibridar en 4 x SSC a 65 °C y a continuación lavar varias veces en 0,1 3 SSC a 65 °C durante un total de aproximadamente 1 hora. El término «condiciones de hibridación astringentes» usado aquí también puede significar: Hibridación a 68 °C en 0,25 M de fosfato de sodio, pH 7,2, 7 % de SDS, 1 mM de EDTA y 1 % de BSA durante 16 horas, y a continuación dos lavados con 2 x SSC y 0,1 % de SDS a 68 °C. Preferentemente, la hibridación tiene lugar en condiciones astringentes.

En el sentido de la invención, por un «homólogo» se entiende una proteína de origen filogenético similar, por un «análogo» se entiende una proteína que ejerce la misma función, pero tiene un origen filogenético diferente, y por un «ortólogo» se entiende una proteína de otra especie que ejerce la misma función.

Una «planta» en el sentido de la invención, puede ser, a menos que se indique lo contrario, cualquier especie de las plantas dicotiledóneas, monocotiledóneas y gimnospermas. Entre ellas se encuentran, por ejemplo *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor*, *Secale cereale*, *Triticale*, *Saccharum officinarum*, *Zea mays*, *Setaria italic*, *Oryza sativa*, *Oryza minuta*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Hordeum bulbosum*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum marinum*, *Aegilops tauschii*, *Beta vulgaris*, *Helianthus annuus*, *Daucus glochidiatus*, *Daucus pusillus*, *Daucus muricatus*, *Daucus carota*, *Eucalyptus grandis*, *Erythranthe guttata*, *Genlisea aurea*, *Gossypium sp.*, *Musa sp.*, *Avena sp.*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Coffea canephora*, *Vitis vinifera*, *Cucumis sativus*, *Morus notabilis*, *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis arenosa*, *Crucihimalaya himalaica*, *Crucihimalaya wallichii*, *Cardamine flexuosa*, *Lepidium virginicum*, *Capsella bursa-pastoris*, *Olmarabidopsis pumila*, *Arabis hirsuta*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Brassica juncacea*, *Brassica nigra*, *Raphanus sativus*, *Eruca vesicaria sativa*, *Citrus sinensis*, *Jatropha curcas*, *Glycine max* y *Populus trichocarpa*. Una planta de acuerdo con la invención es preferiblemente una planta del género *Zea*, en particular de la especie *Zea mays* o sorgo.

«Vinculado operativamente» significa unido en una molécula de ácido nucleico común, de modo que los elementos unidos estén posicionados y orientados entre sí de modo que pueda tener lugar una transcripción de la molécula de ácido nucleico. Un ADN que está operativamente vinculado a un promotor está bajo el control transcripcional de ese promotor.

Los «órganos» vegetales se refieren, por ejemplo, a las hojas, el eje del tallo, el tronco, las raíces, los brotes vegetativos, los meristemos, los embriones, las anteras, los óvulos o las frutas. Las «partes» vegetales se refieren a una unión de varios órganos, por ejemplo, una flor o una semilla, o una parte de un órgano, por ejemplo, una sección transversal del eje del tallo. Los «tejidos» vegetales son, por ejemplo, tejido de callo, tejido de almacenamiento, tejido meristemático, tejido foliar, tejido de tallo, tejido de raíz, tejido de tumor de planta o tejido reproductivo. Por «células» vegetales se entienden, por ejemplo, células aisladas con una pared celular o agregados de las mismas o protoplastos.

Un «fragmento funcional» de una secuencia de nucleótidos se refiere a una sección de una secuencia de nucleótidos que presenta la funcionalidad idéntica o comparable a la secuencia total de nucleótidos de la que proviene el fragmento

funcional. Como tal, el fragmento funcional puede tener una secuencia de nucleótidos que es idéntica o homogénea a la secuencia total de nucleótidos a lo largo de una longitud de al menos el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 92 %, el 94 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %. Además, un «fragmento funcional» de una secuencia de nucleótidos se puede referir también a una sección de una secuencia de nucleótidos, que modifica la funcionalidad de la secuencia total de nucleótidos, por ejemplo, en el curso del silenciamiento génico postranscripcional o transcripcional. Como tal, el fragmento funcional de una secuencia de nucleótidos puede comprender al menos 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25, preferentemente al menos 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 o 140, de manera particularmente preferente al menos 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos consecutivos de la secuencia total de nucleótidos.

El término «heterológico» significa que el polinucleótido introducido proviene, por ejemplo, de una célula u organismo con un fondo genético diferente de la misma especie u otra especie, o es homólogo a la célula huésped procarionota o eucariota, pero luego se localiza en un entorno genético diferente y de esa forma difiere de un eventual polinucleótido correspondiente que existe naturalmente. Un polinucleótido heterológico puede estar presente además de un gen endógeno correspondiente.

En relación con la presente invención, el término «secuencia reguladora» se refiere a una secuencia de nucleótidos que influye en la especificidad y/o la fuerza de expresión, por ejemplo, porque la secuencia reguladora transmite una especificidad de tejido determinada. Una secuencia reguladora de este tipo puede estar localizada corriente arriba del punto de iniciación de la transcripción de un promotor mínimo, pero también corriente abajo del mismo, como por ejemplo en una secuencia líder transcrita pero no traducida, o dentro de un intrón.

El término «intervalo cromosómico» se refiere a una sección lineal continua en un ADN genómico, que está presente en un solo cromosoma en la planta o en un fragmento de cromosoma. Si el intervalo cromosómico se define mediante la indicación de dos posiciones de marcador en los flancos, las mismas representan los puntos finales del intervalo hacia el lado distal y proximal. A este respecto, las posiciones de marcador que definen el intervalo de forma definitiva también pueden ser parte del intervalo. En la descripción también se especifica un intervalo mediante la indicación «entre la posición del marcador A y la posición del marcador B». A continuación, el intervalo cromosómico representa una sección continua de ADN lineal que se localiza entre las posiciones especificadas del marcador. Las posiciones de los marcadores no son los puntos finales del intervalo hacia el lado distal y proximal. Las posiciones de marcador especificadas no forman parte del intervalo.

El término «alelo» se refiere a una de dos o más secuencias de nucleótidos en un locus particular en el genoma. Un primer alelo se encuentra en un cromosoma, un segundo en un segundo cromosoma en la misma posición. Si los dos alelos difieren, son heterocigotos; si son los mismos alelos, son homocigotos. Diferentes alelos de un gen (alelos genéricos) difieren en al menos un SNP. Dependiendo del contexto de la descripción, un alelo también significa un solo SNP, que permite, por ejemplo, distinguir entre dos haplotipos. Una planta de maíz es una planta de la especie *Zea mays* así como sus subespecies, como por ejemplo, *Zea mays* ssp. *mays*, *Zea mays* ssp. *mexicana* o *Zea mays* ssp. *parviglumis*.

Un «marcador» o «marcador molecular» es una secuencia de nucleótidos que se usa como punto de referencia u orientación. Un marcador para reconocer un evento de recombinación debe ser adecuado para monitorear las diferencias o polimorfismos dentro de una población vegetal. Para los marcadores, estas diferencias se encuentran a nivel de ADN y son, por ejemplo, diferencias de secuencia de polinucleótidos, como por ejemplo, SSR (repeticiones de secuencia simple), RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), FLP (polimorfismos de longitud de fragmentos) o SNP (polimorfismos de un solo nucleótido). Los marcadores se pueden derivar de ácidos nucleicos genómicos o expresados, como por ejemplo, ARN empalmado, ADNc o ESTs, y también se pueden referir a ácidos nucleicos que se utilizan como sondas o pares de cebadores y como tales, son adecuados para amplificar un fragmento de secuencia utilizando procedimientos basados en PCR. Los marcadores que afectan a los polimorfismos genéticos entre partes de una población, se pueden detectar mediante procedimientos establecidos a partir del estado de la técnica (An Introduction to Genetic Analysis. 7.ª edición, Griffiths, Miller, Suzuki et al., 2000). Estos incluyen, por ejemplo: Secuenciación de ADN, amplificación específica de secuencia basada en PCR, detección de RFLP, detección de polimorfismos de polinucleótidos mediante hibridación específica de alelos (ASH), detección de SSR, SNP o AFLP. Además, también se conocen procedimientos para la detección de EST (marcadores de secuencia expresada) y RAPD (ADN polimórfico amplificado aleatoriamente). Dependiendo del contexto, el término marcador en la descripción también se puede referir a una posición específica del cromosoma en el genoma de una especie, donde se puede encontrar un marcador específico (por ejemplo, SNP). Dicha posición de marcador se puede utilizar para rastrear la presencia de un locus acoplado, por ejemplo, un locus acoplado que contribuye a la expresión de una característica fenotípica específica. Por ejemplo, el locus marcador también se puede utilizar para observar la segregación de alelos en un locus (QTL o genes individuales) que están estrechamente acoplados genética o físicamente con la posición del marcador.

La presente invención se explicará a continuación en los ejemplos con referencia a las figuras, pero sin limitarse a las mismas. En las figuras muestra

figura 1: La secuencia esquemática de los genes candidatos en la zona entre las posiciones de marcador

ma59778s31 y ma59778119 en comparación con SL, TH y B73 AGPv02. Marco continuo: gen anotado; marco punteado: Información de mapeo basado en marcadores; las zonas en las que existe polimorfismo genético entre las líneas SL y TH son: ORF-SL-01/ORF-TH-01, ORF-SL-02/ORF-TH-02, región SL-13a/región TH-13a, región SL-13b/región TH-13b, ORF-SL-05, ORF-SL-06, región SL-11/ORF-TH-11, ORF-SL-12/región TH-12, región SL-06/región TH-06, ORF-SL-09/ORF-TH-09 y región SL-07/región-TH- 07; las puntas de flecha indican la dirección de 5'-3', dependiendo de en qué cadena de ADN se encuentra el gen correspondiente; SL: genotipo sensible al frío; TH: genotipo resistente al frío; B73: la línea de maíz cuyo genoma ha sido secuenciado y que el experto en cultivo de maíz usa como genoma de referencia. Con ayuda de los datos B73 es posible indicar, además de la posición del gen candidato basada en marcadores, también su posición relativa (con respecto al genoma de referencia B73).

figura 2: Efectos de marcador aditivo (media diferencia entre los valores medios de las dos características homocigóticas del marcador) para las características fenotípicas de altura temprana de la planta y follaje de las plantas recombinantes estudiadas después del estrés por frío en experimentos en campo (izquierda) y cámara climática (derecha). La longitud de una barra detrás de la designación de la posición de marcador refleja la magnitud de la influencia de la genética en la expresión de dichos rasgos después del estrés por frío. En consecuencia, las posiciones de los marcadores ma59778s32, ma59778116 y ma59778119 determinan en gran medida si una planta es resistente al frío. Los valores de medición y los cálculos de la figura 2 se pueden tomar de la tabla 5.

La figura 3 muestra en la zona superior (A) la representación esquemática del cromosoma núm. 4 de *Zea mays* con un total de aproximadamente 225 megabases. La ubicación del centrómero y cuatro posiciones de marcadores importantes con nombres están claramente identificados. En la zona inferior (B) se muestra un fragmento ampliado alrededor del marcador Zm4-5, en el que también se encuentra el gen SAUR31. Se trata de un mapeo fino que muestra con gran precisión la posición de SAUR31 mediante tres posiciones de marcador. SAUR31 está flanqueado por los dos marcadores ma59778s32 y ma59778119.

La figura 4 muestra los valores medios de la característica de altura de crecimiento de las plantas con la mutación en la zona de 5'UTR antes del gen SAUR31 en comparación con la media de la línea de partida no mutagenizada. Se representan dos momentos de medición diferentes (dos niveles diferentes del desarrollo de la planta): La medición representada a la izquierda se realizó 50 días después de la siembra y la segunda medición representada a la derecha se realizó 27 días después de la primera medición representada a la izquierda. La germinación del campo tuvo lugar en condiciones frescas de primavera y ambas mediciones se realizaron antes de la floración del maíz. Los datos verifican la importancia de SAUR31 en la expresión fenotípica de la característica de resistencia al frío.

La figura 5 muestra el grado de diversidad genética basado en las frecuencias alélicas en el grupo de genes Dent (línea inferior) y en el grupo de genes Flint (línea superior) en el cromosoma 4. La diversidad genética máxima está presente a una frecuencia alélica de 0,5. Los valores 0,0 y 1,0 representan a Extrama, que hablan de la fijación completa de un fondo genético determinado sin ninguna variabilidad. Como se puede ver en la imagen, en el grupo de genes Dent se encuentra una clara fijación genética en comparación con el grupo de genes Flint, en particular adyacente a la zona del QTL transmisor que contiene el gen SAUR31.

La figura 6 muestra la expresión relativa del gen SAUR31 en líneas sensibles al frío y resistentes al frío. Las plantas se cultivaron durante dos semanas a temperaturas de 22 °C/25 °C y a continuación se sometieron a un estrés por frío de 6 °C/8 °C durante 24 horas. Al comienzo del tratamiento frío (0 h), así como después de 4 h y 24 h, las partes aéreas de ocho plantas se usaron para el aislamiento de ARN. El ARN se estudió mediante RT-PCR. Los ensayos se realizaron dos veces y ambos resultados se representan como dos barras adyacentes. Todos los valores se estandarizaron al valor SL 0h, que se definió como 1.

SEQ ID NO: 1 al 35 muestran:

SEQ ID NO: 1 marco de lectura abierto ORF-SL-01 de la línea SL

SEQ ID NO: 2 el de la SEQ ID NO: 1 proteína codificada

SEQ ID NO: 3 marco de lectura abierto ORF-TH-01 de la línea TH

SEQ ID NO: 4 el de la SEQ ID NO: 3 proteína codificada

SEQ ID NO: 5 marco de lectura abierto ORF-SL-02 de la línea SL

SEQ ID NO: 6 el de la SEQ ID NO: 5 proteína codificada

SEQ ID NO: 7 marco de lectura abierto ORF-TH-02 de la línea TH

SEQ ID NO: 8 el de la SEQ ID NO: 7 proteína codificada

SEQ ID NO: 9 marco de lectura abierto ORF-SL-03 de la línea SL

SEQ ID NO: 10 el de la SEQ ID NO: 9 proteína codificada

- SEQ ID NO: 11 marco de lectura abierto ORF-TH-03 de la línea TH
- 5 SEQ ID NO: 12 el de la SEQ ID NO: 11 proteína codificada
- SEQ ID NO: 13 marco de lectura abierto ORF-SL-04 de la línea SL
- SEQ ID NO: 14 el de la SEQ ID NO: 13 proteína codificada
- 10 SEQ ID NO: 15 marco de lectura abierto ORF-TH-04 de la línea TH
- SEQ ID NO: 16 el de la SEQ ID NO: 15 proteína codificada
- SEQ ID NO: 17 marco de lectura abierto ORF-SL-05 de la línea SL
- 15 SEQ ID NO: 18 el de la SEQ ID NO: 17 proteína codificada
- SEQ ID NO: 19 marco de lectura abierto ORF-SL-06 de la línea SL
- 20 SEQ ID NO: 20 el de la SEQ ID NO: 19 proteína codificada
- SEQ ID NO: 21 marco de lectura abierto ORF-SL-12 de la línea SL
- SEQ ID NO: 22 el de la SEQ ID NO: 21 proteína codificada
- 25 SEQ ID NO 23 marco de lectura abierto ORF-SL-08 de la línea SL
- SEQ ID NO: 24 el de la SEQ ID NO: 23 proteína codificada
- 30 SEQ ID NO: 25 marco de lectura abierto ORF-TH-08 de la línea TH, que es idéntico a ORF-SL-08 de la línea SL
- SEQ ID NO: 26 el de la SEQ ID NO: 25 proteína codificada
- SEQ ID NO: 27 marco de lectura abierto ORF-SL-09 de la línea SL, que corresponde al gen SAUR 31.
- 35 SEQ ID NO: 28 el de la SEQ ID NO: 27 proteína codificada
- SEQ ID NO: 29 marco de lectura abierto ORF-TH-09 de la línea TH, que corresponde al gen SAUR 31, donde el gen está presente en una variación alélica, que está muy presente en la manifestación de la resistencia al frío.
- 40 SEQ ID NO: 30 el de la SEQ ID NO: 29 proteína codificada
- SEQ ID NO: 31 marco de lectura abierto ORF-B73-09 de la línea de referencia del genoma de maíz B73, que corresponde al gen SAUR 31.
- 45 SEQ ID NO: 32 el de la SEQ ID NO: 31 proteína codificada
- SEQ ID NO: 33 zona promotora del gen AUR31 correspondiente a la variación alélica ORF-TH-09, donde la zona promotora está presente en una variación alélica, que está muy presente en la manifestación de la resistencia al frío.
- 50 SEQ ID NO: 34 zona del promotor del gen SAUR31 correspondiente a la variación alélica ORF-SL-09 SEQ ID NO: 35 marco de lectura abierto ORF-TH-11 de la línea TH SEQ ID NO: 36 cebador
- SEQ ID NO: 37 cebador
- 55 SEQ ID NO: 38 versión mutada de SAUR31 con intercambio de base de adenina por una guanina en la posición -25 (relativa al inicio de la traducción), la hebra codogénica se muestra en la dirección 5' a 3'
- 60 Ejemplos:
- Se realizó un estudio de mapeo QTL en una población de mapeo biparental de las líneas endogámicas SL y TH. La línea endogámica SL es sensible a las temperaturas frías durante el desarrollo temprano de la planta en el campo, mientras que la TH es la línea parental resistente.
- 65 Se realizaron experimentos de campo con 720 líneas de DH (dobles haploides) en 8 sitios (Presterl et al., 2007). Las líneas 720 DH se genotipificaron con 188 marcadores SSR en todo el genoma. Se realizó un fenotipado del desarrollo

de las plantas en un estadio temprano (de seis a ocho hojas completamente desarrolladas), y se determinó el rendimiento total del material vegetal fresco y el número de plantas como una medida de la resistencia al frío en el campo.

- 5 El mapa QTL se calculó en el nivel de la línea *per se* y cruzamientos de prueba. Como resultado, se pudieron determinar 7 regiones QTL en 6 cromosomas, donde el QTL más fuerte se detectó en el cromosoma 4 en un intervalo de 4 cM con el 33,7 % de la varianza del fenotipo explicado. En el primer mapeo QTL, solo 3 marcadores SSR cubrieron la región del genoma (Presterl et al. 2007). En el mapa físico B73 AGPv01, esta región incluye 155 Mb. El mapeo de QTL se verificó más tarde en esta población. Se llevó a cabo un mapeo más detallado de esta región. Se desarrollaron 10 23 marcadores para la región QTL y líneas near isogenic (NIL) para la región QTL grande, y más plantas recombinantes derivadas de cruzamientos entre NIL y los padres SL sensibles fueron genotipadas para desarrollar NIL con segmentos cromosómicos más pequeños. Dos marcadores polimórficos en los flancos de la región QTL se pudieron mapear a 36,7 Mb (Zm4-5) y 156,4 Mb (Zm4-6) en el mapa físico de B73 AGPv01 (véase la figura 3). Los marcadores recién desarrollados se pudieron mapear a 37,1 Mb. Los nuevos marcadores redujeron la región QTL a 15 119,7 Mb, pero debido a la baja frecuencia de recombinación en esta región (región pericentromérica) y la insuficiencia de recursos genómicos, no se pudo determinar un intervalo más pequeño (Baliashvili, 2011).

- Se estableció una prueba fenotípica para determinar la sensibilidad al frío, donde las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento durante 14 días (etapa de tres hojas) durante el día a 25 °C y a 22 °C durante la noche. A 20 continuación, la temperatura se redujo a 8 °C durante el día y a 6 °C durante la noche durante una semana. El rendimiento a 25 °C durante el día y 22 °C durante la noche después del tratamiento por frío produce una lesión clorótica en las hojas cuarta y quinta si la planta es sensible al tratamiento por frío (línea SL). Las plantas resistentes permanecen verdes (línea TH).

- 25 Análisis molecular y recursos genómicos: Para enriquecer la región QTL con los nuevos marcadores moleculares, se han generado nuevos recursos genómicos. De esta forma, un enfoque de captura de secuencia con las líneas SL, TH y la línea NIL TH-N4-32 reveló 28 nuevos marcadores SNP polimórficos en comparación entre SL y TH. También se crearon secuencias BAC de dos bibliotecas BAC que descendían de una línea que llevaba el alelo SL sensible en el QTL y una línea que llevaba el alelo TH resistente en el QTL. Se realizó el cribado de la biblioteca BAC, la 30 secuenciación y la construcción de armazones. Las bibliotecas BAC han sido examinadas con los marcadores conocidos de la región QTL en ambas bibliotecas. Tres clones BAC de las bibliotecas SL-BAC y cuatro clones BAC de las bibliotecas TH-BAC se secuenciaron con tres técnicas diferentes de próxima generación. Para la armazón SL-BAC, se pudo ensamblar un tamaño total de 284 kb y para la armazón TH-BAC, un tamaño total de 356 kb, con ambas comprendiendo la región diana entre ma59778s31 y ma59778119, incluidas las regiones en los flancos. La ausencia 35 de marcadores polimórficos hacia el centrómero se pudo confirmar mediante la comparación de las secuencias BAC de ambas bibliotecas. Detrás de 38729663 bp en la tarjeta B73 AGPv02, no se pudo detectar ningún polimorfismo entre las dos líneas. En la posición 37297901 bp se pudo establecer como último marcador funcional ma59778119. Este marcador permite la determinación de 3' de la región QTL, ya que desde la posición 38729663 no se observaron más polimorfismos entre SL y TH. Sin estos marcadores no habría sido posible identificar introgresiones tan pequeñas 40 como 35 kb (de los marcadores ma59778s31 a ma59778119) (véase la figura 3).

- Identificación de los genes candidatos: Los armazones BAC de ambas bibliotecas BAC han sido anotados. Se asignaron regiones/genes candidatos cuando estaban en consonancia con los resultados del cribado recombinante, su anotación funcional, los resultados de los análisis de expresión y si mostraban polimorfismos entre las líneas SL y 45 TH. Un total de nueve marcos de lectura abiertos (ORFs) se pudieron anotar en el armazón SL-BAC y siete ORF se pudieron anotar en el armazón TH-BAC entre ma59778s31 y 7202707. Se pudieron detectar ORF, donde la mayoría codificó para elementos transponibles completos o acortados (tablas 1a a c). Es conocido que elementos de este tipo, cuando se encuentran cerca de los genes, pueden influir en su expresión (Butelli, Eugenio, et al. «Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges». The Plant Cell 24.3 (2012): 50 1242-1255; Meihls, Lisa N., et al. «Natural variation in maize aphid resistance is associated with 2, 4-dihidroxi-7-metoxi-1, 4-benzoxazin-3-one glucoside me- thyltransferase activity». The Plant Cell 25.6 (2013): 2341-2355.).

- Dos ORF anotados (ORF-SL-03/ORF-TH-03, ORF-SL-08/ORF-TH-08) no mostraron diferencias de secuencia genómica entre SL y TH. Cuatro ORF anotados (ORF-SL-02/ORF-TH-02, ORF-SL-04/ORF-TH-04, ORF-SL- 09/ORF- 55 TH-09, ORF-TH-11/región SL-11, ORF-SL-12/región TH-12) mostraron polimorfismos de cualquiera de los nucleótidos individuales o inserciones/deleciones, un ORF (ORF-SL-01/ORF-TH-01) mapeado solo parcialmente entre los genotipos. Dos ORF (ORF-SL-05, ORF-SL-06) identificados y anotados en SL faltan en TH. Como resultado, todos los ORF que son polimórficos, faltan entre los dos genotipos o muestran una expresión diferente, son genes candidatos adecuados para la propiedad observada de la resistencia al frío. De particular interés es ORF-09, que ha sido 60 identificado como SAUR31 en la base de datos de maíz. Los genes SAUR (ARN de crecimiento de auxina pequeña) responden a la auxina.

- Validación de genes candidatos: El cribado de una población de Tilling con el alelo resistente de TH para la región QTL transmisora de resistencia al frío en el cromosoma 4) se realizó para los genes candidatos, en particular ORF- 65 SL- 09, ORF-TH-09 (B73: GRMZM2G420812). Se pudieron identificar dos intercambios de aminoácidos en los mutantes, y dos mutantes mostraron polimorfismos en la región 5'del gen.

La expresión de genes candidatos seleccionados se analizó mediante qRT-PCR en ambas líneas parentales y en dos NIL, que difirieron en la resistencia al frío. Las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento en las condiciones mencionadas anteriormente, y la expresión de los genes candidatos se analizó en tres momentos de tratamiento frío:

- 5
1. Antes del tratamiento frío ( $t_0$ ),
  2. Cuatro horas después del inicio del tratamiento frío ( $t_4$ ), y
  3. 24 horas después del inicio del tratamiento frío ( $t_{24}$ ).
- 10 La expresión del gen SAUR31 (ORF-09) fue mayor en las líneas sensibles al frío y disminuyó continuamente con cada momento de medición. Dos de los elementos transponibles analizados (ORF-08 y ORF-02) también mostraron una expresión diferente entre líneas sensibles y resistentes (figura 6). Las tablas 1a a c resumen los genes candidatos, sus anotaciones, los polimorfismos observados y los resultados del análisis de expresión. Las diferencias en la expresión se pueden suponer como la causa del retardo en el crecimiento en condiciones frías.
- 15
- 20 Desarrollo de un mutante SAUR31 y su análisis en la prueba de campo: Debido a la influencia especial de SAUR 31 sobre la expresión fenotípica de la resistencia al frío, se buscó una validación funcional de este gen. Como enfoque, se eligió una mutagénesis EMS no dirigida de polen de maíz (según Neuffer y Coe, 1978; Paraffin oil technique for treating mature corn pollen with chemical mutagens. *Maydica* 23: 21-28). Después de la mutagénesis de una línea original (KWS279), se esparcieron semillas M1 y a continuación se llevó a cabo una cosecha foliar de las plantas individuales correspondientes. La subsiguiente extracción de ADN de las muestras de hojas recolectadas permite amplificar un fragmento de ADN del gen AUR31 mediante cebadores específicos (SEQ ID NO 36 y 37). Mediante la secuenciación de estos fragmentos de ADN se pueden detectar de forma selectiva desviaciones con respecto a la secuencia original del gen SAUR31 y reconducirlas a la planta individual correspondiente. Por medio de este
- 25 procedimiento se pudo identificar con éxito un mutante que presenta una mutación del gen AUR31 en el 5'-UTR (zona no traducida). En este caso, en la posición (-25), a partir del inicio ATG, se observa un intercambio de G/C a A/T a la secuencia original. La secuencia asociada se representa como SEQ ID NO: 38. La mutación heterocigota identificada en la generación M1 se fijó mediante el autocruzamiento de la planta individual correspondiente en la siguiente generación M2.
- 30
- 35 En pruebas de campo en el sitio A, el mutante se cultivó en filas de 20 plantas cada una en 5 repeticiones. La línea original no mutagénica se cultivó en las inmediaciones del mutante para garantizar la mejor comparación posible. La evaluación estadística de los valores medios de mutante a línea original muestra un crecimiento significativamente peor del mutante en condiciones frías de primavera en comparación con la línea original (figura 4). La figura 4 muestra los valores medios de la característica de altura de la planta mutante en comparación con la media de la línea de base no mutante en dos momentos de medición diferentes (dos niveles distintos de desarrollo de la planta): La segunda medición representada a la derecha en la figura 4 tuvo lugar 27 días después de la primera medición representada a la izquierda. La germinación del campo tuvo lugar en condiciones frescas de primavera.
- 40
- 45 Desarrollo de NIL recombinantes: Con la ayuda de los nuevos marcadores moleculares, se siguieron desarrollando NIL recombinantes derivados de los NIL TH-N4-8X, TH-N4-56X y TH-N4-32. Se pudieron identificar eventos de recombinación muy pequeños, que incluyen 34,729 kb en el mapa físico B73AGPv02, 32,731 kb en el armazón SL-BAC y 25,662 kb en el armazón TH-BAC (los márgenes se especifican desde el marcador ma59778s31 hasta el marcador ma59778119) (tabla 2). Una visión general de los NIL usados en los diferentes enfoques se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Visión general de NIL y padres, según lo utilizado para los diferentes enfoques. Las posiciones de los marcadores con referencia a AGPv2 son: mall840s01 = 31306276 bp; ma59778s31 = 37263172 bp; ma59778s32 = 37296672 bp; ma59778119 = 37297901 bp; ma52594s01 = 58033711 bp; ma20205s01 = 156.998.152 bp.

| Líneas            | ma59778s32 |   |   |            |            |            | Haplotipo |
|-------------------|------------|---|---|------------|------------|------------|-----------|
|                   | mall840s01 |   |   | ma59778119 | ma52594s01 | ma20205s01 |           |
| SL                | A          | c | c | A          | A          | G          | HP1       |
| TH                | G          | T | T | C          | A          | A          | HP2       |
| TH-N4-32          | G          | T | T | C          | A          | G          | HP3       |
| TH-N4-8X          | G          | T | T | C          | A          | A          | HP2       |
| TH-N4-56X         | G          | T | T | C          | A          | G          | HP3       |
| Biblioteca SL-BAC | A          | C | C | A          | A          | G          | HP1       |
| Biblioteca TH-BAC | G          | T | T | C          | A          | A          | HP2       |
| Tilling KWS279    | G          | T | T | C          | A          | A          | HP2       |
| NIL-003 - RNAseq  | G          | T | T | C          | A          | G          | HP3       |
| NIL-011 - RNAseq  | A          | C | C | A          | A          | G          | HP1       |
| Fenotipo NIL 1    |            | T | T | C          | A          |            | HP1       |
| Fenotipo NIL2     |            | C | T | C          | A          |            | HP4       |
| Fenotipo NIL3     |            | T | C | A          | A          |            | HP5       |
| Fenotipo NIL4     |            | T | C | C          | A          |            | HP6       |

5

Evaluación fenotípica: Los NIL que contenían el segmento donante en el marcador ma59778s32, pero contenían el alelo SL en el marcador ma59778s31, y viceversa, fueron fenotipados en el campo y en la cámara de crecimiento.

10

Los NIL y las líneas parentales se evaluaron para el desarrollo de la siembra en una etapa temprana en dos sitios A y B en el norte de Alemania, que son conocidos por las bajas temperaturas durante los primeros períodos de crecimiento del maíz. El experimento 1 se realizó en dos sitios con 27 plantas recombinantes en 20 réplicas, y el experimento 2 consistió en 38 plantas recombinantes en 10 réplicas evaluadas en el sitio A. En ambos experimentos, los NIL se plantaron en una fila de 20 plantas cada uno. El desarrollo de la planta se midió como la altura de la planta al comienzo de la fase de extensión del tallo.

Tabla 3: Medio de herencia en función del lugar de prueba para la altura temprana de la planta en los experimentos 1 y 2

| Parámetros    | Experimento 1         |             |             | Experimento 2 |
|---------------|-----------------------|-------------|-------------|---------------|
|               | Múltiples ubicaciones | Ubicación A | Ubicación B | Ubicación A   |
| Medio [cm]    | 67,4                  | 61,0        | 73,8        | 58,0          |
| Medio TH [cm] | 83,0                  | 76,2        | 89,8        | 79,9          |
| Medio SL [cm] | 64,8                  | 59,0        | 70,6        | 58,7          |
| LSD5% [cm]    | 1,9                   | 2,4         | 3,0         | 2,6           |
| Herencia [%]  | 98,5                  | 97,2        | 97,2        | 97,4          |

15

La altura de la planta temprana mostró una alta propiedad de herencia (> 97 %, tabla 3). Las dos líneas progenitoras SL y TH se incluyeron en ambos experimentos y difirieron significativamente en la altura temprana de la planta.

La altura de la planta temprana de NIL se calculó como un porcentaje de los padres sensibles SL (tabla 3). RecNIL con genotipos idénticos en el intervalo cromosómico entre los marcadores ma59778s31 y ma59778119 se combinaron como haplotipos (tabla 4). Los RecNIL que mostraron el genotipo SL de los marcadores ma59778s32, ma59778119 y ma59778116 tenían claramente una altura de planta temprana más baja en comparación con el genotipo TH respectivo. De forma sorprendente, la variante TH tenía una longitud de planta aumentada en aproximadamente un 35 %, que era de aproximadamente 21 cm adicionales en términos absolutos. Dos NIL con el genotipo SL en los marcadores ma59778s32 y TH en los marcadores ma59778119 y ma59778116 también tenían una altura de planta temprana similarmente baja. Además, los NIL en la cámara climática fueron fenotipados usando la prueba de fenotipo indicada anteriormente. Las líneas se cultivaron durante dos semanas en el invernadero (25/22 °C) y se transfirieron a la cámara climática a 8/6 °C (condiciones frías) durante una semana, después de una semana de recuperación en el invernadero (25/22 °C) se evaluó la coloración verde de las hojas cuatro y cinco entre 0 (amarillo) y 100 % (verde). En este caso, un valor de 100 % representa la preservación completa del color de la hoja verde y un valor de 0 % representa una coloración amarilla completa (clorosis). Se demostró que la variante TH de la variante SL también era superior en el mantenimiento de la clorofila bajo estrés por frío. En total, se midieron valores del 10 al 85 %. La pérdida de follaje de las variantes TH se redujo en un 19 a 75 % en comparación con las variantes SL.

Tabla 4: Visión general tabular de los haplotipos NIL, que se muestra con diferente número (N) en NIC individuales y sus resultados de fenotipo para las propiedades altura temprana de la planta (SL = 100 %) y verde de las hojas.

| Líneas        | Haplotipo | Nivel temprano de la planta [% SL] | N  | Color verde [%] | N  |
|---------------|-----------|------------------------------------|----|-----------------|----|
| Fenotipo NIL1 | HP2       | 107,6                              | 22 | 83,1            | 10 |
| Fenotipo NIL2 | HP4       | 106,1                              | 6  | 63,1            | 7  |
| Fenotipo NIL3 | HP5       | 92,8                               | 16 | 34,2            | 5  |
| Fenotipo NIL4 | HP6       | 94,3                               | 2  | 15,0            | 2  |
| SL            | HP1       | 100                                | 1  | 10              | 1  |

Adicionalmente, los efectos de los marcadores en el intervalo diana para los resultados del campo y las pruebas de la cámara climática se calcularon utilizando un enfoque de regresión de un solo marcador (figura 1). Los marcadores que están físicamente cerca o en el gen ORF-09 (ma59778120-ma59778119) mostraron los mayores efectos y se asociaron significativamente con las dos mediciones fenotípicas. En la prueba de campo, el 6 % de efecto adicional corresponde a una distinción del 12 % entre las dos clases de marcadores homocigóticos. En valores absolutos, esto se refiere a 7,8 cm, que es el 40 % de la diferencia fenotípica entre SL y TH. Para la cámara de crecimiento, el efecto aditivo se refiere al 22,7 % de los dos marcadores más densos en los flancos.

Tabla 5: Valores LOD (*logarithmic odds ratio*, es decir, estimación estadística de la probabilidad de que los marcadores y las características se hereden de forma combinada. LOD = 3 generalmente se interpreta como un umbral de significancia) y efectos de marcadores aditivos (equivalentes a la mitad de la diferencia entre los dos marcadores homocigóticos) para los fenotipos de altura de planta temprana y coloración verde de las hojas de las plantas recombinantes examinadas en el campo y los experimentos de cámara climática

| Marcadores | Posición | Nivel temprano de la planta |            | Coloración verde |            |
|------------|----------|-----------------------------|------------|------------------|------------|
|            |          | LOD                         | Efecto [%] | LOD              | Efecto [%] |
| zm00139s01 | 37227335 | 0                           | 0,52       | 0                | 0,29       |
| ma59778s17 | 37250743 | 0,3                         | 1,09       | 0                | 2,27       |
| ma59778s20 | 37255740 | 0,2                         | 1,02       | 0                | 2,27       |
| ma59778s21 | 37255778 | 0,2                         | 0,94       | 0                | 1,45       |
| ma59778s22 | 37257777 | 0,1                         | 0,79       | 0                | 1,67       |
| ma59778s24 | 37258325 | 0,2                         | 0,89       | 0                | 2,27       |
| ma35241s01 | 37258811 | 0,3                         | 1,09       | 0,1              | 4,10       |
| ma59778s25 | 37258935 | 0,3                         | 1,09       | 0                | 2,27       |
| ma59778s26 | 37260907 | 0,3                         | 1,09       | 0,1              | 5,32       |
| ma59778s27 | 37260916 | 0,3                         | 1,09       | 0,1              | 4,10       |
| ma59778s30 | 37263151 | 0,2                         | 0,89       | 0,1              | 4,10       |
| ma59778s31 | 37263172 | 0,2                         | 1,00       | 0                | 1,69       |
| ma59778s32 | 37296672 | 19,5                        | 5,99       | 4,4              | 24,20      |
| ma59778119 | 37297901 | 14,1                        | 5,37       | 3,2              | 22,70      |

Relevancia de los marcadores desarrollados para la resistencia al frío: La identificación del haplotipo del gen candidato y el desarrollo de nuevos marcadores permiten utilizar la selección basada en marcadores para cruzar el gen candidato correspondiente en material genético sensible al frío dentro de un intervalo muy limitado. Las plantas generadas de esta manera obtienen una mayor resistencia al frío y al mismo tiempo conservan en gran medida la biodiversidad.

Un análisis de 5598 genotipos del grupo de genes Dent usados en el cultivo mostró que el 86 % de los genotipos tienen el gen candidato en la variante alélica deseada y por tanto, presentan el haplotipo deseado.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> KWS SAAT SE
- <120> Planta resistente al frío
- <130> KWS0225PCT
- <150> documento EP15196721.3
- <151> 2015-11-27
- <160> 38
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 2016
- <212> ADN
- <213> Zea mays
- <400> 1

ES 2 927 268 T3

|             |             |            |             |             |            |      |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| atggcgcccc  | cgagagtgga  | agaccccatg | gcgctggtgt  | tggccaaaat  | cgatgaaggc | 60   |
| agtaaggaaa  | cctgccgacg  | catggaggca | atccattcta  | caatggagaa  | gatggagatc | 120  |
| acagtgcaag  | gactggtctc  | caatcagagc | gacttcaaga  | agtggcagcc  | cgagatcgag | 180  |
| aggaaggtgg  | tggagatggc  | ggaaacccta | gtgaagatcc  | aaacgaagat  | aagtaatacg | 240  |
| accccgctca  | ccacttcttc  | gggagcagta | ccagcggctg  | ccaacgtctc  | gatgtcggaa | 300  |
| acagcttcgg  | tgggtggtggg | ggagaagatg | gcggttctca  | ccctgcaccg  | tacggcggat | 360  |
| ccctccgac   | gacctgctgc  | cgaatcgaag | gtgaaccaga  | tgtcgtgccc  | cttgggaggt | 420  |
| atggccacgc  | ctaatectca  | tgctccttgg | ttattcggcc  | aaacctctgt  | gagtcccttt | 480  |
| gcatctccaa  | cctggtcaca  | aggattggga | ggaaacatgc  | caccgatgaa  | ttttccagtg | 540  |
| tttgatgcat  | ccaatcctaa  | gctatggaaa | aatcgggtgtg | aaacttattt  | tgagtactat | 600  |
| gctgtcctag  | tggatatgtg  | gattcgattg | gctatcatgc  | actttgaggg  | gocgactcta | 660  |
| ttttggctgc  | agtatatgga  | aggtagaacg | agggaaatga  | attgggggtga | actttgtgca | 720  |
| gctctgctca  | ccagattcgg  | tcgtgaccag | cataatttgc  | tcactagaca  | atthtaccat | 780  |
| atattccaga  | caggatcagt  | atcagattat | attgaacaat  | ttgatttggt  | attgcatcag | 840  |
| ttgttggtctc | atgaaaatca  | tctcaccact | accatggtta  | ctgcccgttt  | tgttgatgga | 900  |
| ctgaaagacg  | aactaagggc  | agcggtaatc | atacagcggc  | cagctgattt  | ggatacaaca | 960  |
| tgttctctaa  | cattattaca  | agaagaggtc | atgagtactt  | ccggacgtag  | agaactgaga | 1020 |
| aaagtggata  | ctaactccat  | tgtcagagtt | ccaaacaaac  | ccaatgcctt  | gcctatgttg | 1080 |
| tcaggtagtc  | ggatatcagg  | ggtacaggat | gaacggaggt  | ctatggcaac  | agtgggtgct | 1140 |
| aaaggtgaaa  | cgagtaaat   | ggaagccctc | aaggcatatc  | ggaaggctaa  | gggactgtgt | 1200 |
| tttaagtgtg  | gagaaagatg  | gggtcaactt | cacacgtgct  | ctaacacagt  | gcctttacat | 1260 |

ES 2 927 268 T3

|   |      |
|---|------|
| ctggttgaag aaatgtgggc tctaacaatg ggtgcatctg agccggagat ggactctgaa | 1320 |
| gagcctgcaa ctgagactag cctcgagagt gtgcttgcta tttctgttgc agcagtatct | 1380 |
| ggcagcgaag ggagcaaac tatcagactg tgggcatcca tttattgcca acaggttttg  | 1440 |
| gtgttagtgg attctggtag ctccgagagt tttatggata accatctcac aggagtaatg | 1500 |
| tccacaatga agccattacc aatgcctttg caagtgaagg ttgtcgatgg aaggacacta | 1560 |
| tggagtactc actttgttcc tgattgccag tggctatgtg ggggacatac tttcatccat | 1620 |
| gacttcaaaa tattaccatt gagtgggtat gatctgatte ttagtatgga ctggctggaa | 1680 |
| aaatatagcc caatgtctat aactggggg gaaaagtggg tccaatttat atataaaggg  | 1740 |
| aagtcagtat ggctgcaagg tgttttacc aatactcggg cttgtttttc cctaaattgt  | 1800 |
| ctccagtttg attcccttgt caaacaagat gcaattgagc agttactgga gttgcaagtc | 1860 |
| gtaccactta gtgaaccac tgacatgcct atggtggtgg ctgatttggg taaccagttt  | 1920 |
| aaccatctgt tcgatgagcc aaaagagtta ccgccaaga ggtggattga tcatgctata  | 1980 |
| ccactaatcc caggagctca accttttcga ctctga                           | 2016 |

<210> 2

<211> 671

5 <212> PRT

<213> Zea mays

<400> 2



ES 2 927 268 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 115 |     | 120 |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Lys | Val | Asn | Gln | Met | Ser | Leu | Pro | Leu | Gly | Gly | Met | Ala | Thr | Pro |
| 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Asn | Pro | His | Ala | Pro | Trp | Leu | Phe | Gly | Gln | Thr | Ser | Val | Ser | Pro | Phe |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ala | Ser | Pro | Thr | Trp | Ser | Gln | Gly | Leu | Gly | Gly | Asn | Met | Pro | Pro | Met |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Asn | Phe | Pro | Val | Phe | Asp | Ala | Ser | Asn | Pro | Lys | Leu | Trp | Lys | Asn | Arg |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Cys | Glu | Thr | Tyr | Phe | Glu | Tyr | Tyr | Ala | Val | Leu | Val | Asp | Met | Trp | Ile |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |
| Arg | Leu | Ala | Ile | Met | His | Phe | Glu | Gly | Pro | Thr | Leu | Phe | Trp | Leu | Gln |
| 210 |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Tyr | Met | Glu | Gly | Arg | Thr | Arg | Glu | Met | Asn | Trp | Gly | Glu | Leu | Cys | Ala |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Ala | Leu | Leu | Thr | Arg | Phe | Gly | Arg | Asp | Gln | His | Asn | Leu | Leu | Thr | Arg |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Gln | Phe | Tyr | His | Ile | Phe | Gln | Thr | Gly | Ser | Val | Ser | Asp | Tyr | Ile | Glu |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Gln | Phe | Asp | Leu | Leu | Leu | His | Gln | Leu | Leu | Ala | His | Glu | Asn | His | Leu |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Thr | Thr | Thr | Met | Val | Thr | Ala | Arg | Phe | Val | Asp | Gly | Leu | Lys | Asp | Glu |
|     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Leu | Arg | Ala | Ala | Val | Ile | Ile | Gln | Arg | Pro | Ala | Asp | Leu | Asp | Thr | Thr |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Cys | Ser | Leu | Thr | Leu | Leu | Gln | Glu | Glu | Val | Met | Ser | Thr | Ser | Gly | Arg |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Arg | Glu | Leu | Arg | Lys | Val | Asp | Thr | Asn | Ser | Ile | Val | Arg | Val | Pro | Asn |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Lys | Pro | Asn | Ala | Leu | Pro | Met | Leu | Ser | Gly | Ser | Arg | Ile | Ser | Gly | Val |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |

ES 2 927 268 T3

Gln Asp Glu Arg Arg Ser Met Ala Thr Val Gly Ala Lys Gly Glu Thr  
 370 375 380

Ser Lys Met Glu Ala Leu Lys Ala Tyr Arg Lys Ala Lys Gly Leu Cys  
 385 390 395 400

Phe Lys Cys Gly Glu Arg Trp Gly Gln Leu His Thr Cys Ser Asn Thr  
 405 410 415

Val Pro Leu His Leu Val Glu Glu Met Trp Ala Leu Thr Met Gly Ala  
 420 425 430

Ser Glu Pro Glu Met Asp Ser Glu Glu Pro Ala Thr Glu Thr Ser Leu  
 435 440 445

Glu Ser Val Leu Ala Ile Ser Val Ala Ala Val Ser Gly Ser Glu Gly  
 450 455 460

Ser Lys Thr Ile Arg Leu Trp Ala Ser Ile Tyr Cys Gln Gln Val Leu  
 465 470 475 480

Val Leu Val Asp Ser Gly Ser Ser Ala Ser Phe Met Asp Asn His Leu  
 485 490 495

Thr Gly Val Met Ser Thr Met Lys Pro Leu Pro Met Pro Leu Gln Val  
 500 505 510

Lys Val Val Asp Gly Arg Thr Leu Trp Ser Thr His Phe Val Pro Asp  
 515 520 525

Cys Gln Trp Leu Cys Gly Gly His Thr Phe Ile His Asp Phe Lys Ile  
 530 535 540

Leu Pro Leu Ser Gly Tyr Asp Leu Ile Leu Ser Met Asp Trp Leu Glu  
 545 550 555 560

Lys Tyr Ser Pro Met Ser Ile His Trp Gly Glu Lys Trp Phe Gln Phe  
 565 570 575

Ile Tyr Lys Gly Lys Ser Val Trp Leu Gln Gly Val Leu Pro Asn Thr  
 580 585 590

Arg Ser Cys Phe Ser Leu Asn Cys Leu Gln Phe Asp Ser Leu Val Lys  
 595 600 605

Gln Asp Ala Ile Glu Gln Leu Leu Glu Leu Gln Val Val Pro Leu Ser  
 610 615 620

ES 2 927 268 T3

Glu Pro Thr Asp Met Pro Met Val Val Ala Asp Leu Val Asn Gln Phe  
625 630 635 640

Asn His Leu Phe Asp Glu Pro Lys Glu Leu Pro Pro Lys Arg Trp Ile  
645 650 655

Asp His Ala Ile Pro Leu Ile Pro Gly Ala Gln Pro Phe Arg Leu  
660 665 670

<210> 3

<211> 2568

5 <212> ADN

<213> Zea mays

<400> 3

ES 2 927 268 T3

|  |      |
|--|------|
| atggataaaa atagggaccc tcaaaacaga agtggggaac agagtgaaga gggtaatggc  | 60   |
| agaggcaagt ggggggctga ccagagagtt tccggggacc gtagecgtagt ccttggttgc | 120  |
| agctctgtta acaactctaa tgggtggaccg gacctcgaag ggacaggaga tgaagctggt | 180  |
| ggagatgaag ggaagccgga agctgtccag aaactaagga gaggcctacac tggatcctca | 240  |
| tcacgagtac aacacgagat tgcaggccag agcgggagcg atggcgcccc gagagtggaa  | 300  |
| gaccccatgg cactgttgtt agccaaaatc gatgaaggca ataaggaaac ctgccgacgc  | 360  |
| atggaggcaa tccagtctac aatggagaag atggagatca cagtgcaggg actggtctcc  | 420  |
| gatcggagcg acttcaagaa gtggcggccc gagatcgaga ggaaggtggt ggagatggcg  | 480  |
| gaaaccctag tgaagatcca aacaaagata agtaatacga ccccgctctac cacttcttca | 540  |
| ggagcagtac cagcggtcac caacgtctcg atgtcggcaa caacttcggt ggtggcgggg  | 600  |
| gagaagatgg cgggttctac cctgcaccgt acgacggatc ccttccgacg acctgctacc  | 660  |
| gaatcgaagg tgaaccggat gtcgctgcc ttgggaggtg tggccacgcc taatcctcat   | 720  |
| gctccttggg tattcggcca aacctctgtg agtccctttg catctccaac ctggtcacaa  | 780  |
| ggattgggag gaaacatgcc accgatgaat tttccagtgt ttgatgcac caatcctaag   | 840  |
| ctgtggaaaa atcgggtgtga aacttatttt gagtactatg ctgtcctagt ggagatgtgg | 900  |
| attcgattgg ctatcatgca ctttgagggg ccgactctat tttggctgca gtctatggaa  | 960  |
| ggtagaacga gggaaatgaa ttgggggtgaa ctttgtgcag ctctgctcac cagattcagt | 1020 |
| cgtgaccagc ataatttgct cactagacaa ttttaccata tattccagac aggatcagta  | 1080 |
| tcagattata ttgaacaatt tgatttgta ttgcatcagt tgttggctca tgaaaatcat   | 1140 |
| ctcaccacta ccatggttac tgcccgtttt gttgatggac tgaaagacga actaagggca  | 1200 |
| acgataatca tacagcggcc agctgatttg gataacaacat gttctctagc attattacaa | 1260 |
| gaagaggtca tgagtacttc cggacgtaga gaactgagaa aagtggatac taactcatt   | 1320 |

ES 2 927 268 T3

gtcagagttc caaacaaacc caatgccttg cctatgttgt caggtagtcg gatatcaggg 1380  
 gtacaggatg aacggaggtc tatggcaaca gtgggtgata aaggtgaaac gagtaaaatg 1440  
 gaagccctca aggcataatcg gaaggctaag ggactgtgtt ttaagtgtgg agaaagatgg 1500  
 ggtcaacttc acacgtgctc taacacagtg cctttacatc tggttgaaga aatgtgggct 1560  
 ctaacaatgg gtgcatctga gccggagatg gactctgaag agcctgcaac tgagactagc 1620  
 cttgagagtg tgcttgctat ttctgttgca gcagtatccg acagcgaagg gagcaaaact 1680  
 atcagactgt gggcatccat ttattgcaa caggttttgg tgtagtgga ttctagtagc 1740  
 tccgcgagtt ttatggataa ccatcttaca ggagtaatgt ccacagtga gccattacca 1800  
 atgcctttgc aagtgaaggt tgtcgatgga aggacactat ggagtactca ctttgttct 1860  
 gattgccagt ggctatgtgg gggacatact ttcacatcg acttcaaat attaccattg 1920  
 agtgggtatg atctgattct tgtgttgtat ggccactcac ctatacattt tgggcttgtt 1980  
 gacaatggtc agtgtacagt acctaactct caagagctgt tggtagagag acagctgatg 2040  
 ctccagcaag ttaagttgca tctcaatcgt gccagcaac gtatgaaaaa acaatcggat 2100  
 aaagggagga cagatcatgt tttgaagaa ggacagcaag tgtttctcaa acttcaacct 2160  
 tattgtcaat cttccgtagc ttcacgtcct tatcccaaat tggcttttaa gttctttggt 2220  
 ccattacca ttgctcgcaa ggttaatgtt gtagcttatg agttggctct tccaccaggt 2280  
 tttggtattc atccggtatt ccattgttct cagttgaagc ctcaagttgg ttccaataca 2340  
 cctgttagct cattagtacc tgatatgtcg actggtttgc aagtgcctga acaaatatta 2400  
 gactccaagt tggtttggcg tggaggcaaa gcactttccc atgtgttggg taaatgggtg 2460  
 gattgggatg tctatctagc tacgtgggaa gatgaagcag tgctgaagca acaattcct 2520  
 gcagcaccag cttggggacc agctgtatct ccagggggaa tatgttaa 2568

<210> 4

<211> 855

5 <212> PRT

<213> Zea mays

<400> 4



ES 2 927 268 T3

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

ES 2 927 268 T3

Ile Met His Phe Glu Gly Pro Thr Leu Phe Trp Leu Gln Ser Met Glu  
305 310 315 320

Gly Arg Thr Arg Glu Met Asn Trp Gly Glu Leu Cys Ala Ala Leu Leu  
325 330 335

Thr Arg Phe Ser Arg Asp Gln His Asn Leu Leu Thr Arg Gln Phe Tyr  
340 345 350

His Ile Phe Gln Thr Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Glu Gln Phe Asp  
355 360 365

Leu Leu Leu His Gln Leu Leu Ala His Glu Asn His Leu Thr Thr Thr  
370 375 380

Met Val Thr Ala Arg Phe Val Asp Gly Leu Lys Asp Glu Leu Arg Ala  
385 390 395 400

Thr Ile Ile Ile Gln Arg Pro Ala Asp Leu Asp Thr Thr Cys Ser Leu  
405 410 415

Ala Leu Leu Gln Glu Glu Val Met Ser Thr Ser Gly Arg Arg Glu Leu  
420 425 430

Arg Lys Val Asp Thr Asn Ser Ile Val Arg Val Pro Asn Lys Pro Asn  
435 440 445

Ala Leu Pro Met Leu Ser Gly Ser Arg Ile Ser Gly Val Gln Asp Glu  
450 455 460

Arg Arg Ser Met Ala Thr Val Gly Asp Lys Gly Glu Thr Ser Lys Met  
465 470 475 480

Glu Ala Leu Lys Ala Tyr Arg Lys Ala Lys Gly Leu Cys Phe Lys Cys  
485 490 495

Gly Glu Arg Trp Gly Gln Leu His Thr Cys Ser Asn Thr Val Pro Leu  
500 505 510

His Leu Val Glu Glu Met Trp Ala Leu Thr Met Gly Ala Ser Glu Pro  
515 520 525

Glu Met Asp Ser Glu Glu Pro Ala Thr Glu Thr Ser Leu Glu Ser Val  
530 535 540

Leu Ala Ile Ser Val Ala Ala Val Ser Asp Ser Glu Gly Ser Lys Thr  
545 550 555 560

ES 2 927 268 T3

Ile Arg Leu Trp Ala Ser Ile Tyr Cys Gln Gln Val Leu Val Leu Val  
565 570 575

Asp Ser Ser Ser Ser Ala Ser Phe Met Asp Asn His Leu Thr Gly Val  
580 585 590

Met Ser Thr Val Lys Pro Leu Pro Met Pro Leu Gln Val Lys Val Val  
595 600 605

Asp Gly Arg Thr Leu Trp Ser Thr His Phe Val Pro Asp Cys Gln Trp  
610 615 620

Leu Cys Gly Gly His Thr Phe Ile His Asp Phe Lys Ile Leu Pro Leu  
625 630 635 640

Ser Gly Tyr Asp Leu Ile Leu Val Leu Tyr Gly His Ser Pro Ile His  
645 650 655

Phe Gly Leu Val Asp Asn Gly Gln Cys Thr Val Pro Asn Leu Gln Glu  
660 665 670

Leu Leu Val Glu Arg Gln Leu Met Leu Gln Gln Val Lys Leu His Leu  
675 680 685

Asn Arg Ala Gln Gln Arg Met Lys Lys Gln Ser Asp Lys Gly Arg Thr  
690 695 700

Asp His Val Phe Glu Glu Gly Gln Gln Val Phe Leu Lys Leu Gln Pro  
705 710 715 720

Tyr Cys Gln Ser Ser Val Ala Ser Arg Pro Tyr Pro Lys Leu Ala Phe  
725 730 735

Lys Phe Phe Gly Pro Phe Thr Ile Ala Arg Lys Val Asn Val Val Ala  
740 745 750

Tyr Glu Leu Ala Leu Pro Pro Gly Phe Gly Ile His Pro Val Phe His  
755 760 765

Val Ser Gln Leu Lys Pro Gln Val Gly Ser Asn Thr Pro Val Ser Ser  
770 775 780

Leu Val Pro Asp Met Ser Thr Gly Leu Gln Val Pro Glu Gln Ile Leu  
785 790 795 800

Asp Ser Lys Leu Val Trp Arg Gly Gly Lys Ala Leu Ser His Val Leu  
805 810 815

ES 2 927 268 T3

Val Lys Trp Leu Asp Trp Asp Val Tyr Leu Ala Thr Trp Glu Asp Glu  
 820 825 830

Ala Val Leu Lys Gln Gln Phe Pro Ala Ala Pro Ala Trp Gly Pro Ala  
 835 840 845

Val Ser Pro Gly Gly Ile Cys  
 850 855

<210> 5  
 <211> 705  
 5 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 5

atggtgtgcc atctgagatc tgcgagcgtg ccttcgagcc ctcgctctaa tgagatccat 60  
 gttgaggaac agctgcagag cctgaaggca gccatctcat caccgtcagt gaccatcaaa 120  
 accatggtcg atggtctgag caagctcggg agcatctacg accgcattga tgtgctcaca 180  
 tgcttgccca ccagccagag gaaggcgggtg gaggaagagc tcgagcgcctc cctcgtcctg 240  
 cttgacctct gcagcgcctt gcaagagagc ttcgtggagc tcaaggccag tgttcaagag 300  
 atgcagttgg ctctcaaaag aggagacgac gcggctctcc agaccagggt tcagtgtctac 360  
 gcgcgcttgg tcaagaaggc acagaagctg ttcaagaagt tcaacaagaa gactgcttct 420  
 gacatcgaaa gttgcagggt gatcaacctt gttgctgaag cgagggagat tgctgtgtca 480  
 accctagaat caacattgca tctcctgtca aagcaaattg caatgccaaag ttgtagcaag 540  
 tggtcacttg tctctaagtc tttccaaaag aagagagtca tgtgcgaggc ggatcaattg 600  
 caaggcgtgg agctcggcctt cgttgatctt gagaacagag ttgggacatt gttcaggaaa 660  
 10 ttggtccaga acagagtgtc ttttctgaat attcttagct tgtag 705

<210> 6  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 15 <213> Zea mays

<400> 6

ES 2 927 268 T3

Met Val Cys His Leu Arg Ser Ala Ser Val Pro Ser Ser Pro Arg Ser  
 1 5 10 15

Asn Glu Ile His Val Glu Glu Gln Leu Gln Ser Leu Lys Ala Ala Ile  
 20 25 30

Ser Ser Pro Ser Val Thr Ile Lys Thr Met Val Asp Gly Leu Ser Lys  
 35 40 45

Leu Gly Ser Ile Tyr Asp Arg Ile Asp Val Leu Thr Cys Leu Pro Thr  
 50 55 60

Ser Gln Arg Lys Ala Val Glu Glu Glu Leu Glu Arg Ser Leu Val Leu  
 65 70 75 80

Leu Asp Leu Cys Ser Ala Leu Gln Glu Ser Phe Val Glu Leu Lys Ala  
 85 90 95

Ser Val Gln Glu Met Gln Leu Ala Leu Lys Arg Gly Asp Asp Ala Ala  
 100 105 110

Leu Gln Thr Arg Val Gln Cys Tyr Ala Arg Leu Val Lys Lys Ala Gln  
 115 120 125

Lys Leu Phe Lys Lys Phe Asn Lys Lys Thr Ala Ser Asp Ile Glu Ser  
 130 135 140

Cys Arg Val Ile Asn Leu Val Ala Glu Ala Arg Glu Ile Ala Val Ser  
 145 150 155 160

Thr Leu Glu Ser Thr Leu His Leu Leu Ser Lys Gln Ile Ala Met Pro  
 165 170 175

Ser Cys Ser Lys Trp Ser Leu Val Ser Lys Ser Phe Gln Lys Lys Arg  
 180 185 190

Val Met Cys Glu Ala Asp Gln Leu Gln Gly Leu Glu Leu Gly Phe Val  
 195 200 205

Asp Leu Glu Asn Arg Val Gly Thr Leu Phe Arg Lys Leu Val Gln Asn  
 210 215 220

Arg Val Ser Phe Leu Asn Ile Leu Ser Leu  
 225 230

ES 2 927 268 T3

<210> 7  
 <211> 705  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

5

<400> 7

|  |     |
|--|-----|
| atggtgtgcc atctgagatc tgcgagcgtg ccttcgagcc ctcgctctaa tgagatccat  | 60  |
| gttgaggaac agctgcagag cctgaaggca gccatctcat caccgtcagt gaccatcaaa  | 120 |
| accatggteg atggtctgag caagctcggg agcatctacg accgcattga tgtgctcaca  | 180 |
| tgcttgocca ccagccagag gaaggcgggt gaggaagagc tcgagcgtc cctcgtcctg   | 240 |
|  |     |
| cttgacctct gcagcgcctt gcaagagagc ttcgtggagc tcaaggccag tgttcaagag  | 300 |
| atgcagttgg ctctcaaaag aggagacgac gcggctctcc agaccagggt tcagtgtctac | 360 |
| gcgcgcttgg tcaagaaggc acagaagctg ttcaagaagt tcaacaagaa gactgcttct  | 420 |
| gacatcgaaa gttgcagggt gatcaacctt gttgctgaag cgagggagat tgccgtgtca  | 480 |
| accctagaat caacattgca totcctgtca aagcaaattg caatgccaaag ttgtagcaag | 540 |
| tggtcacttg tctctaagtc tttccaaaag aagagagtca tgtgcgaggc ggatcaattg  | 600 |
| caagggtggy agctcggcctt cattgatctt gagaacagag ttgggacatt gttcaggaaa | 660 |
| ttggtccaga acagagtgtc ttttctgaat attcttagct tgtag                  | 705 |

10

<210> 8  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Zea mays

15

<400> 8

ES 2 927 268 T3

Met Val Cys His Leu Arg Ser Ala Ser Val Pro Ser Ser Pro Arg Ser  
 1 5 10 15

Asn Glu Ile His Val Glu Glu Gln Leu Gln Ser Leu Lys Ala Ala Ile  
 20 25 30

Ser Ser Pro Ser Val Thr Ile Lys Thr Met Val Asp Gly Leu Ser Lys  
 35 40 45

Leu Gly Ser Ile Tyr Asp Arg Ile Asp Val Leu Thr Cys Leu Pro Thr  
 50 55 60

Ser Gln Arg Lys Ala Val Glu Glu Glu Leu Glu Arg Ser Leu Val Leu  
 65 70 75 80

Leu Asp Leu Cys Ser Ala Leu Gln Glu Ser Phe Val Glu Leu Lys Ala  
 85 90 95

Ser Val Gln Glu Met Gln Leu Ala Leu Lys Arg Gly Asp Asp Ala Ala  
 100 105 110

Leu Gln Thr Arg Val Gln Cys Tyr Ala Arg Leu Val Lys Lys Ala Gln  
 115 120 125

Lys Leu Phe Lys Lys Phe Asn Lys Lys Thr Ala Ser Asp Ile Glu Ser  
 130 135 140

Cys Arg Val Ile Asn Leu Val Ala Glu Ala Arg Glu Ile Ala Val Ser  
 145 150 155 160

Thr Leu Glu Ser Thr Leu His Leu Leu Ser Lys Gln Ile Ala Met Pro  
 165 170 175

Ser Cys Ser Lys Trp Ser Leu Val Ser Lys Ser Phe Gln Lys Lys Arg  
 180 185 190

Val Met Cys Glu Ala Asp Gln Leu Gln Gly Leu Glu Leu Gly Phe Ile  
 195 200 205

Asp Leu Glu Asn Arg Val Gly Thr Leu Phe Arg Lys Leu Val Gln Asn  
 210 215 220

Arg Val Ser Phe Leu Asn Ile Leu Ser Leu  
 225 230

<210> 9  
 <211> 678

ES 2 927 268 T3

<212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 9

5

```

atgccttcga gccctcattc cagggagacc aatggtgagg aacagattct atgcctgaaa      60
gcagccatct ctctgccttc agtgactgtc gaaaccgatat tcgatgatct gagcaagctc      120
gggagcatct acaaccacat cgacgcactc acatgcttgc ccaggagcca gaggaaggca      180
gtggaggagg aggttgagca ctccctcgtc ctgctcgacc tctgcagcat tgtgcaagag      240
agctttgttg aactcaaggc ctgtgtccag gagatacagt tggctctgaa acgaggtgat      300
cacacagctg cccataccaa gattcagtcg tatgtgcgct cggccaagaa ggcacagaag      360
ctgttcaaga aggtcaacaa gaagactgtc tctgacatcg aaggatgctg ggtgatcaat      420
ctggttgctg gagcgaggga gattgctgeg ttgatccttg aatcgacatt gcatctcctg      480
tcaaagcaaa ttgtggtcac aagttotagc aagtggtcac ttgtttcaa gtcattccga      540
aagaagtgtg tcatatgtga ggcagaacaa ttgcaagggt tggagctgga cattgttgaa      600
cttgagagca gagtagggac attgttcagg aagttgatcc aaagcagagt gtctcttctt      660
aatgctctta gcttgtag                                     678
    
```

<210> 10  
 <211> 225  
 10 <212> PRT  
 <213> Zea mays

<400> 10

```

Met Pro Ser Ser Pro His Ser Arg Glu Thr Asn Val Glu Glu Gln Ile
1           5           10           15
15
    
```

ES 2 927 268 T3

Leu Cys Leu Lys Ala Ala Ile Ser Leu Pro Ser Val Thr Val Glu Thr  
 20 25 30

Val Phe Asp Asp Leu Ser Lys Leu Gly Ser Ile Tyr Asn His Ile Asp  
 35 40 45

Ala Leu Thr Cys Leu Pro Arg Ser Gln Arg Lys Ala Val Glu Glu Glu  
 50 55 60

Val Glu His Ser Leu Val Leu Leu Asp Leu Cys Ser Ile Val Gln Glu  
 65 70 75 80

Ser Phe Val Glu Leu Lys Ala Cys Val Gln Glu Ile Gln Leu Ala Leu  
 85 90 95

Lys Arg Gly Asp His Thr Ala Ala His Thr Lys Ile Gln Cys Tyr Val  
 100 105 110

Arg Ser Ala Lys Lys Ala Gln Lys Leu Phe Lys Lys Val Asn Lys Lys  
 115 120 125

Thr Val Ser Asp Ile Glu Gly Cys Trp Val Ile Asn Leu Val Ala Gly  
 130 135 140

Ala Arg Glu Ile Ala Ala Leu Ile Leu Glu Ser Thr Leu His Leu Leu  
 145 150 155 160

Ser Lys Gln Ile Val Val Thr Ser Ser Ser Lys Trp Ser Leu Val Ser  
 165 170 175

Lys Ser Phe Arg Lys Lys Cys Val Ile Cys Glu Ala Glu Gln Leu Gln  
 180 185 190

Gly Leu Glu Leu Asp Ile Val Glu Leu Glu Ser Arg Val Gly Thr Leu  
 195 200 205

Phe Arg Lys Leu Ile Gln Ser Arg Val Ser Leu Leu Asn Ala Leu Ser  
 210 215 220

Leu  
 225

ES 2 927 268 T3

<210> 11  
 <211> 678  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

5

<400> 11

```

atgccttcga gccctcattc cagggagacc aatggtgagg aacagattct atgcctgaaa      60

gcagccatct ctctgccttc agtgactgtc gaaaccgtat tcgatgatct gagcaagctc      120

gggagcatct acaaccacat cgacgcactc acatgcttgc ccaggagcca gaggaaggca      180

gtggaggagg aggttgagca ctccctcgtc ctgctcgacc tctgcagcat tgtgcaagag      240

agctttgttg aactcaaggc ctgtgtccag gagatacagt tggctctgaa acgaggtgat      300

cacacagctg cccataccaa gattcagtgc tatgtgcgct cggccaagaa ggcacagaag      360

ctgttcaaga aggtcaacaa gaagactgtc tctgacatcg aaggatgctg ggtgatcaat      420

ctggttgctg gagcgaggga gattgctgog ttgatccttg aatcgacatt gcatctcctg      480

tcaaagcaaa ttgtggtcac aagttctagc aagtggtcac ttgtttccaa gtcattccga      540

aagaagtgtg tcatatgtga ggcagaacaa ttgcaagggt tggagctgga cattgttgaa      600

cttgagagca gagtagggac attgttcagg aagttgatcc aaagcagagt gtctcttctt      660

aatgctctta gcttgtag                                          678
  
```

10 <210> 12  
 <211> 225  
 <212> PRT  
 <213> Zea mays

15 <400> 12

ES 2 927 268 T3

Met Pro Ser Ser Pro His Ser Arg Glu Thr Asn Val Glu Glu Gln Ile  
 1 5 10 15

Leu Cys Leu Lys Ala Ala Ile Ser Leu Pro Ser Val Thr Val Glu Thr  
 20 25 30

Val Phe Asp Asp Leu Ser Lys Leu Gly Ser Ile Tyr Asn His Ile Asp  
 35 40 45

Ala Leu Thr Cys Leu Pro Arg Ser Gln Arg Lys Ala Val Glu Glu Glu  
 50 55 60

Val Glu His Ser Leu Val Leu Leu Asp Leu Cys Ser Ile Val Gln Glu  
 65 70 75 80

Ser Phe Val Glu Leu Lys Ala Cys Val Gln Glu Ile Gln Leu Ala Leu  
 85 90 95

Lys Arg Gly Asp His Thr Ala Ala His Thr Lys Ile Gln Cys Tyr Val  
 100 105 110

Arg Ser Ala Lys Lys Ala Gln Lys Leu Phe Lys Lys Val Asn Lys Lys  
 115 120 125

Thr Val Ser Asp Ile Glu Gly Cys Trp Val Ile Asn Leu Val Ala Gly  
 130 135 140

Ala Arg Glu Ile Ala Ala Leu Ile Leu Glu Ser Thr Leu His Leu Leu  
 145 150 155 160

Ser Lys Gln Ile Val Val Thr Ser Ser Ser Lys Trp Ser Leu Val Ser  
 165 170 175

Lys Ser Phe Arg Lys Lys Cys Val Ile Cys Glu Ala Glu Gln Leu Gln  
 180 185 190

Gly Leu Glu Leu Asp Ile Val Glu Leu Glu Ser Arg Val Gly Thr Leu  
 195 200 205

Phe Arg Lys Leu Ile Gln Ser Arg Val Ser Leu Leu Asn Ala Leu Ser  
 210 215 220

Leu  
 225

<210> 13  
 <211> 681

ES 2 927 268 T3

<212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 13

5

```

atgccttcga gctctcgctc cagtgagacc tctattgacg aacagattct gagcctgaaa      60
gcagccatct ctctgccttc agtgtccatc aaaaccatgg tggatagtct gagcaagctc      120
ggcagcatct acaaccacat cgacgcactc acatgcttgc ccaggagcca gaggaaggca      180
gtggaggagg agctcgagca ctccctggtc ctgctcgatc tctgcagcgc tgtgcaagag      240
agctttgttg agcttaaggc cagtgtccag gaggtgcagt tggctctgga acgaggtgac      300
cacacggctg cccataccaa gattcagtgc tatgtgcgct cggccaagaa ggcacagaag      360
ctgttcaaga aggtcaacaa gaagactgcc tctgacatcg aaggatgctg ggtgattaat      420
ctggttgctg aagcgagaga gattgcogtg ttgatccttg aatcgacatt gcatctcatg      480
ttgaagcaaa ttgtgattcc aagctctagc aagtggccc ttgtttccaa gtcattccga      540
aagaagtgtg ttgtatcatg cgatgcggaa caattgcaag ggttgagct ggacgttgtt      600
gatcttgaga gcagagttgg gacattgttc aggacgttga tccagagcag agtgtctctt      660
cttaatgctc tttagcttga g                                     681
  
```

<210> 14  
 <211> 226  
 <212> PRT  
 <213> Zea mays

10

<400> 14

ES 2 927 268 T3

Met Pro Ser Ser Ser Arg Ser Ser Glu Thr Ser Ile Asp Glu Gln Ile  
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Lys Ala Ala Ile Ser Leu Pro Ser Val Ser Ile Lys Thr  
 20 25 30

Met Val Asp Ser Leu Ser Lys Leu Gly Ser Ile Tyr Asn His Ile Asp  
 35 40 45

Ala Leu Thr Cys Leu Pro Arg Ser Gln Arg Lys Ala Val Glu Glu Glu  
 50 55 60

Leu Glu His Ser Leu Val Leu Leu Asp Leu Cys Ser Ala Val Gln Glu  
 65 70 75 80

Ser Phe Val Glu Leu Lys Ala Ser Val Gln Glu Val Gln Leu Ala Leu  
 85 90 95

Glu Arg Gly Asp His Thr Ala Ala His Thr Lys Ile Gln Cys Tyr Val  
 100 105 110

Arg Ser Ala Lys Lys Ala Gln Lys Leu Phe Lys Lys Val Asn Lys Lys  
 115 120 125

Thr Ala Ser Asp Ile Glu Gly Cys Trp Val Ile Asn Leu Val Ala Glu  
 130 135 140

Ala Arg Glu Ile Ala Val Leu Ile Leu Glu Ser Thr Leu His Leu Met  
 145 150 155 160

Leu Lys Gln Ile Val Ile Pro Ser Ser Ser Lys Trp Ser Leu Val Ser  
 165 170 175

Lys Ser Phe Arg Lys Lys Cys Val Val Ser Cys Asp Ala Glu Gln Leu  
 180 185 190

Gln Gly Leu Glu Leu Asp Val Val Asp Leu Glu Ser Arg Val Gly Thr  
 195 200 205

Leu Phe Arg Thr Leu Ile Gln Ser Arg Val Ser Leu Leu Asn Ala Leu  
 210 215 220

Ser Leu  
 225

<210> 15  
 <211> 681  
 5 <212> ADN

ES 2 927 268 T3

<213> Zea mays

<400> 15

|  |     |
|--|-----|
| atgccttcga gctctcgctc cagtgagacc tctattgacg aacagattct gagcctgaaa  | 60  |
| gcagccatct ctctgccttc agtgtccatc aaaacccatgg tggatagtct gagcaagctc | 120 |
| ggcagcatct acaaccacat cgacgcactc acatgcttgc ccaggagcca gaggaaggca  | 180 |
| gtggaggagg agctcgagca ctccctggtc ctgctcgatc tctgcagcgc tgtgcaagag  | 240 |
| agctttggtg agcttaaggc cagtggtccag gaggtgcagt tggctctgga acgaggtgac | 300 |
| cacacggctg cccataccaa gattcagtg c tatgtgcgct cggccaagaa ggcacagaag | 360 |
| ctgttcaaga aggtcaacaa gaagactgcc tctgacatcg aaggatgctg ggtgattaat  | 420 |
| ctggttgctg aagcgagaga gattgccgtg ttgatccttg aatcgacatt gcctctcatg  | 480 |
| ttgaagcaaa ttgtgattcc aagctctagc aagtgggcc ttgtttccaa gtcattccga   | 540 |
| aagaagtgtg ttgtatcatg cgatgcggaa caattgcaag ggttggagct ggacgttggt  | 600 |
| gatottgaga gcagagttgg gacattgttc aggaogttga tccagagcag agtgtctctt  | 660 |
| 5 cttaatgctc ttagcttgta g  | 681 |

<210> 16

<211> 226

<212> PRT

10 <213> Zea mays

<400> 16

ES 2 927 268 T3

Met Pro Ser Ser Ser Arg Ser Ser Glu Thr Ser Ile Asp Glu Gln Ile  
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Lys Ala Ala Ile Ser Leu Pro Ser Val Ser Ile Lys Thr  
 20 25 30

Met Val Asp Ser Leu Ser Lys Leu Gly Ser Ile Tyr Asn His Ile Asp  
 35 40 45

Ala Leu Thr Cys Leu Pro Arg Ser Gln Arg Lys Ala Val Glu Glu Glu  
 50 55 60

Leu Glu His Ser Leu Val Leu Leu Asp Leu Cys Ser Ala Val Gln Glu  
 65 70 75 80

Ser Phe Val Glu Leu Lys Ala Ser Val Gln Glu Val Gln Leu Ala Leu  
 85 90 95

Glu Arg Gly Asp His Thr Ala Ala His Thr Lys Ile Gln Cys Tyr Val  
 100 105 110

Arg Ser Ala Lys Lys Ala Gln Lys Leu Phe Lys Lys Val Asn Lys Lys  
 115 120 125

Thr Ala Ser Asp Ile Glu Gly Cys Trp Val Ile Asn Leu Val Ala Glu  
 130 135 140

Ala Arg Glu Ile Ala Val Leu Ile Leu Glu Ser Thr Leu His Leu Met  
 145 150 155 160

Leu Lys Gln Ile Val Ile Pro Ser Ser Ser Lys Trp Ser Leu Val Ser  
 165 170 175

Lys Ser Phe Arg Lys Lys Cys Val Val Ser Cys Asp Ala Glu Gln Leu  
 180 185 190

Gln Gly Leu Glu Leu Asp Val Val Asp Leu Glu Ser Arg Val Gly Thr  
 195 200 205

Leu Phe Arg Thr Leu Ile Gln Ser Arg Val Ser Leu Leu Asn Ala Leu  
 210 215 220

Ser Leu  
 225

<210> 17  
 <211> 1836  
 5 <212> ADN  
 <213> Zea mays

&lt;400&gt; 17

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| atggagaata | cgaggcgtgg | gagacgaacg | gaacgatcca | acgcatcgtc | ttcttcatcg | 60  |
| aaacaggctg | ctgcagcagc | atgcataggt | gggcctggcc | tgagagaaag | taatgcgtcg | 120 |
| gtgggccaga | gtggagacgt | gctgtggcgt | tgtgcagtcc | agaacgaacc | atacaagccg | 180 |
| cccgtcggtc | ttgtggttct | ttttgacaga | acacacgcgt | cgcttctctt | ctaccaccga | 240 |
| gcgccaaaga | cgaaacgtct | ggctttaggg | tccaatcct  | acgcggactc | aaccaaggtg | 300 |
| ccgccgacgc | tacccatgga | gaaccgcggg | gactcccagc | aaggagtgca | gggagggcga | 360 |
| cctgtcgagc | ctggcgcagg | gagggctgca | ccgaggcagg | gattccagta | caacggctca | 420 |
| ggtcaattcc | gtccaggata | cggtaggcgg | cgtggctacg | cccagaaccg | ggggaggacc | 480 |
| tggtcgcggg | caggacacgg | gcgcggaatg | cacggcccgg | ttggaggccg | tggcgcggcg | 540 |
| agacccaacc | cagctggccc | tggcacgatg | actccggcat | cgggcatgga | tggcacaacg | 600 |
| gggactggtc | cggttgcagg | tggaagtatt | ggcacagctg | gggatcaggc | aggaatggca | 660 |

5

ES 2 927 268 T3

|   |      |
|---|------|
| gcggtgttgc tacagcaagc actctcagct ctccagggta tgaatgccga caagggaggg | 720  |
| ggtgctgctc aaccttctgc tgctcaacaa cctgtgatgc cggtagctag tgatgggaag | 780  |
| aaggtacacc cgaaacctgc tgttgtggaa gagaagaaaa agtccgatca agagaaggag | 840  |
| ggttttgtgg atgcgcctaa gaacaacaag agctactgcc ataggtgcta cggcaagggg | 900  |
| catgtcatga gtgagtgttc gacggcgctg ttttgtgaag tatgtggcac tgatacgcac | 960  |
| ataaagcaca aatgcccggg gttcaacgct ccgaaggttt atgcggttcc ggccggcttt | 1020 |
| ggcatcaaca agggcggtt cttccacatt ccctcgaaca agaagctggg gaagacgaag  | 1080 |
| caagatgcta ggacagcaat gatacaggtg tcggagggac agatcagctt ggagaatggt | 1140 |
| aaccgtgagc tggaccgctt gcttccggg tctgctcctt ggaagtgga acaagtttcg   | 1200 |
| gctagttcct acagaactac ctttccatca gcctcggaac tgcagcgtat ggtggagtgg | 1260 |
| gggccggttc gtgctaaatc acagaaggca gtgctggaat tcatagctag cactagcatg | 1320 |
| gctgaaggac gggcaaggc aaggctgacg gatgtgtggg tgcagtttga tggactgccg  | 1380 |
| gctcagcttt gcacttacca acacatttgg ggagtgggtt cgaaacttgg ggtcacggtt | 1440 |
| gaagtggaca tgctttttt ccgcaagcat gggatctgta gaatgttggg ggctgtcatt  | 1500 |
| gatccagagg caattccatt cgcaggtgat gtggaaatta acaagataat ttacgaggtg | 1560 |
| cactattggg tggacaagc ccctctggat gatgaaccaa cacctatggt ctctgatctt  | 1620 |
| ggcggtgatg accagggtaa cggtgacaac agcaagcaaa ataatgcaa ggaagggat   | 1680 |
| gagcaattca aaatgccggg tgaggaaggg agagatggag aggagaagaa aggcagtaat | 1740 |
| gatgtcgggg agcataagca agtcatggat gctgctccgg tggatgatgg tcaagccttg | 1800 |
| caatgtgatg aggagaatag gctggctgtt ttttga                           | 1836 |

<210> 18

<211> 611

5 <212> PRT

<213> Zea mays

<400> 18

ES 2 927 268 T3

Met Glu Asn Thr Arg Arg Gly Arg Arg Thr Glu Arg Ser Asn Ala Ser  
1 5 10 15

Ser Ser Ser Ser Lys Gln Ala Ala Ala Ala Ala Cys Ile Gly Gly Pro  
20 25 30

Gly Leu Arg Glu Ser Asn Ala Ser Val Gly Gln Ser Gly Asp Val Leu  
35 40 45

Trp Arg Cys Ala Val Gln Asn Glu Pro Tyr Lys Pro Pro Val Gly Leu  
50 55 60

ES 2 927 268 T3

Val Val Leu Phe Asp Arg Thr His Ala Ser Leu Pro Leu Tyr His Arg  
65 70 75 80

Ala Pro Lys Thr Lys Arg Leu Ala Leu Gly Ser Gln Ser Tyr Ala Asp  
85 90 95

Ser Thr Lys Val Pro Pro Thr Leu Pro Met Glu Asn Arg Gly Asp Ser  
100 105 110

Gln Gln Gly Val Gln Gly Gly Arg Pro Val Glu Pro Gly Ala Gly Arg  
115 120 125

Ala Ala Pro Arg Gln Gly Phe Gln Tyr Asn Gly Ser Gly Gln Phe Arg  
130 135 140

Pro Gly Tyr Gly Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Gln Asn Arg Gly Arg Thr  
145 150 155 160

Trp Ser Arg Ala Gly His Gly Arg Gly Met His Gly Pro Val Gly Gly  
165 170 175

Arg Gly Ala Ala Arg Pro Asn Pro Ala Gly Pro Gly Thr Met Thr Pro  
180 185 190

Ala Ser Gly Met Asp Gly Thr Thr Gly Thr Gly Pro Val Ala Gly Gly  
195 200 205

Ser Ile Gly Thr Ala Gly Asp Gln Ala Gly Met Ala Ala Val Leu Leu  
210 215 220

Gln Gln Ala Leu Ser Ala Leu Gln Gly Met Asn Ala Asp Lys Gly Gly  
225 230 235 240

Gly Ala Ala Gln Pro Ser Ala Ala Gln Gln Pro Val Met Pro Val Pro  
245 250 255

Ser Asp Gly Lys Lys Val His Pro Lys Pro Ala Val Val Glu Glu Lys  
260 265 270

Lys Lys Ser Asp Gln Glu Lys Glu Gly Phe Val Asp Ala Pro Lys Asn  
275 280 285

Asn Lys Ser Tyr Cys His Arg Cys Tyr Gly Lys Gly His Val Met Ser  
290 295 300

Glu Cys Ser Thr Ala Leu Phe Cys Glu Val Cys Gly Thr Asp Thr His  
305 310 315 320

ES 2 927 268 T3

Ile Lys His Lys Cys Pro Val Phe Asn Ala Pro Lys Val Tyr Ala Val  
325 330 335

Pro Ala Gly Phe Gly Ile Asn Lys Gly Gly Phe Phe His Ile Pro Ser  
340 345 350

Asn Lys Lys Leu Val Lys Thr Lys Gln Asp Ala Arg Thr Ala Met Ile  
355 360 365

Gln Val Ser Glu Gly Gln Ile Ser Leu Glu Asn Val Asn Arg Glu Leu  
370 375 380

Asp Arg Leu Leu Pro Gly Ser Ala Pro Trp Lys Val Glu Gln Val Ser  
385 390 395 400

Ala Ser Ser Tyr Arg Thr Thr Phe Pro Ser Ala Ser Glu Leu Gln Arg  
405 410 415

Met Val Glu Trp Gly Pro Val Arg Ala Lys Ser Gln Lys Ala Val Leu  
420 425 430

Glu Phe Ile Ala Ser Thr Ser Met Ala Glu Gly Arg Val Lys Ala Arg  
435 440 445

Leu Thr Asp Val Trp Val Gln Phe Asp Gly Leu Pro Ala Gln Leu Cys  
450 455 460

Thr Tyr Gln His Ile Trp Gly Val Gly Ser Lys Leu Gly Val Thr Val  
465 470 475 480

Glu Val Asp Met Pro Phe Phe Arg Lys His Gly Ile Cys Arg Met Leu  
485 490 495

Val Ala Val Ile Asp Pro Glu Ala Ile Pro Phe Ala Gly Asp Val Glu  
500 505 510

Ile Asn Lys Ile Ile Tyr Glu Val His Tyr Trp Val Glu Gln Gly Pro  
515 520 525

Leu Asp Asp Glu Pro Thr Pro Met Val Ser Asp Leu Gly Gly Asp Asp  
530 535 540

Gln Gly Asn Gly Asp Asn Ser Lys Gln Asn Asn Ala Lys Glu Gly Asn  
545 550 555 560

Glu Gln Phe Lys Met Pro Gly Glu Glu Gly Arg Asp Gly Glu Glu Lys

ES 2 927 268 T3

565

570

575

Lys Gly Ser Asn Asp Val Gly Glu His Lys Gln Val Met Asp Ala Ala  
580 585 590

Pro Val Asp Asp Gly Gln Ala Leu Gln Cys Asp Glu Glu Asn Arg Leu  
595 600 605

Ala Val Phe  
610

<210> 19  
<211> 645  
5 <212> ADN  
<213> Zea mays

<400> 19

atgaagatgg gaaagagtag gaaagaacca agggggcggg caggaggtat acttatgggt 60  
attgatctca atgtgaactc atcagagaag aataacgaca attttaatgc gagatggcct 120  
tttctattca atgcgctga attcaagttc gaacttggat ggctgttgcg ggagggattc 180  
tgggagatgg tcaactcaaatt ttggtcaaag gagtatgggt gagatactgc cattgagaga 240  
tggcagcgaa aaataaggaa gttaagacaa tacttgagag aagtagacat gcgcagtttt 300  
cttcgtaata ggctcgcgcc catgttacga gaagaagagg ttaagtggta ccagagagca 360  
aaaactaaag gtttgctgga aggggatgcg aacactaaat atttccatct ggctcgcaat 420  
ggacgcaata tcatggaagg gatagtgatt agatgggtcat ttctaggcaa taacttccaa 480  
actaagaagg ggctacggca aggccttaaa attaacttcc ataaaagtga aatcttctgc 540  
tttgggtcgg ctaaagaaag tgaacattta tactcccaac ttttcggatg tactctttcg 600  
aggaacctac tgggtgctgtt tctggggact actccaaaag cgtga 645

10

<210> 20  
<211> 214  
<212> PRT  
15 <213> Zea mays

<400> 20

ES 2 927 268 T3

Met Lys Met Gly Lys Ser Arg Lys Glu Pro Arg Gly Arg Ser Gly Gly  
 1 5 10 15

Ile Leu Met Gly Ile Asp Leu Asn Val Asn Ser Ser Glu Lys Asn Asn  
 20 25 30

Asp Asn Phe Asn Ala Arg Trp Pro Phe Leu Phe Asn Ala Pro Glu Phe  
 35 40 45

Lys Phe Glu Leu Gly Trp Leu Leu Arg Glu Gly Phe Trp Glu Met Val  
 50 55 60

Thr Gln Ile Trp Ser Lys Glu Tyr Gly Gly Asp Thr Ala Ile Glu Arg  
 65 70 75 80

Trp Gln Arg Lys Ile Arg Lys Leu Arg Gln Tyr Leu Arg Glu Val Asp  
 85 90 95

Met Arg Ser Phe Leu Arg Asn Arg Leu Ala Ala Met Leu Arg Glu Glu  
 100 105 110

Glu Val Lys Trp Tyr Gln Arg Ala Lys Thr Lys Gly Leu Leu Glu Gly  
 115 120 125

Asp Ala Asn Thr Lys Tyr Phe His Leu Val Ala Asn Gly Arg Asn Ile  
 130 135 140

Met Glu Gly Ile Val Ile Arg Trp Ser Phe Leu Gly Asn Asn Phe Gln  
 145 150 155 160

Thr Lys Lys Gly Leu Arg Gln Gly Leu Lys Ile Asn Phe His Lys Ser  
 165 170 175

Glu Ile Phe Cys Phe Gly Ala Ala Lys Glu Ser Glu His Leu Tyr Ser  
 180 185 190

Gln Leu Phe Gly Cys Thr Leu Ser Arg Asn Leu Leu Val Ser Phe Leu  
 195 200 205

Gly Thr Thr Pro Lys Ala  
 210

ES 2 927 268 T3

<210> 21  
 <211> 234  
 <212> ADN  
 5 <213> Zea mays

<400> 21

```

atgcgagtcataatgcgcttgcttagatatactatctaatctgattatggtggtgattta      60
gacaggaggagatctctttcagaagctgagtatatggcaattgcagaagttactaaggaa      120
gccttatggtgaaagatcagatgattactgagaaatccaacatattgatattcgttat      180
cacttcattcgtgatatcatggagaacgtgtatttgcacagcagtttaa atga      234
    
```

10 <210> 22  
 <211> 77  
 <212> PRT  
 <213> Zea mays

15 <400> 22

```

Met Arg Val Ile Cys Val Val Ala Arg Tyr Met Ser Asn Pro Asp Tyr
1           5           10           15

Gly Gly Asp Leu Asp Arg Arg Arg Ser Leu Ser Glu Ala Glu Tyr Met
          20           25           30

Ala Ile Ala Glu Val Thr Lys Glu Ala Leu Trp Leu Lys Asp Gln Met
          35           40           45

Ile Thr Glu Lys Ser Lys His Ile Asp Ile Arg Tyr His Phe Ile Arg
          50           55           60

Asp Ile Ile Gly Glu Arg Val Phe Ala Gln Gln Phe Lys
65           70           75
    
```

20 <210> 23  
 <211> 693  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

25 <400> 23

ES 2 927 268 T3

```

atggcgtgcc acctgagatc tgctagcatg ccttcgagcc ctcgctccgt tgaggaacag      60
attctgagcc tgaagtagc catctctctg ccttcagtga ccatcgaaac catggtggat      120
agtctgagca agctcgggag catctacagc cacatagacg cgctcgcate cctgcccagc      180
tgccagagga aggcaatgga ggaggagctc gagcgctccg ttgtcctgct tgacctctgc      240
agcgccatgc aagagagctt tgcagaactc aaggccagtg tccaggagac gcagttggct      300
ctcaaaagag gagacgagcc ggctcttcat gccaaagattc agtgctatgc gcgctcagct      360
aagaaggcac agaagctggt caagaaggtc aacaagaaga ctgcctccga catcaaagga      420
tgcaggggta tcagcctggt cgctgaagcg agggaagttg cctatcgat cctcgagtcg      480
aactgcate tcctggcgaa gcagattgcg gtcccaagtc ccagcaagtg gtcacttgta      540
tccaaatcgt tccagaagaa gagaatcatg tgtgaggcgg agcagttgca agggttggag      600
ccggagattg ctggtcttga gagcggagtt gggactttgt tcaggacggt gatccagagc      660
agagtttctc ttctcaatgc tcttagtttg tag                                     693

```

<210> 24  
 <211> 214  
 5 <212> PRT  
 <213> Zea mays

<400> 24

```

Met Lys Met Gly Lys Ser Arg Lys Glu Pro Arg Gly Arg Ser Gly Gly
1           5           10           15

```

10

ES 2 927 268 T3

Ile Leu Met Gly Ile Asp Leu Asn Val Asn Ser Ser Glu Lys Asn Asn  
 20 25 30

Asp Asn Phe Asn Ala Arg Trp Pro Phe Leu Phe Asn Ala Pro Glu Phe  
 35 40 45

Lys Phe Glu Leu Gly Trp Leu Leu Arg Glu Gly Phe Trp Glu Met Val  
 50 55 60

Thr Gln Ile Trp Ser Lys Glu Tyr Gly Gly Asp Thr Ala Ile Glu Arg  
 65 70 75 80

Trp Gln Arg Lys Ile Arg Lys Leu Arg Gln Tyr Leu Arg Glu Val Asp  
 85 90 95

Met Arg Ser Phe Leu Arg Asn Arg Leu Ala Ala Met Leu Arg Glu Glu  
 100 105 110

Glu Val Lys Trp Tyr Gln Arg Ala Lys Thr Lys Gly Leu Leu Glu Gly  
 115 120 125

Asp Ala Asn Thr Lys Tyr Phe His Leu Val Ala Asn Gly Arg Asn Ile  
 130 135 140

Met Glu Gly Ile Val Ile Arg Trp Ser Phe Leu Gly Asn Asn Phe Gln  
 145 150 155 160

Thr Lys Lys Gly Leu Arg Gln Gly Leu Lys Ile Asn Phe His Lys Ser  
 165 170 175

Glu Ile Phe Cys Phe Gly Ala Ala Lys Glu Ser Glu His Leu Tyr Ser  
 180 185 190

Gln Leu Phe Gly Cys Thr Leu Ser Arg Asn Leu Leu Val Ser Phe Leu  
 195 200 205

Gly Thr Thr Pro Lys Ala  
 210

ES 2 927 268 T3

<210> 25  
 <211> 693  
 <212> ADN  
 5 <213> Zea mays

<400> 25

```

atggcgtgcc acctgagatc tgctagcatg ccttcgagcc ctgctccgt tgaggaacag      60
attctgagcc tgaagtagc catctctctg ccttcagtga ccatogaaac catggtggat      120

agtctgagca agctcgggag catctacagc cacatagacg cgctcgcatc cctgcccagc      180
tgccagagga aggcaatgga ggaggagctc gaggcgtccg ttgtcctgct tgacctctgc      240
agcgcctatgc aagagagctt tgcagaactc aaggccagtg tccaggagac gcagttggct      300
ctcaaaagag gagacgacgc ggctcttcat gccaaagattc agtgctatgc gcgctcagct      360
aagaaggcac agaagctggt caagaaggtc aacaagaaga ctgcctccga catcaaagga      420
tgcaggggtga tcagcctggt cgctgaagcg agggagttg ccctatcgat cctcgagtcg      480
aactgcatc tcctggcgaa gcagattgcg gtcccaagtc ccagcaagtg gtcacttgta      540
tccaaatcgt tccagaagaa gagaatcatg tgtgaggcgg agcagttgca agggttggag      600
ccggagattg ctggtcttga gagcggagtt gggactttgt tcaggacggt gatccagagc      660
agagtttctc ttctcaatgc tcttagtttg tag                                     693
    
```

10  
 <210> 26  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 <213> Zea mays

15  
 <400> 26

ES 2 927 268 T3

Met Ala Cys His Leu Arg Ser Ala Ser Met Pro Ser Ser Pro Arg Ser  
 1 5 10 15

Val Glu Glu Gln Ile Leu Ser Leu Lys Val Ala Ile Ser Leu Pro Ser  
 20 25 30

Val Thr Ile Glu Thr Met Val Asp Ser Leu Ser Lys Leu Gly Ser Ile  
 35 40 45

Tyr Ser His Ile Asp Ala Leu Ala Ser Leu Pro Ser Cys Gln Arg Lys  
 50 55 60

Ala Met Glu Glu Glu Leu Glu Arg Ser Val Val Leu Leu Asp Leu Cys  
 65 70 75 80

Ser Ala Met Gln Glu Ser Phe Ala Glu Leu Lys Ala Ser Val Gln Glu  
 85 90 95

Thr Gln Leu Ala Leu Lys Arg Gly Asp Asp Ala Ala Leu His Ala Lys  
 100 105 110

Ile Gln Cys Tyr Ala Arg Ser Ala Lys Lys Ala Gln Lys Leu Phe Lys  
 115 120 125

Lys Val Asn Lys Lys Thr Ala Ser Asp Ile Lys Gly Cys Arg Val Ile  
 130 135 140

Ser Leu Val Ala Glu Ala Arg Glu Val Ala Leu Ser Ile Leu Glu Ser  
 145 150 155 160

Thr Leu His Leu Leu Ala Lys Gln Ile Ala Val Pro Ser Pro Ser Lys  
 165 170 175

Trp Ser Leu Val Ser Lys Ser Phe Gln Lys Lys Arg Ile Met Cys Glu  
 180 185 190

Ala Glu Gln Leu Gln Gly Leu Glu Pro Glu Ile Ala Gly Leu Glu Ser  
 195 200 205

Gly Val Gly Thr Leu Phe Arg Thr Leu Ile Gln Ser Arg Val Ser Leu  
 210 215 220

Leu Asn Ala Leu Ser Leu  
 225 230

<210> 27  
 <211> 309  
 5 <212> ADN

ES 2 927 268 T3

<213> Zea mays

<400> 27

```

atggcggcgg gaaagctggg gcagcagctg atgacgaggc tgcacctcgc gaggaccgga      60
tcgtcggcga cggcggacgt gccgcggggc cacctggcgg tgtacgtggg cgagggggcgg      120
aagcggctgg tcatcccgac ggcgtgcctc agccaccggg ccttcgtcac gctgctgaag      180
cgggtggagg acgagttcgg cttcgaccac cgctgcggcg gcctcacat  ccctgcgcc      240
tccgagaccg agttcgtca  catcgtcggc gccgccggcg ccgccgggga cgaccaccac      300
catcactga                                     309

```

5

<210> 28

<211> 102

<212> PRT

10 <213> Zea mays

<400> 28

```

Cys Leu Ser His Pro Ala Phe Val Thr Leu Leu Lys Arg Val Glu Asp
   50                               55                               60

Glu Phe Gly Phe Asp His Arg Cys Gly Gly Leu Thr Ile Pro Cys Ala
  65                               70                               75                               80

Ser Glu Thr Glu Phe Ala His Ile Val Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly
           85                               90                               95

Asp Asp His His His His
           100

```

15

<210> 29

<211> 309

<212> ADN

<213> Zea mays

20

<400> 29

```

atggcggcgg gaaagctggg gcagcagctg atgacgaggc tgcacctcgc gaggaccgga      60
tcgtcggcga cggcggacgt gccgcggggc cacctggcgg tgtacgtggg cgagggggcgg      120
aagcggctgg tcatcccgac ggcgtgcctc agccaccggg ccttcgtcac gctgctcaag      180
cgggtggagg acgagttcgg cttcgaccac cgctgcggcg gcctcacat  ccctgcgcc      240
tccgagaccg agttcgtca  catcgtcggc gccgccggcg ccgccgggga cgaccaccac      300
catcactga                                     309

```

ES 2 927 268 T3

<210> 30  
 <211> 102  
 <212> PRT  
 5 <213> Zea mays

<400> 30

Met Ala Ala Gly Lys Leu Gly Gln Gln Leu Met Thr Arg Leu His Leu  
 1 5 10 15

Ala Arg Thr Arg Ser Ser Ala Thr Ala Asp Val Pro Arg Gly His Leu  
 20 25 30

Ala Val Tyr Val Gly Glu Gly Arg Lys Arg Leu Val Ile Pro Thr Ala  
 35 40 45

Cys Leu Ser His Pro Ala Phe Val Thr Leu Leu Lys Arg Val Glu Asp  
 50 55 60

Glu Phe Gly Phe Asp His Arg Cys Gly Gly Leu Thr Ile Pro Cys Ala  
 65 70 75 80

10

Ser Glu Thr Glu Phe Ala His Ile Val Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly  
 85 90 95

Asp Asp His His His His  
 100

<210> 31  
 15 <211> 512  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 31  
 20

ES 2 927 268 T3

```

atggcggcgg gaaagctggg gcagcagctg atgacgaggc tgcacctcgc gaggaccgga      60
ccgtcggcga cggcggacgt gccgcggggc cacctggcgg tgtacgtggg cgagggggcgg      120
aagcggctgg tcatccaac ggcgtgcctc agccaccag ccttcgtcac gctgctgaag      180
cgggtggagg acgagttcgg cttegaccac cgctgcggcg gcctcaccat cccctgcgcc      240
tccgagaccg agttcgtca catcgtgggc gccgcgcgcg ccggggacgg ccaccaccat      300
cactgacgat cgcgtgcgtg cccgcgcgca tcgatcgagt tagagtccgg ccgtgtogat      360
agattaattc cgcttcagt tccacctagc taggacaaaa ttattgttct cttttggggg      420
ggtgtcgatc gtagcagcaa tagtgttggg ttttgcttga cgacactgta aagattgtga      480
ttggaattg gaagaataag ctcttctctc ac                                     512

```

<210> 32  
 <211> 101  
 5 <212> PRT  
 <213> Zea mays

<400> 32

```

Met Ala Ala Gly Lys Leu Gly Gln Gln Leu Met Thr Arg Leu His Leu
1           5           10           15

Ala Arg Thr Arg Pro Ser Ala Thr Ala Asp Val Pro Arg Gly His Leu
          20           25           30

Ala Val Tyr Val Gly Glu Gly Arg Lys Arg Leu Val Ile Pro Thr Ala
          35           40           45

Cys Leu Ser His Pro Ala Phe Val Thr Leu Leu Lys Arg Val Glu Asp
50           55           60

Glu Phe Gly Phe Asp His Arg Cys Gly Gly Leu Thr Ile Pro Cys Ala
65           70           75           80

Ser Glu Thr Glu Phe Ala His Ile Val Gly Ala Ala Ala Ala Gly Asp
          85           90           95

Gly His His His His
100

```

10  
 <210> 33  
 <211> 1501  
 <212> ADN  
 15 <213> Zea mays

<400> 33

ES 2 927 268 T3

cctatgcaaa cctagattaa atttatagtg ggattttaacc caaataatgc atgccccgct 60  
aatgggtgat ggatttcccc tcataagttt ttaccatatg gtcatttctt gccatcctaa 120  
caacttctaa ttcatgaatt ggattgggtg acataacccc ataaaattgt gggttgggta 180  
aagcagttaa tttgacatgg ggttgaggta gatatgggat ggaatttttg ttttaagagc 240  
aatggcatca gctctactat ttattaattt aaaagggaaa acaaatagtt cataaaattg 300  
tgtagagtag aagctagcta gctagcattg gtcagaataa gcaggacaca cctgggtgag 360  
agaagagagc ttattcttcc aatccccaat cacaatcttt acagtgtcgt caagcaaaaa 420  
cccaatcact attgctgcta cgacaccacc ccaaagagaa caataatttt gtectagcta 480  
ggtggaactg gaagcggaat taatctatcg acacggccgg actcgatcga tgggcgctgg 540  
cacgcacgcg atcgtcagtg atggtgggtg tcgtccccgg cggcggcggc ggcgcccagc 600  
atgtgagcga actcggctc ggaggcgag gggatggtga ggccgcccga gcggtggtcg 660  
aagccgaact cgtcctccac ccgcttgagc agcgtgacga aggcgggtg gctgaggcac 720  
gccgtcggga tgaccagccg cttccgcccc tcgcccacgt acaccgccag gtggccccgc 780  
ggcacgtccg ccgtcgcga cgategggtc ctgcgaggt gcagcctcgt catcagctgc 840  
tgccccagct tccccgccc catctctagc tctagctgtg tgtgtcggtg attggtgcac 900  
aaagtcgtgt gtatagctct agcttgctat agctagagtg gtgctgctag atttggagct 960  
caagagcttt gtgtggcgac ctgtgctgtg aggaccaagg ttgcactggg ccggtctttt 1020  
atagcgctc acaccagcta gctcagctc aggcagcatg catggagatg gagccaatct 1080  
tgccatggca cccaacaac gcgcctacc ggataaatta gaaagaatca tggaagcaca 1140  
gtacggagta gtagttagt gtggcacgca ccacttgagc tttcttggtg gtgatatgat 1200  
gatgatcata aagctgggca tatgcatgtc aatcacatgc tgcatgcagc agcactggca 1260  
ctaatgagta gtgatgtctc taaaagtac acccaccatt cacaaatact aacaccattg 1320  
atttaaaaaa aactttaaac actcgtctta tataaaatat aaaatataaa attttaagtt 1380  
ataacttatt tttctaataa gacgagtgat aaaaaattta aaaagaacgg tgtcatatat 1440  
ttatgaacgg atgaagtata ggacaacatt gatttttttt aaaaaaaaaa ttaatcactc 1500  
a 1501

ES 2 927 268 T3

<210> 34  
 <211> 1501  
 <212> ADN  
 5 <213> Zea mays

<400> 34

```

ccctatgcaa acctagatta aatttatagt gggatttaac ccaaataatg catgccccgc      60
taatgggtga tggatttccc ctcataagtt tttaccatat ggtcatttcc tgccatccta      120
acaacttcta attcatgaat tggattgggt gacataaccc cataaaattg tgggttgggt      180
aaagcagtta atttgacatg gggttgaggt agatatggga tgggaattttt gttttaagag      240
caatggcatc agctctacta tttattaatt taaaagggaa acaaatagtt tcataaaatt      300
gtgtagagta gaagctagct agctagcatt ggtcagaata agcaggacac acctgggtga      360
gagaagagag cttattcttc caatccocaa tcacaatctt tacagtgtcg tcaagcaaaa      420
acccaatcac tattgctgct acgacaccac ccaaagaga acaataattt tgtcctagct      480
aggtggaact ggaagcggaa ttaatctatc gacacggccg gactcgatcg atcggcgcgg      540
gcacgcacgc gatcgtcagt gatgggtggtg gtcgtccccg gcggcggcgg cggcgcgcac      600
gatgtgagcg aactcggctc cggaggcgca ggggatgggtg aggccgcgcg agcgggtggtc      660
gaagccgaac tcgtctcca cccgcttcag cagcgtgacg aaggccgggt ggctgaggca      720
cgccgtcggg atgaccagcc gcttcgccc ctgcgccacg tacaccgcca ggtggccccg      780
cggcacgtcc gccgtgcgcg acgatcgggt cctcgcgagg tgcagcctcg tcatcagctg      840
ctgccccagc tttcccgccg ccattctctag ctctagctgt gtgtgtcgggt gattgttgca      900
caaagtcgtg tgtatagctc tagcttgcta tagctagagt ggtgctgcta gatttgagc      960
tcaagagctt tgtgtggcga cctgtgctgt gaggaccaag gttgcactgg gccggtcttt     1020
tatagcgctt cacaccagct agctcagtct caggcagcat gcatggagat ggagccaatc     1080
ttgccatggc acccaacaac gcgcgcctac cggataaatt agaaataatc atggaagcac     1140
agtacggagt agtagtgtaa tggcacgcac cacttgacgt ttcttgttgg tgatatgatg     1200
atgatcataa agctgggcat atgcatgtca atcacatgct gcatgcagca gcaactggcac     1260
taatgagtag tgatgtctct aaaaagtaca cccaccattc acaataacta acaccattga     1320
tttaaaaaaa actttaaaca ctctctttat ataaaatata aaatataaaa ttttaagtta     1380
taacttattt ttctaataag acgagtgata aaaaatttaa aaagaacggt gtcatatatt     1440
tatgaacgga tgaagtatag gacaacattg atttttttta aaaaaaaaaat taatcactca     1500
t                                                                                   1501
    
```

ES 2 927 268 T3

<210> 35  
 <211> 507  
 <212> ADN  
 5 <213> Zea mays

<400> 35

|  |     |
|--|-----|
| atgcgagtca tatgcgttgt tgctagatac atgtctaatac ctggtaaaga gcattggaaa | 60  |
| gctgttcagt ggattttcag atatctacgt ggttcttcta gtgcttgttt atgttttggg  | 120 |
| aaatctggag atggtctgat tggctatggt gattcagatt atggtggtga tttagacagg  | 180 |
| aggagatctc tttcaggta tgtctttact attggagatt gtgctgtgag ttggaaagct   | 240 |
| cgtttacagg atactgttgc tttgtctacc acagaagctg aatataatggc aattgcagaa | 300 |
| gttactaagg aagccttatg gttgaaaggt atatattcag agctatgtgg aattaagtct  | 360 |
| tgcattacca tctattgtga tagccagagt gccattcatc tcaccaaga tcagatgatt   | 420 |
| actgagaaat ccaaacatat tgatattcgt taccacttca ttcgtgatat cattggagaa  | 480 |
| cgtgtatttg cacagcagtt taaatga                                      | 507 |

10  
 <210> 36  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

15  
 <400> 36

agctatacac acgactttgt gcaacaatca 30

20  
 <210> 37  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

25  
 <400> 37

cgacacacac agctagagct agagatggcg 30

30  
 <210> 38  
 <211> 509  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

35  
 <223> SAUR31 mutante

<220>  
 <221> 5'UTR

40 <222> (310)..(435)

<220>  
 <221> mutación  
 <222> (334)..(334)

45  
 <400> 38

ES 2 927 268 T3

|  |     |
|--|-----|
| tcagtgatgg tgggtggtcgt ccccggcggc ggcggcggcg ccgacgatgt gagcgaactc | 60  |
| ggtctcggag gcgcagggga tgggtgaggcc gccgcagcgg tggtcgaagc cgaactcgtc | 120 |
| ctccacccgc ttgagcagcg tgacgaagge cgggtggctg aggcaacgcc tcgggatgac  | 180 |
|  |     |
| cagccgcttc cgcccctcgc ccacgtacac cggcaggtgg ccccgcggca cgtccgcgt   | 240 |
| cgccgacgat cgggtcctcg cgaggtgcag cctcgtcacc agctgctgcc ccagctttcc  | 300 |
| cgccgccacc tctagctcta gctgtgtgtg tcgatgattg ttgcacaaag tcgtgtgtat  | 360 |
| agctctagct tgctatagct agagtgggtc tgctagattt ggagctcaag agctttgtgt  | 420 |
| ggcgacctgt gctgtgagga ccaaggttgc actgggcggg tcttttatag cgctcacac   | 480 |
| cagctagctc agtctcagge agcatgcat                                    | 509 |

**REIVINDICACIONES**

1. Planta de maíz resistente al frío o una parte de la misma, que comprende un primer intervalo cromosómico de un donante en el cromosoma 4 entre las posiciones de marcador ma59778s31 y ma59778119, que presenta un ácido nucleico endógeno transmisor de resistencia al frío, donde el ácido nucleico transmisor de resistencia al frío comprende una secuencia de ácido nucleico, seleccionada del grupo que consiste en
- a) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 29,
  - b) una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 98 % idéntica a una secuencia de a),
  - c) una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con a), según el código genético degenerado,
  - d) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO 30,
- donde hay en la posición del marcador ma59778s31 una T, en una posición del marcador ma59778s32 una T, en la posición del marcador ma59778119 una C, en una posición del marcador ma52594s01 una A y en una posición del marcador ma20205s01 una G, o donde hay en la posición de marcador ma59778s31 una C, en una posición de marcador ma59778s32 una T, en la posición de marcador ma59778119 una C y en una posición de marcador ma52594s01 una A; y donde las posiciones de marcador con referencia a la línea de maíz B73 AGPv2 son las siguientes: ma59778s31 = 37263172 bp, ma59778s32 = 37296672 bp, ma59778119 = 37297901 bp, ma52594s01 = 58033711 bp y ma20205s01 = 156.998.152 bp.
2. Planta de maíz o una parte de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la zona en el cromosoma 4, flanqueada por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01, presenta al menos en parte una frecuencia alélica elevada.
3. Planta de maíz o una parte de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la secuencia de ácido nucleico está vinculada operativamente con un promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33, o con una variante alélica que genera una tasa de expresión o altura de expresión comparable a la del promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33, o por que la secuencia de ácido nucleico está operativamente vinculada a una forma modificada de un promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 34, donde la forma modificada comprende una tasa de expresión o altura de expresión comparable a la del promotor que genera la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33.
4. Procedimiento para la selección de una planta de maíz resistente al frío que comprende las etapas de:
- i. identificar una planta de maíz resistente al frío que comprende un primer intervalo cromosómico de un donante en el cromosoma 4 entre las posiciones de marcador ma59778s31 y ma59778119, que presenta un ácido nucleico endógeno transmisor de la resistencia al frío, que comprende las etapas de
    - A) aislamiento del ADN del genoma de una planta de maíz,
    - B) detección de los alelos en las posiciones de marcador ma59778s31, ma59778s32 y ma59778119, que es un diagnóstico del ácido nucleico transmisor de la resistencia al frío en un intervalo cromosómico flanqueado por las posiciones de marcador ma59778s31 y ma59778119, donde en la posición del marcador ma59778s31 hay una T, en la posición del marcador ma59778s32 una T y en la posición del marcador ma59778119 una C, o donde en la posición del marcador ma59778s31 hay una C, en la posición del marcador ma59778s32 una T y en la posición del marcador ma59778119 una C; y
  - ii. selección de la planta de maíz resistente al frío en base a la detección en la etapa i. B);
- donde el ácido nucleico endógeno transmisor de resistencia al frío comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en
- a) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO 29,
  - b) una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 98 % idéntica a una secuencia de a),
  - c) una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con a), según el código genético degenerado,
  - d) una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO 30,
- donde las posiciones de los marcadores con referencia a la línea de maíz B73 AGPv2 son las siguientes: ma59778s31 = 37263172 bp, ma59778s32 = 37296672 bp y ma59778119 = 37297901 bp.
5. Procedimiento para la selección de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** la secuencia de ácido nucleico está vinculada operativamente con un promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de

acuerdo con la SEQ ID NO: 33, o con una variante alélica que genera una tasa de expresión o altura de expresión comparable a la del promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33, o por que la secuencia de ácido nucleico está operativamente vinculada a una forma modificada de un promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 34, donde la forma modificada comprende una  
5 tasa de expresión o altura de expresión comparable a la del promotor que genera la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33.

6. Procedimiento para la selección de acuerdo con la reivindicación 4 **caracterizado por que** la zona sobre el cromosoma 4, flanqueada por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01, presenta al menos en parte  
10 una frecuencia de alelos elevada.

Figura 1:

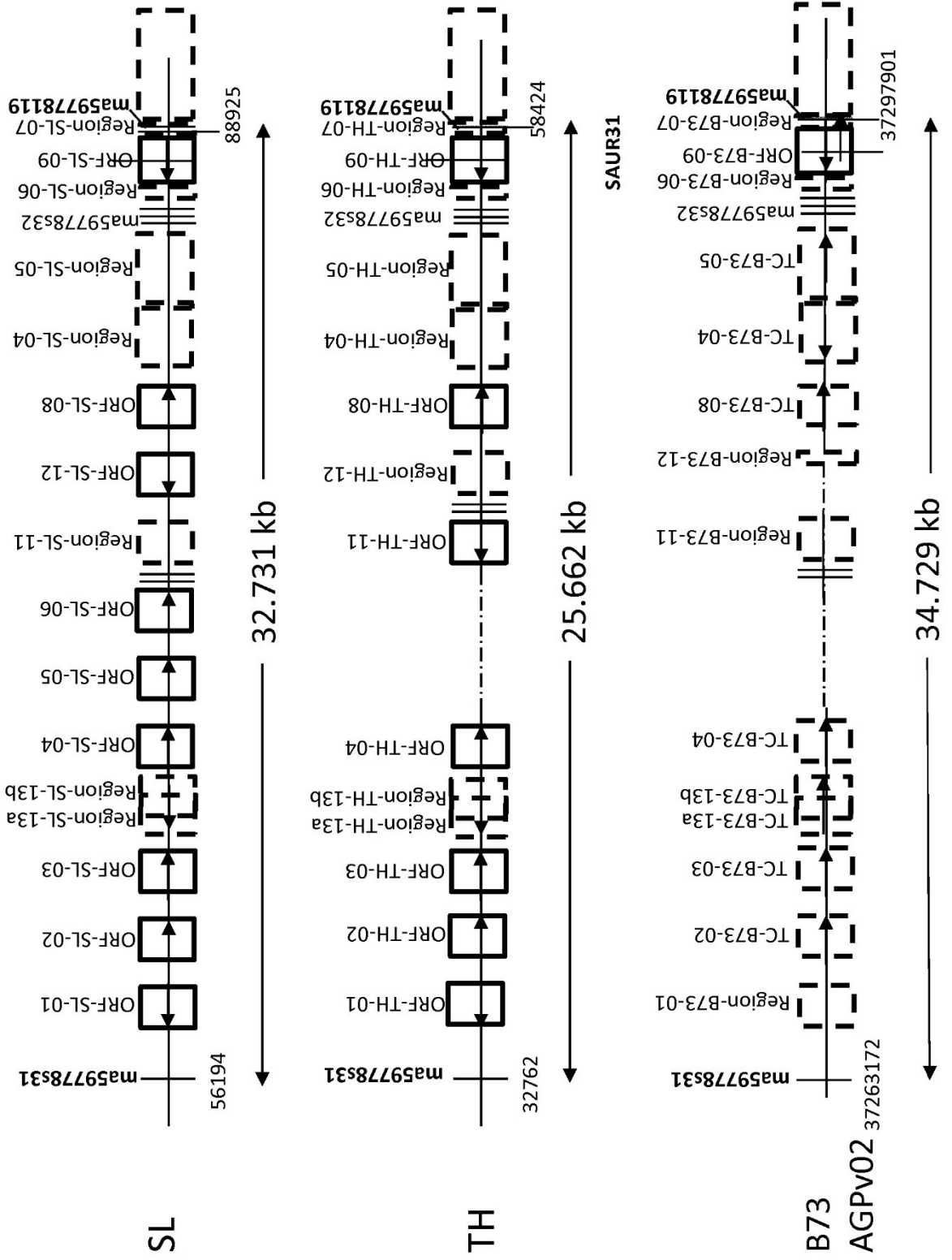


Figura 2:

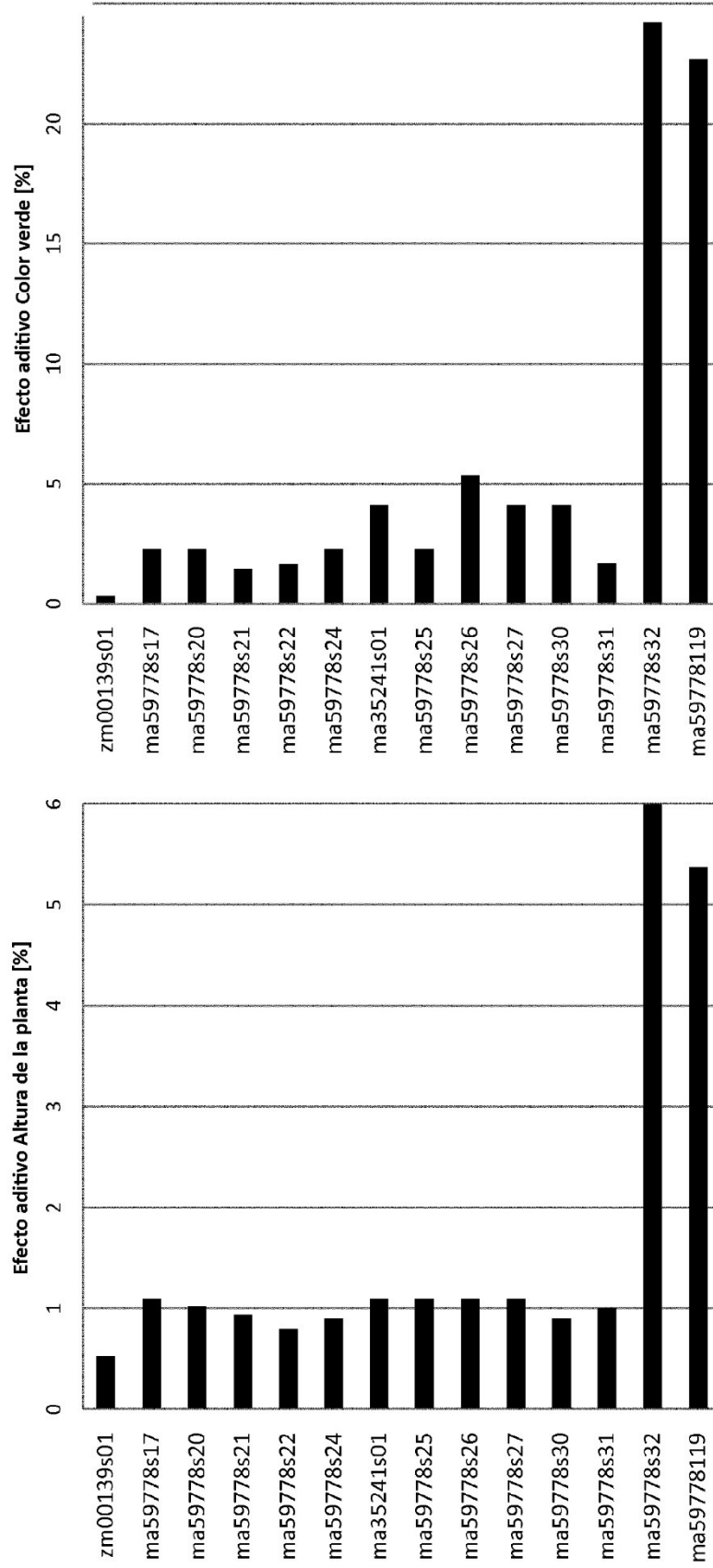


Figura 3:

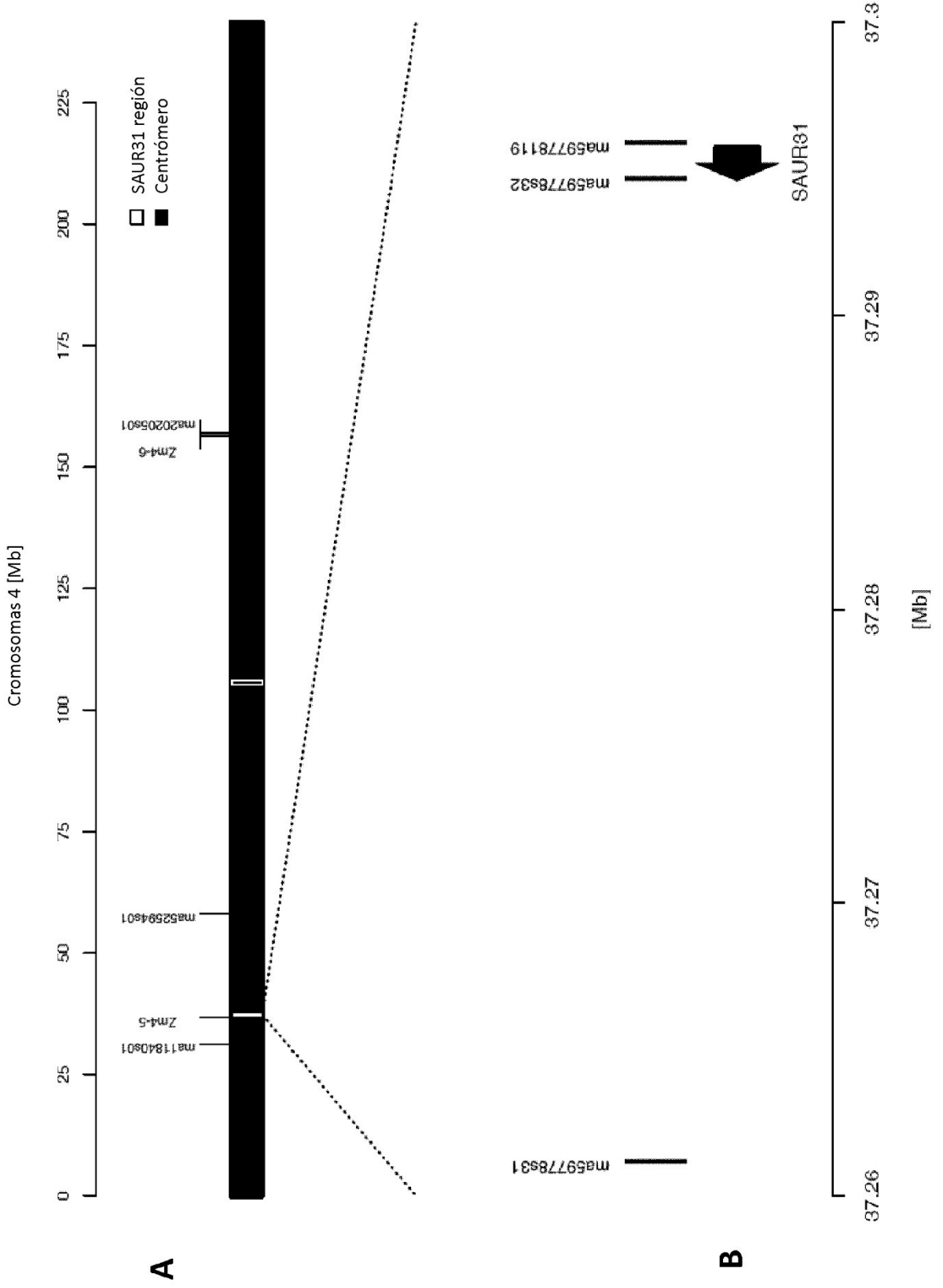
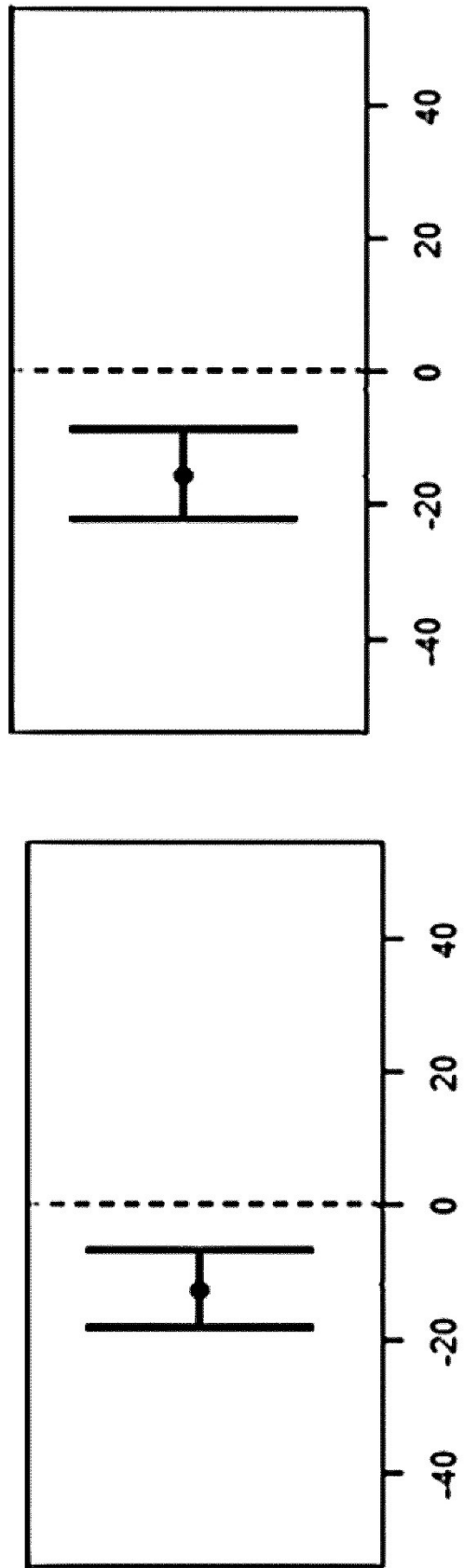


Figura 4:



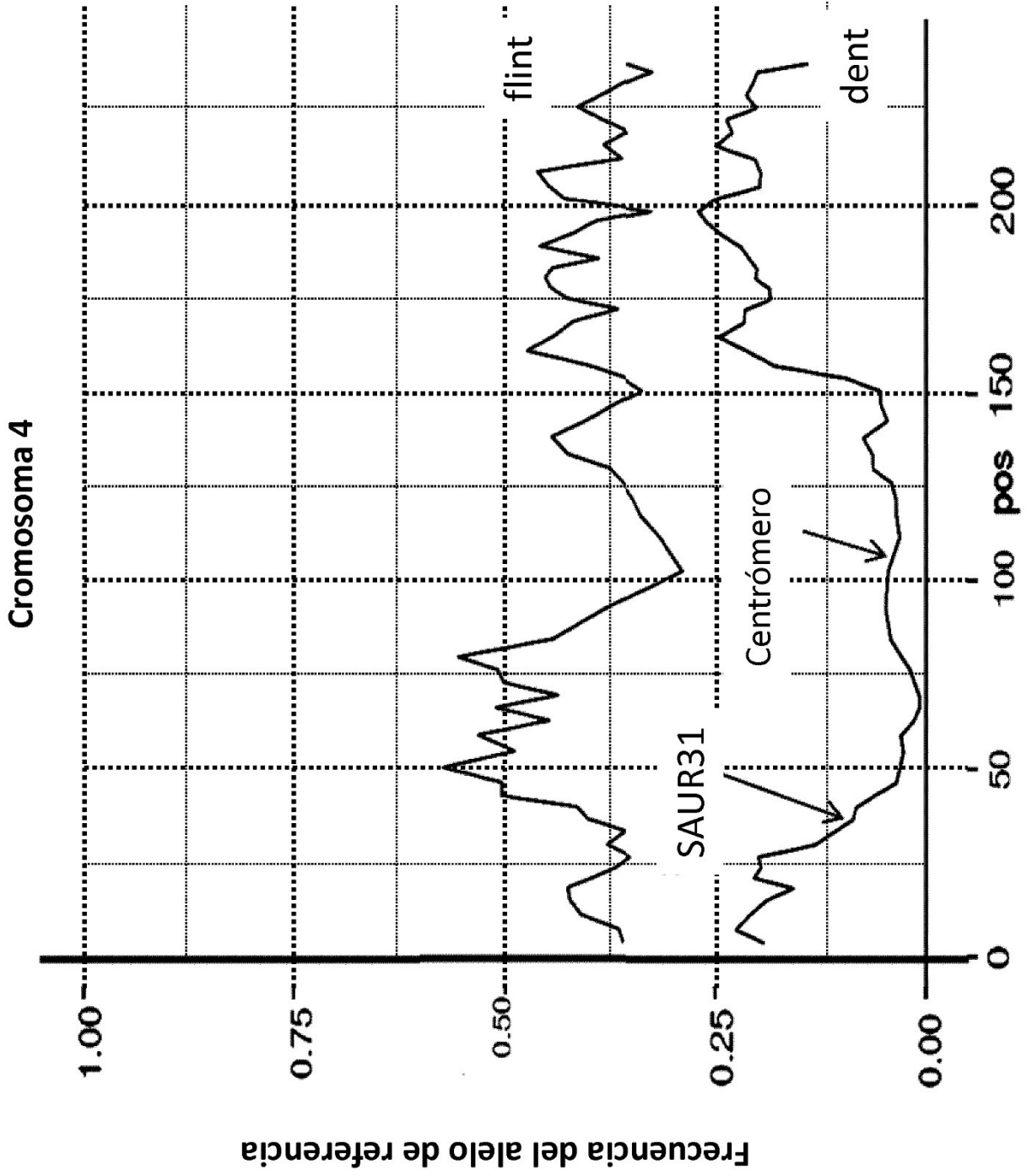


Figura 5:

Figura 6:

