

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 899 176**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A01H 5/10 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2015** **E 15196721 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.08.2021** **EP 3173485**

54 Título: **Plantas tolerantes a las bajas temperaturas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2022

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 2 899 176 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas tolerantes a las bajas temperaturas

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la modificación de plantas por medio de métodos de biología molecular y tecnología de marcadores y la técnica de ingeniería genética. Se refiere a una nueva planta tolerante a las bajas temperaturas, especialmente una planta de maíz, así como a la identificación y la caracterización molecular, y al uso de genes y marcadores de un intervalo cromosómico de 25,7 kb, el cual en las líneas de maíz contiene un locus para la tolerancia al frío/a las bajas temperaturas. Otro aspecto de la invención se refiere al desarrollo de marcadores moleculares para ayudar durante el cultivo, especialmente para evitar una fijación de un barrido selectivo ("*selective sweep*") en una región con una tasa de recombinación reducida.

Antecedentes de la invención

El término "bajas temperaturas" se refiere a temperaturas a las cuales la planta de maíz puede sobrevivir, pero el crecimiento se ve perjudicado o incluso muy perjudicado. La temperatura de crecimiento óptima para la germinación de las semillas de maíz y el desarrollo de plantas de maíz se encuentra entre 21–27 °C (Greaves JA (1996) *Improving suboptimal temperature tolerance in maize—the search for variation*. J Exp Bot 47: 307–323, 1996).

Por lo tanto aparece el estrés ya a temperaturas por debajo de 20 °C, que es una temperatura típica medida durante el tiempo de siembra en el norte de Europa. Un estrés por bajas temperaturas más leve, con fotosíntesis reducida bajo luz y crecimiento reducido se encuentra a 12–17 °C, y un estrés por bajas temperaturas más fuerte aparece junto con estrés hídrico por las bajas temperaturas, un tipo de estrés por sequía, bajo luz a 2–10 °C (Marocco A., Lorenzoni C and Fracheboud Y, 2005. *Chilling stress in maize*. Maydica, 50: 571–580).

El estrés por bajas temperaturas se produce o bien con una fotoinhibición y estrés oxidativo bajo luz o modificaciones de la expresión genética en la oscuridad (resumido en Marocco et al., 2005). La más sensible es la fase heterótrofa (de la siembra hasta la tercer hoja), sin embargo, el estrés por bajas temperaturas perjudica también a 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). Una incidencia prolongada de temperaturas reducidas lleva a un daño irreversible de las células y del tejido (Greaves, 1996) y un crecimiento y rendimiento en consecuencia reducidos.

Un crecimiento fuerte temprano de la planta se considera un indicador importante de rendimientos altos y estables, por ejemplo, en el maíz, especialmente en el clima fresco de Europa Central y del Norte. Adicionalmente, las clases de maíz que tienen un mayor crecimiento temprano producen un mejor cubrimiento del suelo y ayudan de este modo a reducir la erosión y el lavado de nitratos al comienzo de la fase de crecimiento.

Se realizaron múltiples investigaciones del locus de rasgos cuantitativos (QTL = *Quantitative Trait Locus*) para identificar una tolerancia genética a las bajas temperaturas en el maíz. La mayoría de los estudios analizaron plantas de maíz que fueron cultivadas en cámaras de crecimiento bajo condiciones óptimas (25/22 °C) y subóptimas (15/13 °C). Para ello se midieron parámetros tales como la eficiencia cuántica del Fotosistema II, la eficiencia cuántica máxima del Fotosistema II, la fluorescencia de clorofila, el contenido de clorofila de la tercer hoja (SPAD), la superficie 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* 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 documentó ningún QTL en la proximidad del QTL descrito en el cromosoma 4 y clonado. Leipner et al. (QTL studies reveal little relevance of chilling-related seedling traits for yield in maize. Theor Appl Genet (2008) 116:555–562) informaron sobre un experimento de mapeo de QTL durante la fase de floración y cosecha en un experimento de campo con dos siembras temporalmente diferentes. Los parámetros medidos eran tiempo de floración, altura de la planta, peso de la materia seca de la paja y las espigas, y los autores compararon sus QTLs identificados con QTLs que fueron identificados por medio de experimentos en cámaras de crecimiento en la fase de germinación, como publicaron 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, Año 56., No. 414, pp. 1153–1163.). Sólo de comprobaron pocos QTLs comunes. Leipner et al. llegaron a la conclusión a partir de esto que la tolerancia a las bajas temperaturas de las plántulas aparentemente no tenía un efecto significativo sobre el rendimiento.

Jompuk et al. (2005) determinaron el intercambio de carbono y la fluorescencia de la clorofila, la eficiencia cuántica operativa del Fotosistema II, la coloración verde de la tercer hoja (SPAD), la superficie de la tercer hoja y la masa seca de la plántula en la misma población, y mapearon un QTL para SPAD en una siembra temprana y la eficiencia cuántica operativa del Fotosistema II sobre el cromosoma 4 a 31,1 Mb, lo que se encuentra aproximadamente 6 Mb alejado 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 sobre el cromosoma 4 un QTL de 4 cM, el cual comprende sin embargo, un tamaño físico de aproximadamente 155 Mb, lo que representa no menos de aproximadamente 7 % del genoma total en el maíz. Si bien se informa de un estudio de mapeo fino continuado en Baliashvili en 2011 (Feinkartierung eines QTL (Quantitative Trait Locus) für Kühleintoleranz auf Chromosom 4 in Mais und dessen molekularbiologische und phänotypische Charakterisierung. Diss. Universitäts- y Landesbibliothek der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2011), no se publican allí, sin embargo, ni los marcadores ni otras informaciones de secuencias.

Un estudio sobre QTL realizado hace poco fue publicado por Rodríguez et al. (Effects of selection for color intensity on antioxidant capacity in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica*, 2013, 193. Año, No. 3, pp. 339–345.). Los descendientes de un cruzamiento de maíz flint y maíz dent fueron evaluados bajo condiciones controladas, en donde la línea de maíz dent reaccionó en forma sensible contra las bajas temperaturas y mostró una reducción drástica del contenido de clorofila. Las temperaturas de control se ajustaron allí a 25/20 °C, y las temperaturas más frías a 14/8 °C. Los parámetros medidos eran el número de plantas que sobrevivieron bajo las condiciones control y de frío, el peso seco de la plántula bajo condiciones control, el rendimiento cuántico del Fotosistema II bajo condiciones control y el contenido total de antocianina. Si bien cuatro de 10 regiones comprobadas de QTL se superpusieron con el QTL mapeado por Presterl et al 2007 sobre el cromosoma 4, no se realizaron, sin embargo, otras investigaciones con respecto a las bases genéticas, como por ej., el mapeo fino de las regiones o la identificación de los genes candidatos.

En tales investigaciones es importante básicamente que por el análisis de un origen parental de alelos en marcadores que flanquean un locus objetivo se pueda seleccionar individuos con un segmento cromosómico dador intacto corto alrededor del gen objetivo y así se pueda reducir el arrastre por ligamiento ("*linkage drag*"). Stam y Zeven (The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers bred by backcrossing. *Euphytica*, 1981, 30. Jg., Nr. 2, S. 227–238) mostraron, sin embargo, que la longitud esperada de un segmento cromosómico dador que está acoplado con un gen objetivo, incluso después de seis generaciones de retrocruzamientos y combinado con la selección aún se encuentra en el gen objetivo 32 cM sobre un cromosoma de 100 cM. Se encuentran ejemplos de propiedades genéticamente codificadas negativas que permanecen acopladas con un gen objetivo 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, Año 32., No. 2, pp. 319–327).

Básicamente, la tolerancia a las bajas temperaturas en el desarrollo ulterior de las plantas de cultivo es una característica importante. Así, para otros tipos de cultivo ya se conocen genes que brindan tolerancia a las bajas temperaturas. Ma et al. describen (en: COLD1 confers chilling tolerance in rice. *Cell*. 2015 Mar 12; 160(6):1209–21), por ejemplo el QTL COLD1 en el arroz. Una sobreexpresión de COLD1(jap) aumenta la tolerancia a las bajas temperaturas en forma significativa. El COLD1 codifica para un regulador de la cascada de señales de la proteína G. Además, también se describe un SNP en COLD1, denominado SNP2. La tolerancia a las bajas temperaturas también es un objetivo importante para el cultivo de maíz con respecto a los silos, los granos y la energía en numerosas regiones de cultivo de maíz, especialmente en las regiones frías de Europa Central y del Norte, pero también en Europa del Sur, en donde los granjeros desearían poder sembrar más temprano las plantas de maíz, para poder aprovechar mejor la humedad del invierno que se encuentra en el suelo. El hallazgo y la caracterización de genes que brinden tolerancia a las bajas temperaturas y la provisión de nuevos marcadores para la tolerancia a las bajas temperaturas en plantas en general y especialmente en plantas de cultivo, así como la provisión de plantas con una mayor tolerancia a las bajas temperaturas, sin que estas plantas presenten además otras desventajas agronómicas o de cultivo, es por lo tanto de interés especial y un objeto de esta invención. Otros aspectos resultarán evidentes para el experto en el arte durante el estudio de la siguiente descripción y los ejemplos.

Un primer aspecto de la presente solicitud describe la provisión de un ácido nucleico que tiene una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en a) una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO 29, b) una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 90% o 95% o es preferente al menos 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a una secuencia de a), c) una secuencia de ácidos nucleicos que, según el código genético degenerado, se deriva de una secuencia de ácidos nucleicos según a) o b), o d) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína según una de SEQ ID NO 30. Además, se describe un ácido nucleico que tiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno o más ARN que es/son al menos parcialmente capaces de hibridar consigo mismo o entre sí y de ese modo formar una parte bicatenaria, esta secuencia de ácidos nucleicos sobre al menos 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25, preferiblemente al menos 30, 32, 34, 36, 38 o 40, con especial preferencia al menos 50, 60, 70, 80, 90 o 100, o muy particularmente preferiblemente al menos 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 o 1000 nucleótidos consecutivos corresponden a una de las secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos según SEQ ID NO: 27, (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria a una secuencia de i) es, (iii) una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 80%, 85%, 90% o 95% o preferiblemente al menos 96%, 97%, 98 % o 99% idéntica a una secuencia de (i) o (ii), (iv) una secuencia de un ácidos nucleicos, que según el código genético degenerado, se deriva de una secuencia de ácidos nucleicos según (i), (ii) o (iii), (v) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos según (i) , (ii) o (iii) bajo condiciones rigurosas, (vi) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de acuerdo con SEQ ID NO: 28, o un homólogo, análogo u ortólogo de la misma, o vii) una secuencia de ácidos nucleicos en orientación antisentido a una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con (i) a (vi).

La presente invención es el resultado de esfuerzos del inventor para identificar en forma precisa y localizar un locus marcador cuantitativo de tolerancia a las bajas temperaturas (*quantitative trait locus (QTL)*) en el cromosoma 4 del maíz, clonar y secuenciar este QTL, e identificar el o los genes que son responsables del fenotipo de tolerancia a las bajas temperaturas. La región identificada de 25,7 kb en total (genotipo dador) fue investigada molecularmente, y se identificaron genes candidatos adecuados (véase Figura 1). La validación funcional realizada comprendía la identificación de mutantes de Tilling y estudios de expresión génica. De esta manera se vuelve aprovechar recién la tolerancia a las bajas temperaturas identificada con respecto al cultivo y a la técnica de ingeniería genética. En el curso de los trabajos de mapeo y mapeo fino se desarrollaron marcadores moleculares especiales que se pueden usar como diagnóstico para la selección de plantas con mayor tolerancia a las bajas temperaturas. Además, los marcadores desarrollados pueden ser usados para introducir por cruzamiento específicamente la fuente genética de la mayor tolerancia a las bajas temperaturas en material de cultivo presente (por ej., tipo existentes, líneas de elite, etc.) y de este modo mantener reducida la longitud de la introgresión producida. De este modo es posible por primera vez transferir la característica de tolerancia a las bajas temperaturas, sin arrastrar un sector genético extenso de la región del centrómero del cromosoma 4 del dador. Esto es especialmente ventajoso porque se determinó que este sector genético está fijado fuertemente y por lo tanto sólo admite una medida reducida de diversidad genética y frecuencia de recombinación. Si se arrastrara este sector genético, que representa más del 5% del genoma total del maíz, esto limitaría drásticamente el aprovechamiento de cultivo de tipos que tienen esta importante característica agronómica. La presente invención posibilita por lo tanto en forma ventajosa el aprovechamiento de cultivo de la característica de tolerancia a las bajas temperaturas identificada y reduce al mismo tiempo la pérdida de la diversidad genética (*selective sweep*) a un mínimo.

Como resultado de los análisis realizados en el marco de la invención se pudo hallar también una correlación significativa de marcadores fenotípicos para la tolerancia a las bajas temperaturas con la región entre los marcadores ma59778s31 y ma59778119 (véase, por ejemplo, Figura 2). El hallazgo de un QTL en el cromosoma 4 en el pool de dent que aclara el 35% de la variancia fenotípica para la tolerancia a las bajas temperaturas, representa un recurso decisivo para el aprovechamiento en el cultivo.

En base a la reducida tasa de recombinación y de la posición pericentromérica del QTL era especialmente difícil limitar el sector original en el estrecho intervalo y en lugar de un medio cromosoma de 122 MB, con el cual se heredaban aún otras características negativas y que hubieran llevado a una pérdida de la diversidad genética, introducir por cruzamiento en el cultivo sólo pocos kb. Con el conocimiento de las bases genéticas de rasgo de tolerancia a las bajas temperaturas también fue posible su aprovechamiento único evitando un arrastre de ligamiento y una reducida diversidad genética.

En la región alrededor de dicho QTL, por medio de comparaciones entre las diversas plantas y comparaciones de bancos de datos subsiguientes se pudieron identificar varios elementos funcionales, y genes, (véanse ejemplos), que participan solos o en combinación en la tolerancia a las bajas temperaturas. Las siguientes Tablas 1a, 1b y 1c los presentan.

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

SEQ NO:	ID	Denominación	Posición (SL)	Anotación
29		ORF TH-09	88663	Proteína SAUR que responde a auxina (SAUR31)
3		ORF TH-01	61977	Proteína gag del retrotransposón
7		ORF TH-02	63012	Transposón Sb07g001920 de <i>Sorghum bicolor</i>
11		ORF TH-03	65848	Transposón Sb07g001880 de <i>Sorghum bicolor</i>
15		ORF TH-04	70255	Transposón Sb07g001880 de <i>Sorghum bicolor</i>
25		ORF TH-08	80491	Transposón Sb07g001900 de <i>Sorghum bicolor</i>
35		ORF TH-11	79716	Poliproteína putativa, <i>Oryza sativa</i> ssp. japonica
		Región TH-12		Transposón Sb07g001920 de <i>Sorghum bicolor</i>

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

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

Tabla 1c: Elementos genéticos y genes en la región objetivo de 25,7 kb (Genotipo SL; ORF - Marco de lectura abierta (*open reading frame*) como se identificó; SL - línea sensible; TH - línea tolerante)

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

5 De especial interés en el marco de la presente invención, y por lo tanto preferidos, son ORF-09 (SAUR31), ORF-08 y ORF-02, los que mostraron diferente expresión entre las líneas SL y TH (véase Tabla 1b). Por ejemplo, la tasa de expresión de ORF-09 bajo estrés por bajas temperaturas era mayor en las líneas más sensibles a las bajas temperaturas (SL) que en las líneas más tolerantes a las bajas temperaturas (TH) y fue disminuyendo con el tiempo.

10 Los datos de análisis con respecto al gen ORF-09 y la anotación correspondiente SAUR31 de acuerdo con la SEQ ID NO: 27 (secuencia de nucleótidos del genotipo SL), la SEQ ID NO: 29 (secuencia de nucleótidos del genotipo TH) y la SEQ ID NO: 31 (secuencia de nucleótidos de la línea de referencia del genoma del maíz B73) permitieron con ayuda de los análisis de marcadores y la evaluación de las frecuencias de recombinación en las diversas líneas SL, TH y B73 (Figura 1) un claro posicionamiento de SAUR31 dentro de un tramo en el cromosoma 4 entre los marcadores ma59778s31 y ma59778s119, preferentemente entre ma59778s32 y ma59778s119. Para ello SAUR31 es un gen, que

15 codifica para la proteína que responde a auxina del mismo nombre (véase SEQ ID NOs: 28, 30 y 32). De los genes SAUR se conoce que participan en la expansión celular, la transducción de señales mediada por auxina y el desarrollo de los meristemas de raíces y también son reguladores positivos de la senescencia de la hoja (Xu, N.; Hagen, G; Guilfoyle, T. "Multiple auxin response modules in the soybean SAUR 15A promoter". Plant Science, 1997, Año 126, No. 2, pp. 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, Año 88, No. 3, pp. 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, Año 276., No. 11, pp. 3148-3162; Spartz, AK, et al. "The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion". The Plant Journal, 2012, Año 70, No.

20

6, pp. 978–990; Hou et al.. "SAUR36, a small auxin up RNA gene, is involved in the promotion of leaf senescence in Arabidopsis". Plant physiology, 2013, Año 161, No. 2, pp. 1002–1009). Los genes SAUR son genes primarios que responde a auxina, los que participan el camino de señales de 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, Año 56, No. 2, pp. 133–150). Pueden ser divididos en diversos grupos y se hallaron hasta ahora en *A. thaliana*, arroz y soja en diversas funciones. En el maíz se identificaron en el genoma B73, 79 genes SAUR putativos (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, Año 56, No. 2, pp. 133–150). El gen candidato ORF–09 fue mencionado como ZmSAUR37, pero el significado en la transmisión de tolerancia a las bajas temperaturas sin embargo no ha sido descrito previamente y es sorprendente. En los estudios en los que se basa la invención se determinó una expresión de diferente intensidad de SAUR31 en las líneas sensibles (SL) en comparación con las líneas tolerantes (TH) durante el estrés por bajas temperaturas (Tabla 1b). La secuencia de promotores mostró un alto número de polimorfismos entre las líneas investigadas, mientras que la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada permaneció en gran parte inalterada. Si bien se puede suponer que la diferente expresión del gen SAUR putativo, transmitida por la variación en su promotor participa en el presente fenotipo tolerante a las bajas temperaturas, también todos los otros genes o regiones (como se representa en la Tabla 1a–c) dentro del QUL que trasmite la tolerancia a las bajas temperaturas, en forma individual o juntos, eventualmente junto con SAUR, pueden ser responsables del fenotipo de la tolerancia a las bajas temperaturas o tener influencia sobre la medida de la tolerancia a las bajas temperaturas.

El objeto en el que se basa la invención se logra por medio de la provisión de un casete de expresión que comprende un ácido nucleico con una secuencia de ácidos nucleicos, seleccionada del grupo compuesto por a) una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con una de la SEQ ID NO 29 b) una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 90% o 95% o preferentemente al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a una secuencia de a) o c) una secuencia de ácidos nucleicos, que codifica para una proteína de acuerdo con una la SEQ ID NO 30, caracterizado porque la secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a un promotor que comprende la secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 33. Además, se describe un casete de expresión que comprende un ácido nucleico con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para uno o más ARNs, que pueden hibridarse al menos parcialmente consigo mismos o entre sí y formar de este modo una parte de doble hebra, en donde esta secuencia de ácidos nucleicos concuerda en al menos 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25, preferentemente al menos 30, 32, 34, 36, 38 o 40, más preferentemente al menos 50, 60, 70, 80, 90 o 100, o más preferentemente aún con al menos 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 o 1000 nucleótidos consecutivos con una de las secuencias de ácidos nucleicos seleccionada del grupo compuesto por (i) una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO: 27, (ii) una secuencia de ácidos nucleicos (i) , que es complementaria de una secuencia (iii) una secuencia de ácidos nucleicos, 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 ácidos nucleicos, que de acuerdo con el código genético degenerado, se deriva de una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con (i), (ii) o (iii), (v) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con (i), (ii) o (iii) bajo condiciones rigurosas, (vi) una secuencia de ácidos nucleicos, que codifica para una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 28, o un homólogo, análogo u ortólogo de éstas, o vii) una secuencia de ácidos nucleicos en orientación antisentido con respecto a una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con (i) a (vi).

Un casete de expresión de acuerdo con la invención es adecuado preferentemente, después de la transcripción o después de la expresión en una planta, para transmitir la propiedad de tolerancia a las bajas temperaturas o para aumentar la tolerancia a las bajas temperaturas de la planta.

En principio, los casetes de expresión, su estructura y sus componentes son conocidos por el experto en el arte y se han descrito en la literatura (Sambrook et al. 2001, "Molecular cloning: a laboratory manual" (conjunto de 3 volúmenes) (Vol. 999). Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Tales casetes están compuestos al menos por un gen a expresar y un promotor unido operativamente con éste. Tales promotores pueden transmitir la expresión transgénica de determinados genes específica para el desarrollo de la planta o específica del tejido, como por ejemplo, en la WO 2003/006660 o la WO 2000/026388. La DE102005021365 describe, por ejemplo, un casete de expresión específico para la floración. También puede estar contenida al menos una secuencia terminadora funcional en células vegetales y organismos vegetales (por ejemplo, como en la WO 2003/008596). También pueden estar contenidos uno o más genes de tolerancia en el casete de expresión, los que permiten una selección de células transformadas o transfectadas exitosamente. El experto en el arte conoce también diversos genes de tolerancia adecuados para la selección (marcadores de selección) del estado de la técnica (Miki, B; McHugh, S. "Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety". Journal of Biotechnology, 2004, Año 107, No. 3, pp. 193–232). Estos pueden comprender, por ejemplo, una tolerancia a la kanamicina, la estreptomycinina o la ampicilina. Los casetes de expresión pueden encontrarse como ácidos nucleicos lineales o en un vector o plásmido.

En una forma de realización del casete de expresión de la presente invención, un ácido nucleico descrito anteriormente está unido operativamente con 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, US5, 352, 605A), un promotor inducible por bajas temperaturas/frío como por ejemplo, BN115 (US5, 847, 102A) o un promotor como por ejemplo, p63 (EP2116606B1), el que es especialmente activo en el desarrollo temprano de plantas o en tejidos jóvenes de plantas, en donde desarrollo temprano significa las primeras 12 semanas después de la

germinación, especialmente las primeras 8 semanas después de la germinación y especialmente las primeras 4 semanas después de la germinación.

En una forma de realización preferida de la presente invención, el casete de expresión comprende un ácido nucleico, que presenta una secuencia de ácidos nucleicos, seleccionada del grupo compuesto por a) una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NOs 29, b) una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 90% o 95% o preferentemente al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a una secuencia de a) o c), una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO 30, , preferentemente se une operativamente con un promotor, el que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33. También se describe que el casete de expresión está operativamente unido a una variante alélica o una forma modificada de un promotor **que comprende la secuencia de nucleótidos de** acuerdo con la SEQ ID NO: 34, en donde la variante alélica o la forma modificada que produce una tasa de expresión comparable o una medida de expresión igual que 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 medida de expresión reducida en más de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% o 50% en comparación con la tasa de expresión o medida de expresión, producida por el promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 34. Una tasa de expresión o medida 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 medida de expresión que se diferencia en no más de 20%, 18%, 16%, 14% o 12%, preferentemente en no más de 10%, 9%, 8%, 7% o 6%, o más preferentemente no más de 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% o 0% de la tasa de expresión o medida de expresión del promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33.

La presente invención comprende además también un promotor que responde al estrés por bajas temperaturas que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 33 o 34 o una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 33 o 34 o una secuencia de nucleótidos que se hibrida con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 33 o 34 o a una secuencia de nucleótidos complementaria de 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 bajas temperaturas, un vector que comprende el promotor que responde al estrés por bajas temperaturas o el casete de expresión que comprende el promotor que responde al estrés por bajas temperaturas, una célula huésped o una planta o partes de ésta que comprenden el promotor que responde al estrés por bajas temperaturas como transgén, el casete de expresión que comprende el promotor que responde al estrés por bajas temperaturas, o el vector que comprende el promotor que responde al estrés por bajas temperaturas o el casete de expresión que comprende el promotor que responde al estrés por bajas temperaturas.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un vector que comprende el casete de expresión de acuerdo con la invención. El vector puede ser un plásmido, un cósmido, un fago o un vector de expresión, un vector de transformación, un vector shuttle o un vector de clonación, puede ser de hebra simple o doble, lineal o circular o puede transformar un huésped procariota o eucariota ya sea por integración en su genoma o en forma extracromosómica. Además, se describe que el ácido nucleico descrito anteriormente está unido operativamente en un vector con una o más secuencias reguladoras las cuales permiten la transcripción y opcionalmente la expresión en una célula huésped procariota o eucariota. Una secuencia reguladora, preferentemente ADN, puede ser homóloga o heteróloga con respecto al ácido nucleico de acuerdo con la invención. Por ejemplo, el ácido nucleico se encuentra bajo el control de un promotor adecuado o un terminador.

Además de los vectores arriba descritos, la presente invención proporciona también un procedimiento que comprende la introducción de un vector descrito en una célula huésped. El vector puede ser introducido, por ejemplo, por conjugación, movilización, transformación biolística, transformación mediada por *Agrobacterium*, transfección, transducción, infiltración al vacío o electroporación. Tales procedimientos, igual que los procedimientos para la preparación de los vectores descritos son conocidos por el experto en el arte (Sambrook et al. 2001, "Molecular cloning: a laboratory manual" (conjunto de 3 volúmenes) (Vol. 999). Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

En otro aspecto la presente invención se refiere a 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 invención puede ser una célula procariota (por ejemplo, bacteriana) o una célula eucariota (por ejemplo, una célula vegetal o una célula de levadura). Preferentemente, la célula huésped es un *Agrobacterium*, tal como *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* o una célula vegetal que comprende el ácido nucleico, el casete de expresión o el vector de la presente invención. El experto en el arte conoce tanto numerosos métodos, tales como conjugación o electroporación, con los cuales pueden introducir el ácido nucleico descrito anteriormente, el casete de expresión o el vector en un *Agrobacterium*, como también métodos tales como diversos procedimientos de transformación (transformación biolística, transformación mediada por *Agrobacterium*), con los cuales se puede introducir el ácido nucleico descrito anteriormente, el casete de expresión o el vector en una célula de planta (Sambrook et al. 2001).

En otro aspecto la presente invención se refiere a una célula de planta transgénica de la especie *Zea mays*, la cual comprende el casete de expresión o el vector de la presente invención, donde el ácido nucleico descrito anteriormente está presente como un transgén, y una planta transgénica de la especie *Zea mays*, o una parte de ésta, las cuales

comprenden las células de planta transgénica. Una célula de planta transgénica o planta como ésta es, por ejemplo, una célula de planta o una planta de la especie *Zea mays*, que ha sido transformada con el casete de expresión o con el vector de la presente invención, preferentemente en forma estable. Una planta transgénica o célula de la presente invención presenta preferentemente una tolerancia a las bajas temperaturas recién transmitida o un aumento de la tolerancia a las bajas temperaturas en comparación con una planta de tipo salvaje, la que es isogénica, pero que no fue transformada, sin embargo, con el casete de expresión o con el vector de la presente invención, preferentemente en forma estable.

Una secuencia reguladora, preferentemente ADN, puede ser homóloga o heteróloga con respecto al ácido nucleico anterior. El constructo total del ácido nucleico descrito anteriormente y su o sus secuencias reguladoras pueden representar entonces el transgén en forma del casete de expresión. Una parte de una planta puede ser una semilla fecundada o no fecundada, un embrión, un polen, un tejido, un órgano o una célula de planta, en donde la semilla fecundada o no fecundada, el embrión o el polen son producidos en la planta transgénica y en su genoma está integrado el casete de expresión o el vector está integrado, estando presente el ácido nucleico descrito anteriormente como un transgén. La presente invención comprende también un descendiente de la planta transgénica, en cuyo genoma está integrado el casete de expresión o el vector.

Se presenta una tolerancia a las bajas temperaturas transmitida o una tolerancia a las bajas temperaturas aumentada en comparación con una planta de tipo salvaje, la cual es isogénica, pero que no ha sido transformada con el casete de expresión o con el vector de la presente invención, preferentemente en forma estable.

Una tolerancia a las bajas temperaturas recién transmitida o aumentada puede ser determinada específicamente por especies y experimentalmente. Para ello se realiza un análisis del cuadro foliar, el cual sustancialmente comprende las siguientes etapas de procedimiento: a) dos a cuatro semanas de cultivo exogámico de las plantas bajo condiciones sin estrés con respecto a la temperatura exterior, b) exposición de las plantas a un estrés por bajas temperaturas significativo durante un período de al menos una semana, c) realización de una fase de regeneración de nuevo bajo condiciones sin estrés durante un período de al menos una semana y d) medición de la pérdida del color verde de las hojas en una o más hojas, cuyo crecimiento se produjo durante el período de aplicación del estrés por bajas temperaturas. Como ejemplo se describe a continuación esto para el maíz (*Zea mays*): Las plantas se cultivan durante dos semanas bajo condiciones óptimas (sin estrés) en el invernadero a 25 °C (temperatura de día) y 22 °C (temperatura de noche). A continuación durante una semana se las coloca en una cámara acondicionada con 8 °C y 6 °C. Luego sigue una fase de regeneración de una semana en el invernadero a 25 °C y 22 °C. A continuación se examinó preferentemente la 4^o y 5^o hoja con respecto a su color. Para ello se da un valor de 100% para la conservación completa del color verde de la hoja y un valor de 0% para una coloración amarillenta completa (Clorosis). En el marco de la presente invención se pudo demostrar así que la variante TH era superior a la variante SL con respecto a la conservación de la clorofila bajo estrés por bajas temperaturas (véase Tabla 5). En total se midieron valores de 10% a 85% de color verde de la hoja. La pérdida del color verde de las variantes TH era de alrededor de 19% hasta 75% reducido con respecto a las variantes SL, es decir, la tolerancia a las bajas temperaturas había aumentado significativamente. Por lo tanto, el concepto de tolerancia a las bajas temperaturas – sin quedar limitado a éste – significa una reducción de la pérdida del color verde bajo estrés por bajas temperaturas de alrededor de 5%, 10%, 15%, 20%, preferentemente 30%, 40% o 50%, más preferentemente 60%, 70%, 80% o 90% medida con el análisis del cuadro foliar arriba descrito.

Alternativamente, la tolerancia a las bajas temperaturas recién transmitida o aumentada en una planta puede ser medida por la altura de la planta en el momento del comienzo del crecimiento de estiramiento en el sector de brote. Para ello se cultivan plantas tolerantes a las bajas temperaturas y sensibles a las bajas temperaturas bajo condiciones de estrés por bajas temperaturas en pruebas comparativas. En el marco de la presente invención se pudo demostrar así que, por ejemplo, la variante TH del maíz tienen una longitud aproximadamente 35% mayor, la que considerada en forma absoluta representó aproximadamente 21 cm adicionales en comparación con la variante SL sensible. Por lo tanto, el concepto tolerancia a las bajas temperaturas también puede significar que una planta con tolerancia a las bajas temperaturas recién transmitida o aumentada presenta una altura de la planta al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o 35% aumentada en comparación con una planta control en el momento del comienzo del crecimiento de estiramiento.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para la producción de una planta tolerante a las bajas temperaturas. Un procedimiento de este tipo comprende las siguientes etapas: A) mutagenización de células de plantas o de partes de una planta y regeneración subsiguiente de plantas a partir de las células de plantas mutagenizadas o partes mutagenizadas o mutagenización de plantas, y B) identificación de una planta de A), la que en una secuencia de ADN endógena, la que es idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos, seleccionada del grupo compuesto por (i) una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO: 27, (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria de la secuencia de i), (iii) una secuencia de ácidos nucleicos 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 ácidos nucleicos, la que de acuerdo con el código genético degenerado, se deriva de una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con (i), (ii) o (iii), (v) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con (i), (ii) o (iii) bajo condiciones rigurosas, o (vi) una secuencia de ácidos nucleicos, que codifica para una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 28, o un homólogo, análogo u ortólogo de éstas, o en una secuencia reguladora de la secuencia de ADN endógena, presenta al menos una mutación que causa una

modificación de la expresión de transcripción o de la tasa de expresión o de la medida de transcripción o la medida de expresión de la secuencia de ADN endógena en la planta identificada en comparación con una planta de tipo salvaje no mutagenizada o una modificación de la actividad o estabilidad de una proteína o polipéptido codificada por la secuencia de ADN endógena en la planta identificada en comparación con una planta de tipo salvaje no mutagenizada.

5 Preferentemente la al menos una mutación hace que la planta identificada se torne tolerante a las bajas temperaturas o que aumente la tolerancia a las bajas temperaturas ya existente.

Preferentemente, la secuencia de ADN endógena de la etapa B) codifica para una proteína que responde a auxina o una proteína SAUR, más preferentemente para la proteína SAUR31 de acuerdo con una de las SEQ ID NOs: 28 o 30 o un homólogo, análogo u ortólogo de éstas. Preferentemente, la secuencia reguladora de la secuencia de ADN endógena de la etapa B) es un promotor o una parte de éste. Más preferentemente, el promotor es un promotor de acuerdo con la SEQ ID NO: 34 o un promotor que presenta una identidad de al menos 80%, 85% o 90%, preferentemente de al menos 92%, 94%, 96% o 98% o más preferentemente de al menos 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.

15 Una mutación significa una modificación a nivel del ADN, es decir, una modificación de la genética y/o de la epigenética. Por ejemplo, una modificación de la genética puede ser el intercambio de al menos una nucleobase en la secuencia de ADN endógena o en una secuencia reguladora de la secuencia de ADN endógena. Si se produce un intercambio de nucleobases de este tipo, por ejemplo, en un promotor, esto puede llevar a una actividad modificada del promotor, ya que, por ejemplo, elementos cis-reguladores son modificados de tal modo que la afinidad de un factor de transcripción con respecto a los elementos cis-reguladores mutados está modificada en comparación con el promotor de tipo salvaje de tal modo que la actividad del promotor con los elementos cis-reguladores mutados está aumentada o disminuida, según si el factor de transcripción es un represor o un inductor o si la afinidad del factor de transcripción con respecto a los elementos cis-reguladores mutados está reforzada o debilitada. Si se produce un intercambio de nucleobases de este tipo, por ejemplo, en una región codificadora de la secuencia de ADN endógena, esto puede llevar a un intercambio de aminoácidos en la proteína codificada, lo que puede causar una modificación de la actividad o estabilidad de la proteína en comparación con la proteína de tipo salvaje. Otro ejemplo de una modificación de la genética es la delección de nucleótidos en la secuencia reguladora y/o en la secuencia de ADN endógena así como la adición de nucleótidos en la secuencia reguladora y/o en la secuencia de ADN endógena. Un ejemplo de la regulación de genes por inserción de nucleótidos por mutagénesis de transposón en el maíz muestran Das & Martienssen (Das, Lekha, and Robert Martienssen. "Site-selected transposon mutagenesis at the hcf106 locus in maize". The Plant Cell 7.3 (1995): 287–294.). Una modificación de la epigenética puede producirse, por ejemplo, por un modelo de metilación modificado del ADN.

El experto en el arte conoce que se puede lograr una mutación en el sentido de la invención por medio del proceso de una mutagenización en la etapa A) del procedimiento para la producción de una planta tolerante a las bajas temperaturas. La mutagenización comprende aquí tanto la mutagénesis convencional como también la mutagénesis específica de un sitio, y la edición del genoma (*Genome Editing*). En la mutagénesis convencional no se realiza la modificación a nivel de ADN en forma direccionada. La célula de planta o la planta se expone a condiciones mutagénicas, tales como por ejemplo, TILLING por radiación con luz UV o el uso 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 la mutagénesis al azar es la mutagénesis con ayuda de un transposón. Se encuentra a disposición libremente una amplia colección de mutantes 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 de un sitio hace posible la introducción de una modificación a nivel del ADN direccionada a sitios predefinidos del ADN. Para ello se pueden usar, por ejemplo, TALENS (WO 2010/079430, WO 2011/072246), meganucleasas (Silva, George, et al. "Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy". Current gene therapy 11.1 (2011): 11.), endonucleasas de Homing (Stoddard, Barry L. "Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification". Structure 19.1 (2011): 7–15.), nucleasas de dedo de zinc (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, and Carlos F. Barbas. "ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering". Trends in biotechnology 31.7 (2013): 397–405). Preferentemente se realiza la mutación en todas las copias o alelos o en donde sea conveniente en todos los homólogos de las secuencias de ADN endógenas correspondientes. Esto significa, con respecto a un organismo diploide, como por ejemplo, *Zea mays*, típicamente al menos dos alteraciones.

55 La identificación de una planta en la etapa B) se puede realizar, por ejemplo, con ayuda de marcadores moleculares o sondas. Las sondas de ADN son, por ejemplo, cebadores o pares de cebadores que se pueden usar en una reacción de PCR. Por ejemplo, mutantes de Tilling pueden ser determinados o identificados por secuenciación del gen objetivo en una población de Tilling o por otros métodos que determinan malos apareamientos en el ADN, como por ejemplo, análisis de puntos de fusión o el uso de nucleasas específicas de malos apareamientos. La presente invención comprende para ello también los cebadores/pares de cebadores que se pueden utilizar, como por ejemplo, cebadores para la determinación de SAUR31 o una forma mutante del promotor de SAUR31. Además, las mutantes que son producidas por medio de transposones pueden ser determinadas por medio del uso de cebadores específicos del transposón y cebadores específicos del gen objetivo en la PCR a través de toda la población y la secuenciación

subsiguiente de productos de PCR. También estos cebadores están comprendidos en la presente invención. La modificación de la tasa de expresión o medida de expresión se puede determinar, por ejemplo, con RT-PCR en tejidos vegetales, la modificación de la estabilidad, por ejemplo, por examen de los sitios de unión de ubiquitina y predicción de las modificaciones de la estructura terciaria. Además, también son adecuadas la expresión recombinante de las proteínas de tipo salvaje y de las proteínas mutadas correspondientes y tests de actividad bioquímicos siguientes. El experto en el arte conoce del estado de la técnica otros medios y procedimientos que puede usar para la identificación de una planta o célula de planta en la etapa B).

La presente invención se refiere también a marcadores moleculares que demuestran la presencia o ausencia de una mutación en la secuencia de ADN endógena o en una secuencia reguladora de la secuencia de ADN endógena. Tales marcadores se basan, por ejemplo, en un SNP y son específicos para la mutación (Ejemplos: marcadores KASPar o TaqMan).

La presente invención se refiere además también a una planta que se puede producir o que ha sido producida con el procedimiento precedente, o una parte de esta planta, en donde una parte de una planta puede ser una semilla fecundada o no fecundada, un embrión, un polen, un tejido, un órgano o una célula vegetal, en donde la semilla fecundada o no fecundada, el embrión o el polen son producidos en la planta transgénica y en cuyo genoma se encuentra presente en la al menos una mutación. La presente invención comprende también un descendiente de la planta, el cual presenta la al menos una mutación y es tolerante a las bajas temperaturas.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para el aislamiento de un ácido nucleico, el que transmite o aumenta en una planta o célula de planta la tolerancia a las bajas temperaturas, que comprende las siguientes etapas:

A) Producción de una planta de acuerdo con el procedimiento descrito más arriba o provisión de una planta o una célula de una planta, que se puede producir o ha sido producida con el procedimiento descrito más arriba, y B) aislamiento de un ácido nucleico que comprende la secuencia de ADN endógena con la al menos una mutación del genoma de la planta o la célula de planta de A). El aislamiento del ácido nucleico en la etapa B) puede realizarse por extracción CTAB o a través de columnas que ligan el ADN, la comprobación de la mutación a través de secuenciación o marcadores moleculares, como marcadores KASPar basados en SNP o TaqMan, o en mutantes por inserción o delección a través de marcadores en base a polimorfismos de longitud.

La presente invención comprende también un ácido nucleico, el cual fue obtenido mediante el procedimiento descrito más arriba para el aislamiento o que se puede obtener mediante el procedimiento descrito más arriba, así como un casete de expresión o un vector, que comprende el ácido nucleico aislado.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para la producción de una planta transgénica, tolerante a las bajas temperaturas de la especie *Zea mays*. El procedimiento puede comprender las siguientes etapas: A) Provisión del ácido nucleico o del casete de expresión descritos más arriba, o provisión del vector arriba descrito, B) transformación, preferentemente transformación en forma estable, de al menos una célula de planta de la especie *Zea mays* mediante la introducción del casete de expresión o del vector de A), C) regeneración de plantas transgénicas a partir de la al menos una célula de planta transformada de B), y D) identificación de una planta transgénica, tolerante a las bajas temperaturas de la especie *Zea mays* de C). Complementariamente también se pueden usar como transgén, aparte de los ácidos nucleicos descritos anteriormente, también uno o más de otros ácidos nucleicos, los que se conoce que se pueden usar para la transmisión o el aumento de la tolerancia a las bajas temperaturas (por ejemplo, WO2002/048378A2, WO2008/148298A1).

La presente invención se refiere además también a una planta transgénica, tolerante a las bajas temperaturas, la que se puede producir o que ha sido producida con el procedimiento mencionado, o una parte de esta planta, en donde una parte de una planta puede ser una semilla fecundada o no fecundada, un embrión, un polen, un tejido, un órgano o una célula vegetal, en donde la semilla fecundada o no fecundada, el embrión o el polen son producidos en la planta transgénica y en cuyo genoma está integrado el casete de expresión o el vector, en el que el ácido nucleico descrito anteriormente está presente como un transgén. La presente invención comprende también un descendiente de la planta transgénica, el cual es tolerante a las bajas temperaturas.

En otro aspecto la presente invención se describe un procedimiento para la transmisión o el aumento de la tolerancia a las bajas temperaturas en una célula de planta o una planta. Un procedimiento de este tipo puede comprender las siguientes etapas: A) transformación, preferentemente transformación estable, preferentemente de al menos una célula de planta mediante la introducción del ácido nucleico de acuerdo con la invención arriba descrito o el casete de expresión de la presente invención, o del vector de la presente invención arriba descrito, opcionalmente B) regeneración de plantas transgénicas a partir de la al menos una célula de planta transformada de A).

El procedimiento para la producción de la planta transgénica, tolerante a las bajas temperaturas comprende también la transformación de dos o más de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, arriba descritos, opcionalmente también diferentes formas de realización de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención y opcionalmente de uno o más casetes de expresión o vectores de la presente invención. En una forma de realización preferida del procedimiento la transformación en la etapa A) lleva a una célula de planta o planta, la que en comparación con una

célula de planta de tipo salvaje, que es, por ejemplo, una célula de planta isogénica, no transformada, o con una planta, la que, por ejemplo, fue regenerada a partir de una célula de planta isogénica, no transformada, presenta preferentemente un modelo de expresión modificado, caracterizada porque en base al silenciamiento de genes post-transcripcional, se ha reducido la tasa de expresión o medida de expresión de una secuencia de ADN endógena con una secuencia de ácidos nucleicos, seleccionada del grupo compuesto por (i) una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO: 27, (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria de una secuencia de i), (iii) una secuencia de ácidos nucleicos 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 ácidos nucleicos, la que de acuerdo con el código genético degenerado, se deriva de una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con (i), (ii) o (iii), (v) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con (i), (ii) o (iii) bajo condiciones rigurosas, o (vi) una secuencia de ácidos nucleicos, que codifica para una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 28, o un homólogo, análogo u ortólogo de éstas.

Además a un aspecto alternativo al uso del ácido nucleico descrito anteriormente, del casete de expresión o del vector de la presente invención en un procedimiento para la producción de una célula de planta o planta transgénica, tolerante a las bajas temperaturas o en un procedimiento para la transmisión o el aumento de la tolerancia a las bajas temperaturas en una célula de planta o planta.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un medio para la aplicación exterior en plantas. Este medio se provee para la aplicación exterior en plantas. Contiene ARN de doble hebra, en donde una hebra de este ARN presenta una secuencia de ácidos nucleicos, la que concuerda en al menos 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25, preferentemente al menos 30, 32, 34, 36, 38 o 40, más preferentemente al menos 50, 60, 70, 80, 90 o 100, o más preferentemente aún en al menos 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 o 1000 nucleótidos consecutivos con una de las secuencias de ácidos nucleicos seleccionada del grupo compuesto por (i) una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO: 27, (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria de una secuencia de i), (iii) una secuencia de ácidos nucleicos 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 ácidos nucleicos, la que de acuerdo con el código genético degenerado, se deriva de una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con (i), (ii) o (iii), (v) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con (i), (ii) o (iii) bajo condiciones rigurosas, (vi) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 28, o un homólogo, análogo u ortólogo de éstas, o (vii) una secuencia de ácidos nucleicos en orientación antisentido con respecto a una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con (i) a (vi). El ARN de doble hebra para la producción del medio de acuerdo con la invención puede ser producido *in vitro* mediante métodos conocidos por el experto en el arte. Por ejemplo, la síntesis del ARN de doble hebra se puede realizar sintéticamente, en donde el ARN es formado directamente *in vitro*. El ARN de doble hebra también puede ser sintetizado partiendo de un ADN de doble hebra a través de la formación de un transcrito de mRNA, el cual forma luego, por ejemplo, una estructura de horquilla.

El medio se puede usar como mezcla en una cubierta de semillas o en el desarrollo temprano por medio del rociado en forma de un spray. Además, el medio puede ser usado mediante el mezclado con el sustrato de cultivo antes o después de la emergencia de las plantas. En cada caso, el medio es adecuado para transmitir tolerancia a las bajas temperaturas o para aumentar la tolerancia a las bajas temperaturas en una célula de la semilla o planta, o en la semilla o la planta propiamente dichas. En el uso para el tratamiento previo de las semillas, el medio puede ser combinado primero con una sustancia vehículo y en una combinación, que comprende el ARN de doble hebra y la sustancia vehículo, y aplicado sobre las semillas, en donde la sustancia vehículo, por ejemplo, tiene la acción estabilizadora del ARN. Como estabilizadores del ARN se pueden usar, por ejemplo, liposomas, los cuales encapsulan la molécula de ARN.

Además, también se describe un procedimiento para la transmisión o el aumento de la tolerancia a las bajas temperaturas en una célula de planta o una planta, que comprende la etapa de la aplicación exterior del medio. Preferentemente, el medio se mezcla con la cubierta de las semillas o la película de las semillas o es rociado directamente sobre las semillas o la planta. También se describe el uso del medio para la transmisión o el aumento de la tolerancia a las bajas temperaturas en una célula de planta o una planta.

En un aspecto adicional, se describe una planta de maíz tolerante a las bajas temperaturas o una parte de ésta que comprende un primer intervalo cromosómico de un dador en el cromosoma 4 entre las posiciones de los marcadores ma59778s31 y ma59778119, el que presenta un ácido nucleico que transmite una tolerancia a las bajas temperaturas, preferentemente un ácido nucleico endógeno que transmite la tolerancia a las bajas temperaturas, y en una región del cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de los marcadores ma59778119 y ma20205s01 presenta al menos otro intervalo cromosómico del mismo dador que el primer intervalo cromosómico y al menos un intervalo cromosómico que no proviene del dador, en donde el ácido nucleico que transmite la tolerancia a las bajas temperaturas comprende una o más secuencias de ácidos nucleicos, seleccionadas del grupo compuesto por a) una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO 29, b) una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 98%, 99% o 99,5% idéntica a una secuencia de a) o b), c) una secuencia de ácidos nucleicos, la que de acuerdo con el código genético degenerado, se deriva de una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con a), d) una secuencia de ácidos nucleicos, que codifica para una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO 30 o un homólogo, análogo u ortólogo de éstas. En un ejemplo de realización preferido, el intervalo cromosómico en el cromosoma 4, que presenta un ácido nucleico que transmite una tolerancia a las bajas temperaturas, comprende un intervalo entre las posiciones de los marcadores

ma59778s32 y ma59778119 y/o el ácido nucleico que transmite la tolerancia a las bajas temperaturas comprende una secuencia de ácidos nucleicos, seleccionada del grupo compuesto por a) una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con las SEQ ID NOs 29, b) una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 98%, 99% o 99,5% idéntica a una secuencia de a), c) una secuencia de ácidos nucleicos, la que de acuerdo con el código genético degenerado, se deriva de una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con a), o d) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO 30 o un homólogo, análogo u ortólogo de éstas, preferentemente la secuencia de ácidos nucleicos está unida operativamente con un promotor, el cual 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, el cual comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 34, en donde la variante alélica o la forma modificada comprende una tasa de expresión o medida de expresión comparable 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 medida de expresión reducida en más de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% o 50% en comparación con la tasa de expresión o la medida de expresión, producida por el promotor, que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 34. Una tasa de expresión o medida 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, sustancialmente presenta una tasa de expresión o medida de expresión que no se aparte más de 20%, 18%, 16%, 14% o 12%, preferentemente no más de 10%, 9%, 8%, 7% o 6%, o más preferentemente no más de 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% o 0% de la tasa de expresión o medida 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 dador, en la región del cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de marcadores ma59778119 y ma20205s01, significa que, por ejemplo, en base a uno o más eventos de recombinación en el proceso de cruzamiento con una planta de maíz, que no es portadora de los intervalos dadores, se reemplazó un intervalo dador correspondiente o intervalos dadores correspondientes por el al menos un intervalo cromosómico, que no proviene del dador. Expresado de otro modo, el intervalo cromosómico proveniente originalmente del dador flanqueado por las posiciones de los marcadores ma59778119 y ma20205s01 está acortado por alelos dadores o se encuentra en forma trunca.

Alternativamente, la biotecnología moderna pone a disposición del experto en el arte diversas otras herramientas que hacen posible una ingeniería genética precisa del genoma: las propuestas de técnica genética con las cuales se pueden reemplazar los tramos dadores en forma direccionada por tramos no dadores y así se puede reducir o eliminar un barrido selectivo (*'selective sweep'*) en un genoma de planta, comprenden el uso de nucleasas TALE (TALENs) o nucleasas de dedo de zinc (ZFNs) así como sistemas CRISPR/Cas, los que se describen, entre otros, por ejemplo, en la solicitud de patente alemana DE 10 2013 014 637 para la eliminación de secuencias de nucleótidos que llevan el arrastre por ligamiento (*"Linkage Drag"*) del genoma de maíz (híbrido) tolerante al *Helminthosporium turcicum*; ver la DE 10 2013 014 637 en las páginas 13 y 14 en los párrafos [0038] a [0042] y las referencias allí mencionadas. Estas técnicas, que también se describen en la solicitud de patente internacional WO 2014/104878, se pueden usar en forma equivalente en la producción de las plantas de acuerdo con la presente invención.

La presente descripción comprende además también una combinación de la técnica de cultivo convencional y de la moderna biotecnología. Así, por ejemplo, con ayuda de estas nuevas propuestas novedosas de la edición del genoma se pueden crear puntos calientes (*"Hot spots"*) de recombinación en una planta, los que se realizan en sitios adecuados, para favorecer directamente el intercambio de tramos dadores en la región del cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de los marcadores ma59778119 y ma20205s01 por tramos no dadores. La presente invención pone a disposición del experto en el arte para ello las informaciones necesarias sobre localización de los barridos selectivos (*'selective sweeps'*), así como la posición del o de los ácidos nucleicos que transmiten la tolerancia a las bajas temperaturas.

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

En otro ejemplo, la planta en la región del cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de los marcadores ma59778119 y ma20205s01 presenta al menos otro intervalo cromosómico del mismo dador y al menos un intervalo cromosómico, que no proviene del dador, en donde el al menos otro intervalo cromosómico del mismo dador representa menos de 100 Mb, menos de 90Mb, menos de 80Mb, preferentemente menos de 70 Mb, menos de 60 Mb, menos de 50 Mb, o más preferentemente menos de 40 Mb, menos de 30 Mb, menos de 20 Mb, menos de 15 Mb, menos de 10 Mb o menos de 5 Mb de la región del cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de los marcadores ma59778119 y ma20205s01, o en donde el al menos un intervalo cromosómico, que no proviene del dador, 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 más preferentemente más de 60 Mb, más de 70 Mb, más de 80 Mb, más de 90 Mb o más de 100 Mb de la región del cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de los marcadores ma59778119 y ma20205s01.

- 5 Ppor ejemplo, la planta presenta en la región del cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de los marcadores ma59778119 y ma20205s01 un intervalo cromosómico del mismo dador de las posiciones de los marcadores ma59778119 a ma52594s01 y un intervalo cromosómico, que no proviene del dador, de ma52594s01 a ma20205s01.

Además, la región en el cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de los marcadores ma59778119 y ma20205s01 está caracterizada o bien alternativamente o adicionalmente porque presenta, al menos en partes, una mayor frecuencia de alelos.

- 10 El intervalo cromosómico entre las posiciones de los marcadores ma59778s31 y ma59778119 y el intervalo cromosómico entre las posiciones de los marcadores ma59778119 y ma20205s01 se encuentran localizados en el cromosoma 4 en el genoma del maíz. El intervalo cromosómico entre las posiciones de los marcadores ma59778119 y ma20205s01 puede contener el centrómero del cromosoma 4.

- 15 En un ejemplo, el intervalo cromosómico que presenta un ácido nucleico que transmite una tolerancia a las bajas temperaturas, es un intervalo cromosómico entre las posiciones de los marcadores ma59778s32 y ma59778119. En otro ejemplo de realización preferido, el intervalo cromosómico entre las posiciones de los marcadores ma59778s31 y ma59778119 comprende un intervalo cromosómico flanqueado por las posiciones de los marcadores ma59778s32 y ma59778119

- 20 El intervalo cromosómico entre las posiciones de los marcadores ma59778s31 y ma59778119 así como también el ácido nucleico que transmite la tolerancia a las bajas temperaturas allí contenido provienen de una línea de maíz del pool de Dent o es característico para el pool de Dent, es decir, el experto en el arte puede identificar el tramo cromosómico claramente como proveniente del pool de dent, por ejemplo, con ayuda de marcadores moleculares.

- 25 Una selección en genes con fuertes efectos o intervalos cromosómicos que contienen un gen con fuerte efecto, como por ejemplo, en el intervalo del genoma de acuerdo con la invención o el QTL que tramite la tolerancia a las bajas temperaturas (especialmente el gen SAUR31 identificado) lleva a una modificación de las frecuencias de alelos. Dependiendo del grado de recombinación y de la intensidad de selección, esta modificación de la frecuencia de los alelos no sólo afecta el sector adyacente al gen o al intervalo, sino también las regiones cromosómicas adyacentes. Esto puede llevar a una diversidad genética limitada, la que es denominada barrido selectivo ("*selective sweep*"). Para un experto en el arte en el campo del cultivo de plantas, este barrido selectivo ("*Selective Sweep*") es
30 extraordinariamente desventajoso, ya que el material de planta producido ya no puede desarrollar su potencial originalmente presente en los cultivos posteriores. El empobrecimiento genético hace que termine en nada la propuesta clásica del cultivo de nueva recombinación y selección. Esto se puede ver claramente en la Fig. 5. La Figura muestra una diversidad genética claramente reducida en el pool de genes de Dent en comparación con el pool de genes de Flint en el sector del QTL que transmite la tolerancia a las bajas temperaturas, que comprende, por ejemplo, el gen SAUR31. Todos los ORFs que se encuentran aquí del QTL y los genes correspondientes provienen del pool de genes de Dent. El cruzamiento no controlado del QTL que transmite la tolerancia a las bajas temperaturas en otra base genética (por ejemplo el pool de Flint) llevaría también en ese pool a un retroceso drástico de las frecuencias de alelos. En el marco de la invención se tornó evidente que el cruzamiento del intervalo cromosómico de acuerdo con la invención entre las posiciones de los marcadores ma59778s31 y ma59778119, que presenta un ácido nucleico que
40 transmite una tolerancia a las bajas temperaturas, sin las medidas adecuadas para contrarrestarla en cada caso llevaría a una clara disminución de la frecuencia de alelos en el cromosoma 4. La transmisión del QTL identificado o del ácido nucleico que trasmite la tolerancia a las bajas temperaturas identificado, sin una reducción de la diversidad del material de cultivo representaba un enorme desafío y pudo ser realizada finalmente por un mapeo fino de la región con el apoyo de marcadores, muy complicado. En este contexto también era necesaria la identificación de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs; sucesión de los SNPs = haplotipo) en el intervalo cromosómico y los sectores adyacentes. Mediante la identificación de los haplotipos TH provistos de una mayor tolerancia a las bajas temperaturas y el desarrollo de nuevos marcadores fue posible sorprendentemente de acuerdo con la invención, por medio de marcadores moleculares recién desarrollados, para una selección ayudada por los marcadores, cruzar el intervalo cromosómico correspondiente de acuerdo con la invención, arriba descrito, con el ácido nucleico que
50 transmite la tolerancia a las bajas temperaturas dentro de un intervalo fuertemente limitado. Las plantas producidas de este modo mostraron una mayor tolerancia a las bajas temperaturas y al mismo tiempo una amplia diversidad genética mantenida. De líneas de cultivo conocidas, como por ejemplo, la B73, no se pudo derivar una solución para el problema del barrido selectivo debido a la diferente estructura de la región.

- 55 Una frecuencia de alelos aumentada "al menos en partes" significa, por ejemplo, que la región del cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de los marcadores ma59778119 y ma20205s01 en una región 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 más preferentemente al menos 70 Mb, al menos 80 Mb, al menos 90 Mb o al menos 100 Mb, presenta una mayor frecuencia de alelos. Además, una mayor frecuencia de alelos "al menos en partes" puede significar que la región del cromosoma 4 flanqueada por las posiciones de los marcadores
60 ma59778119 y ma20205s01 en una región 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 más preferentemente al menos 30 Mb, al menos 35 Mb, al menos 40 Mb o al menos 50 Mb, presenta a ambos lados del centrómero, preferentemente del cromosoma 4, una mayor frecuencia de alelos.

Una "mayor frecuencia de alelos" significa, por ejemplo, una diferencia con respecto a la frecuencia de alelos de 0,5, de no más de 0,4, 0,375 o 0,35, preferentemente no más de 0,325, 0,3 o 0,275, o más preferentemente no más de 0,25. Además, una "mayor frecuencia de alelos" puede significar también que la frecuencia de alelos es no menor que 0,1, 0,125 o 0,15, preferentemente no menor que 0,175, 0,2 o 0,225, o más preferentemente no menor que 0,25. Además, una "mayor frecuencia de alelos" puede significar que al menos 10%, 15% o 20%, preferentemente 25%, 30% o 40% o más preferentemente 45% o 50% de un tramo cromosómico provienen del pool de Flint. Por el contrario, una "menor frecuencia de alelos" significa una diferencia con respecto a la frecuencia de alelos de 0,5, de más de 0,4 o 0,425. Además, una "menor frecuencia de alelos" también puede significar que la frecuencia de alelos es menor que 0,1 o 0,075. Además, una "menor frecuencia de alelos" también puede significar que menos de 5%, 6%, 7%, 8%, 9% o 10% de un tramo cromosómico provienen del pool de Flint. Con relación a la presente invención, una "mayor frecuencia de alelos" también puede significar que el intervalo cromosómico, que tiene que presentar la mayor frecuencia de alelos, preferentemente proximal o distal al ácido nucleico que transmite la tolerancia a las bajas temperaturas, 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 más preferentemente al menos 70 Mb, al menos 80 Mb, al menos 90 Mb o al menos 100 Mb.

En otro aspecto la presente invención comprende marcadores moleculares que son adecuados, en un intervalo cromosómico flanqueado por las posiciones de los marcadores ma59778s31 y ma20205s01 o por las posiciones de los marcadores ma59778s31 y ma52594s01 o por las posiciones de los marcadores ma59778s31 y ma59778119, diferenciar entre un haplotipo tolerante a las bajas temperaturas y uno sensible a las bajas temperaturas. Preferentemente, el haplotipo tolerante a las bajas temperaturas de la línea TH se corresponde con un haplotipo de acuerdo con la Tabla 2, y/o el haplotipo sensible a las bajas temperaturas de la línea SL se corresponde con un haplotipo de acuerdo con la Tabla 2. Un marcador molecular de la presente solicitud puede ser, por ejemplo, un marcador molecular que es adecuado, para diferenciar en una de las posiciones de los marcadores ma59778s31, ma59778s32, ma59778119, ma52594s01 y ma20205s01 entre un haplotipo tolerante a las bajas temperaturas y uno sensible a las bajas temperaturas. Un marcador molecular puede ser un oligonucleótido, especialmente un cebador oligonucleótido, o puede encontrarse en forma aislada. En una forma de realización especialmente preferida, el marcador molecular de la presente solicitud es adecuado, sólo o en combinación con otros marcadores moleculares para determinar el ácido nucleico que transmite la tolerancia a las bajas temperaturas. La presente solicitud describe además el uso de al menos uno de los marcadores moleculares de la presente invención para la identificación o selección de una planta de maíz, o de una parte de ésta, tolerante a las bajas temperaturas.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para identificar una planta de maíz tolerante al frío, que comprende un intervalo cromosómico de un donante en el cromosoma 4 entre las posiciones del marcador ma59778s31 y ma59778119, que tiene un ácido nucleico mediador de tolerancia al frío, preferiblemente un ácido nucleico endógeno que media la tolerancia al frío, en el que el donante tiene una "T" en la posición del marcador ma59778s31, una "T" en la posición del marcador ma59778s32 y una "C" en la posición del marcador ma59778119 y el ácido nucleico que media la tolerancia al frío comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en a) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 29, b) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 98% idéntica a la secuencia de a), c) una secuencia de ácido nucleico que deriva de la secuencia de ácido nucleico según a) según el código genético degenerado, y d) una secuencia de ácido nucleico que para una proteína según SEQ ID NO: 30 codificado, que comprende las etapas de A) aislamiento de ADN del genoma de una planta de maíz, y B) detección de un alelo de un marcador diagnóstico para el ácido nucleico mediador de tolerancia al enfriamiento en un intervalo cromosómico flanqueado por las posiciones de marcador ma59778s31 y ma59778119 en el cromosoma 4, el alelo del ácido nucleico mediador de tolerancia al frío o está estrechamente acoplado al locus del ácido nucleico mediador de tolerancia al frío, el locus acoplado para la expresión del rasgo fenotípico de la altura de una planta aumentó en al menos un 10% en comparación con una planta de control de un genotipo comparable que no está en su genoma y que contiene ácido nucleico que media la tolerancia al frío, contribuye en condiciones de estrés por frío y en el momento del inicio del crecimiento de elongación en el área de los brotes, las posiciones del marcador con referencia a la línea de maíz B73 AGPv2 son las siguientes: ma59778s31 = 37263172 pb, ma59778s32 = 37296672 pb y ma59778119 = 37297901 pb. El procedimiento se puede ampliar opcionalmente mediante una etapa C) Detección de al menos un intervalo cromosómico que no proviene del donante, o de una frecuencia de alelos al menos parcialmente aumentada en un intervalo cromosómico flanqueado por las posiciones de marcador ma59778119 y ma20205s01 o por las posiciones de marcador ma59778119 y ma52594s01. En otra realización particularmente preferida, los marcadores moleculares descritos anteriormente se utilizan para la detección en la etapa B).

En un aspecto adicional, se describe un procedimiento para la selección de una planta de maíz, o una parte de ésta, tolerante a las bajas temperaturas, de acuerdo con la invención, arriba descrita, que comprende el procedimiento arriba descrito para la identificación de una planta de maíz, o una parte de ésta, tolerante a las bajas temperaturas, de acuerdo con la invención, arriba descrita, es ampliado con una etapa adicional de la etapa de la selección de la planta de maíz o una parte de ésta tolerante a las bajas temperaturas en base a las determinaciones de la etapa B) y opcionalmente de la etapa C).

Además se describe un procedimiento para la producción de una planta de maíz descrito anteriormente, que comprende una primera etapa de cruzamiento de dos plantas de maíz, en donde una planta de maíz que es tolerante a las bajas temperaturas comprende un primer intervalo cromosómico entre las posiciones de los marcadores ma59778s31 y ma59778119, que presenta un ácido nucleico que transmite la tolerancia a las bajas temperaturas y otro intervalo cromosómico flanqueado por las posiciones de los marcadores ma59778119 y ma20205s01, el cual proviene al menos en parte del mismo dador que el primer intervalo cromosómico, y/o presenta al menos en parte una menor frecuencia de alelos, y como segunda etapa, el procedimiento arriba descrito para la selección de una planta de maíz tolerante a las bajas temperaturas de acuerdo con la invención, proveniente de los descendientes del cruzamiento de la primera etapa. Preferentemente, el ácido nucleico que transmite la tolerancia a las bajas temperaturas comprende una o más secuencias de ácidos nucleicos, seleccionadas del grupo compuesto por a) una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO 29, b) una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 98%, 99% o 99,5% idéntica a una secuencia de a) o b), c) una secuencia de ácidos nucleicos, que de acuerdo con el código genético degenerado, se deriva de una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con a), d) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO 30 o un homólogo, análogo u ortólogo de éstas. En un ejemplo de realización preferido, el intervalo cromosómico que se encuentra en el cromosoma 4, el cual presenta un ácido nucleico que transmite una tolerancia a las bajas temperaturas, es un intervalo entre las posiciones de los marcadores ma59778s32 y ma59778119 y/o el ácido nucleico que transmite la tolerancia a las bajas temperaturas comprende una secuencia de ácidos nucleicos, seleccionada del grupo compuesto por a) una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO 29, b) una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 98%, 99% o 99,5% idéntica a una secuencia de a), c) una secuencia de ácidos nucleicos, que de acuerdo con el código genético degenerado, se deriva de una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con a), o d) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO 30 o un homólogo, análogo u ortólogo de éstas, preferentemente la secuencia de ácidos nucleicos está unida operativamente con 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 la SEQ ID NO: 34, en donde la variante alélica o la forma modificada produce una tasa de expresión o medida de expresión comparable 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 tiene una tasa de expresión o medida de expresión reducida en más de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% o 50% en comparación con la tasa de expresión o medida de expresión, producida por el promotor, que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 34. Una tasa de expresión o medida 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, sustancialmente presenta una tasa de expresión o medida de expresión, que se desvía no más de 20%, 18%, 16%, 14% o 12%, preferentemente no más de 10%, 9%, 8%, 7% o 6%, o más preferentemente no más de 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% o 0% de la tasa de expresión o medida de expresión del promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento para el aumento del rendimiento de plantas o plantas de maíz, que comprende el cultivo de plantas transgénicas de acuerdo con la invención, tolerantes a las bajas temperaturas, plantas mutadas tolerantes a las bajas temperaturas o plantas de maíz de acuerdo con la invención, tolerantes a las bajas temperaturas, así como la cosecha de un mayor rendimiento. Las plantas que crecen disponen de una mayor tolerancia a las bajas temperaturas, las cuales en latitudes moderadas les permite, durante una fase de estrés por bajas temperaturas, crecer más rápido que una planta de genotipo comparable, que no contienen en su genoma un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Esto lleva a que en el momento de la cosecha las plantas transgénicas tolerantes a las bajas temperaturas de acuerdo con la invención, las plantas mutadas tolerantes a las bajas temperaturas o las plantas de maíz tolerantes a las bajas temperaturas de acuerdo con la invención den un mayor rendimiento.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para la reducción del uso de herbicidas en el cultivo de plantas o plantas de maíz, especialmente durante el desarrollo temprano de las plantas o plantas de maíz, que comprende el cultivo de plantas transgénicas tolerantes a las bajas temperaturas de acuerdo con la invención, plantas mutadas tolerantes a las bajas temperaturas o plantas de maíz tolerantes a las bajas temperaturas, de acuerdo con la invención. Las plantas que crecen disponen de una mayor tolerancia a las bajas temperaturas, la que en las latitudes moderadas les permite durante una fase de estrés por bajas temperaturas crecer más rápido que una planta de genotipo comparable que no contiene en su genoma un ácido nucleico de acuerdo con la invención. De este modo, las plantas son competitivas con respecto a malezas/ vegetación extraña que crece. Preferentemente las plantas cultivadas disponen adicionalmente de una resistencia a los herbicidas.

Algunos de los términos usados en esta solicitud se explicarán más detalladamente a continuación:

Bajo "hibridar" o "hibridación" se entiende un procedimiento con el cual una molécula de ácido nucleico de una sola hebra se une con una hebra de ácido nucleico más complementaria, es decir, se produce un apareamiento de bases. Procedimientos estándar para la hibridación se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. 2001. Preferentemente se entiende bajo este término que al menos 60%, más preferentemente al menos 65%, 70%, 75%, 80% o 85%, más preferentemente aún 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las bases de la molécula de ácido nucleico forma un apareamiento de bases con la hebra de ácido nucleico más complementaria. La posibilidad de una unión de este tipo depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. El término "rigurosidad" se refiere a

las condiciones de hibridación. Alta rigurosidad es aquella en la que se dificulta un apareamiento de bases, baja rigurosidad es aquella en la que se facilita un apareamiento de bases. La rigurosidad de las condiciones de hibridación depende, por ejemplo, de la concentración de sales o la concentración de iones y la temperatura. En general, la rigurosidad puede aumentarse por medio de un aumento de la temperatura y/o una disminución del contenido de sales. Bajo "condiciones de hibridación rigurosas" se entienden aquellas condiciones bajo las cuales se produce una hibridación principalmente sólo entre moléculas de ácidos nucleicos homólogas. El término "condiciones de hibridación" se refiere para ello no sólo a las condiciones imperantes durante la unión de los ácidos nucleicos propiamente dicha, sino también a las condiciones imperantes durante las etapas de lavado subsiguientes. Las condiciones de hibridación rigurosas son, por ejemplo, condiciones bajo las cuales principalmente sólo se hibridan aquellas moléculas de ácidos nucleicos, que presentan una identidad de secuencia de al menos 70%, preferentemente al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95%. Condiciones de hibridación rigurosas son, por ejemplo: hibridación en 4 x SSC a 65 °C y a continuación múltiples lavados en 0,1 x SSC a 65 °C durante aproximadamente 1 hora en total. El término aquí usado "condiciones de hibridación rigurosas" también puede significar: hibridación a 68 °C en 0,25 M fosfato de sodio, pH 7,2, 7 % SDS, 1 mM EDTA y 1 % BSA durante 16 horas y a continuación lavado dos veces con 2 x SSC y 0,1 % SDS a 68 °C. Preferentemente se realiza una hibridación bajo condiciones rigurosas.

En el sentido de la invención, se entiende bajo un "homólogo" una proteína de igual origen filogenético, bajo un "análogo" una proteína que tiene la misma función, pero tiene otro origen filogenético, y bajo un "ortólogo" se entiende una proteína de otra especie que tiene la misma función.

Una "planta" en el sentido de la invención es una planta de la especie *Zea mays*.

"Unido operativamente" significa unido en una molécula común de ácido nucleico, de una manera que los elementos unidos están posicionados y orientados entre sí de tal modo que se puede realizar una transcripción de la molécula de ácido nucleico. Un ADN que está unido operativamente con un promotor, se encuentra bajo el control transcripcional de este promotor.

Por "órganos" de la planta se entienden, por ejemplo, hojas, eje del tallo, tallo, raíces, brotes vegetativos, meristemas, embriones, anteras, óvulos o frutos. Por "partes" de la planta se entiende un conjunto de varios órganos, por ejemplo, una flor o una semilla, o una parte de un órgano, por ejemplo, una sección del eje del tallo. "Tejidos" de la planta, son, por ejemplo, tejidos del callo, tejidos de almacenamiento, tejidos meristemáticos, tejidos de las hojas, tejidos de los brotes, tejidos de las raíces, tejido tumoral de la planta o tejido reproductivo. Bajo "células" de la planta se entienden, por ejemplo, células aisladas con una pared celular o agregados de éstas o protoplastos.

Un "fragmento funcional" de una secuencia de nucleótidos significa un tramo de una secuencia de nucleótidos, el cual presenta una funcionalidad idéntica o comparable con la secuencia total de nucleótidos, de la cual proviene el fragmento funcional. Como tal, el fragmento funcional puede poseer una secuencia de nucleótidos que es idéntica en una longitud de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% u homóloga con la secuencia de nucleótidos total. Además, un "fragmento funcional" de una secuencia de nucleótidos también puede significar un tramo de una secuencia de nucleótidos, el cual modifica la funcionalidad de la secuencia de nucleótidos total, por ejemplo, en el curso de un silenciamiento de genes posttranscripcional 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, más preferentemente al menos 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos total.

El término "heterólogo" significa que el polinucleótido introducido proviene, por ejemplo, de una célula o un organismo con otra base genética de la misma especie o de otra especie, o es homólogo con respecto a la célula huésped procarionota o eucarionota, luego, sin embargo es localizado en un ambiente genético diferente y así se diferencia de un polinucleótido correspondiente eventualmente naturalmente existente. Un polinucleótido heterólogo puede estar presente adicionalmente a un gen endógeno correspondiente.

En el contexto de la presente invención, el término "secuencia reguladora" se refiere a una secuencia de nucleótidos, que influye sobre la especificidad y/o la fuerza de la expresión, por ejemplo, en cuanto la secuencia reguladora transmite una determinada especificidad del tejido. Una secuencia reguladora como ésta puede estar localizada corriente arriba del punto de iniciación de la transcripción de un promotor mínimo, pero también corriente debajo de éste, como por ejemplo, en una secuencia líder transcripta pero no traducida o dentro de un intrón.

El término "intervalo cromosómico" significa un tramo lineal continuo en un ADN genómico, el cual se encuentra en un cromosoma individual en la planta o en un fragmento del cromosoma. Si el intervalo cromosómico es definido por la indicación de dos posiciones de los marcadores que lo flanquean, éstos representan los puntos extremos del intervalo hacia los lados distal y proximal. Para ello las posiciones de los marcadores, que definen el intervalo en los extremos también pueden ser parte del intervalo. En la descripción también se especifica un intervalo con la indicación "entre la posición del marcador A y la posición del marcador B". Entonces el intervalo cromosómico representa un tramo de ADN lineal continuo, el cual está localizado entre las posiciones especificadas de los marcadores. Las posiciones de

los marcadores no son los puntos extremos del intervalo hacia los lados distal y proximal. Las posiciones de los marcadores especificadas no son parte del intervalo.

El término "alelo" se refiere a una de dos o más secuencias de nucleótidos en un locus determinado 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 son diferentes, son heterocigotas, si son los mismos alelos son homocigotas. Diversos alelos de un gen (alelos de gen) se diferencian en al menos un SNP. Según el contexto de la descripción, un alelo puede significar también un solo SNP, el que, por ejemplo, permite una diferenciación 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 debería ser adecuado para controlar diferencias o polimorfismos dentro de una población de plantas. Para los marcadores estas diferencias se encuentran a nivel del ADN y son, por ejemplo, diferencias de secuencias de polinucleótidos, como por ejemplo, SSRs (*simple sequence repeats*), RFLPs (*restriction fragment length polymorphisms*), FLPs (*fragment length polymorphisms*) o SNPs (*single nucleotide polymorphisms*). Los marcadores pueden ser derivados de ácidos nucleicos genómicos o expresados, como por ejemplo, ARN empalmado, cADN o ESTs y también se pueden referir a ácidos nucleicos, los que se usan como sondas o pares de cebadores y como tales son adecuados para amplificar un fragmento de secuencia usando un procedimiento basado en PCR. Los marcadores, que se refieren a polimorfismos genéticos entre partes de una población, pueden ser determinados por medio de procedimientos conocidos del estado de la técnica ("*An Introduction to Genetic Analysis*". 7ª Edición, Griffiths, Miller, Suzuki et al., 2000). Estos comprenden, por ejemplo: secuenciación de ADN, amplificación específica de secuencias basada en PCR, determinación de RFLPs, determinación de polimorfismos de polinucleótidos por medio de hibridación específica de alelos (ASH), detección de SSRs, SNPs o AFLPs. Además también se conocen los procedimientos para la detección de ESTs (*expressed sequence tags*) y RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*). Según el contexto, el término marcadores en la descripción también puede significar una posición específica del cromosoma en el genoma de una especie, en donde se puede hallar un marcador específico (por ejemplo, SNP). Una posición de marcador como ésta puede ser aprovechada para controlar la presencia de un locus acoplado, por ejemplo, un locus acoplado que aporta para la expresión de una determinada característica fenotípica. Por ejemplo, el locus del marcador también puede ser usado para controlar la segregación de alelos en un locus (QTL o gen individual), que están acoplados estrechamente genéticamente o físicamente con la posición del marcador.

La presente invención se explicará a continuación en los ejemplos haciendo referencia a las figuras, pero sin quedar limitada por éstas. En las figuras se muestra:

Figura 1: La sucesión esquemática de genes candidatos en el sector entre las posiciones de los marcadores ma59778s31 y ma59778119 en comparación entre SL, TH y B73 AGPv02. Marco de línea continua: gen anotado; marco de línea de puntos: información del mapeo soportado por los marcadores; sectores en los cuales existe un polimorfismo genético entre la línea SL y la 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 las flechas muestran en la dirección 5'-3', según sobre qué hebra de ADN se encuentre el gen correspondiente; SL: genotipo sensible a las bajas temperaturas; TH: genotipo tolerante a las bajas temperaturas; B73: línea de maíz cuyo genoma fue secuenciado y que el experto en el arte utiliza para el cultivo de maíz como genoma de referencia. Con ayuda de los datos de B73 es posible indicar aparte de la posición del gen candidato soportado por los marcadores también su posición relativa (relativa con respecto al genoma de referencia B73).

Figura 2: Efectos aditivos de los marcadores (la mitad de la diferencia entre los valores medios de las dos expresiones de los marcadores homocigotas) para las características fenotípicas altura de planta temprana y color verde de la hoja de las plantas recombinantes examinadas después del estrés por bajas temperaturas en experimentos en el campo (izquierda) y en la cámara acondicionada (derecha). La longitud de una barra detrás de la indicación de la posición del marcador representa la magnitud de la influencia de la genética sobre la expresión de dichas características después del estrés por bajas temperaturas. De acuerdo con esto, las posiciones de los marcadores ma59778s32, ma59778116 y ma59778119 deciden en gran parte si una planta es tolerante a las bajas temperaturas. Los valores de medición y los cálculos de la Figura 2 pueden ser obtenidos de la Tabla 5.

La Figura 3 muestra en el sector superior (A) la representación esquemática del cromosoma No. 4 de *Zea mays* con aproximadamente 225 Megabases en total. La posición del centrómero y cuatro posiciones importantes de los marcadores se indican con nombres. En el sector inferior (B) hay un recorte alrededor de los marcadores Zm4-5, en el cual se encuentra también el gen SAUR31, representado en forma ampliada. Se trata de un mapeo fino, el cual por medio de tres posiciones de los marcadores reproduce con exactitud la posición de SAUR31. SAUR31 es flanqueado por los dos marcadores ma59778s32 y ma59778119.

La Figura 4 muestra los valores medios de la características altura de crecimiento de la planta de plantas con la mutación en el sector 5'UTR delante del gen SAUR31 en comparación con el medio de la línea de salida no mutagenizada. Se representan dos puntos de tiempo de medición diferentes (dos estadios 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 emergencia en el campo se produjo bajo condiciones de primavera de baja temperatura y las dos mediciones se realizaron antes de la floración del maíz. Los datos verifican la importancia de SAUR31 en la expresión fenotípica de la característica de tolerancia a bajas temperaturas.

La Figura 5 muestra la medida de la diversidad genética en base a la frecuencia de alelos en el pool de genes de Dent (línea inferior) y en el pool de genes de Flint (línea superior) en el cromosoma 4. Hay una diversidad genética máxima a una frecuencia de alelos de 0,5. Los valores 0,0 y 1,0 representan Extrama, los que indican la fijación completa de una base genética determinada sin cualquier variabilidad. Como se puede observar de la figura, se encuentra en el pool de genes de Dent una clara fijación genética en comparación con el pool de genes de Flint, especialmente en el límite con el sector del QTL que transmite la tolerancia a bajas temperaturas, que contiene el gen SAUR31.

La Figura 6 muestra la expresión relativa del gen SAUR31 en líneas sensibles a bajas temperaturas y tolerantes a bajas temperaturas. Las plantas se cultivaron durante dos semanas a temperaturas de 22 °C/25 °C y a continuación fueron expuestas a un estrés por bajas temperaturas de 6 °C/8 °C durante 24 hs. Al comienzo del tratamiento con bajas temperaturas (0 h) así como también después de 4 hs y 24 hs se usaron las partes que estaban sobre la tierra de ocho plantas para el aislamiento del ARN. El ARN se examinó con ayuda del RT-PCR. Los ensayos se realizaron dos veces y ambos eventos se representan como dos barras adyacentes. Todos los valores fueron estandarizados al valor SL 0 h, el que se definió como 1.

SEQ ID NOs: 1 a 35 muestran:

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

SEQ ID NO: 2 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 1

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

SEQ ID NO: 4 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 3

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

SEQ ID NO: 6 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 5

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

SEQ ID NO: 8 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 7

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

SEQ ID NO: 10 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 9

SEQ ID NO: 11 marco de lectura abierto ORF-TH-03 de la línea TH

SEQ ID NO: 12 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 11

SEQ ID NO: 13 marco de lectura abierto ORF-SL-04 de la línea SL

SEQ ID NO: 14 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 13

SEQ ID NO: 15 marco de lectura abierto ORF-TH-04 de la línea TH

SEQ ID NO: 16 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 15

SEQ ID NO: 17 marco de lectura abierto ORF-SL-05 de la línea SL

SEQ ID NO: 18 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 17

SEQ ID NO: 19 marco de lectura abierto ORF-SL-06 de la línea SL

SEQ ID NO: 20 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 19

SEQ ID NO: 21 marco de lectura abierto ORF-SL-12 de la línea SL

SEQ ID NO: 22 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 21

SEQ ID NO 23 marco de lectura abierto ORF-SL-08 de la línea SL

SEQ ID NO: 24 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 23

SEQ ID NO: 25 marco de lectura abierto ORF–TH–08 de la línea TH, que es idéntico al ORF–SL–08 de la línea SL

SEQ ID NO: 26 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 25

SEQ ID NO: 27 marco de lectura abierto ORF–SL–09 de la línea SL, el cual corresponde al gen SAUR 31.

SEQ ID NO: 28 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 27

- 5 SEQ ID NO: 29 marco de lectura abierto ORF–TH–09 de la línea TH, el cual corresponde al gen SAUR 31, en donde el gen se encuentra en una variación alélica, la que sustancialmente participa en la expresión de la tolerancia a bajas temperaturas.

SEQ ID NO: 30 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 29

- 10 SEQ ID NO: 31 marco de lectura abierto ORF–B73–09 de la línea de referencia B73 del genoma del maíz, el cual corresponde al gen SAUR 31.

SEQ ID NO: 32 la proteína codificada por la SEQ ID NO: 31

SEQ ID NO: 33 Región promotora del gen SAUR31 que corresponde a la variación alélica ORF–TH–09, en donde la región promotora se encuentra en una variación alélica, la que participa sustancialmente en la expresión de la tolerancia a bajas temperaturas.

- 15 SEQ ID NO: 34 Región promotora del gen SAUR31 que corresponde 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

- 20 SEQ ID NO: 38 Versión mutada de SAUR31 con intercambio de bases de adenina contra una guanina en la posición –25 (con relación al inicio de la traducción), se representa la hebra codogénica en la dirección 5' a 3'

Ejemplos:

Se realizó un estudio de mapeo de QTL en una población de mapeo bi–parental de las líneas SL y TH producidas por endogamia. La línea endogámica SL es sensible con respecto a las bajas temperaturas durante el desarrollo temprano de las plantas en el campo, mientras que la TH es la línea parental tolerante.

- 25 Los experimentos de campo se realizaron con 720 líneas DH (haploides dobles) en 8 sitios (Presterl et al., 2007). Las 720 líneas DH fueron genotipadas con 188 SSR marcadores más allá del genoma. Se realizó un fenotipado del desarrollo de las plantas en un estadio temprano (seis a ocho hojas completamente desarrolladas) y el rendimiento total de material de planta fresco y el número de plantas fue determinado como medida de la tolerancia a bajas temperaturas en el campo.

- 30 El mapeo de QTL fue calculado al nivel de la línea *per se* y cruzamientos de prueba. Como resultado se pudieron determinar 7 regiones QTL en 6 cromosomas, en donde el QTL más fuerte se determinó en el cromosoma 4 en un intervalo 4 cM con 33,7% de la variancia del fenotipo declarada. En el primer mapeo de QTL sólo 3 SSR marcadores cubrían la región del genoma (Presterl et al. 2007). En el mapa físico de B73 AGPv01 esta región comprende 155 Mb. El mapeo de QTL fue verificado más tarde en esta población. Se realizaron mapeos adicionales de esta región. Se desarrollaron 23 marcadores para la región QTL y se genotiparon líneas casi isogénicas (NILs = *Near Isogenic Lines*) para la región QTL grande, y se derivaron otras plantas recombinantes de cruzamientos entre NILs y la SL parental sensible, para desarrollar NILs con segmentos de cromosomas más pequeños. Se pudieron mapear dos marcadores polimorfos flanqueadores de la región QTL a 36,7 Mb (Zm4–5) y 156,4Mb (Zm4–6) en el mapa físico de B73 AGPv01 (véase Figura 3). Los marcadores recién desarrollados pudieron ser mapeados a 37,1 Mb. Los nuevos marcadores estrecharon la región QTL a 119,7 Mb, pero debido a una reducida frecuencia de recombinación en esta región (región pericentrómera) y sin suficientes recursos genómicos no se pudo determinar un intervalo más pequeño (Baliashvili, 2011).

- 45 Se estableció un test fenotípico para la determinación de la sensibilidad a bajas temperaturas, en donde las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento durante 14 días (estadio de tres hojas) durante el día a 25 °C y a 22 °C a la noche. Luego se redujo la temperatura a 8 °C en el día y 6 °C en la noche durante una semana. El rendimiento a 25 °C en el día y 22 °C en la noche después del tratamiento con bajas temperaturas dio una lesión clorótica en la cuarta y la quinta hojas, cuando la planta es sensible al tratamiento con bajas temperaturas (línea SL). Las plantas tolerantes permanecen verdes (línea TH).

- 50 Análisis molecular y recursos genómicos: Para enriquecer la región QTL con los nuevos marcadores moleculares, se produjeron nuevos recursos genómicos. Así una propuesta de captura de secuencia con las líneas SL, TH y la línea

NIL TH-N4-32 28 dio nuevos marcadores polimorfos SNP en la comparación entre SL y TH. Se prepararon además las secuencias BAC de dos bibliotecas BAC, las que provenían de una línea que llevaba el alelo SL sensible en el QTL y una línea que llevaba el alelo TH tolerante en el QTL. Se realizó un rastreo de bibliotecas BAC, una secuenciación y una construcción de un andamio. Las bibliotecas BAC fueron rastreadas 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 de TH-BAC fueron secuenciados con tres diferentes técnicas de la generación siguiente. Para el andamio de SL-BAC pudo componerse un tamaño total de 284 kb y para el andamio de TH-BAC un tamaño total de 356 kb, en donde ambos contienen la región objetivo entre ma59778s31y ma59778119 inclusive las regiones flanqueadoras. La falta de marcadores polimorfos en dirección al centrómero pudo ser confirmada por la comparación de las secuencias BAC de ambas bibliotecas. Detrás de 38729663 bp en el mapa de B73 AGPv02 no se pudo determinar ningún polimorfismo entre las dos líneas. En la posición 37297901 bp pudo establecerse como último marcador funcional ma59778119. Este marcador hace posible la determinación 3' de la región QTL, ya que de la posición 38729663 en adelante no observaron otros polimorfismos entre SL y TH. Sin estos marcadores no hubiera sido posible identificar introgresiones tan pequeñas como 35 kb (de los marcadores ma59778s31 a ma59778119) (véase Figura 3).

Identificación de los genes candidatos: los andamios BAC de ambas bibliotecas BAC fueron anotados. Los genes/regiones candidatos fueron adjudicados cuando concordaban con los resultados del rastreo recombinante, su anotación funcional, los resultados de los análisis de expresión, y si mostraban polimorfismos entre las líneas SL y TH. En total se pudieron anotar nueve marcos de lectura abiertos (ORFs) en el andamio SL-BAC, y siete ORFs se pudieron anotar en el andamio TH-BAC entre ma59778s31 y 7202707. Los ORFs pudieron ser demostrados, en donde la mayoría codificaban para elementos transponibles completos o acortados (Tabla 1a a c). Es conocido que tales elementos, cuando están localizados cerca de genes, pueden influir sobre su expresión (Butelli, Eugenio, et al. "Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges". The Plant Cell 24.3 (2012): 1242-1255; Meihls, Lisa N., et al. "Natural variation in maize aphid resistance is associated with 2, 4-dihydroxy-7-methoxy-1, 4-benzoxazin-3-one glucoside methyltransferase activity." The Plant Cell 25.6 (2013): 2341-2355.).

Dos ORFs (ORF-SL-03/ORF-TH-03, ORF-SL-08/ORF-TH-08) anotados no mostraron entre SL y TH ninguna diferencia de secuencias genómicas. Cuatro ORFs (ORF-SL-02/ORF-TH-02, ORF-SL-04/ORF-TH-04, ORF-SL-09/ORF-TH-09, ORF-TH-11/Región-SL-11, ORF-SL-12/Región-TH-12) anotados mostraron polimorfismo o bien de nucleótidos individuales o inserciones/deleciones, un ORF (ORF-SL-01/ORF-TH-01) estaba mapeado sólo parcialmente entre los genotipos. Dos ORFs (ORF-SL-05, ORF-SL-06), que fueron identificados y anotados en la SL, faltan en la TH. Como resultados, todos los ORFs, que son polimorfos, entre los cuales faltan dos genotipos o muestran una expresión diferente, son genes candidatos adecuados para la propiedad observada de tolerancia a bajas temperaturas. De especial interés es ORF-09, el cual fue identificado como SAUR31 en el banco de datos del maíz. Los genes SAUR (*small auxin upregulated RNA*) reaccionan a auxina.

Validación de genes candidatos: El rastreo de una población de Tilling con el alelo tolerante de TH para la región QTL que transmite tolerancia a bajas temperaturas en el cromosoma 4) se inició para los genes candidatos especialmente ORF-SL-09, ORF-TH-09 (B73: GRMZM2G420812). Dos intercambios de aminoácidos pudieron ser identificados en los mutantes, y dos mutantes presentaban polimorfismos en la región 5' del gen.

La expresión de genes candidatos elegidos fue analizada por qRT-PCR en ambas líneas parentales y en dos NILs, que se diferenciaban en la tolerancia a bajas temperaturas. Las plantas fueron cultivadas en una cámara de crecimiento bajo las condiciones arriba mencionadas, y se analizó la expresión de los genes candidatos con respecto a tres puntos de tiempo del tratamiento con bajas temperaturas:

1. Antes del tratamiento con bajas temperaturas (t_0),
2. Cuatro horas después de comenzar el tratamiento con bajas temperaturas (t_4) y
3. 24 horas después de comenzar el tratamiento con bajas temperaturas (t_{24}).

La expresión del gen SAUR31 (ORF-09) era mayor en las líneas sensibles a bajas temperaturas y disminuyó con cada punto de tiempo de medición en forma continua. Dos de los elementos transponibles analizados (ORF-08 y ORF-02) mostraron igualmente una expresión diferente entre las líneas sensibles y tolerantes (Fig. 6). Las Tablas 1a a c resumen los genes candidatos, su anotación, los polimorfismos observados y los eventos del análisis de expresión. Las diferencias de la expresión pueden asumirse como la causa del retardo del crecimiento bajo condiciones de bajas temperaturas.

Desarrollo de una SAUR31-mutante y su análisis en el ensayo de campo: En base a la especial influencia de SAUR 31 sobre la expresión fenotípica de la tolerancia a bajas temperaturas se buscó una validación funcional de este gen. Como propuesta se eligió una mutagénesis EMS no direccionada 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 distribuyeron semillas M1 y a continuación se realizó una cosecha de las hojas de las plantas individuales correspondientes. La extracción de ADN subsiguiente de las muestras de hojas

cosechadas permite amplificar por medio de un cebador específico (SEQ ID NOs 36 y 37), un fragmento de ADN del gen SAUR31. Por medio de secuenciación de estos fragmentos de ADN pueden detectarse desviaciones con respecto a la secuencia original del gen SAUR31 y reintroducirlas en la planta individual correspondiente. Por medio de este procedimiento se pudo identificar en forma exitosa una mutante de este tipo que presenta una mutación del gen SAUR31 en la 5'-UTR (región no traducida). Aquí se puede observar en una posición (-25), partiendo del Start ATG, un intercambio de G/C a A/T con respecto a la secuencia original. La secuencia correspondiente se representa como SEQ ID NO: 38. La mutación heterocigota identificada en la generación M1 se fijó por medio de autofecundación de la planta individual correspondiente en la generación M2 siguiente.

En los ensayos de campo en el sitio A se cultivó la mutante en filas con 20 plantas cada una en 5 repeticiones. La línea original no mutagenizada se cultivó en cada caso en la proximidad directa de la mutante, para garantizar la mejor comparación posible. La evaluación estadística de los valores medios de la mutante a la línea original muestra un crecimiento significativamente peor de la mutante bajo condiciones de bajas temperaturas de primavera en comparación con la línea original (Fig. 4). La Fig. 4 muestra los valores medios de la característica de altura de crecimiento de la planta de la mutante con respecto al medio de la línea de partida no mutagenizada en dos puntos de tiempo de medición diferentes (dos estadios diferentes del desarrollo de la planta): La segunda medición representada en la Figura 4 a la derecha se realizó 27 días después de la primera medición representada a la izquierda. La emergencia en el campo se realizó bajo condiciones de bajas temperaturas de primavera.

Desarrollo de NILs recombinantes: Con ayuda de los nuevos marcadores moleculares se desarrollaron además NILs recombinantes que provenían de los NILs TH-N4-8X, TH-N4-56X y TH-N4-32. Se pudieron identificar muy pequeños eventos de recombinación, los que comprenden 34,729 kb en el mapa físico B73AGPv02, 32,731 kb en el andamio SL-BAC y 25,662 kb en el andamio TH-BAC (Los bordes son indicados por los marcadores ma59778s31 a marcadores ma59778119) (Tabla 2). Un panorama de los NILs, que se usaron en diversas propuestas se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Panorama de NILs y progenitores, como se usaron para las diversas propuestas. Las posiciones de los marcadores con referencia a AGPv2 son: ma11840s01= 31306276 bp; ma59778s31= 37263172 bp; ma59778s32= 37296672 bp; ma59778119= 37297901 bp; ma52594s01= 58033711 bp; ma20205s01= 156.998.152 bp.

Líneas	ma11840s01	ma59778s31	ma59778s32	ma59778119	ma52594s01	ma20205s01	Haplotipo
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
Biblioeca SL-BAC	A	C	C	A	A	G	HP1
Biblioteca TH-BAC	G	T	T	C	A	A	HP2
KWS279-Tilling	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
NIL1-Fenotipo		T	T	C	A		HP1
NIL2-Fenotipo		C	T	C	A		HP4
NIL3-Fenotipo		T	C	A	A		HP5
NIL4-Fenotipo		T	C	C	A		HP6

Evaluación fenotípica: Las NILs que contenían el segmento dador en los marcadores ma59778s32, pero contenían el alelo SL en los marcadores ma59778s31, y a la inversa, fueron fenotipadas en el campo y en la cámara de crecimiento.

Las NILs y las líneas parentales fueron evaluadas con respecto al desarrollo de la planta en un estadio temprano en dos sitios A y B en el norte de Alemania, los que son conocidos por las bajas temperaturas de períodos de crecimiento tempranos del maíz. El Experimento 1 se realizó en dos sitios con 27 plantas recombinantes en 20 réplicas, y el Experimento 2 estaba compuesto por 38 plantas recombinantes en 10 réplicas y se evaluó en el sitio A. En los dos experimentos se plantaron NILs en una fila con 20 plantas cada una. El desarrollo de las plantas se midió como la altura de la planta al comienzo de la fase de extensión del tallo.

Tabla 3: Medios de la heredabilidad en función del sitio de ensayo para la altura de la planta temprana para los Experimentos 1 y 2

Parámetro	Experimento 1			Experimento 2
	Varios sitios	Sitio A	Sitio B	Sitio 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
Heredabilidad [%]	98,5	97,2	97,2	97,4

La altura de la planta temprana mostró una heredabilidad muy alta (>97%, Tabla 3). Las dos líneas parentales SL y TH se incluyeron en ambos experimentos y se diferenciaron claramente en la altura de la planta temprana.

La altura de la planta temprana de NILs fue calculada como porcentaje de la SL de los progenitores sensibles (Tabla 3). Los RecNILs con genotipos idénticos en el intervalo cromosómico entre los marcadores ma59778s31 y ma59778119 fueron resumidos como haplotipos (Tabla 4). Los RecNILs, que mostraron el genotipo SL en los marcadores ma59778s32, ma59778119 y ma59778116, tenían claramente una menor altura de planta temprana en comparación con los genotipos TH correspondientes. La variante TH tenía sorprendentemente una longitud de planta aproximadamente 35% aumentada, la que considerada en forma absoluta representaba aproximadamente 21 cm adicionales. Dos NILs con el genotipo SL en los marcadores ma59778s32 y TH en los marcadores ma59778119 y ma59778116 presentaban también una altura de planta temprana similarmente reducida.

Adicionalmente, las NILs fueron fenotipadas en la cámara acondicionada usando el test de fenotipo arriba indicado. Las líneas fueron cultivadas durante dos semanas en el invernadero (25/22 °C) y se transfirieron una semana a la cámara acondicionada a 8/6 °C (condiciones de baja temperatura), después de una semana de recuperación en el invernadero (25/22 °C) se evaluó el color verde de las hojas cuatro y cinco entre 0 (amarillo) y 100 % (verde). Aquí el valor de 100% indica la conservación completa del color de hoja verde y un valor de 0% indica un color amarillo completo (clorosis). Se mostró que la variante TH era superior a la variante SL también en la conservación de la clorofila bajo estrés por baja temperatura. En total se midieron valores de 10 a 85%. La pérdida del color verde de las hojas de las variantes TH era alrededor de 19 hasta 75% reducida con respecto a las variantes SL.

Tabla 4: Panorama en forma de tabla de los haplotipos NIL, representados con un número diferente (N) en NILs individuales y sus resultados de fenotipo para las propiedades de altura de planta temprana (SL = 100%) y color verde de las hojas.

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

Adicionalmente se calcularon los efectos de los marcadores en el intervalo objetivo para los resultados de los ensayos de campo y de la cámara acondicionada usando una propuesta de regresión de marcadores individuales (Figura 1). Los marcadores que están físicamente cerca o en el ORF-09 del gen (ma59778120–ma59778119), mostraron los mayores efectos y estaban asociados significativamente con las dos mediciones fenotípicas. En el ensayo de campo un efecto adicional de 6% corresponde a una diferencia entre las dos clases de marcadores homocigotas de 12%. En valores absolutos esto se refiere a 7,8 cM, lo que representa 40% de la diferencia fenotípica entre SL y TH. Para la cámara de crecimiento, el efecto aditivo se refiere a 22,7% de los dos marcadores flanqueadores más cercanos.

Tabla 5: Valores LOD (*logarithmic odds ratio*, evaluación estadística de la probabilidad con respecto a si la expresión de los marcadores y de las características se hereda en forma acoplada. LOD=3 se interpreta en general como umbral significativo) y efectos aditivos de los marcadores (corresponde a la mitad de la diferencia de las dos expresiones de los marcadores homocigotas) para los fenotipos altura de planta temprana y color verde de las hojas de las plantas recombinantes examinadas en el campo y en los experimentos en la cámara acondicionada.

Marcadores	Posición	Altura de planta Temprana		Color 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 tolerancia a bajas temperaturas: La identificación del haplotipo del gen candidato y el desarrollo de nuevos marcadores hacen posible, con ayuda de la selección soportada por marcadores, introducir por cruzamiento el gen candidato correspondiente dentro de un intervalo fuertemente limitado en material de cultivo sensible a las bajas temperaturas. Las plantas producidas de este modo obtienen una mayor tolerancia a bajas temperaturas y al mismo tiempo mantienen la mayor biodiversidad.

Un análisis de 5.598 genotipos del pool de genes de Dent usados para el cultivo demostró que 86% de los genotipos poseen el gen candidato en la variante alélica deseada y por lo tanto presentan los haplotipos deseados.

Listado de secuencias.

<110> KWS SAAT SE

<120> Plantas tolerantes a las bajas temperaturas

<130> KWS0225EP

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2016

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 1

atggcgcccc cgagagtgga agaccccatg gcgctgttgt tggccaaaat cgatgaaggc	60
agtaaggaaa cctgccgacg catggaggca atccattcta caatggagaa gatggagatc	120
acagtgcaag gactggtctc caatcagagc gacttcaaga agtggcagcc cgagatcgag	180
aggaagggtg tggagatggc ggaaacccta gtgaagatcc aaacgaagat aagtaatacg	240
accccgctcta ccacttcttc gggagcagta ccagcggctc ccaacgtctc gatgtcggaa	300
acagcttcgg tgggtggggg ggagaagatg gcgggttcta ccctgcaccg tacggcggat	360
cccttcgcac gacctgctgc cgaatcgaag gtgaaccaga tgcgctgcc cttgggaggt	420
atggccacgc ctaatcctca tgctccttgg ttattcggcc aaacctctgt gagtcccttt	480
gcatctccaa cctggtcaca aggattggga ggaaacatgc caccgatgaa ttttccagt	540
tttgatgcat ccaatcctaa gctatggaaa aatcggtgtg aaacttattt tgagtactat	600
gctgtcctag tggatatgtg gattcgattg gctatcatgc actttgaggg gccgactcta	660
ttttggctgc agtatatgga aggtagaacg agggaaatga attgggggtga actttgtgca	720
gctctgctca ccagattcgg tcgtgaccag cataatttgc tactagaca attttaccat	780
atattccaga caggatcagt atcagattat attgaacaat ttgatttggt attgcatcag	840
ttgttggtct atgaaaatca tctcaccact accatggtta ctgcccgttt tgttgatgga	900
ctgaaagacg aactaagggc agcggtaatc atacagcggc cagctgattt ggatacaaca	960
tggtctctaa cattattaca agaagaggtc atgagtactt ccggacgtag agaactgaga	1020
aaagtggata ctaactccat tgtcagagtt ccaaacaac ccaatgcctt gcctatgttg	1080
tcaggtagtc ggatatcagg ggtacaggat gaacggaggt ctatggcaac agtgggtgct	1140
aaaggtgaaa cgagtaaaat ggaagccctc aaggcatatc ggaaggctaa gggactgtgt	1200
tttaagtgtg gagaaagatg gggtcactt cacacgtgct ctaacacagt gcctttacat	1260
ctggttgaag aaatgtgggc tctaacaatg ggtgcatctg agccggagat ggactctgaa	1320
gagcctgcaa ctgagactag cctcgagagt gtgcttgcta tttctgttgc agcagtatct	1380

5

ES 2 899 176 T3

```

ggcagcgaag ggagcaaaac tatcagactg tgggcatcca tttattgccac acaggttttg 1440
gtgttagtggt attctggttag ctccgcgagt tttatggata accatctcac aggagtaatg 1500
tccacaatga agccattacc aatgcctttg caagtgaagg ttgtcgatgg aaggacacta 1560
tggagtactc actttgttcc tgattgccag tggctatgtg ggggacatac tttcatccat 1620
gacttcaaaa tattaccatt gagtgggtat gatctgattc ttagtatgga ctggctggaa 1680
aaatatagcc caatgtctat acactggggg gaaaagtggg tccaatttat atataaaggg 1740
aagtcagtat ggctgcaagg tggtttaccc aatactcggg ctgtgttttc cctaaattgt 1800
ctccagtttg attcccttgt caaacaagat gcaattgagc agttactgga gttgcaagtc 1860
gtaccactta gtgaaccac tgacatgcct atggtgggtg ctgatttggt taaccagttt 1920
aaccatctgt tcgatgagcc aaaagagtta ccgccaaga ggtggattga tcatgctata 1980
ccactaatcc caggagctca accttttcga ctctga 2016

```

<210> 2

<211> 671

<212> PRT

5 <213> Zea mays

<400> 2

```

Met Ala Pro Pro Arg Val Glu Asp Pro Met Ala Leu Leu Leu Ala Lys
1          5          10          15

Ile Asp Glu Gly Ser Lys Glu Thr Cys Arg Arg Met Glu Ala Ile His
          20          25          30

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

Gln Ser Asp Phe Lys Lys Trp Gln Pro Glu Ile Glu Arg Lys Val Val
          50          55          60

Glu Met Ala Glu Thr Leu Val Lys Ile Gln Thr Lys Ile Ser Asn Thr
65          70          75          80

Thr Pro Ser Thr Thr Ser Ser Gly Ala Val Pro Ala Val Ala Asn Val
          85          90          95

Ser Met Ser Glu Thr Ala Ser Val Val Val Gly Glu Lys Met Ala Gly
          100          105          110

Ser Thr Leu His Arg Thr Ala Asp Pro Phe Arg Arg Pro Ala Ala Glu
115          120          125

```

ES 2 899 176 T3

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

ES 2 899 176 T3

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
 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

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 3

atggataaaa ataggggaccc tcaaaacaga agtggggaac agagtgaaga gggtaatggc	60
agaggcaagt ggggggctga ccagagagtt tccggggacc gtagcgtagt ccttggttgc	120
agctctgtta acaactctaa tgggtggaccg gacctcgaag ggacaggaga tgaagctgtt	180
ggagatgaag ggaagccgga agctgtccag aaactaagga gagcctacac tggatcctca	240
tcacgagtac aacacgagat tgcaggccag agcgggagcg atggcgcccc gagagtggaa	300
gaccccatgg cactgttggt agccaaaatc gatgaaggca ataaggaaac ctgccgacgc	360
atggaggcaa tccagtctac aatggagaag atggagatca cagtgcgaag actggtctcc	420
gatcggagcg acttcaagaa gtggcgggcc gagatcgaga ggaaggtggt ggagatggcg	480
gaaaccctag tgaagatcca aacaaagata agtaatacga ccccgctctac cacttcttca	540
ggagcagtac cagcgggtcac caacgtctcg atgtcgcaa caacttcggt ggtggcgggg	600
gagaagatgg cgggttctac cctgcaccgt acgacggatc ccttcgcgacg acctgctacc	660
gaatcggaag tgaaccggat gtcgctgccc ttgggaggta tggccacgcc taatcctcat	720
gctccttggt tattcggcca aacctctgtg agtccctttg catctccaac ctggtcacia	780
ggattgggag gaaacatgcc accgatgaat tttccagtgt ttgatgcatc caatcctaag	840
ctgtggaaaa atcgggtgtga aacttatctt 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 tgatttggtta ttgcatcagt tgttggctca tgaaaatcat	1140
ctcaccacta ccatggttac tgcccgtttt gttgatggac tgaaagacga actaagggca	1200
acgataatca tacagcggcc agctgatttg gataacaacat gttctctagc attattacaa	1260
gaagagggtc tgagtacttc cggacgtaga gaactgagaa aagtggatac taactccatt	1320
gtcagagttc caaacaacc caatgccttg cctatgttgt caggtagtcg gatatcaggg	1380
gtacaggatg aacggaggtc tatggcaaca gtgggtgata aaggtgaaac gagtaaaatg	1440

ES 2 899 176 T3

```

gaagccctca aggcataatcg gaaggctaag ggactgtggtt ttaagtgtgg agaaagatgg      1500
gggtcaacttc 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 ctttgttcct      1860
gattgccagt ggctatgtgg gggacatact ttcatccatg acttcaaaat attaccattg      1920
agtgggtatg atctgattct tgtgttgat ggccactcac ctatacattt tgggcttggt      1980
gacaatggtc agtgtacagt acctaattct caagagctgt tggtagagag acagctgatg      2040
ctccagcaag ttaagttgca tctcaatcgt gccagcaac gtatgaaaaa acaatcggat      2100
aaagggagga cagatcatgt ttttgaagaa ggacagcaag tgtttctcaa acttcaacct      2160
tattgtcaat cttccgtagc ttcacgtcct tatcccaaat tggcttttaa gttctttggt      2220
ccatttacca ttgctcgcaa ggtaaatggt gtagcttatg agttggctct tccaccaggt      2280
tttggtattc atccggtatt ccatgtttct cagttgaagc ctcaagttgg ttccaataca      2340
cctgttagct cattagtacc tgatatgtcg actggtttgc aagtgcctga acaaatatta      2400
gactccaagt tggtttggcg tggaggcaaa gcactttccc atgtgttggt taaatggttg      2460
gattgggatg tctatctagc tacgtgggaa gatgaagcag tgctgaagca acaattccct      2520
gcagcaccag cttggggacc agctgtatct ccagggggaa tatgttaa      2568

```

<210> 4

<211> 855

<212> PRT

5 <213> Zea mays

<400> 4

```

Met Asp Lys Asn Arg Asp Pro Gln Asn Arg Ser Gly Glu Gln Ser Glu
1          5          10          15

Glu Gly Asn Gly Arg Gly Lys Trp Gly Ala Asp Gln Arg Val Ser Gly
20          25          30

Asp Arg Ser Val Val Leu Gly Cys Ser Ser Val Asn Asn Ser Asn Gly
35          40          45

Gly Pro Asp Leu Glu Gly Thr Gly Asp Glu Ala Val Gly Asp Glu Gly
50          55          60

```

ES 2 899 176 T3

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

ES 2 899 176 T3

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

ES 2 899 176 T3

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
 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

ES 2 899 176 T3

<211> 705

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 5

```

atggtgtgcc atctgagatc tgcgagcgtg ccttcgagcc ctgctctaa tgagatccat      60
gttgaggaac agctgcagag cctgaaggca gccatctcat caccgtcagt gaccatcaaa      120
accatggtcg atggtctgag caagctcggg agcatctacg accgcattga tgtgctcaca      180
tgcttgccca ccagccagag gaaggcgggt gaggaagagc tcgagcgctc cctcgctcctg      240
cttgacctct gcagcgccctt gcaagagagc ttcgtggagc tcaaggccag tgttcaagag      300
atgcagttgg ctctcaaaag aggagacgac gcggtctctc agaccagggt tcagtgtctac      360
gcgcgcttgg tcaagaaggc acagaagctg ttcaagaagt tcaacaagaa gactgcttct      420
gacatcgaaa gttgcagggt gatcaacctt gttgctgaag cgaggagat tgctgtgtca      480
accctagaat caacattgca tctcctgtca aagcaaattg caatgccaaag ttgtagcaag      540
tggtcacttg tctctaagtc tttccaaaag aagagagtca tgtgcgaggc ggatcaattg      600
caagggtcgg agctoggctt cgttgatctt gagaacagag ttgggacatt gttcaggaaa      660
5  ttggtccaga acagagtgtc ttttctgaat attcttagct tgtag                      705

```

<210> 6

<211> 234

<212> PRT

<213> Zea mays

10 <400> 6

```

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

```

ES 2 899 176 T3

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

<210> 7

<211> 705

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<400> 7

atggtgtgcc atctgagatc tgcgagcgtg ccttcgagcc ctgctctaa tgagatccat	60
gttgaggaac agctgcagag cctgaaggca gccatctcat caccgtcagt gaccatcaaa	120
accatggtcg atggtctgag caagctcggg agcatctacg accgcattga tgtgctcaca	180
tgcttgccca ccagccagag gaaggcgggt gaggaagagc tcgagcgctc cctcgtcctg	240
cttgacctct gcagcgcctt gcaagagagc ttcgtggagc tcaaggccag tgttcaagag	300
atgcagttgg ctctcaaaag aggagacgac gcggtctctcc agaccagggt tcagtgtctac	360

ES 2 899 176 T3

gcgcgcttgg tcaagaaggc acagaagctg ttcaagaagt tcaacaagaa gactgcttct 420
gacatcgaaa gttgcagggt gatcaacctt gttgctgaag cgaggagat tgccgtgtca 480
accctagaat caacattgca tctcctgtca aagcaaattg caatgccaaag ttgtagcaag 540
tggtcacttg tctctaagtc ttccaaaag aagagagtca tgtgcgaggc ggatcaattg 600
caagggtgg agctcggctt cattgatctt gagaacagag ttgggacatt gttcaggaaa 660
ttgtccaga acagagtgtc ttttctgaat attcttagct tgtag 705

<210> 8

<211> 234

<212> PRT

5 <213> Zea mays

<400> 8

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

ES 2 899 176 T3

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

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<400> 9

atgccttcga gccctcattc cagggagacc aatgttgagg 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 gattgctgcg 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

<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

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

ES 2 899 176 T3

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> 11

<211> 678

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<400> 11

atgccttcga gccctcattc cagggagacc aatgttgagg aacagattct atgcctgaaa 60

gcagccatct ctctgccttc agtgactgtc gaaaccgtat tcgatgatct gagcaagctc 120

ES 2 899 176 T3

```

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 gattgctgcg ttgatccttg aatcgacatt gcattcctg      480
tcaaagcaaa ttgtggtcac aagttctagc aagtggtcac ttgtttccaa gtcattccga      540
aagaagtgtg tcatatgtga ggcagaacaa ttgcaagggt tggagctgga cattgttgaa      600
cttgagagca gagtagggac attgttcagg aagtgtatcc aaagcagagt gtctcttctt      660
aatgctctta gcttgtag      678

```

<210> 12

<211> 225

<212> PRT

5 <213> Zea mays

<400> 12

```

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

```

ES 2 899 176 T3

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

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<400> 13

atgccttcga gctctcgctc cagtgcgacc 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 gattgccgtg ttgatccttg aatcgacatt gcattctcatg	480
ttgaagcaaa ttgtgattcc aagctctagc aagtgggtccc ttgtttccaa gtcattccga	540
aagaagtgtg ttgtatcatg cgatgcggaa caattgcaag ggttgagct ggacgttggt	600
gatcttgaga gcagagttgg gacattgttc aggacgttga tccagagcag agtgtctctt	660
cttaatgctc ttagcttgta g	681

<210> 14

<211> 226

10 <212> PRT

<213> Zea mays

<400> 14

ES 2 899 176 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

<212> ADN

ES 2 899 176 T3

<213> Zea mays

<400> 15

```
atgccttcga gctctcgctc cagtgcgacc 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 gattgccgtg ttgatccttg aatcgacatt gcatctcatg      480
ttgaagcaaa ttgtgattcc aagctctagc aagtggccc ttgtttccaa gtcattccga      540
aagaagtgtg ttgtatcatg cgatgcggaa caattgcaag ggttggagct ggacgttggt      600
gatcttgaga gcagagttgg gacattgttc aggacgttga tccagagcag agtgtctctt      660
cttaatgctc ttagcttgta g                                     681
```

<210> 16

<211> 226

<212> PRT

5 <213> Zea mays

<400> 16

```
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
```

ES 2 899 176 T3

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

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<400> 17

atggagaata cgaggcgtgg gagacgaacg gaacgatcca acgcatcgtc ttcttcatcg	60
aaacaggctg ctgcagcagc atgcataggt gggcctggcc tgagagaaag taatgcgtcg	120
gtgggccaga gtggagacgt gctgtggcgt tgtgcagtcc agaacgaacc atacaagccg	180
cccgctcggtc ttgtggttct ttttgacaga acacacgcgt cgcttcctct ctaccaccga	240
gcgccaaaga cgaaacgtct ggcttttaggg tccaatcct acgcggactc aaccaaggtg	300
ccgccgacgc taccatgga gaaccgcggg gactcccagc aaggagtgcg gggagggcga	360
cctgtcgagc ctggcgagcagg gagggctgca ccgaggcagg gattccagta caacggctca	420
gggtcaattcc gtccaggata cgggtggcggc cgtggctacg ccagaaccg ggggaggacc	480
tggtcgcggg caggacacgg gcgcggaatg cacggcccgg ttggaggccg tggcgcgggc	540
agacccaacc cagctggccc tggcacgatg actccggcat cgggcatgga tggcacaacg	600
gggactggctc cggttgacagc tggaggtatt ggcacagctg gggatcaggc aggaatggca	660
gcggtgttgc tacagcaagc actctcagct ctccagggtg tgaatgccga caagggaggg	720
gggtgctgctc aaccttctgc tgctcaacaa cctgtgatgc cgttacctag tgatgggaag	780

ES 2 899 176 T3

```

aaggtacacc cgaaacctgc tgttgtggaa gagaagaaaa agtccgatca agagaaggag      840
ggttttgtgg atgcgcctaa gaacaacaag agctactgcc ataggtgcta cggcaaggga      900
catgtcatga gtgagtgttc gacggcgctg ttttgtgaag tatgtggcac tgatacgcac      960
ataaagcaca aatgcccggt gttcaacgct ccgaaggttt atgcggttcc ggccggcttt     1020
ggcatcaaca agggcgggctt cttccacatt ccctcgaaca agaagctggt gaagacgaag     1080
caagatgcta ggacagcaat gatacagggtg tcggagggac agatcagctt ggagaatggt     1140
aaccgtgagc tggaccgctt gcttcccggg tctgctcctt ggaaggtgga acaagtttcg     1200
gctagtctct acagaactac ctttccatca gcctcggaac tgcagcgtat ggtggagtgg     1260
gggcccggttc gtgctaaatc acagaaggca gtgtctggaat tcatagctag cactagcatg     1320
gctgaaggac gggccaaggc aaggctgacg gatgtgtggg tgcagtttga tggactgccg     1380
gctcagcttt gcacttacca acacatttgg ggagtggggt cgaaacttgg ggtcacggtt     1440
gaagtggaca tgcctttttt ccgcaagcat gggatctgta gaatgttggg ggctgtcatt     1500
gatccagagg caattccatt cgcagggtgat gtggaaatta acaagataat ttacgaggtg     1560
cactattggg tggaacaagg ccctctggat gatgaaccaa cacctatggt ctctgatctt     1620
ggcgggtgatg accagggtaa cggtgacaac agcaagcaaa ataatgccaa ggaagggaat     1680
gagcaattca aaatgccggg tgaggaaggg agagatggag aggagaagaa aggcagtaat     1740
gatgtcgggg agcataagca agtgatggat gctgctccgg tggatgatgg tcaagccttg     1800
caatgtgatg aggagaatag gctggctggt ttttga                                1836

```

<210> 18

<211> 611

<212> PRT

5 <213> Zea mays

<400> 18

```

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 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

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

```

ES 2 899 176 T3

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

Ile Lys His Lys Cys Pro Val Phe Asn Ala Pro Lys Val Tyr Ala Val

ES 2 899 176 T3

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

ES 2 899 176 T3

<210> 19

<211> 645

<212> ADN

<213> Zea mays

5 <400> 19

```

atgaagatgg gaaagagtag gaaagaacca agggggcggt caggaggtat acttatgggt      60
attgatctca atgtgaactc atcagagaag aataacgaca attttaatgc gagatggcct      120
tttctattca atgcgcctga attcaagttc gaacttggat ggctggtgcg ggagggattc      180
tgggagatgg tcactcaaat ttgggtcaaag gagtatgggt gagatactgc cattgagaga      240
tggcagcgaa aaataaggaa gttaagacaa tacttgagag aagtagacat gcgcagtttt      300
cttcgtaata ggctcgcggc catgttacga gaagaagagg ttaagtggta ccagagagca      360
aaaactaaag gtttgctgga aggggatgcg aactactaaat atttccatct ggtcgcgaat      420
ggacgcgaata tcatggaagg gatagtgatt agatgggtcat ttctaggcaa taacttccaa      480
actaagaagg ggctacggca aggccttaaa attaacttcc ataaaagtga aatcttctgc      540
tttggtgcgg ctaaagaaaag tgaacattta tactcccaac ttttcggatg tactctttcg      600
aggaacctac tggtgtcgtt tctggggact actccaaaag cgtga                        645

```

<210> 20

<211> 214

<212> PRT

10 <213> Zea mays

<400> 20

```

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

```

ES 2 899 176 T3

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

<210> 21

<211> 234

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<400> 21

atgcgagtca tatgcgttgt tgctagatac atgtctaadc ctgattatgg tggatgattta 60

gacaggagga gatctcttttc agaagctgag tatatggcaa ttgcagaagt tactaaggaa 120

gccttatggg tgaaagatca gatgattact gagaaatcca aacatattga tattcgttat 180

cacttcattc gtgatatcat tggagaacgt gtatttgcac agcagtttaa atga 234

<210> 22

<211> 77

10 <212> PRT

<213> Zea mays

<400> 22

ES 2 899 176 T3

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

<210> 23

<211> 693

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<400> 23

atggcgtgcc acctgagatc tgctagcatg ccttcgagcc ctgctccgt tgaggaaacag	60
attctgagcc tgaaagtagc catctctctg ccttcagtga ccatcgaaac catggtggat	120
agtctgagca agctcgggag catctacagc cacatagacg cgctcgcatc cctgcccagc	180
tgccagagga aggcaatgga ggaggagctc gagcgctccg ttgtcctgct tgacctctgc	240
agcgccatgc aagagagctt tgcagaactc aaggccagtg tccaggagac gcagttggct	300
ctcaaaagag gagacgacgc ggctcttcat gccaaagattc agtgctatgc gcgctcagct	360
aagaaggcac agaagctggt caagaaggtc aacaagaaga ctgcctccga catcaaagga	420
tgcaggggtga tcagcctggt cgctgaagcg aggggaagttg ccctatcgat cctcgagtcg	480
acactgcata tcctggcgaa gcagattgcg gtcccaagtc ccagcaagtg gtcacttgta	540
tccaaatcgt tccagaagaa gagaatcatg tgtgaggcgg agcagttgca agggttggag	600
ccggagattg ctggtcttga gagcggagtt gggactttgt tcaggacgtt gatccagagc	660
agagttttctc ttctcaatgc tcttagtttg tag	693

<210> 24

<211> 214

10 <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

Ile Leu Met Gly Ile Asp Leu Asn Val Asn Ser Ser Glu Lys Asn Asn

ES 2 899 176 T3

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

<210> 25

<211> 693

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<400> 25

atggcgtgcc acctgagatc tgctagcatg ccttcgagcc ctgcgtccgt tgaggaacag	60
attctgagcc tgaaagtagc catctctctg ccttcagtga ccatcgaaac catggtggat	120
agtctgagca agctcgggag catctacagc cacatagacg cgctcgcac cctgcccagc	180

ES 2 899 176 T3

tgccagagga aggcaatgga ggaggagctc gagcgctccg ttgtcctgct tgacctctgc 240
agcgccatgc aagagagctt tgcagaactc aaggccagtg tccaggagac gcagttggct 300
ctcaaaagag gagacgacgc ggctcttcat gccaaagattc agtgctatgc gcgctcagct 360
aagaaggcac agaagctgtt caagaaggtc aacaagaaga ctgcctccga catcaaagga 420
tgcaggggtga tcagcctggt cgctgaagcg aggggaagttg ccctatcgat cctcgagtcg 480
aactgcac tcctggcgaa gcagattgcg gtcccaagtc ccagcaagtg gtcacttgta 540
tccaaatcgt tccagaagaa gagaatcatg tgtgaggcgg agcagttgca agggttggag 600
ccggagattg ctggtcttga gagcggagtt gggactttgt tcaggacgtt gatccagagc 660
agagtttctc ttctcaatgc tcttagtttg tag 693

<210> 26

<211> 230

<212> PRT

5 <213> Zea mays

<400> 26

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

ES 2 899 176 T3

[illegible]

<210> 27

<211> 309

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<400> 27

atggcggcgg	gaaagctggg	gcagcagctg	atgacgaggc	tgcacctcgc	gaggacccca	60
tcgtcggcga	cggcggacgt	gccgcggggc	cacctggcgg	tgtacgtggg	cgaggggcgg	120
aagcggctgg	tcatcccgac	ggcgtgcctc	agccaccgcg	ccttcgtcac	gctgctgaag	180
cgggtggagg	acgagttcgg	cttcgaccac	cgctgcggcg	gcctcaccat	cccttgcgcc	240
tccgagaccg	agttcgctca	catcgtcggc	gccgcgcccg	cgcgcgggga	cgaccaccac	300
catcactga						309

<210> 28

<211> 102

10 <212> PRT

<213> Zea mays

<400> 28

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				

ES 2 899 176 T3

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

<210> 29

<211> 309

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<400> 29

atggcgggcg	gaaagctggg	gcagcagctg	atgacgaggg	tgcacctcgc	gaggaccgga	60
tcgtcggcga	cggcggacgt	gccgcggggc	cacctggcgg	tgtacgtggg	cgagggggcg	120
aagcggctgg	tcattcccac	ggcgtgcctc	agccaccggg	ccttcgtcac	gctgctcaag	180
cgggtggagg	acgagttcgg	cttcgaccac	cgctgcggcg	gcctcaccat	cccctgcgcc	240
tccgagaccg	agttcgctca	catcgtcggc	gccgccggcg	ccgccgggga	cgaccaccac	300
catcactga						309

<210> 30

<211> 102

10 <212> PRT

<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

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> 31

<211> 512

ES 2 899 176 T3

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 31

```
atggcggcgg gaaagctggg gcagcagctg atgacgaggg tgcacctcgc gaggaccgga      60
ccgtcggcga cggcggacgt gccgcggggc cacctggcgg tgtacgtggg cgaggggcgg      120
aagcggctgg tcatcccaac ggcgtgcctc agccacccag ccttcgtcac gctgctgaag      180
cggggtggagg acgagttcgg cttcgaccac cgctgcggcg gcctcaccat cccctgcgcc      240
tccgagaccg agttcgctca catcgtgggc gccgcggcgg ccggggacgg ccaccacat      300
cactgacgat cgcgtgcgtg cccgcgccga tcgatcgagt tagagtcggg ccgtgtcgat      360
agattaattc cgcttcaggt tccacctagc taggacaaaa ttattgttct cttttggggt      420
ggtgtcgatc gtagcagcaa tagtgttggg ttttgcttga cgacactgta aagattgtga      480
ttgggaattg gaagaataag ctcttctctc ac      512
```

5 <210> 32

<211> 101

<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
10          100
```

<210> 33

<211> 1501

<212> ADN

<213> Zea mays

15 <400> 33

ES 2 899 176 T3

```

cctatgcaaa cctagattaa atttatagtg ggattttaacc caaataatgc atgccccgct      60
aatgggtgat ggatttcccc tcataagttt ttaccatatg gtcatttcct gccatcctaa      120
caacttctaa ttcatgaatt ggattgggtg acataacccc ataaaattgt gggttgggta      180
aagcagttaa tttgacatgg ggttgaggta gatatgggat ggaatTTTTTg ttttaagagc      240
aatggcatca gctctactat ttattaatTTT aaaagggaaa acaaatagtt cataaaaattg      300
tgtagagtag aagctagcta gctagcattg gtcagaataa gcaggacaca cctgggtgag      360
agaagagagc ttattcttcc aatccccaat cacaatcttt acagtgtcgt caagcaaaaa      420
cccaatcact attgctgcta cgacaccacc ccaaagagaa caataatTTTt gtcctagcta      480
gggtggaactg gaagcggaat taatctatcg acacggccgg actcgatcga tcggcgcggg      540
cacgcacgcg atcgtcagtg atggtgggtg tcgtccccgg cgggcgcggc ggcgccgacg      600
atgtgagcga actcgggtctc ggaggcgagc gggatgggtga ggccgcccga gcggtggtcg      660
aagccgaact cgtcctccac ccgcttgagc agcgtgacga aggccgggtg gctgaggcac      720
gccgtcgga tgaccagccg cttccgcccc tcgcccacgt acaccgccag gtggccccgc      780
ggcacgtccg ccgtcgccga cgatcgggtc ctcgcgaggt gcagcctcgt catcagctgc      840
tgccccagct ttcccgccgc catctctagc tctagctgtg tgtgtcgggtg attgttgcac      900
aaagtctgtg gtatagctct agcttgctat agctagagtg gtgctgctag atttgagct      960
caagagcttt gtgtggcgac ctgtgctgtg aggaccaagg ttgcactggg ccggtctttt      1020
atagcgctc acaccagcta gctcagctc aggcagcatg catggagatg gagccaatct      1080
tgccatggca cccaacaacg cgcgctacc ggataaatta gaaagaatca tggaagcaca      1140
gtacggagta gtagtgtagt gtggcacgca ccacttgagc tttcttggtg gtgatatgat      1200
gatgatcata aagctgggca tatgcatgtc aatcacatgc tgcagtcagc agcactggca      1260
ctaatagagta gtgatgtctc taaaaagtac acccaccatt cacaataact 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

```

<210> 34

<211> 1501

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<400> 34

ES 2 899 176 T3

ccctatgcaa acctagatta aatttatagt gggattttaac 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 taaaaggga aacaaatagt tcataaaatt 300
 gtgtagagta gaagctagct agctagcatt ggtcagaata agcaggacac acctgggtga 360
 gagaagagag cttatttctc caatcccaa tcacaatctt tacagtgtcg tcaagcaaaa 420
 acccaatcac tattgctgct acgacaccac ccaaagaga acaataattt tgtcctagct 480
 aggtggaact ggaagcggaa ttaatctatc gacacggccg gactcgatcg atcggcgcg 540
 gcacgcacgc gatcgtcagt gatgggtgtg gtcgtccccg gcggcggcgg cggcgccgac 600
 gatgtgagcg aactcgggtc cggaggcgca ggggatgggt aggccgccgc agcgggtggtc 660
 gaagccgaac tcgtcctcca cccgcttcag cagcgtgacg aaggccgggt ggctgaggca 720
 cgccgtcggg atgaccagcc gcttcgccc ctcgcccacg tacaccgcca ggtggccccg 780
 cggcacgtcc gccgtcgccg acgatcgggt cctcgcgagg tgcagcctcg tcatcagctg 840
 ctgccccagc tttcccgccg ccatctctag ctctagctgt gtgtgtcggg gattgttgca 900
 caaagtcgtg tgtatagctc tagcttgcta tagctagagt ggtgctgcta gatttgagc 960
 tcaagagctt tgtgtggcga cctgtgctgt gaggaccaag gttgactgg gccggtcttt 1020
 tatagcgctt cacaccagct agctcagtct caggcagcat gcatggagat ggagccaatc 1080
 ttgccatggc acccaacaac gcgcgcctac cggataaatt agaaataatc atggaagcac 1140
 agtacggagt agtagtgtaa tggcacgcac cacttgcaagt ttcttggttg tgatatgatg 1200
 atgatcataa agctgggcat atgcatgtca atcacatgct gcatgcagca gactggcac 1260
 taatgagtag tgatgtctct aaaaagtaca cccaccattc acaataacta acaccattga 1320
 tttaaaaaaa actttaaaaca ctcgctctat ataaaatata aaatataaaa ttttaagtta 1380
 taacttattt ttctaataag acgagtgata aaaaatttaa aaagaacggg gtcatatatt 1440
 tatgaacgga tgaagtatag gacaacattg atttttttta aaaaaaaat taatcactca 1500
 t 1501

<210> 35

<211> 507

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<400> 35

ES 2 899 176 T3

```

atgCGagTca tatGcgTtGt tgctagatac atgtctaata ctggtaaaga gcattggaaa      60
gctgttcagt ggattttcag atatctacgt ggttcttcta gtgcttggtt atgttttggt      120
aaatctggag atggtctgat tggctatggt gattcagatt atggtggtga tttagacagg      180
aggagatctc tttcagggtta tgtctttact attggagatt gtgctgtgag ttggaaagct      240
cgtttacagg atactgttgC tttgtctacc acagaagctg aatatatggc aattgcagaa      300
gttactaagg aagccttatg gttgaaaggt atatattcag agctatgtgg aattaagtct      360
tgcattacca tctattgtga tagccagagt gccattcatc tcaccaaaga tcagatgatt      420
actgagaaat ccaaacaat tGatattcgt tatcacttca ttCGtgatat cattggagaa      480
cgtgtatttg cacagcagtt taaatga                                          507

```

<210> 36

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<400> 36

agctatacac acgactttgt gcaacaatca 30

<210> 37

<211> 30

10 <212> ADN

<213> Zea mays

<400> 37

cgacacacac agctagagct agagatggcg 30

<210> 38

15 <211> 509

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> SAUR31 mutante

20 <220>

<221> 5'UTR

<222> (310)..(435)

<220>

<221> mutación

25 <222> (334)..(334)

<400> 38

ES 2 899 176 T3

tcagtgatgg tggtaggtcgt ccccggcggc gccggcggcg ccgacgatgt gagcgaactc	60
ggtctcggag gcgcagggga tggtagggcc gccgcagcgg tggtcgaagc cgaactcgtc	120
ctccacccgc ttgagcagcg tgacgaaggc cgggtggctg aggcacgccg tcgggatgac	180
cagccgcttc cggccctcgc ccacgtacac cggcaggtgg ccccgcgga cgtccgccgt	240
cggcgacgat cgggtcctcg cgaggtgcag cctcgtcatc agctgctgcc ccagctttcc	300
cggcgccatc tctagctcta gctgtgtgtg tcgatgattg ttgcacaaag tcgtgtgtat	360
agctctagct tgctatagct agagtgtgc tgctagattt ggagctcaag agctttgtgt	420
ggcgacctgt gctgtgagga ccaaggtgc actgggccgg tcttttatag cgcctcacac	480
cagctagctc agtctcaggc agcatgcat	509

REIVINDICACIONES

1. Un casete de expresión que comprende un ácido nucleico que tiene 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,
 - 5 b) una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 90% idéntica a una secuencia de a),
 - c) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO 30, caracterizada porque, la secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a un promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 33.
2. Vector que comprende el casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 3. Célula de planta transgénica de la especie *Zea mays*, que comprende el casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 1 o el vector de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el ácido nucleico definido en la reivindicación 1 está presente como transgén.
4. Planta transgénica de la especie *Zea mays* o una parte de la misma, que comprende la célula de planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 3.
- 15 5. Procedimiento para producir una planta transgénica tolerante al frío de la especie *Zea mays*, que comprende las siguientes etapas:
 - A) provisión de
 - i) el casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, o
 - ii) el vector de acuerdo con la reivindicación 2,
 - 20 B) transformar al menos una célula de planta de la especie *Zea mays* introduciendo el casete de expresión o el vector de A),
 - C) regenerar plantas transgénicas de la especie *Zea mays* a partir de la al menos una célula de planta transformada de B), y
 - D) identificar una planta transgénica tolerante al frío de la especie *Zea mays* de C).
- 25 6. Procedimiento para identificar una planta de maíz tolerante al frío, que comprende un intervalo cromosómico de un donante en el cromosoma 4 entre las posiciones de los marcadores ma59778s31 y ma59778119, que tiene un ácido nucleico mediador de tolerancia al frío, preferiblemente un ácido nucleico endógeno mediador de tolerancia al frío, en el que el donante en la posición del marcador ma59778s31 tiene una "T", una "T" en la posición del marcador ma59778s32 y una "C" en la posición del marcador ma59778119 y el ácido nucleico que media la tolerancia al frío
- 30 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 un 98% idéntica a la secuencia de a),
 - c) una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con a) de acuerdo con el código genético generado, y
 - 35 d) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 30, que comprende las etapas
 - A) aislamiento de ADN del genoma de una planta de maíz, y
 - B) detección de un alelo de un marcador diagnóstico para el ácido nucleico mediador de tolerancia al frío en un intervalo cromosómico flanqueado por las posiciones de los marcadores ma59778s31 y ma59778119 en el cromosoma
 - 40 4, estando el alelo en el ácido nucleico mediador de tolerancia al frío o estrechamente acoplado al locus del ácido nucleico mediador de la tolerancia al frío,
- en el que el locus acoplado contribuye a la expresión del rasgo fenotípico de la altura de una planta aumentada en al menos un 10% en comparación con una planta de control de un genotipo comparable que no contiene el ácido nucleico que media la tolerancia al frío en su genoma, bajo condiciones de estrés por frío y en el momento del inicio del
- 45 crecimiento de estiramiento en el área del brote,
- en el que las posiciones del marcador con referencia a la línea de maíz B73 AGPv2 son las siguientes: ma59778s31 = 37263172 bp, ma59778s32 = 37296672 bp y ma59778119 = 37297901 bp.

Figura 1

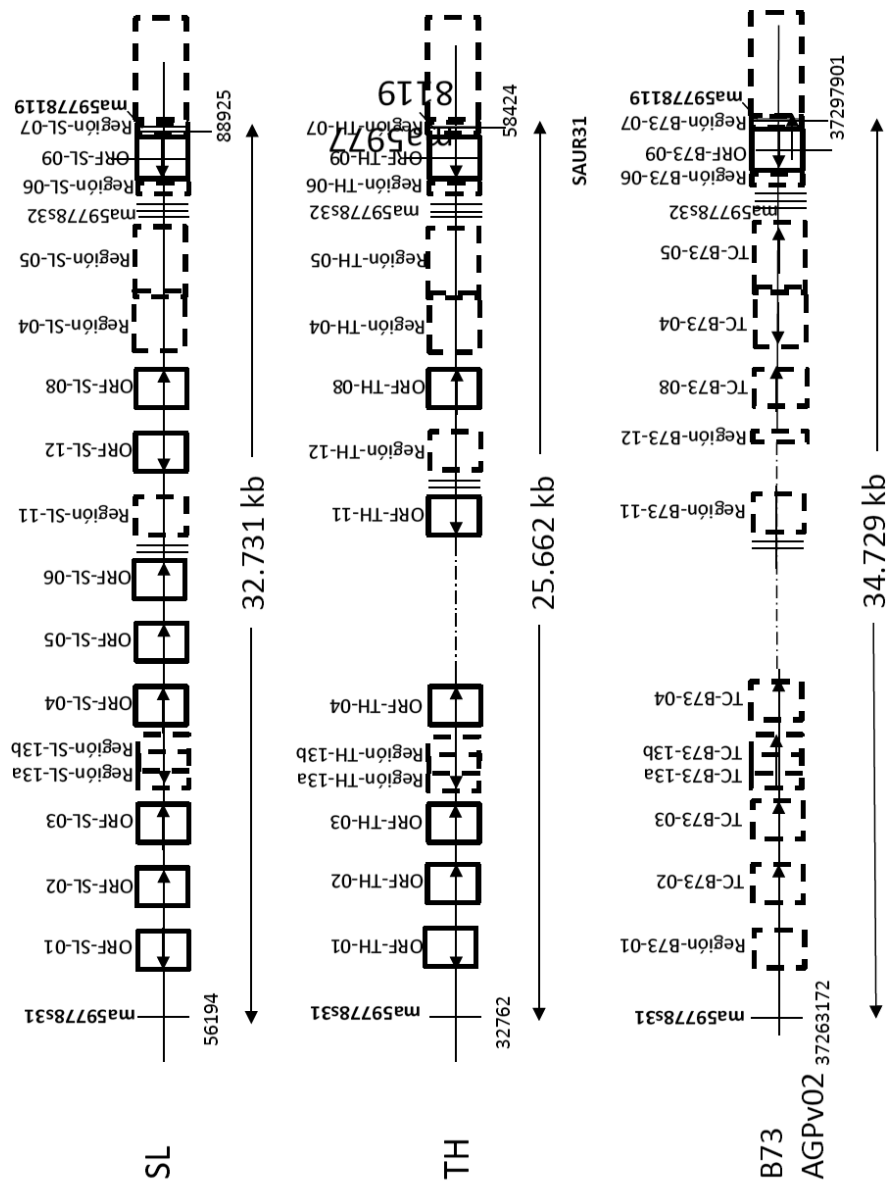


Figura 2:

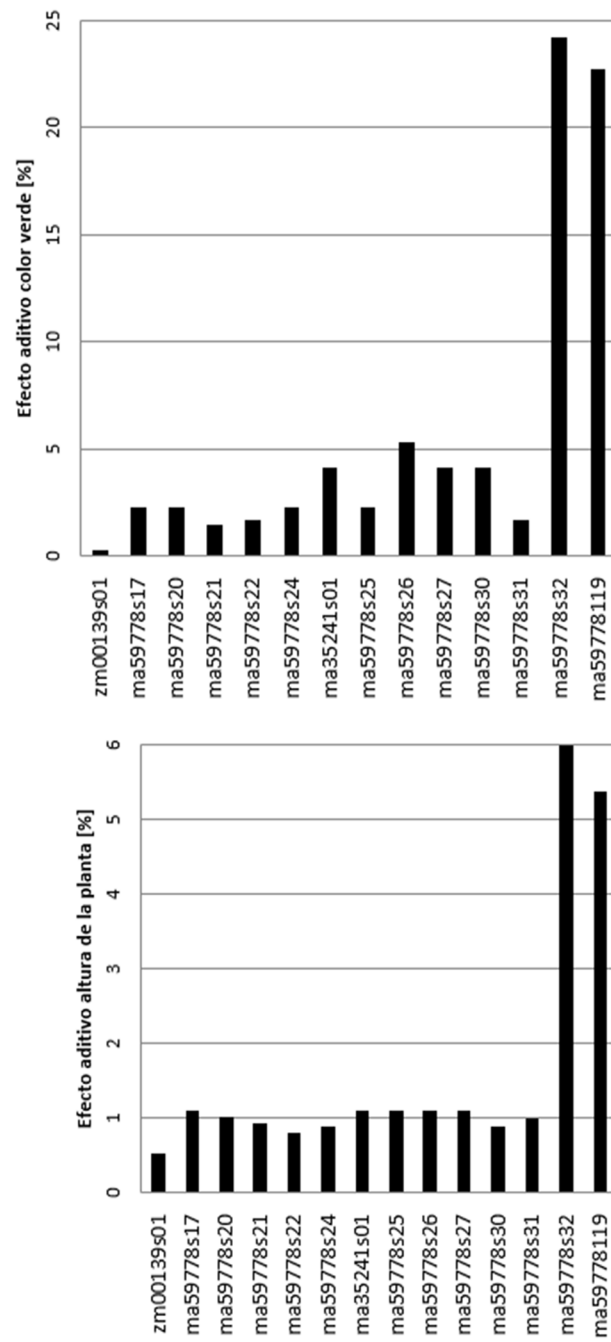
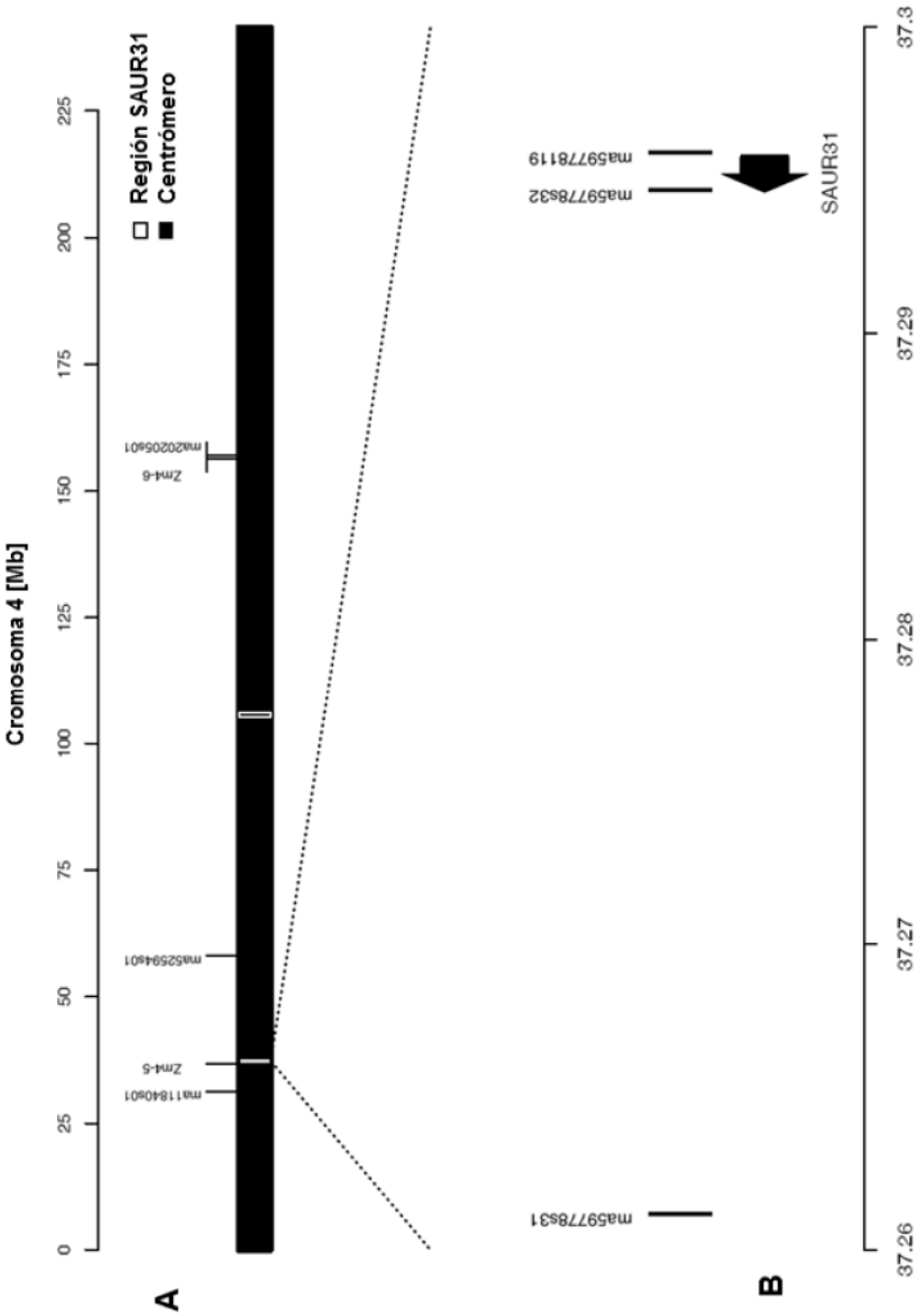


Figura 3:



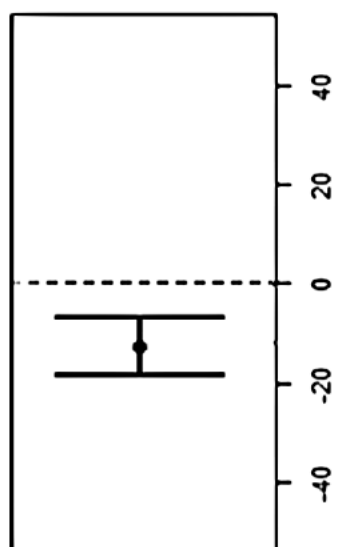
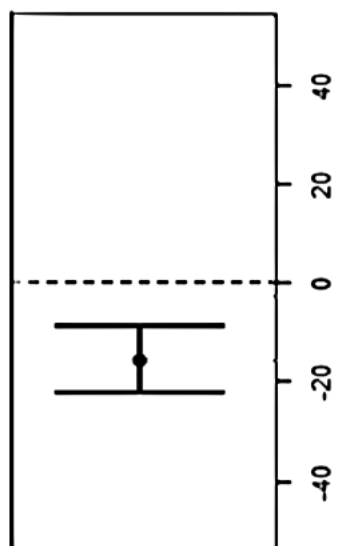


Figura 4:

Figura 5:

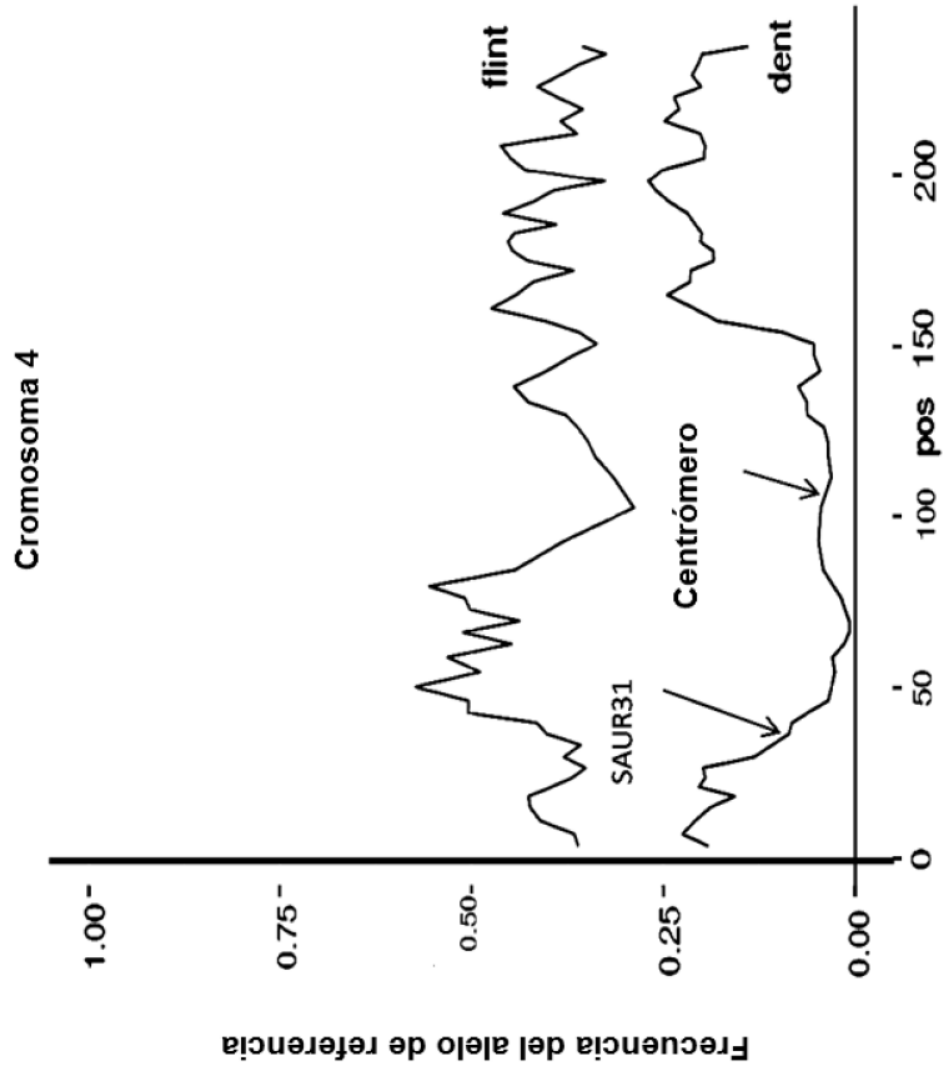


Figura 6:

