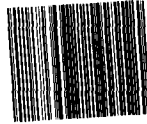


PETITORIO


Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA



02 077192 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Ubicación: 82077192 00000000 Folios: 189
 Fecha (AMD): 2002-08-30 15:27:55
 Tipo: 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I☒ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **RESEARCH & DEVELOPMENT INSTITUTE, INC.**Dirección: **1711 West College, Bozeman, Montana 59715 - USA**Nacionalidad o Domicilio: **Montana - US**

Lugar de Constitución:

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO (74)Nombre: **MARGARITA CASTELLANOS A.**Dirección: **CARRERA 9 No. 93-09**Teléfono: **610 74 80** Fax: **610 07 06**E-mail: **acastell@impsat.net.co**

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐Número **39'779.654** TPA **70.819**

④

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: **Michael GIROUX**Dirección: **1104 Mountain Ash Avenue Bozeman, Montana 59718 - USA**Nacionalidad o Domicilio **Estadounidense**

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/US 01/06.622

Fecha

01.03.2001

Publicación Internacional No.

WO 01/64928 A2

Fecha

07.09.2001

⑥

Título (54)

PLANTAS TRANSGENICAS QUE PRESENTAN UN MAYOR RENDIMIENTO EN SEMILLAS, UNA MAYOR BIOMASA Y UN MAYOR INDICE DE COSECHA.

⑦

Clasificación Internacional (51)

C 12 N 15/82

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

01.03.2000

(31) Número de Solicitud

09/516.250

10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA:

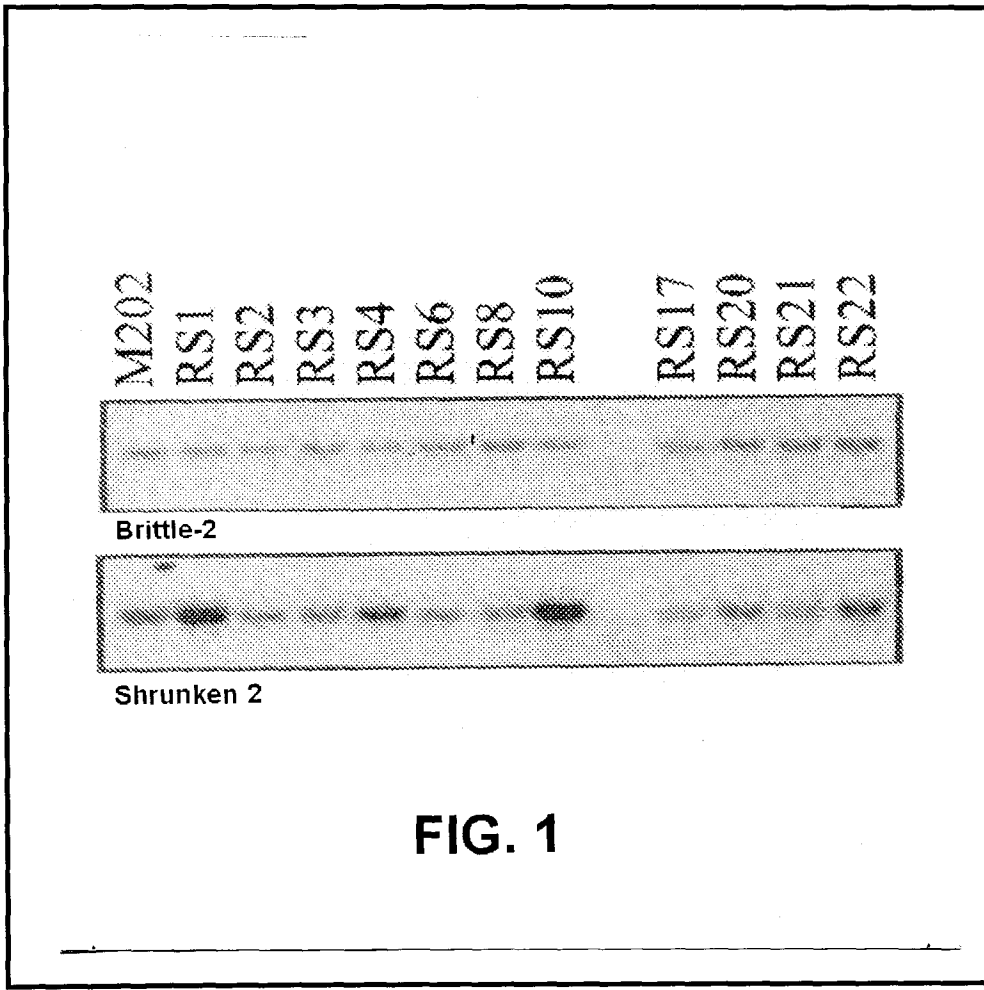


FIG. 1

12

Solicito la concesión de la patente,



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 02077192 00000000

Folios: 189

Fecha (AMD): 2002-08-30 15:27:55

Tramite : 011 PCT-PATENT 370 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 57,426
FECHA : AGOSTO 29 DE 2002

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
MONICA VALENCIA ABONDANO	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	4884922	29/08/2002	1,599,400.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	378,000.00
		TOTAL :	\$ 378,000.00

SON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONDE: 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference

(if desired) (12 characters maximum) RDI-100C2

Box No. I TITLE OF INVENTION

Transgenic Plants with Increased Seed Yield, Biomass and Harvest Index

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

RESEARCH & DEVELOPMENT INSTITUTE, INC.
1711 West College
Bozeman, Montana 59715
US

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☒ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

GIROUX, MICHAEL
1104 Mountain Ash Avenue
Bozeman, Montana 59718
US

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below)

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

PACE, DORAN R.
Saliwanchik, Lloyd & Saliwanchik
A Professional Association
2421 N.W. 41st Street, Suite A-1
Gainesville, FL 32606-6669
US

Telephone No.

(352) 375-8100

Facsimile No.

(352) 372-5800

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

See Notes to the request form

Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|--|--|
| ☒ AE United Arab Emirates | ☒ LC Saint Lucia |
| ☒ AG Antigua and Barbuda | ☒ LK Sri Lanka |
| ☒ AL Albania | ☒ LR Liberia |
| ☒ AM Armenia | ☒ LS Lesotho |
| ☒ AT Austria | ☒ LT Lithuania |
| ☒ AU Australia | ☒ LU Luxembourg |
| ☒ AZ Azerbaijan | ☒ LV Latvia |
| ☒ BA Bosnia and Herzegovina | ☒ MA Morocco |
| ☒ BB Barbados | ☒ MD Republic of Moldova |
| ☒ BG Bulgaria | ☒ MG Madagascar |
| ☒ BR Brazil | ☒ MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| ☒ BY Belarus | ☒ MN Mongolia |
| ☒ BZ Belize | ☒ MW Malawi |
| ☒ CA Canada | ☒ MX Mexico |
| ☒ CH and LI Switzerland and Liechtenstein | ☒ MZ Mozambique |
| ☒ CN China | ☒ NO Norway |
| ☒ CR Costa Rica | ☒ NZ New Zealand |
| ☒ CU Cuba | ☒ PL Poland |
| ☒ CZ Czech Republic | ☒ PT Portugal |
| ☒ DE Germany | ☒ RO Romania |
| ☒ DK Denmark | ☒ RU Russian Federation |
| ☒ DM Dominica | ☒ SD Sudan |
| ☒ DZ Algeria | ☒ SE Sweden |
| ☒ EE Estonia | ☒ SG Singapore |
| ☒ ES Spain | ☒ SI Slovenia |
| ☒ FI Finland | ☒ SK Slovakia |
| ☒ GB United Kingdom | ☒ SL Sierra Leone |
| ☒ GD Grenada | ☒ TJ Tajikistan |
| ☒ GE Georgia | ☒ TM Turkmenistan |
| ☒ GH Ghana | ☒ TR Turkey |
| ☒ GM Gambia | ☒ TT Trinidad and Tobago |
| ☒ HR Croatia | ☒ TZ United Republic of Tanzania |
| ☒ HU Hungary | ☒ UA Ukraine |
| ☒ ID Indonesia | ☒ UG Uganda |
| ☒ IL Israel | ☒ US United States of America |
| ☒ IN India | ☒ UZ Uzbekistan |
| ☒ IS Iceland | ☒ VN Viet Nam |
| ☒ JP Japan | ☒ YU Yugoslavia |
| ☒ KE Kenya | ☒ ZA South Africa |
| ☒ KG Kyrgyzstan | ☒ ZW Zimbabwe |
| ☒ KP Democratic People's Republic of Korea | |
| ☒ KR Republic of Korea | |
| ☒ KZ Kazakhstan | |

Check-box reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

☒ **CO Republic of Colombia**

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit)

Supplemental Box *If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

1. If, in any of the Boxes, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No. ..." [indicate the number of the Box] and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:

- (i) if more than two persons are involved as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.
- (ii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;
- (iii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;
- (iv) if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;
- (v) if, in Box No. V, the name of any State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. V, the name of the United States of America is accompanied by an indication "continuation" or "continuation-in-part": in such case, write "Continuation of Box No. V" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;
- (vi) if, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI;
- (vii) if, in Box No. VI, the earlier application is an ARIPO application: in such case, write "Continuation of Box No. VI", specify the number of the item corresponding to that earlier application and indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed.

2. If, with regard to the precautionary designation statement contained in Box No. V, the applicant wishes to exclude any State(s) from the scope of that statement: in such case, write "Designation(s) excluded from precautionary designation statement" and indicate the name or two-letter code of each State so excluded.

3. If the applicant claims, in respect of any designated Office, the benefits of provisions of the national law concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty: in such case, write "Statement concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty" and furnish that statement below

Continuation of Box IV.

SALIWANCHIK, DAVID R.
 LLOYD, JEFF
 MCLEOD, CHRISTINE Q.
 SANDERS, JAY M.
 PARKER, JAMES S.
 EISENSCHENK, FRANK C.
 BLUM, SETH M.
 LADWIG, GLENN P.
 KYLE, JEAN

The above attorneys are members of the firm of Saliwanchik, Lloyd & Saliwanchik and have the same address as DORAN R. PACE, which can be found in Box IV.

Box No. VI PRIORITY CLAIM		☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) (01/03/2000) 01 March 2000	09/516,250	US		
item (2)				
item (3)				

☒ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office)* identified above as item(s): (1)

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(iii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY			
Choice of International Searching Authority (ISA) <i>(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used)</i>		Request to use results of earlier search: reference to that search <i>(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority)</i> :	
		Date (day/month/year)	Number Country (or regional Office)
ISA / EP			

Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING	
This international application contains the following number of sheets: request : 4 description (excluding sequence listing part) : 52 claims : 5 abstract : 1 drawings : 1 sequence listing part of description : 10 Total number of sheets : 73	This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. ☒ fee calculation sheet 2. ☐ separate signed power of attorney 3. ☐ copy of general power of attorney: reference number, if any: 4. ☐ statement explaining lack of signature 5. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s); 6. ☐ translation of international application into (language): 7. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. ☐ nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. ☒ other (specify): Transmittal Letter to the US/RO
Figure of the drawings which should accompany the abstract: 1	Language of filing of the international application: English

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT	
Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).	
 Doran R. Pace	

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application.	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.

For International Bureau use only
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

DESCRIPTIONTRANSGENIC PLANTS WITH INCREASED SEED YIELD,BIOMASS AND HARVEST INDEX

5

Field of the Invention

This invention relates to improving plant production, both plant seed production and plant biomass production. More specifically, this invention relates to transgenic plants which have increased seed production and increased biomass production when compared to non-transgenic plants of the same genetic background. Even more specifically, this invention relates to plants which are transgenic for *Sh2-Rev6-HS* and to methods for producing such plants.

10

Background of the Invention

15

ADP glucose pyrophosphorylase (AGP) is one of the primary enzymes involved in the biosynthesis of starch and glycogen in organisms such as plants, algae, fungi and bacteria, particularly plants. AGP catalyzes the following reaction:



20

ADP-glucose, the product of the above reaction, is the major donor of glucose in the biosynthesis of starch in plants and in the biosynthesis of glycogen by bacteria.

25

AGP is widely distributed throughout the plant kingdom. It is present in monocots such as wheat, rice, barley, and maize, as well as dicots such as spinach, potato, and pea. It is also found in some starch producing bacteria, such as *E. coli*. Plant AGP exists as a tetramer (210 to 240 kDa) composed of two small sub-units (50 to 55 kDa) and two large sub-units (51 to 60 kDa) in contrast to bacterial AGP which appears to consist of four units of equal size. AGP has also been shown to be produced in cyanobacteria and in algae, where its tetrameric structure is similar to that in plants, *i.e.* two large and two small sub-units, rather than the homotetrameric structure found in ordinary bacteria.

30

Because of the commercial importance of starch, primarily as a foodstuff but also as an important industrial chemical, much work has been done to isolate and characterize the nucleic acid encoding AGP. Plant AGP consists of two different protein subunits. In maize endosperm, AGP is encoded by the Shrunk-2 (*Sh2*) and Brittle-2 (*Bt2*) genes (Bhave *et al.*, 1990 and Bae *et al.*, 1990). *Sh2* encodes the large subunit having a predicted molecular weight of 57,179 Da, while *Bt2* encodes the small subunit having a molecular weight of 52,224 Da. The isolation of nucleic acids encoding AGPs from various other plants has also been reported: the small subunit cDNA (Anderson *et al.*, 1989) and the genomic DNA (Anderson *et al.*, 1991) from rice; the small and large subunit cDNAs from spinach leaf (Morell *et al.*, 1988); and the small and large subunit cDNAs from potato tuber (Muller-Rober *et al.*, 1990; and Nakata *et al.*, 1991).

Moreover, work has been done to alter AGP expression in plants in order to regulate starch synthesis. EP 455,316 provides a plasmid that comprises a DNA encoding AGP placed in an inverted orientation, which results in the transcription of the anti-sense mRNA in a host plant. The patent shows that transgenic potatoes comprising the plasmid has reduced AGP activity and reduced starch concentration compared to non-transformed plants. U.S. Patent No. 5,773,693 discloses a method of increasing sucrose content of pea plant by suppressing or reducing the expression of either or both subunits of AGP. The method comprises transforming a pea plant with a plasmid comprising nucleic acid encoding the *Sh2* subunit or the *Bt2* or both subunits in antisense orientation to the promoter and the terminator.

In contrast, U.S. Patent No. 5,977,437 teaches a method of increasing the rate and/or yield of starch production in a plant comprising introducing into a plant, a nucleic acid encoding barley endosperm AGP operably linked to a plastid transit peptide. EP 634,491 discloses a method of decreasing oil content in seed by increasing the amount of starch comprising transforming a plant cell with a nucleic acid comprising a promoter, and a DNA encoding a fusion protein comprising an amino terminal plastid transit peptide, an AGP enzyme, and a 3' non-translated transcription termination sequence, obtaining transformed plant cells, and regenerating transformed plants from the transformed plant cells. Finally, U.S. Patent No. 5,792,290 discloses the nucleic acid encoding wheat AGP and teaches inserting extra copies of the AGP gene into a plant genome by transformation

to enhance starch production and inserting the complement of the mRNA encoding the endogenous AGP to reduce starch production.

The maize endosperm is the site of most starch deposition during kernel development. *Sh2* and *Bt2* maize endosperm mutants have greatly reduced starch levels corresponding to deficient levels of AGP activity. Mutations of either gene have been shown to reduce AGP activity by about 95% (Tsai *et al.*, 1966; Dickinson *et al.*, 1969). Lack of AGP and a decrease in starch levels compared to that of the wild-type endosperm result in shrunken, brittle, and/or collapsed kernels at seed maturity. Furthermore, it has been observed that enzymatic activities increase with the dosage of functional wild-type *Sh2* and *Bt2* alleles, whereas mutant enzymes have altered kinetic properties.

AGP is the rate limiting step in starch biosynthesis in plants. Stark *et al.* placed a mutant form of *E. coli* AGP in potato tuber and obtained a 35% increase in starch content (Stark *et al.*, 1992). AGP is an allosteric enzyme, *i.e.* its activity is regulated through the binding of an effector to an allosteric site. In plants, the positive effector of AGP is 3-phosphoglycerate (3-PGA), and the negative effector is phosphate (Dickinson *et al.*, 1969). Inhibition of AGP by phosphate is likely the largest limitation on starch biosynthesis in plants (Giroux *et al.*, 1996).

Giroux *et al.* (1996; U.S. Patent Nos. 5,872,216 and 5,589,618, each of which is hereby incorporated by reference in their entireties) used *in vivo*, site-specific mutagenesis to create short insertion mutations in a region of the gene known to be involved in the allosteric regulation of AGP. Single mutations of the *Sh2* gene containing an insertion of an additional tyrosine or serine residue reduced total AGP activity and the amount of SH2 protein. A specific revertant containing an additional tyrosine residue and an additional serine residues increased seed weight 11-18%. This later revertant were named "*Sh2-m1Rev6*" (this gene is designated as "*Sh2-Rev6*" herein). Giroux *et al.* (1996) also found that the increase in seed weight of the *Sh2-m1Rev6* was not solely attributable to an increase in starch content, although there was an increase in the absolute starch content in the variant expressing *Sh2-m1Rev6*. Giroux *et al.* (1996) suggested that the enhanced starch synthesis caused by *Rev6* creates a stronger sink within the seed leading to increased synthesis of other seed components. Mutations in AGP conferring

increased heat stability to a plant expressing the mutant AGP are disclosed in U.S. Patent No. 6,069,300 and published PCT application WO 99/58698.

Modulation of the sink strength of a plant is one of the methods to increase harvest yield. The leaves and other green tissue active in photosynthesis are commonly referred to as the "source", and those parts in which storage occurs are referred to as the "sink". In cereals such as maize, rice, and wheat, the primary sink is the endosperm, and individual seed weight is the primary determinant of the yield of corn (Duvick *et al.*, 1992). As evidenced by Giroux *et al.* (1996), rendering the maize endosperm AGP insensitive to phosphate inhibition, increases individual seed weight without dramatically affecting starch content (U.S. Patent Nos. 5,650,557 and 5,872,216).

Over the years, the desire for high biological yield has aroused an interest in manipulating plant structure in order to obtain plants where the economically useful part forms are as large a proportion of the plant as is consistent with acceptable plant vigor and health. Attempts to increase yield by altering the relative contribution of the different components of grain or kernel yield, such as ears or heads per plant, grains per head or kernels per ear, grain size or kernel size, *etc.*, have proven unsuccessful because increases in one component tend to be accompanied by reductions in another (Wilson, D. (1981) Plant Breeding II. K. Frey Edited, Iowa, Iowa State University Press, page 255). However, yield increases due to an increase in the proportion of grain relative to vegetative parts have been common in the cereal crops (Wilson, D. (1981) Plant Breeding II. K. Frey Edited, Iowa, Iowa State University Press, page 255).

Langer and Hill (Langer, R. H. M. and Hill, G. D. (1991) Agricultural Plants. Second Edition. Cambridge, Cambridge University Press, page 341) state that higher yields can be achieved by improving the Harvest Index (HI), since HI links biological yield (Y_{biol}) and economic yield (Y_{econ}) in the following manner :

$$Y_{biol} \times HI = Y_{econ}$$

It is pointed out that treatments affecting HI will also affect Y_{biol} but not necessarily to the same extent or in the same direction. For instance, in cereals it is possible to increase biological yields by applying nitrogen at high population densities in the presence of adequate water. The expected result is heavy vegetative growth, but reduced light transmission into the canopy, poor grain set and development will lead to a low Harvest

Index. In contrast, short-strawed cereals are characterized by greater Harvest Index. Short, erect cultivars of rice yielding 4-5 t ha⁻¹ have been shown to have a Harvest Index of about 0.53 to 0.56, compared with 0.39 to 0.42 for tall, leafy cultivars with a grain yield of about 2.4 t ha⁻¹ (Langer, R. H. M. and Hill, G. D. (1991) Agricultural Plants, Second Edition, Cambridge, Cambridge University Press, page 341). Likewise, in wheat, the dwarf and semidwarf cultivars emanating from the Mexican plant breeding program have a higher Harvest Index. However, short plants may also produce little grain. Thus, it is necessary to assess both the biological yield and Harvest Index in plant breeding programs.

The present invention provides a method of increasing the seed production and the biomass production of plants. More specifically, this invention provides transgenic plants which have increased total seed number, increased individual seed weight, increased total seed weight per plant, as well as increased above-ground plant biomass and an improved Harvest Index when compared to non-transgenic plants of the same genetic background. The production of plants with increases in all of these parameters as the result of a transgene is quite unexpected in view of normal source/sink relationships in plants.

Brief Summary of the Invention

This invention provides methods of producing plants which have improved plant production, both plant seed production and plant biomass production. This invention also provides the plants produced by the disclosed methods, wherein the plants are monocotyledonous plants and dicotyledonous plants.

More specifically, this invention provides methods for increasing the number of seeds produced by plants, increasing the biomass produced by plants, or increasing the Harvest Index of plants by introducing into such plants a nucleic acid operably linked to a promoter, wherein the nucleic acid is that of *SH2-REV6-HS* (SEQ ID NO: 3), a nucleic acid which hybridizes with *SH2-REV6-HS* under high stringency conditions and encodes a polypeptide that retains biological activity of the protein *SH2-REV6-HS* (SEQ ID NO: 4), a fragment of *SH2-REV6-HS* encoding a peptide that retains biological activity of *SH2-REV6-HS*, a nucleic acid encoding a polypeptide comprising SEQ ID NO:4, or a

fragment thereof that retains biological activity of SH2-REV6-HS, or a nucleic acid encoding an SH2HS or an SH2RTS polypeptide. Preferably, the SH2HS polypeptide is the SH2HS33 polypeptide. The methods further include growing the plants produced by such methods. The present invention also includes the plants produced by such methods.

5 The methods of the present invention are applicable to monocotyledonous plants, such as rice, wheat, barley, oats, sorghum, and millet, and dicotyledonous plants, such as peas, alfalfa, birdsfoot trefoil, chickpea, chicory, clover, kale, lentil, prairie grass, small burnet, soybean, and lettuce.

10 This invention also provides methods of increasing the flag leaf weight of monocotyledonous plants by introducing into such plants a nucleic acid operably linked to a promoter, wherein the nucleic acid is that of *SH2-REV6-HS* (SEQ ID NO: 3), a nucleic acid which hybridizes with *SH2-REV6-HS* under high stringency conditions and encodes a polypeptide that retains biological activity of the protein SH2-REV6-HS (SEQ ID NO: 4), a fragment of *SH2-REV6-HS* encoding a peptide that retains biological
15 activity of SH2-REV6-HS, a nucleic acid encoding a polypeptide comprising SEQ ID NO:4, or a fragment thereof that retains biological activity of SH2-REV6-HS, or a nucleic acid encoding an SH2HS or an SH2RTS polypeptide. Preferably, the SH2HS polypeptide is the SH2HS33 polypeptide. The methods further include growing the plants produced by such methods. The present invention also includes the plants
20 produced by such methods.

 The invention also provides methods of increasing the number of seed heads produced by monocotyledonous plants by introducing into such plants a nucleic acid operably linked to a promoter, wherein the nucleic acid is that of *SH2-REV6-HS* (SEQ ID NO: 3), a nucleic acid which hybridizes with *SH2-REV6-HS* under high stringency
25 conditions and encodes a polypeptide that retains biological activity of the protein SH2-REV6-HS (SEQ ID NO: 4), a fragment of *SH2-REV6-HS* encoding a peptide that retains biological activity of SH2-REV6-HS, a nucleic acid encoding a polypeptide comprising SEQ ID NO:4, or a fragment thereof that retains biological activity of SH2-REV6-HS, or a nucleic acid encoding an SH2HS or an SH2RTS polypeptide. Preferably, the SH2HS
30 polypeptide is the SH2HS33 polypeptide. The methods further include growing the

plants produced by such methods. The present invention also includes the plants produced by such methods.

The invention also provides methods of increasing two or more traits of dicotyledonous plants by introducing into such plants a nucleic acid operably linked to a promoter, wherein the nucleic acid is that of *SH2-REV6-HS* (SEQ ID NO: 3), a nucleic acid which hybridizes with *SH2-REV6-HS* under high stringency conditions and encodes a polypeptide that retains biological activity of the protein SH2-REV6-HS (SEQ ID NO: 4), a fragment of *SH2-REV6-HS* encoding a peptide that retains biological activity of SH2-REV6-HS, a nucleic acid encoding a polypeptide comprising SEQ ID NO:4, or a fragment thereof that retains biological activity of SH2-REV6-HS, or a nucleic acid encoding an SH2HS or an SH2RTS polypeptide. Preferably, the SH2HS polypeptide is the SH2HS33 polypeptide. The methods further include growing the plants produced by such methods. The present invention also includes the plants produced by such methods.

The invention further provides methods of increasing the yield of two or more traits of monocotyledonous plants by introducing into such plants a nucleic acid operably linked to a promoter, wherein the nucleic acid is that of *SH2-REV6-HS* (SEQ ID NO: 3), a nucleic acid which hybridizes with *SH2-REV6-HS* under high stringency conditions and encodes a polypeptide that retains biological activity of the protein SH2-REV6-HS (SEQ ID NO: 4), a fragment of *SH2-REV6-HS* encoding a peptide that retains biological activity of SH2-REV6-HS, a nucleic acid encoding a polypeptide comprising SEQ ID NO:4, or a fragment thereof that retains biological activity of SH2-REV6-HS, or a nucleic acid encoding an SH2HS or an SH2RTS polypeptide. Preferably, the SH2HS polypeptide is the SH2HS33 polypeptide. The methods further include growing the plants produced by such methods. The present invention also includes the plants produced by such methods.

The present invention further includes crossing the plants obtained by the above-methods to one or more other plants and harvesting and growing the seed which is produced as a result of making the crosses.

The present invention further includes harvesting seed which produced by selfing the plants obtained by the above methods and growing the harvested seed.

The present invention provides plants which include a nucleic acid encoding the amino acid sequence of SH2-REV6-HS (SEQ ID NO: 4), or a fragment thereof that retains biological activity of SH2-REV6-HS.

The present invention provides plants which include a nucleic acid encoding the amino acid sequence of an SH2HS or an SH2RTS protein, or a fragment thereof that retains biological activity of an SH2HS or an SH2RTS protein. In a preferred embodiment, the SH2HS polypeptide has the amino acid sequence of SH2HS33.

Brief Description of the Drawing

Figure 1 shows a Northern blot analysis of *Sh2-Rev6-HS* transgenic rice lines.

Detailed Description of the Invention

I. Definitions

As used herein, the term "AGP" means ADP glucose pyrophosphorylase.

As used herein, the term "allele" means any of several alternative forms of a gene.

As used herein, the term "biological activity" means any functional activity of an SH2 mutant polypeptide of the invention, such as the SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS polypeptides. The functional activity of the subject polypeptides includes but, is not limited to, increasing total seed number, increasing individual seed weight, increasing total seed weight per plant, increasing above-ground plant biomass, increasing Harvest Index, and phosphate insensitivity, and increased heat stability.

As used herein, the term "*Bt2*" means the Brittle-2 gene encoding the small subunit of AGP. As used herein, the term "*bt2*" means a mutant form of the *Bt2* gene, which renders the kernels of corn brittle in texture upon drying.

As used herein, the term "cereal" means, depending on the context, either: 1) a grass plant, such as corn, or 2) the grain of a grass plant.

As used herein, the term "crop plant" means any plant grown for any commercial purpose, including, but not limited to the following purposes: seed production, grain production, hay production, ornamental use, fruit production, berry production, vegetable production, oil production, protein production, forage production, silage, animal grazing, golf courses, lawns, flower production, landscaping, erosion control, green manure,

improving soil tilth/health, producing pharmaceutical products/drugs, producing food additives, smoking products, pulp production and wood production. Particular crop plants of interest to the present invention include, but are not limited to, wheat, rice, maize, barley, rye, sugar beets, potatoes, sweet potatoes, soybeans, cotton, tomatoes, canola and tobacco.

As used herein, the term "cross pollination" or "cross-breeding" means the pollen of one flower on one plant is applied (artificially or naturally) to the ovule (stigma) of a flower on another plant.

As used herein, the term "cultivar" means a variety, strain or race of plant which has been produced by horticultural or agronomic techniques and is not normally found in wild populations.

As used herein, the terms "Dicotyledoneae", "dicotyledonous", "dicotyledon" or "dicot" are synonymous and mean any of various flowering plants having two embryonic seed leaves or cotyledons that usually appear at germination. Examples include, but are not limited to, tobacco, soybeans, potato, sweet potato, radish, cabbage, rape and apple trees.

As used herein, the term "flag leaf" refers to the uppermost leaf on a fruiting (fertile) culm; the leaf immediately below the inflorescence or seed head.

As used herein, the term "genotype" means the genetic makeup of an individual cell, cell culture, plant, or group of plants.

As used herein, the term "grain" means, depending on its context, either: 1) the cereal grasses considered as a group, or 2) the fruit of one or more of the cereal grasses.

As used herein, the terms "grass" or "grasses" mean a plant belonging to the family Poaceae.

As used herein, the term "Harvest Index" is the proportion of total plant mass harvested. It is the ratio of weight of grain/ (weight of grain plus weight of plant). This is identical to HI as discussed elsewhere herein (see, also, Langer and Hill, 1991), wherein HI links biological yield and economic yield, and HI is the ratio of economic yield/biological yield. The economic yield (Y_{econ}) is the weight of grain, while the biological yield (Y_{biol}) is the weight of grain plus weight of plant. The weight of grain is synonymous with the total seed weight.

As used herein, the term "heterozygote" means a diploid or polyploid individual cell or plant having different alleles (forms of a given gene) at least at one locus.

As used herein, the term "heterozygous" means the presence of different alleles (forms of a given gene) at a particular gene locus.

5 As used herein, the term "homozygote" means an individual cell or plant having the same alleles at one or more loci.

As used herein, the term "homozygous" means the presence of identical alleles at one or more loci in homologous chromosomal segments.

10 As used herein, the term "hybrid" means any individual plant resulting from a cross between parents that differ in one or more genes.

As used herein, the term "inbred" or "inbred line" means a relatively true-breeding strain.

15 As used herein, a nucleic acid molecule is said to be "isolated" when the nucleic acid molecule is substantially separated from contaminant nucleic acid encoding other polypeptides from the source of nucleic acid.

As used herein, the term "line", when directed to a type of plant, means self- or cross-fertilizing plants and single-line facultative apomicts, having largely the same genetic background, that are similar in essential and distinctive characteristics.

20 As used herein, the term "locus" (plural: "loci") means any site that has been defined genetically. A locus may be a gene, or part of a gene, or a DNA sequence that has some regulatory role, and may be occupied by different sequences.

As used herein, the term "mass selection" means a form of selection in which individual plants are selected and the next generation propagated from the aggregate of their seeds.

25 As used herein, the terms "Monocotyledoneae", "monocotyledonous", "monocotyledon" or "monocot" are synonymous and mean any of various flowering plants having a single cotyledon in the seed. Examples of monocots include, but are not limited to, rice, wheat, barley, maize and lilies.

30 As used herein, the term "Northern Blot" refers to the analysis of RNA by electrophoresis of RNA on agarose gels to fractionate the RNA according to size followed by transfer of the RNA from the gel to a solid support, such as nitrocellulose

or a nylon membrane. The immobilized RNA is then probed with a labeled probe to detect RNA species complementary to the probe used. Northern blots are a standard tool of molecular biologists (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1985).

5 As used herein, the term "open pollination" means a plant population that is freely exposed to some gene flow, as opposed to a closed one in which there is an effective barrier to gene flow.

As used herein, the terms "open-pollinated population" or "open-pollinated variety" mean plants normally capable of at least some cross-fertilization, selected to a standard, that may show variation but that also have one or more genotypic or phenotypic characteristics by which the population or the variety can be differentiated from others. A hybrid which has no barriers to cross-pollination is an open-pollinated population or an open-pollinated variety.

As used herein, the term "ovule" means the female gametophyte, whereas the term "pollen" means the male gametophyte.

As used herein, the term "phenotype" means the observable characters of an individual cell, cell culture, plant, or group of plants which results from the interaction between that individual's genetic makeup (*i.e.*, genotype) and the environment.

As used herein, the term "progeny" means the descendants of a particular plant (self-cross) or pair of plants (crossed or backcrossed). The descendants can be of the F_1 , the F_2 , or any subsequent generation. Typically, the parents are the pollen donor and the ovule donor which are crossed to make the progeny plant of this invention. Parents also refer to F_1 parents of a hybrid plants of this invention (the F_2 plants). Finally, parents refer to a recurrent parent which is backcrossed to hybrid plants of this invention to produce another hybrid plant of this invention.

As used herein, the term "Polymerase Chain Reaction" is synonymous with "PCR" and refers to techniques in which cycles of denaturation, annealing with oligonucleotide primers, and extension with DNA polymerase, are used to amplify the number of copies of a target DNA sequence.

As used herein, the term "revertant" refers to a mutated *Sh2* gene (*i.e.*, mutated relative to the wild-type *Sh2* gene) wherein the mutant results in a wild-type kernel

phenotype (*i.e.*, a plump seed, not a shrunken seed like the phenotype displayed by the mutant *sh2sh2* genotype). A revertant genotype would have more AGP activity than a *sh2sh2* genotype and may have either more or less AGP activity than a wild-type *Sh2* genotype. Typically, the revertants have a wild-type seed phenotype with at least around 30% AGP activity compared to that of a normal (*i.e.*, non-revertant), wild-type. In some instances, the term "revertant" may refer to the cell or plant which contains the mutated *Sh2* gene.

As used herein, the term "rice" means any *Oryza* species, including, but not limited to, *O. sativa*, *O. glaberrima*, *O. perennis*, *O. nivara*, and *O. breviligulata*. Thus, as used herein, the term "rice" means any type of rice including, but is not limited to, any cultivated rice, any wild rice, any rice species, any intra- and inter-species rice crosses, all rice varieties, all rice genotypes and all rice cultivars.

As used herein, the term "self pollinated" or "self-pollination" means the pollen of one flower on one plant is applied (artificially or naturally) to the ovule (stigma) of the same or a different flower on the same plant.

As used herein, the term "*Sh2*" refers to the Shrunken-2 gene encoding the large subunit of AGP. Sometimes, the term may refer to the cell or plant which contains the *Sh2* genotype.

As used herein the term "*sh2*" means a mutant form of the *Sh2* gene, which renders the kernels of corn shrunken or collapsed upon drying. Sometimes, the term may refer to the cell or plant which contains the *sh2* genotype.

As used herein, the term "*Sh2hs*" refers to mutants of the Shrunken-2 gene which encode heat-stable variants of maize endosperm AGP. Sometimes, the term may refer to the cell or plant which contains the *Sh2hs* genotype. The term "SH2HS" refers to polypeptides encoded by *Sh2hs*. A preferred embodiment contemplated by the subject invention is the *Sh2hs33* gene which encodes the polypeptide referred to herein as SH2HS33. The SH2HS33 polypeptide contains the HS33 mutation disclosed in U.S. Patent No. 6,069,300 and published PCT application WO 99/58698. Other embodiments contemplated for use in the methods of the present invention include, but are not limited to, *Sh2hs13*, *Sh2hs14*, *Sh2hs16*, *Sh2hs39*, *Sh2hs40*, and *Sh2hs47* polynucleotides which encode the polypeptides referred to herein as SH2HS13, SH2HS14, SH2HS16,

SH2HS39, SH2HS40, and SH2HS47, respectively. The SH2HS13, SH2HS14, SH2HS16, SH2HS39, SH2HS40, and SH2HS47 polypeptides contain the HS13, HS14, HS16, HS39, HS40, and HS47 mutations, respectively, that are disclosed in U.S. Patent No. 6,069,300 and published PCT application WO 99/58698.

5 As used herein, the term "*Sh2rts*" refers to temperature sensitive revertant mutants of the Shrunk-2 gene which encode heat-stable variants of maize endosperm AGP. Sometimes, the term may refer to the cell or plant which contains the *Sh2rts* genotype. The term "SH2RTS" refers to polypeptides encoded by *Sh2rts*. Examples of embodiments contemplated for use in the methods of the present invention include, but are not limited to, *Sh2rts48-2*, and *Sh2rts60-1* polynucleotides which encode the polypeptides referred to herein as SH2RTS48-2 and SH2RTS60-1, respectively. The SH2RTS48-2 and the SH2RTS60-2 polypeptides contain the RTS48-2 and RTS60-2 mutations, respectively, disclosed in U.S. Patent No. 6,069,300 and published PCT application WO 99/58698.

15 As used herein, the term "*Sh2hs33*" refers to a single point mutation in *Sh2* which increases the stability of maize endosperm AGP through enhanced subunit interactions. The mutation is a change from His-to-Tyr at amino acid position 333 (Greene and Hannah, 1998). Sometimes, the term may refer to the cell or plant which contains the *Sh2hs33* genotype.

20 As used herein, the term "*Sh2-Rev6*" is synonymous with "*Sh2-m1-Rev6*" and refers to variants of the Shrunk-2 gene. The polypeptide product of the *Sh2-Rev6* gene contains two additional amino acids, tyrosine and serine, inserted between amino acids 494 and 495 of the wild-type *Sh2* polypeptide. Maize endosperm encoded by *Sh2-Rev6* expresses an AGP that is insensitive to phosphate and results in an increased seed weight in maize (Giroux *et al.*, 1996; U.S. Patent Nos. 5,650,557 and 5,872,216). Sometimes, the term may refer to the cell or plant which contains the *Sh2-Rev6* genotype.

25 As used herein, the term "*Sh2-Rev6-HS*" is synonymous with "*Sh2-m1Rev6-HS*" and refers to a heat stable variant of the *Sh2-Rev6* gene, wherein His is replaced by Tyr at position 333. Sometimes, the term may refer to the cell or plant which contains the *Sh2-Rev6-HS* genotype. The HS33 mutation of maize AGP, along with other mutations conferring heat stability, are disclosed in U.S. Patent No. 6,069,300 and published PCT

30

application WO 99/58698 and are specifically contemplated for use in the methods of the present invention.

As used herein, the term "*Sh2hs33*" refers to a specific heat stable genetic variant of *Sh2*. The variant contains a His to Tyr mutation at position 333 of the wild-type maize *Sh2* gene (Greene and Hannah, 1998). The mutation renders the maize endosperm AGP activity heat-stable. Sometimes, the term may refer to the cell or plant which contains the *Sh2hs33* genotype.

As used herein, the phrase "shrunk and brittle" describes the morphology of specific types of kernels of a corn. In a brittle and shrunk kernel, the endosperm is greatly collapsed. The endosperm before drying is like a fluid-filled sac that develops with little starch. On drying, the kernel shrinks and collapses into an angular structure with marked concavities and brittle texture (Coe *et al.*, 1988).

As used herein, the term "synthetic" means a set of progenies derived by intercrossing a specific set of clones or seed-propagated lines. A synthetic may contain mixtures of seed resulting from cross-, self-, and sib-fertilization.

As used herein, the terms " T_1 , T_2 , T_3 , ..." refer to the succeeding generations of cells or plants tracing back to a particular tissue culture-derived or transformed cell line designated as T_0 , or the parental generation. As regards plants, the plants produced directly from the transformed cells are referred to as the T_0 generation. The seeds produced by selfing the T_0 generation plants are referred to as the T_1 seeds. When the T_1 seeds are germinated, the resulting plants are referred to as the T_1 generation or the T_1 progeny. Seeds produced by the T_1 generation are referred to as the T_2 seeds.

As used herein, in grasses, the term "tiller" means a lateral shoot arising at ground level. Each of the tillers that were counted in the present studies had a head on the stem of the shoot.

As used herein, the term "transformation" means the transfer of nucleic acid (*i.e.*, a nucleotide polymer) into a cell. As used herein, the term "genetic transformation" means the transfer and incorporation of DNA, especially recombinant DNA, into a cell.

As used herein, the term "transgenic" means cells, cell cultures, plants, and progeny of plants which have received a foreign or modified nucleic acid sequence by one of the various methods of transformation, wherein the foreign or modified nucleic

acid sequence is from the same or different species than the species of the plant receiving the foreign or modified nucleic acid sequence. The foreign or modified nucleic acid used to produce such transgenic cells, cell cultures, plants and progeny of such plants includes genes, gene fragments as well as nucleic acid sequences which code for a product which has at least one biological activity or function. As used herein, the terms "transgenic plant" and "transformed plant" are synonymous, as are the terms "transgenic line" and "transformed line". As used herein, the phrases "corresponding non-transgenic plant" and "corresponding non-transgenic line" refer to the cells, cell cultures, plants and progeny of plants which did not receive the foreign or modified gene which the "transgenic" cells, cell cultures, plants and progeny of plants which did receive the foreign or modified gene.

As used herein, the term "variety" means a subdivision of a species, consisting of a group of individuals within the species which are distinct in form or function from other similar arrays of individuals.

As used herein, the term "wheat" means any *Triticum* species, including, but not limited to, *T. aestivum*, *T. monococcum*, *T. tauschii* and *T. turgidum*. Thus, as used herein, the term "wheat" means any type of wheat including, but is not limited to, any cultivated wheat, any wild wheat, any wheat species, any intra- and inter-species wheat crosses, all wheat varieties, all wheat genotypes and all wheat cultivars. Cultivated wheats include, but are not limited to, einkorn, durum and common wheats.

As used herein, the term "wild-type" refers to the naturally occurring allele of a particular gene. Sometimes the terms refers to the cell or plant containing the wild-type alleles of the particular gene.

II. Nucleic Acids Encoding *Sh2-Rev6* and *Sh2-Rev6-HS*

Giroux *et al.* (1996) isolated and sequenced genomic DNA and cDNA encoding *Sh2-Rev6*. The nucleotide sequence of *Sh2-Rev6* is provided in SEQ ID NO: 1 and the amino acid sequence of SH2-REV6 is provided in SEQ ID NO: 2 (see, also, U.S. Patent No. 5,650,557 and U.S. Patent No. 5,872,216). Corn seeds that contain at least one functional *Sh2-Rev6* allele have been deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852 USA, on May 16,

1999 and assigned accession number ATCC 97624 (see, column 5 of U.S. Patent Nos. 5,650,557 and 5,872,216).

Sh2-Rev6 was further modified by altering His to Tyr at amino acid position 333 to produce the variant *Sh2-Rev6-HS* (Greene and Hannah *et al.*, 1998; U.S. Patent No. 6,069,300). The nucleotide sequence of *Sh2-Rev6-HS* is provided in SEQ ID NO: 3 and the amino acid sequence of SH2-REV6-HS is provided in SEQ ID NO: 4.

As used herein, *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, and *Sh2-Rev6-HS* include the specifically identified and characterized variants herein described as well as allelic variants, conservative substitution variants and homologues that can be isolated/generated and characterized without undue experimentation following methods well known to one skilled in the art.

Homology or identity at the amino acid or nucleotide level is determined by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analysis using the algorithm employed by the programs **blastp**, **blastn**, **blastx**, **tblastn** and **tblastx** (Karlin *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2264-2268 and Altschul, 1993, J. Mol. Evol. 36, 290-300, fully incorporated by reference) which are tailored for sequence similarity searching. The approach used by the BLAST program is to first consider similar segments between a query sequence and a database sequence, then to evaluate the statistical significance of all matches that are identified and finally to summarize only those matches which satisfy a preselected threshold of significance. For a discussion of basic issues in similarity searching of sequence databases (see Altschul *et al.*, 1994, Nature Genetics 6, 119-129 which is fully incorporated by reference). The search parameters for **histogram**, **descriptions**, **alignments**, **expect** (*i.e.*, the statistical significance threshold for reporting matches against database sequences), **cutoff**, **matrix** and **filter** are at the default settings. The default scoring matrix used by **blastp**, **blastx**, **tblastn**, and **tblastx** is the BLOSUM62 matrix (Henikoff *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919, fully incorporated by reference). For **blastn**, the scoring matrix is set by the ratios of M (*i.e.*, the reward score for a pair of matching residues) to N (*i.e.*, the penalty score for mismatching residues), wherein the default values for M and N are 5 and -4, respectively.

The terms "*Sh2-Rev6* genes," "*Sh2-Rev6-HS* genes," and "*Sh2hs33* genes" include all allelic variants of the *Sh2-Rev6* genes, *Sh2hs33* genes, and *Sh2-Rev6-HS* genes

exemplified herein, wherein such allelic variants code for proteins which result in one or more of the same physiological characteristics as those of the proteins produced by the *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, and *Sh2-Rev6-HS* genes disclosed herein.

The *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, and *Sh2-Rev6-HS* nucleic acid molecules or fragments thereof utilized in the present invention may also be synthesized using methods known in the art. It is also possible to produce the molecule by genetic engineering techniques, by constructing DNA using any accepted technique, cloning the DNA in an expression vehicle and transfecting the vehicle into a cell which will express the SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS proteins. See, for example, the methods set forth in Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1985.

It is understood that all polynucleotides encoding all or a portion of the polypeptides of the present invention, such as the SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS proteins, are also included herein, as long as they encode a polypeptide with one or more of the functional activities of the subject proteins as set forth herein. Thus, for example, any polynucleotide fragment having the activities of the SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS proteins discussed herein are encompassed by the present invention.

Polynucleotide sequences of the invention include DNA, cDNA, synthetic DNA and RNA sequences which encode polypeptides of the present invention, such as, for example, SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS proteins. Such polynucleotides also include naturally occurring, synthetic and intentionally manipulated polynucleotides. For example, such polynucleotide sequences may include genomic DNA which may or may not include naturally occurring introns. Moreover, such genomic DNA may be obtained in association with promoter regions or poly A sequences. As another example, portions of the mRNA sequence may be altered due to alternate RNA splicing patterns or the use of alternate promoters for RNA transcription. As yet another example, *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, and *Sh2-Rev6-HS* polynucleotides may be subjected to additional mutations using, for example, site-directed mutagenesis and DNA shuffling.

The polynucleotides of the invention further include sequences that are degenerate as a result of the genetic code. The genetic code is said to be degenerate because more

than one nucleotide triplet can code for the same amino acid. There are 20 natural amino acids, most of which are specified by more than one codon. It will be appreciated by those skilled in the art that as a result of the degeneracy of the genetic code, a multitude of nucleotide sequences, some bearing minimal nucleotide sequence homology to the nucleotide sequences of the subject polynucleotides, such as *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, and *Sh2-Rev6-HS*, may be utilized in the present invention. Therefore, all degenerate nucleotide sequences are included in the invention as long as the amino acid sequence of the subject polypeptides, for example, the SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS polypeptides, encoded by the nucleotide sequence are functionally unchanged or substantially similar in function. The invention specifically contemplates each and every possible variation of peptide or nucleotide sequence that could be made by selecting combinations based on the possible amino acid and codon choices made in accordance with the standard triplet genetic code as applied to polynucleotide sequences of the invention, as exemplified by *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, and *Sh2-Rev6-HS*, and all such variations are to be considered specifically disclosed herein.

Also included in the invention are fragments (portions, segments) of the sequences disclosed herein which selectively hybridize to polynucleotides of the present invention, such as, for example, *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, and *Sh2-Rev6-HS*. Selective hybridization as used herein refers to hybridization under stringent conditions (See, for example, the techniques in Maniatis *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press), which distinguishes related from unrelated nucleotide sequences. The active fragments of the invention, which are complementary to mRNA and the coding strand of DNA, are usually at least about 15 nucleotides, more usually at least 20 nucleotides, preferably 30 nucleotides and more preferably may be 50 nucleotides or more.

"Stringent conditions" are those that (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example, 0.5 M sodium phosphate buffer pH 7.2, 1 mM EDTA pH 8.0 in 7% SDS at either 65°C or 55°C, or (2) employ during hybridization a denaturing agent such as formamide, for example, 50% (vol/vol) formamide with 0.1% bovine serum albumin, 0.1% Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.05 M sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate at 42°C. A

specific example includes the use of 50% formamide, 5× SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5× Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 55°C, with washes at 55°C in 0.2× SSC and 0.1% SDS. A skilled artisan can readily determine and vary the stringency conditions appropriately to obtain a clear and detectable hybridization signal. Preferred molecules are those that hybridize under the above conditions to the complements of *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, and *Sh2-Rev6-HS* and which encode a functional protein.

The present invention utilizes nucleic acid molecules encoding the subject SH2 mutant proteins, such as SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS, which hybridize with nucleic acid molecules comprising sequences complementary to the subject polynucleotides encoding SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS under conditions of sufficient stringency to produce a clear signal. As used herein, "nucleic acid" is defined as RNA or DNA encoding polypeptides of the invention, such as, for example, SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS polypeptides, or RNA or DNA sequences which are complementary to nucleic acids encoding such peptides, or RNA or DNA sequences which hybridize to such nucleic acids and remain stably bound to them under stringent conditions, or RNA or DNA sequences which encode polypeptides sharing at least 60% sequence identity, or at least 65% sequence identity, or at least 70% sequence identity, or at least 75% sequence identity, or at least 80% sequence identity, or at least 85% sequence identity, preferably at least 90% sequence identity, and more preferably at least 95% sequence identity with proteins of the present invention, such as SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS.

The present invention further provides fragments of any one of the encoding nucleic acids molecules. As used herein, a fragment of an encoding nucleic acid molecule refers to a small portion of the entire protein coding sequence. The size of the fragment will be determined by the intended use. For example, if the fragment is chosen so as to encode an active portion of the protein, the fragment will need to be large enough to encode the functional region(s) of the protein. For instance, fragments of the invention encode the domains or regions of the SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS of the present invention which are involved with the allosteric regulation of AGP. If the

fragment is to be used as a nucleic acid probe or PCR primer, then the fragment length is chosen so as to obtain a relatively small number of false positives during probing and priming.

Fragments of the encoding nucleic acid molecules of the present invention (*i.e.*, synthetic oligonucleotides) that are used as probes or specific primers for the polymerase chain reaction (PCR), or to synthesize gene sequences encoding proteins of the invention can easily be synthesized by chemical techniques, for example, the phosphotriester method of Matteucci *et al.* (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3185-3191) or using automated synthesis methods. In addition, larger DNA segments can readily be prepared by well known methods, such as synthesis of a group of oligonucleotides that define various modular segments of the gene, followed by ligation of oligonucleotides to build the complete modified gene.

The encoding nucleic acid molecules of the present invention may further be modified so as to contain a detectable label for diagnostic and probe purposes. A variety of such labels are known in the art and can readily be employed with the encoding molecules herein described. Suitable labels include, but are not limited to, biotin, radiolabeled nucleotides and the like. A skilled artisan can employ any of the art known labels to obtain a labeled encoding nucleic acid molecule.

Modifications to the primary structure itself by deletion, addition, or alteration of the amino acids incorporated into the protein sequence during translation can be made without destroying the activity of the protein. Such substitutions or other alterations result in proteins having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid falling within the contemplated scope of the present invention.

III. Isolation of Other Related Nucleic Acid Molecules

As described herein, the identification and characterization of the nucleic acid molecules of the present invention, such as those encoding an SH2-REV6, SH2HS33, or SH2-REV6-HS protein, or a fragment of an SH2-REV6, SH2HS33, or SH2-REV6-HS protein, allows a skilled artisan to isolate nucleic acid molecules that encode other members of the protein family in addition to the sequences herein described. Further, the presently disclosed nucleic acid molecules allow a skilled artisan to isolate nucleic acid molecules that

encode other members of the family of proteins in addition to the SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS disclosed herein.

Essentially, a skilled artisan can readily use any one of the amino acid sequences disclosed herein to generate antibody probes to screen expression libraries prepared from appropriate cells. Typically, polyclonal antiserum from mammals such as rabbits immunized with the purified protein or monoclonal antibodies can be used to probe a cDNA or genomic expression library to obtain the appropriate coding sequence for other members of the protein family. The cloned cDNA sequence can be expressed as a fusion protein, expressed directly using its own control sequences, or expressed by constructions using control sequences appropriate to the particular host used for expression of the enzyme.

Alternatively, a portion of the coding sequence herein described can be synthesized and used as a probe to retrieve DNA encoding a member of the protein family from any organism. Oligomers containing approximately 18-20 nucleotides (encoding about a six to seven amino acid stretch) are prepared and used to screen genomic DNA or cDNA libraries to obtain hybridization under stringent conditions or conditions of sufficient stringency to eliminate an undue level of false positives.

Additionally, pairs of oligonucleotide primers can be prepared for use in a polymerase chain reaction (PCR) to selectively clone an encoding nucleic acid molecule. A PCR denature/anneal/extend cycle for using such PCR primers is well known in the art and can readily be adapted for use in isolating other encoding nucleic acid molecules.

IV. Production of Recombinant Proteins Using a Recombinant DNA (rDNA) Molecule

The present invention further provides methods for producing polypeptides of the invention, such as SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS using the nucleic acid molecules herein described. In general terms, the production of a recombinant form of a protein typically involves the following steps: First, a nucleic acid molecule is obtained that encodes, for example, an SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS protein, or a fragment of an SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS protein. If the encoding sequence is uninterrupted by introns, it is directly suitable for expression in any host. The nucleic acid molecule is then preferably placed in operable linkage with suitable control sequences, as described above, to form an expression unit containing the protein open reading frame. The

expression unit is used to transform a suitable host and the transformed host is cultured under conditions that allow the production of the recombinant protein. Optionally the recombinant protein is isolated from the medium or from the cells; recovery and purification of the protein may not be necessary in some instances where some impurities may be tolerated.

Each of the foregoing steps can be done in a variety of ways. For example, the desired coding sequences may be obtained from genomic fragments and used directly in appropriate hosts. The construction of expression vectors that are operable in a variety of hosts is accomplished using appropriate replicons and control sequences, as set forth above. The control sequences, expression vectors, and transformation methods are dependent on the type of host cell used to express the gene and were discussed in detail earlier. Suitable restriction sites can, if not normally available, be added to the ends of the coding sequence so as to provide an excisable gene to insert into these vectors. A skilled artisan can readily adapt any host-expression system known in the art for use with the nucleic acid molecules of the invention to produce recombinant protein.

V. SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS Proteins

As used herein, an SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS protein refers to a protein that has the amino acid sequence encoded by the polynucleotide of SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS, allelic variants thereof and conservative substitutions thereof that have SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS activity. In addition, the polypeptides utilized in the present invention include the proteins encoded by *SH2-REV6*, *SH2HS33*, and *SH2-REV6-HS*, as well as polypeptides and fragments, particularly those which have the biological activity of SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS and also those which have at least 65% sequence identity to the polypeptides encoded by SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS or the relevant portion, or at least 70% identity, or at least 75% identity, or at least 80% identity, or at least 85% identity to the polypeptides encoded by SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS or the relevant portion, and more preferably at least 90% sequence identity to the polypeptides encoded by SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS or the relevant portion, and still more preferably at least 95% sequence identity to the polypeptides encoded by SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS or the relevant portion, and also include portions of such polypeptides. One of skill will recognize whether an amino

acid sequence of interest is within a functional domain of a protein, such as the domain or region of the SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS involved in the allosteric regulation of AGP. Thus, it may be possible for a homologous protein to have less than 40% homology over the length of the amino acid sequence but greater than 90% homology in one functional domain.

The SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS proteins utilized in the present invention include the specifically identified and characterized variants herein described as well as allelic variants, conservative substitution variants and homologues that can be isolated/generated and characterized without undue experimentation following the methods well known to one skilled in the art.

The term "substantially pure" as used herein refers to polypeptides of the present invention, such as SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS polypeptides, which are substantially free of other proteins, lipids, carbohydrates or other materials with which they are naturally associated. One skilled in the art can purify the subject polypeptides using standard techniques for protein purification.

The invention also utilizes amino acid sequences coding for isolated polypeptides of the invention, such as the SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS polypeptides. The polypeptides of the invention include those which differ from the exemplified SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS proteins as a result of conservative variations. The terms "conservative variation" or "conservative substitution" as used herein denotes the replacement of an amino acid residue by another, biologically similar residue. Conservative variations or substitutions are not likely to change the shape of the polypeptide chain. Examples of conservative variations, or substitutions, include the replacement of one hydrophobic residue such as isoleucine, valine, leucine or methionine for another, or the substitution of one polar residue for another, such as the substitution of arginine for lysine, glutamic for aspartic acid, or glutamine for asparagine, and the like. Therefore, all conservative substitutions are included in the invention as long as the subject polypeptides encoded by the nucleotide sequence are functionally unchanged or similar.

As used herein, an isolated polypeptide of the present invention, such as an SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS protein, can be a full-length or any homologue of such proteins, such as, for example, SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS proteins in which

amino acids have been deleted (e.g., a truncated version of the protein, such as a peptide), inserted, inverted, substituted and/or derivatized (e.g., by glycosylation, phosphorylation, acetylation, myristoylation, prenylation, palmitoylation, amidation and/or addition of glycosylphosphatidyl inositol). Such modified proteins include those that retain at least one of the functional activities of the subject proteins or produce at least one of the physiological characteristics produced as a result of the expression of the subject proteins. A homologue of the subject proteins is a protein having an amino acid sequence that is sufficiently similar to the subject proteins, such as the SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS protein amino acid sequences, that a nucleic acid sequence encoding the homologue is capable of hybridizing under stringent conditions to (i.e., with) a nucleic acid sequence encoding the subject proteins (e.g., SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS protein amino acid sequences). Appropriate stringency requirements are discussed above.

The subject protein homologues, including SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS protein homologues, can be the result of allelic variation of a gene encoding the protein. For example, SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS protein homologues can be produced using techniques known in the art including, but not limited to, direct modifications to a gene encoding a protein using, for example, classic or recombinant DNA techniques to effect random or targeted mutagenesis.

Minor modifications of the primary amino acid sequence of a protein of the present invention may result in proteins which have substantially equivalent activity as compared to the subject proteins (e.g., SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS) produced by the genes described herein. As used herein, a "functional equivalent" of a subject protein is a protein which possesses a biological activity or immunological characteristic substantially similar to a biological activity or immunological characteristic of the subject protein. The term "functional equivalent" is intended to include the fragments, variants, analogues, homologues, or chemical derivatives of a molecule which possess the biological activity of proteins, such as, SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS, encoded by the genes of the present invention.

The terms "SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS proteins," "SH2-REV6 proteins," "SH2HS33 proteins," and "SH2-REV6-HS proteins" include all allelic variants of these proteins that possess normal SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS activity. In

general, allelic variants of SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS proteins will have slightly different amino acid sequence than that specifically encoded by the genes utilized in the present invention but will be able to produce the exemplified phenotypes. Allelic variants, though possessing a slightly different amino acid sequence than those recited
5 individual a above, will possess the ability to produce a phenotype which exhibits increased individual and total seed weight, increased seed number, increased Harvest Index (HI) and increased above-ground plant mass.

The methods of the present invention can be used by one skilled in the art to produce plants with increased individual and total seed weight, increased seed number, increased
10 Harvest Index and increased total plant mass.

Applicants further teach methods of recognizing variations in the DNA sequences of polynucleotides, such as *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, and *Sh2-Rev6-HS*, of the present invention. One method involves the introduction of a nucleic acid molecule (also known as a probe) having a sequence complementary to, for example, an *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, or *Sh2-Rev6-HS* gene,
15 utilized in the invention under sufficient hybridizing conditions, as would be understood by those in the art. Another method of recognizing DNA sequence variation associated with polynucleotides of the present invention, including *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, and *Sh2-Rev6-HS*, is direct DNA sequence analysis by multiple methods well known in the art. Another embodiment involves the detection of DNA sequence variation in the subject polynucleotides
20 as represented by different plant genera, species, strains, varieties or cultivars. Polynucleotide sequences of the invention, for example, *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, and *Sh2-Rev6-HS*, can be used as probes to detect the presence of corresponding genes in other plants. As discussed previously, *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, and *Sh2-Rev6-HS* sequences have been determined and are readily available to one of ordinary skill in the art. In one embodiment, the sequences will
25 bind specifically to one allele of an *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, or *Sh2-Rev6-HS* gene, or a fragment thereof, and in another embodiment will bind to multiple alleles. Such detection methods include the polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and single stranded conformational analysis.

Diagnostic probes useful in such assays of the invention include antibodies to
30 polypeptides of the present invention, such as SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS. The antibodies may be either monoclonal or polyclonal, produced using standard techniques

well known in the art (See Harlow & Lane's Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Antibodies can be used to detect a protein of the invention by binding to the protein and subsequent detection of the antibody-protein complex by ELISA, Western blot, or the like. Antibodies are also produced from peptide sequences of the subject proteins, such as SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS, using standard techniques in the art (See Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, 1994). Fragments of the monoclonals or the polyclonal antisera which contain the immunologically significant portion can also be prepared.

Assays to detect or measure the subject polypeptides, for example, SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS polypeptides, in a biological sample with an antibody probe may be based on any available format. For instance, in immunoassays where SH2-REV6, SH2HS33, or SH2-REV6-HS polypeptides are the analyte, the test sample, typically a biological sample, is incubated with anti-SH2-REV6, anti-SH2HS33, or anti-SH2-REV6-HS antibodies under conditions that allow the formation of antigen-antibody complexes. Various formats can be employed, such as "sandwich" assay where antibody bound to a solid support is incubated with the test sample; washed, incubated with a second, labeled antibody to the analyte; and the support is washed again. Analyte is detected by determining if the second antibody is bound to the support. In a competitive format, which can be either heterogeneous or homogeneous, a test sample is usually incubated with an antibody and a labeled competing antigen, either sequentially or simultaneously. These and other formats are well known in the art.

VI. Transformation Methods

Methods of producing transgenic plants are well known to those of ordinary skill in the art. Transgenic plants can now be produced by a variety of different transformation methods including, but not limited to, electroporation; microinjection; microprojectile bombardment, also known as particle acceleration or biolistic bombardment; viral-mediated transformation; and *Agrobacterium*-mediated transformation (see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,405,765, 5,472,869, 5,538,877, 5,538,880, 5,550,318, 5,641,664, 5,736,369 and 5,736,369; Watson *et al.* (1992) Recombinant DNA, Scientific American Books; Hinchey *et al.* (1988) Bio/Tech. 6:915-922 (1988); McCabe *et al.*, Bio/Tech. 6:923-926; Toriyama *et al.* (1988)

Bio/Tech. 6:1072-1074; Fromm *et al.* (1990) Bio/Tech. 8:833-839; Mullins *et al.* (1990) Bio/Tech. 8:833-839; and, Raineri *et al.* (1990) Bio/Tech. 8:33-38).

A. Agrobacterium-Mediated Transformation

5 Agrobacterium-mediated transformation is the most widely utilized method for introducing an expression vector into plants (Horsch *et al.* (1985) Science 227:1229). *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes* are plant pathogenic soil bacteria which genetically transform plant cells. The Ti and Ri plasmids of *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes*, respectively, carry genes responsible for genetic transformation of the plant. (Kado, C.I. (1991) Crit. Rev. Plant. Sci. 10:1). Descriptions of Agrobacterium vector systems and methods for Agrobacterium-mediated gene transfer are provided by Gruber *et al.* (1993) "Vectors for Plant Transformation" in Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B.R. and Thompson, J. E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton), pages 89-119), Miki *et al.* (1993) "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" in Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B. R. and Thompson, J. E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton) pages 67-88, and Moloney *et al.* (1989) Plant Cell Reports 8:238.

20 Agrobacterium-mediated transformation methods have been used principally to transform dicotyledonous plants. Agrobacterium-mediated transformation in dicotyledons facilitates the delivery of larger pieces of heterologous nucleic acid as compared with other transformation methods such as particle bombardment, electroporation, and polyethylene glycol-mediated transformation method. In addition, Agrobacterium-mediated transformation appears to result in relatively few gene rearrangements and more typically results in the integration of low numbers of gene copies into the plant chromosome.

25 Monocotyledons are not a natural host of Agrobacterium. Although Agrobacterium-mediated transformation has been reported for asparagus (Bytebier *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5354-5349) and for *Dioscore bulbifera* (Schafer *et al.* (1987) Nature 327:529-532), it was generally believed that plants in the family Gramineae could not be transformed with Agrobacterium (Potrykus I. (1987) Biotechnology 8:535-543). However, recently in U.S. Patent No. 5,981,840, Zhao *et al.* disclosed agrobacterium-mediated transformation in maize. The method of Zhao *et al.* includes the following steps:

30 contacting at least one immature embryo from a maize plant with Agrobacterium capable of

transferring at least one gene to said embryo; co-cultivating the embryos with *Agrobacterium*; culturing the embryos in medium comprising N6 salts, an antibiotic capable of inhibiting the growth of *Agrobacterium*, and a selective agent to select for embryos expressing the gene; and regenerating plants expressing the gene.

B. Microprojectile-Mediated Transformation

In a microprojectile bombardment process, also referred to as a biolistic process, the transport of the DNA is mediated by very small particles of a biologically inert material. When the inert particles are coated with DNA and accelerated to a suitable velocity, one or more of the particles is able to enter into one or more of the cells where the DNA is released from the particle and expressed within the cell. While some of the cells are fatally damaged by the bombardment process, some of the recipient cells do survive, stably retain the introduced DNA, and express it. Sanford *et al.* provides a general description of a suitable particle bombardment instrument (Sanford *et al.* (1987) Particulate Sci. Technol. 5: 27-37).

Microprojectile bombardment process has been used to successfully introduce genes encoding new genetic traits into a number of plants, including onion, cotton, maize, tobacco, rice, wheat, sunflowers, soybeans and certain vegetables (U.S. Pat. No. 4,945,050; Sanford *et al.* (1988) Trends in Biotechnology 6:299; Sanford *et al.* (1988) Part. Sci. Technol. 5:27; J. J. Finer and M. D. McMullen (1990) Plant Cell Reports 8:586-589; and Gordon-Kamm (1990) The Plant Cell 2:603; Klein *et al.* (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:4305-4309). Although transformation by microprojectile bombardment is less species and genotype specific than transformation with *Agrobacterium*, the frequencies of stable transformation events achieved following bombardment can be quite low, partly due to the absence of a natural mechanism for mediating the integration of a DNA molecule or gene responsible for a desired phenotypic trait into the genomic DNA of a plant. Particle gun transformation of cotton for example, has been reported to produce no more than one clonal transgenic plant per 100-500 meristems targeted for transformation. Only 0.1 to 1% of these transformants were capable of transmitting foreign DNA to progeny (WO 92/15675). Cells treated by particle bombardment must be regenerated into whole plants, which requires labor intensive, sterile tissue culture procedures and is generally genotype dependent in most crop plants, particularly so in cotton. Similar low transformation frequencies have been reported for other

plant species as well. Other disadvantages of microprojectile bombardment include the inability to control the site of wounding of a plant tissue and thus, the site to which the transforming agent is delivered. The inability to target germline tissues accounts in part for the low transformation efficiencies achieved by microprojectile bombardment. Additionally, bombardment frequently results in the delivery of more than one copy of the transforming DNA or gene into the genome of the transformed plant cell, which can have deleterious effects on the regenerated, transformed plant. Fragmentation of the DNA to be inserted can also occur when transforming DNA via microprojectile bombardment, resulting in transgenic plants with only a portion of the gene that is being inserted.

Attempts have been made to improve the efficiency of microprojectile bombardment. For example, EPA 0486 233 describes treating bombarded tissues with *Agrobacterium* carrying the gene of interest. It is thought that the high velocity impact of the dense microprojectile particles generates an array of microwounds creating an environment that is particularly conducive to infection by the *Agrobacterium*. However, the transformed plant cells must still be regenerated into whole plants, and the fertile, stably transformed plants must be selected from the total population of regenerated plants. Organogenesis and somatic embryogenesis have been used to regenerate plants. Nonetheless, organogenesis frequently produces chimeric plant containing both transformed and nontransformed cells, and somatic embryogenesis, although superior to organogenesis is highly genotype dependent in most crop plants.

Efforts have been made to deliver the transforming agent or DNA to germline tissues such that the agent or DNA will be incorporated directly into the DNA of the cells in these tissues, particularly into the DNA of the egg cells of the plant. In U.S. Patent No. 5,994,624, Trolinder *et al.* describes a method of implanta transformation which provides an improved method for delivering transforming agents to plant tissues. The method uses a needleless-injection device that is capable of injecting a small, high pressure stream of a solution through the many cell layers of plant tissue. The transforming agent is delivered to a plant's floral tissues, thereby facilitating delivery of a transforming agent comprising a gene of interest into germline cells of the plant. The high pressure stream provided by the injection device insures that the *Agrobacterium* culture or the DNA solution penetrates the many cell layers of the plant floral tissue without causing massive tissue damage, such as that caused

by direct injection with a syringe having a needle or by particle bombardment. The method can be used to transform plant cells and tissues, including embryonic tissue culture cells, meristematic tissues and plant callus, which can be regenerated into whole plants. Moreover, the method can be used to transform plant cells and tissues selected from the group consisting of cotton, soybean, alfalfa, flax, tobacco, sunflower, peanut, strawberry, tomato, pea, bean, squash, pepper, maize, sorghum, barley, oat, rye, wheat, rice, brassica, and potato.

Although Klein *et al.* (Klein *et al.* (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:4305-4309; Klein *et al.* (1988) Bio/Technol. 6:59-563; Klein *et al.* (1989) Plant Physiol. 91:440-444) provides protocols for bombardment of maize non-regenerable suspension culture cells, no protocols have been published for the bombardment of callus cultures or regenerable maize cells until recently. Lundquist *et al.* (U.S. Patent No. 6,013,863) describes delivery of DNA into regenerable maize callus cultures via particle bombardment process which results in high level of viability for a few transformed cells. The method maybe applicable to producing fertile stably transgenic plants of other graminaceous cereals. Dwight *et al.* (U.S. Patent No. 5,990,387) discloses a method of producing fertile, stably transformed, *Zea mays* plant. The methods comprise the following steps: providing a foreign DNA comprising an expression vector carrying a gene encoding an agronomic trait; providing a maize embryogenic callus, suspension culture, or immature embryo isolated from a plant; introducing the foreign DNA into the embryogenic callus, suspension culture or immature embryo isolated from a plant by one or more microparticle bombardments; and regenerating fertile transgenic *Zea mays* plant. Plants that can be successfully transformed by the method of Dwight *et al.* include maize, rye, barley, wheat, sorghum, oats, millet, rice, sunflower, alfalfa, rape seed and soybean.

Biswas *et al.* describes generation of transgenic rice plants by microprojectile bombardment of embryogenic cell clusters (Biswas *et al.* (1998) Plant Science, 133:203-210), and Yao *et al.* discloses the production of transgenic barley plants via direct delivery of plasmid DNA into microspores of barley using high velocity microprojectiles (Yao *et al.* (1997) Genome, 40:570-581). Christou *et al.* reports on the parameters that influence stable transformation of rice embryogenic callus and the recovery of transgenic plants using electric discharge particle acceleration (Christou *et al.* (1995) Annals of Botany 75:407-413).

C. Alternative Methods of Transformation

Other methods for physical delivery of DNA to plants include sonication of target cells (Zhang *et al.* (1991) Bio/Technology 9:996) and liposome or spheroplast fusion (Deshayes *et al.* (1985) EMBO J., 4: 2731, Christou *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3962). Direct uptake of DNA into protoplasts using CaCl_2 precipitation, polyvinyl alcohol or poly-L-ornithine has also been reported (Hain *et al.* (1985) Mol. Gen. Genet. 199: 161 and Draper *et al.* (1982) Plant Cell Physiol. 23: 451). Nobre *et al.* reports the regeneration of fertile transgenic plants of barley using PEG-mediated transformation of scutellum protoplast (Nobre *et al.* (1997) Barley Genetics Newsletter, 27:16-17). Electroporation of protoplasts and whole cells and tissues has also been described (Donn *et al.* (1990) Abstracts of VIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC, A2-38, p 53; D'Halluin *et al.* (1992) Plant Cell 4: 1495-1505 and Spencer *et al.* (1994) Plant Mol. Biol. 24: 51-61). In fact, D'Halluin *et al.* (U.S. Patent No. 6,002,070) describes a rapid and efficient method of transforming monocotyledonous plants by electroporation. The method of D'Halluin comprises electroporation of DNA of interest into either intact tissue capable of forming compact embryogenic callus or compact embryogenic callus obtained from intact tissue.

Another technology for production of transgenic plants is whisker-mediated transformation whereby certain materials, when incubated with plant tissue, facilitate entry of DNA molecules into plant cells. It has been proposed that such materials that promote DNA uptake, primarily silicone carbide, do so by damaging the cell surface. For a review, see Wang *et al.* (1995) In Vitro Cell. Dev. Biol. 34: 101-4.

VII. Transgenes

Genes successfully introduced into plants using recombinant DNA methodologies include, but are not limited to, those coding for the following traits: seed storage proteins, including modified 7S legume seed storage proteins (U.S. Patent Nos. 5,508,468, 5,559,223 and 5,576,203); herbicide tolerance or resistance (U.S. Patent Nos. 5,498,544 and 5,554,798; Powell *et al.* (1986) Science 232:738-743; Kaniewski *et al.* (1990) Bio/Tech. 8:750-754; Day *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6721-6725); phytase (U.S. Patent No. 5,593,963); resistance to bacterial, fungal, nematode and insect pests, including resistance to the

lepidoptera insects conferred by the *Bt* gene (U.S. Patent Nos. 5,597,945 and 5,597,946; Hilder *et al.* Nature 330:160-163; Johnson *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9871-9875; Perlak *et al.* (1990) Bio/Tech. 8:939-943); lectins (U.S. Patent No. 5,276,269); and flower color (Meyer *et al.* (1987) Nature 330:677-678; Napoli *et al.* (1990) Plant Cell 2:279-289 (1990); van der Krol *et al.* (1990) Plant Cell 2:291-299).

VIII. Expression Units to Express Exogenous DNA in a Plant

The present invention further provides host cells transformed with a nucleic acid molecule that encodes a protein of the present invention. The host cell can be either prokaryotic or eukaryotic. Eukaryotic cells useful for expression of a protein of the invention are not limited, so long as the cell line is compatible with cell culture methods and compatible with the propagation of the expression vector and expression of the gene product. Preferred eukaryotic host cells include any plant species.

Any prokaryotic host can be used to express a rDNA molecule encoding a protein of the invention. The preferred prokaryotic host is *E. coli*.

Transformation of appropriate cell hosts with a rDNA molecule of the present invention is accomplished by well known methods that typically depend on the type of vector used and host system employed. With regard to transformation of prokaryotic host cells, electroporation and salt treatment methods are typically employed, see, for example, Cohen *et al.* (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110-2114; and Maniatis *et al.* (1982) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. With regard to transformation of vertebrate cells with vectors containing rDNAs, electroporation, cationic lipid or salt treatment methods are typically employed, see, for example, Graham *et al.* (1973) Virology 52:456-467; and Wigler *et al.* (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1373-1376.

Successfully transformed cells, i.e., cells that contain a rDNA molecule of the present invention, can be identified by well known techniques including the selection for a selectable marker. For example, cells resulting from the introduction of an rDNA of the present invention can be cloned to produce single colonies. Cells from those colonies can be harvested, lysed and their DNA content examined for the presence of the rDNA using a method such as that described by Southern, (1975) J. Mol. Biol. 98:503-517; or Berent *et al.*

(1985) Biotech. Histochem. 3:208; or the proteins produced from the cell assayed via an immunological method.

As provided herein elsewhere, several embodiments of the present invention employ expression units (or expression vectors or systems) to express an exogenously supplied nucleic acid sequence, such as the sequence coding for SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS protein in a plant. Methods for generating expression units/systems/vectors for use in plants are well known in the art and can readily be adapted for use in expressing polynucleotide sequences encoding proteins of the present invention, such as SH2-REV6, SH2HS33, and SH2-REV6-HS proteins, in a plant cell. A skilled artisan can readily use any appropriate plant/vector/expression system in the present methods following the outline provided herein.

The expression control elements used to regulate the expression of the protein can either be the expression control element that is normally found associated with the coding sequence (homologous expression element) or can be a heterologous expression control element. A variety of homologous and heterologous expression control elements are known in the art and can readily be used to make expression units for use in the present invention. Transcription initiation regions, for example, can include any of the various opine initiation regions, such as octopine, mannopine, nopaline and the like that are found in the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. Alternatively, plant viral promoters can also be used, such as the cauliflower mosaic virus 35S promoter to control gene expression in a plant. Lastly, plant promoters such as prolifera promoter, fruit-specific promoters, Ap3 promoter, heat shock promoters, seed-specific promoters, etc. can also be used. The most preferred promoters will be most active in seedlings.

Either a constitutive promoter (such as the CaMV or Nos promoter), an organ-specific promoter (such as the E8 promoter from tomato) or an inducible promoter is typically ligated to the protein or antisense encoding region using standard techniques known in the art. The expression unit may be further optimized by employing supplemental elements such as transcription terminators and/or enhancer elements.

Thus, for expression in plants, the expression units will typically contain, in addition to the protein sequence, a plant promoter region, a transcription initiation site and a

transcription termination sequence. Unique restriction enzyme sites at the 5' and 3' ends of the expression unit are typically included to allow for easy insertion into a preexisting vector.

In the construction of heterologous promoter/structural gene or antisense combinations, the promoter is preferably positioned about the same distance from the heterologous transcription start site as it is from the transcription start site in its natural setting. As is known in the art, however, some variation in this distance can be accommodated without loss of promoter function.

In addition to a promoter sequence, the expression cassette can also contain a transcription termination region downstream of the structural gene to provide for efficient termination. The termination region may be obtained from the same gene as the promoter sequence or may be obtained from different genes. If the mRNA encoded by the structural gene is to be efficiently processed, DNA sequences which direct polyadenylation of the RNA are also commonly added to the vector construct. Polyadenylation sequences include, but are not limited to the *Agrobacterium* octopine synthase signal (Gielen *et al.* (1984) EMBO J 3:835-846) or the nopaline synthase signal (Depicker *et al.* (1982) Mol. and Appl. Genet 1: 561-573).

The resulting expression unit is ligated into or otherwise constructed to be included in a vector which is appropriate for higher plant transformation. The vector will also typically contain a selectable marker gene by which transformed plant cells can be identified in culture. Usually, the marker gene will encode antibiotic resistance. These markers include resistance to G418, hygromycin, bleomycin, kanamycin, and gentamicin. After transforming the plant cells, those cells having the vector will be identified by their ability to grow on a medium containing the particular antibiotic. Replication sequences, of bacterial or viral origin, are generally also included to allow the vector to be cloned in a bacterial or phage host, preferably a broad host range prokaryotic origin of replication is included. A selectable marker for bacteria should also be included to allow selection of bacterial cells bearing the desired construct. Suitable prokaryotic selectable markers also include resistance to antibiotics such as kanamycin or tetracycline.

Other DNA sequences encoding additional functions may also be present in the vector, as is known in the art. For instance, in the case of *Agrobacterium* transformations, T-DNA sequences will also be included for subsequent transfer to plant chromosomes.

63 - 42
112

The polynucleotide sequences of the subject invention, such as the *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, and *Sh2-Rev6-HS* sequences, utilized in the present invention can also be fused to various other nucleic acid molecules such as Expressed Sequence Tags (ESTs), epitopes or fluorescent protein markers.

5 ESTs are gene fragments, typically 300 to 400 nucleotides in length, sequenced from the 3' or 5' end of complementary-DNA (cDNA) clones. Nearly 30,000 *Arabidopsis thaliana* ESTs have been produced by a French and an American consortium (Delseny *et al.* (1997) FEBS Lett. 405(2):129-132; *Arabidopsis thaliana* Database, <http://genome-www.stanford.edu/Arabidopsis>). For a discussion of the analysis of gene-
10 expression patterns derived from large EST databases, see, e.g., M. R. Fannon (1996) TIBTECH 14:294-298.

Biologically compatible fluorescent protein probes, particularly the self-assembling green fluorescent protein (GFP) from the jellyfish *Aequorea victoria*, have revolutionized research in cell, molecular and developmental biology because they allow visualization of
15 biochemical events in living cells (Murphy *et al.* (1997) Curr. Biol. 7(11):870-876; Grebenok *et al.* (1997) Plant J. 11(3):573-586; Pang *et al.* (1996) Plant Physiol. 112(3); Chiu *et al.* (1996) Curr. Biol. 6(3):325-330; Plantz *et al.*, (1996) Gene 173(1):83-87; Sheen *et al.* (1995) Plant J. 8(5):777-784).

Site-directed mutagenesis has been used to develop a more soluble version of the
20 codon-modified GFP call soluble-modified GFP (smGFP). When introduced into *Arabidopsis*, greater fluorescence was observed when compared to the codon-modified GFP, implying that smGFP is 'brighter' because more of it is present in a soluble and functional form (Davis *et al.* (1998) Plant Mol. Biol. 36(4):521-528). By fusing genes encoding GFP and beta-glucuronidase (GUS), researchers were able to create a set of bifunctional reporter
25 constructs which are optimized for use in transient and stable expression systems in plants, including *Arabidopsis* (Quaedvlieg *et al.* (1998) Plant Mol. Biol. 37(4):715-727).

Berger *et al.* (Berg *et al.* (1998) Dev. Biol. 194(2):226-234) report the isolation of a GFP marker line for *Arabidopsis* hypocotyl epidermal cells. GFP-fusion proteins have been used to localize and characterize a number of *Arabidopsis* genes, including geranylgeranyl
30 pyrophosphate (GGPP) (Zhu *et al.* (1997) Plant Mol. Biol. 35(3):331-341).

IX. Breeding Methods

Open-Pollinated Populations. The improvement of open-pollinated populations of such crops as rye, many maizes and sugar beets, herbage grasses, legumes such as alfalfa and clover, and tropical tree crops such as cacao, coconuts, oil palm and some rubber, depends essentially upon changing gene-frequencies towards fixation of favorable alleles while maintaining a high (but far from maximal) degree of heterozygosity. Uniformity in such populations is impossible and trueness-to-type in an open-pollinated variety is a statistical feature of the population as a whole, not a characteristic of individual plants. Thus, the heterogeneity of open-pollinated populations contrasts with the homogeneity (or virtually so) of inbred lines, clones and hybrids.

Population improvement methods fall naturally into two groups, those based on purely phenotypic selection, normally called mass selection, and those based on selection with progeny testing. Interpopulation improvement utilizes the concept of open breeding populations; allowing genes for flow from one population to another. Plants in one population (cultivar, strain, ecotype, or any germplasm source) are crossed either naturally (e.g., by wind) or by hand or by bees (commonly *Apis mellifera* L. or *Megachile rotundata* F.) with plants from other populations. Selection is applied to improve one (or sometimes both) population(s) by isolating plants with desirable traits from both sources.

There are basically two primary methods of open-pollinated population improvement. First, there is the situation in which a population is changed *en masse* by a chosen selection procedure. The outcome is an improved population which is indefinitely propagable by random-mating within itself in isolation. Second, the synthetic variety attains the same end result as population improvement but is not itself propagable as such; it has to be reconstructed from parental lines or clones. These plant breeding procedures for improving open-pollinated populations are well known to those skilled in the art and comprehensive reviews of breeding procedures routinely used for improving cross-pollinated plants are provided in numerous texts and articles, including: Allard, (1960) Principles of Plant Breeding, John Wiley & Sons, Inc.; Simmonds (1979) Principles of Crop Improvement, Longman Group Limited; Hallauer and Miranda (1981) Quantitative Genetics in Maize Breeding, Iowa State University Press; and, Jensen (1988) Plant Breeding Methodology, John Wiley & Sons, Inc.

Mass Selection. In mass selection, desirable individual plants are chosen, harvested, and the seed composited without progeny testing to produce the following generation. Since selection is based on the maternal parent only, and there is no control over pollination, mass selection amounts to a form of random mating with selection. As stated above, the purpose of mass selection is to increase the proportion of superior genotypes in the population.

Synthetics. A synthetic variety is produced by crossing *inter se* a number of genotypes selected for good combining ability in all possible hybrid combinations, with subsequent maintenance of the variety by open pollination. Whether parents are (more or less inbred) seed-propagated lines, as in some sugar beet and beans (*Vicia*) or clones, as in herbage grasses, clovers and alfalfa, makes no difference in principle. Parents are selected on general combining ability, sometimes by test crosses or topcrosses, more generally by polycrosses. Parental seed lines may be deliberately inbred (e.g., by selfing or sib crossing). However, even if the parents are not deliberately inbred, selection within lines during line maintenance will ensure that some inbreeding occurs. Clonal parents will, of course, remain unchanged and highly heterozygous.

Whether a synthetic can go straight from the parental seed production plot to the

farmer or must first undergo one or two cycles of multiplication depends on seed production and the scale of demand for seed. In practice, grasses and clovers are generally multiplied once or twice and are thus considerably removed from the original synthetic.

While mass selection is sometimes used, progeny testing is generally preferred for polycrosses, because of their operational simplicity and obvious relevance to the objective, namely exploitation of general combining ability in a synthetic.

The number of parental lines or clones that enter a synthetic vary widely. In practice, numbers of parental lines range from 10 to several hundred, with 100-200 being the average. Broad based synthetics formed from 100 or more clones would be expected to be more stable during seed multiplication than narrow based synthetics.

Hybrids. A hybrid is an individual plant resulting from a cross between parents of differing genotypes. Commercial hybrids are now used extensively in many crops, including corn (maize), sorghum, sugarbeet, sunflower and broccoli. Hybrids can also be produced in wheat and rice. Hybrids can be formed a number of different ways, including by crossing two parents directly (single cross hybrids), by crossing a single cross hybrid with another parent

(three-way or triple cross hybrids), or by crossing two different hybrids (four-way or double cross hybrids).

Strictly speaking, most individuals in an outbreeding (*i.e.*, open-pollinated) population are hybrids, but the term is usually reserved for cases in which the parents are individuals whose genomes are sufficiently distinct for them to be recognized as different species or subspecies. Hybrids may be fertile or sterile depending on qualitative and/or quantitative differences in the genomes of the two parents. Heterosis, or hybrid vigor, is usually associated with increased heterozygosity which results in increased vigor of growth, survival, and fertility of hybrids as compared with the parental lines which were used to form the hybrid. Maximum heterosis is usually achieved by crossing two genetically different, highly inbred lines.

The production of hybrids is a well-developed industry, involving the isolated production of both the parental lines and the hybrids which result from crossing those lines. For a detailed discussion of the hybrid production process, see, *e.g.*, Wright, Commercial Hybrid Seed Production 8:161-176, In Hybridization of Crop Plants, *supra*.

X. Seed Number, Grain Yield, and Sink Capacity in Wheat

Wheat seed number and subsequent grain yield is affected by competition between inflorescences (Whingwiri *et al.*, 1981). Wheat yield is always lower than ears potential due to lack of assimilate supply or competition among florets limiting seed size and/or number (Zamski and Grunberger, 1995). Healthy, well-grown wheat plants always produce more shoots (potential heads) and florets (potential seeds) than heads and seeds. A significant factor controlling seed number is sink strength of the developing seeds (Thorne and Wood, 1987). A review of this area (Evans *et al.*, 1975) indicates for wheat in many cases, yield is limited by the sink capacity of developing seeds. The limitations imparted by low sink strength may be seen as reduced grain set, reduced number of wheat heads, and reduced individual seed weight. In wheat, it is generally believed that the rate of assimilate flow to developing heads determines the survival of initiated florets and plays a significant role in determining final grain number (Spiertz and vanKeulen, 1980; Abbate *et al.*, 1998). Possibly the most effective method of increasing kernel number in wheat would be to modify

assimilate flow to developing kernels (Bindrahan *et al.*, 1998). The transgenic wheat of the present invention which contains increased sink strength confirms this hypothesis.

All patents, patent applications, provisional applications, and publications referred to or cited herein are incorporated by reference in their entirety to the extent they are not inconsistent with the explicit teachings of this specification.

Materials and Methods

I. Production of Transgenic Plants

Vectors according to the invention may be used to transform plants as desired, to make plants according to the invention as discussed elsewhere herein.

Wheat Transformation. The methods described by Weeks *et al.* (1993) and Vasil *et al.* (1993) have been adopted with minor modifications for transforming the wheat cultivar 'Hi-Line' (Lanning *et al.*, 1992). The technique as routinely practiced initially utilizes immature embryos isolated from wheat cultivars approximately 7 days post anthesis.

The Biolistic PDS-1000 He (Bio-Rad laboratories, USA) device was used for transforming the wheat tissues via microprojectile bombardment.

For wheat calli 1500 psi rupture discs were used. Other procedures such as sterilization of the rupture discs, macrocarriers, stopping screens *etc.*, were strictly in accordance with the manufacturer's manual.

Rice Transformation. The methods described by Sivamani *et al.* (1996) may be adopted for transforming rice cultivar 'M202' (Johnson *et al.* 1986). The technique as routinely practiced initially utilizes embryogenic calli cultured from mature seeds.

The Biolistic PDS-1000 He (Bio-Rad laboratories, USA) device is used for transforming the rice tissues via microprojectile bombardment.

For rice calli 1500 psi rupture discs are used. Other procedures such as sterilization of the rupture discs, macrocarriers, stopping screens *etc.*, are strictly in accordance with the manufacturer's manual.

Pea Transformation. The methods described by U.S. Patent No. 5,286,635 (Example 9) and U.S. Patent No. 5,773,693 (Example V) may be adopted with minor modifications for transforming the pea (*Pisum sativum* L.) cultivar 'Pea Green Arrow' (available commercially

from Park Seed®). Pea explant material is transformed by incubation with *Agrobacterium* cells carrying *Sh2-Rev6-HS* sequence. The pea explant is preferably obtained from the plumule of a pea seed, and transformed shoots are preferably induced directly in the explant material without passage through a callus phase. Whole transformed pea plants may be regenerated from the transformed shoots by rooting and subsequent planting in the soil. The exogenous *Sh2-Rev6-HS* DNA will be stably incorporated into the chromosomes of the regenerated 'Pea Green Arrow' plant which will be able to express the gene.

II. Plasmids

Wheat. The plasmid DNA pRQ101 containing the coding sequence of the *Bar* gene (Fromm *et al.*, 1990) under control of the CaMV 35S promoter with *Adh1* intron and NOS terminator was used as selectable marker for selecting transgenic wheat tissue.

Rice. As a selectable marker for rice, the plasmid DNA pIL.TAB222 containing the coding sequence of the hygromycin B phosphotransferase under the control of the maize ubiquitin promoter was used (Sivamani *et al.*, 1996).

Pea. As a selectable marker for pea, the coding sequence of cefotaxime resistance may be used according to U.S. Patent No. 5,773,693. This anti-*Agrobacterium* antibiotic may be used in the selection and regeneration medium (500 mg/l) used for growing the pea callus.

General. The marker genes (i.e., *Bar*, hygromycin resistance, or cefotaxime) were on different construct than *Sh2-Rev6-HS* genes.

For the introduction of the *Sh2-Rev6-HS* genes into cereals, plasmid pSh2-Rev6-HS were created. Besides containing *Sh2-Rev6-HS* cDNA, the plasmid also contained the *Sh2* promoter, *Sh1* first intron, and NOS terminator (Rogers *et al.*, 1987). Specifically, plasmid pSh2-Rev6-HS contains the following nucleotide fragments linked in the 5' to 3' direction: nucleotides -1084 to +36 of the *Sh2* promoter; 8 nucleotides of polylinker; two C's; nucleotides of the *Sh1* intron 1 cassette containing nucleotides +43 to +52 of *Sh1* exon 1, nucleotides +53 to +1080 of *Sh1* intron 1 and nucleotides +1081 to 1097 of *Sh1* exon 2; one C; 13 nucleotides of polylinker containing a *Bam*HI restriction site; cDNA encoding *Sh2-Rev6-HS* (SEQ ID NO: 3); 18 nucleotides polylinker containing *Kpn*I and *Sst*I restriction sites; and nucleic acid of the NOS terminator. The nucleic acid sequence of the *Sh2* promoter is disclosed by Shaw and Hannah, (1992), *Plant Physiology*, 98:1214-1216. The sequence

numbering of *Sh1* intron cassette is shown in Zack *et al.* (1986) *Maydica*, 31, 5-16, and the effects of the *Sh1* intron1 cassette on transient gene expression are described by Clancy *et al.* ((1994) *Plant Science*, 98, 151-161) and Vasil *et al.* ((1989), *Plant Science*, 91, 1575-1579). The 3 additional C's (2 at the 5' end and 1 at the 3' end) are subcloning derived nucleotides. The plasmid includes transit peptide and consensus start site. Plasmid pSh2-Rev6-HS used in the present application is provided by Florida State University.

For introduction of *Sh2-Rev-HS* into dicots such as pea, the above plasmid is modified such that the *Sh2* promoter is replaced with a dicot seed specific promoter such as pea vicilin promoter (U.S. Patent No. 5,773,693). Other suitable promoters and/or constructs for expression of *Sh2-Rev6-HS* in dicots are well known to the skilled artisan (see, e.g., U.S. Patent No. 5,773,693).

III. Selection and Regeneration of Transgenic Plants

Wheat. Transgenic wheat plants were obtained from bombarded immature embryos by the methods described by Weeks *et al.* (1993) and Vasil *et al.* (1993) using bialaphos (Meiji Seika Kaisha Ltd, Japan) selection. The resistant calli of wheat are transferred to medium to induce production of both shoots and roots.

Rice. Transgenic rice plants were obtained from the bombarded embryogenic calli of rice by the technique of Sivamani *et al.* (1996) using hygromycin selection. The resistant calli of rice are transferred to medium to induce production of both shoots and roots.

Peas. Transgenic pea plants may be obtained from *Agrobacterium*-transformed calli of pea explants by the method of U.S. Patent No. 5,773,693 using cefotaxime selection.

Pea shoots may be rooted by transfer to Sorbarod plugs (Baumgarten Papiers SA, Switzerland) and soaked in liquid YRM according to U.S. Patent No. 5,773,693 (Example V).

General. Putative transgenic plantlets were transferred to the greenhouse and allowed to self-fertilize. For wheat, typically more than 75% of these plantlets are escapes and true transgenic plants were selected by spraying the plants with 0.1% glufosinate (Liberty®, Agrevo Inc.).

IV. Primers for PCR

An *Sh2* specific primer and a NOS specific primer for PCR were used to confirm the presence of *Sh2-Rev6-HS* transgene in the transgenic plants. The 5' primer was MC4Sh2, a 26-mer which is specific to *Sh2* sequences in the construct:

5' CTG GAT GTG AAC TCA AGG ACT CCG TG 3' (SEQ ID NO: 5).

The 3' primer was MC35PUC19, a 24-mer specific to the puc backbone of the construct:

5' GGC TTA ACT ATG CCG CAT CAG AGC 3' (SEQ ID NO: 6).

The primers produce a PCR product of 826 bp (309 bp of *Sh2* cDNA, 260 bp of NOS, and 257 bp pUC19).

Following are examples which illustrate procedures for practicing the invention. These examples should not be construed as limiting. All percentages are by weight and all solvent mixture proportions are by volume unless otherwise noted.

Example 1—Genetic Analysis of Transgenic Wheat Plants

The initial pool of wheat transformants yielded a number of independent transformants which were transgenic for *Sh2-Rev6-HS* and/or basta resistance.

The T₀ plants were allowed to set seed and mature in the greenhouse under controlled conditions.

The selected wheat transformants were analyzed by PCR for the presence of the introduced transgene and for T₁ seed segregation data for basta resistance.

PCR screening of transgenic wheat plants utilized MC4Sh2 and MC35PUC19 (primer sequences given above) for the presence of *Sh2-Rev6-HS* in genomic DNA samples prepared from leaf tissue using standard PCR protocols.

Twenty seven independent lines of transgenic wheat were tested. All 27 transgenic lines tested positive for basta resistance. Fifteen of the 27 transgenic lines tested positive for the presence of the *Sh2-Rev6-HS* transgene and the other 12 did not test positive for the presence of the *Sh2-Rev6-HS* transgene.

Example 2--Phenotypic Analysis of the Transgenic Wheat Plants

Various phenotypic traits were collected and analyzed for each of the 27 transgenic wheat plants grown in a greenhouse. As mentioned previously, all 27 transgenic lines carried the herbicide resistance gene. These traits included the following: number of seeds per plant (Seeds/Plant); individual seed weight (Individual Seed Wt.) in milligrams per kernel (mg/kernel); Harvest Index (Harvest Index); total seed weight (Total Seed Wt.) in grams per plant (g/plant); number of grain heads per plant (Heads); total plant weight (Plant Wt.) in grams per plant (g/plant); and flag leaf weight (Flag Leaf Wt.) in grams per plant (g/plant).

Seeds were uniformly dried in a 37°C incubator to a moisture of between about 10% to about 14%.

The above ground parts of the plants were harvested at time of maturity and uniformly dried to about 0% moisture in a 125°C incubator. The dried plant weights and dried flag leaf weights were adjusted to reflect weights at the same moisture content as that of the seeds (i.e., about 10% to about 14%). Roots were not collected.

Plant weight represents the total weight of the "above ground" plant parts not including the total seed weight of the plant and the flag leaf weight of the plant.

Harvest Index (HI) was calculated as follows:

$$HI = \{(\text{Total Seed Wt.})/(\text{Total Seed Wt.} + \text{Plant Wt.} + \text{Flag Leaf Wt.})\}.$$

For the number of wheat heads per plant, the number of heads were counted without regard to whether or how many seeds were in any particular head.

The phenotypic data were analyzed in several different ways, as discussed below.

Comparison Between PCR+ and PCR- Lines. This comparison was made for all transgenic lines (15 lines) with positive PCR results (PCR+) for *Sh2-Rev6-HS* versus all transgenic lines (12 lines) with negative PCR results (PCR-) for *Sh2-Rev6-HS*. Thus, the PCR+ lines carry both the herbicide resistance gene and the *Sh2-Rev6-HS* gene while the PCR- lines only carry the herbicide resistance genes. The results are presented in Table 1.

Table I. Comparison Between PCR+ and PCR- Lines

Number and Types of Lines		Seeds/ Plants	Individual Seed Wt.	Total Seed Wt.	Harvest Index	Heads	Plant Wt.	Flag Leaf Wt.	# of Plants
			(mg/kernel)	(g/plant)		#	(g/plant)	(g/plant)	
15 PCR +	Avg	63.68**	25.2***	1.73**	0.30**	5.71	3.74	0.40	183
	Std	10.59	1.80	0.34	0.08	0.86	2.38	0.20	
12 PCR -	Avg	53.50	24.10	1.37	0.25	5.82	3.64	0.41	148
	Std	9.6	1.50	0.26	0.10	0.81	1.74	0.18	
PCT+/PCR-		1.19*	1.05***	1.26**	1.17**	0.98	1.03	0.97	

*, **, *** indicate p values of less than or equal to: 0.05, 0.01, or 0.001, respectively, based on a t test.

Comparison Between SH2+ and SH2-. In the second comparison, only the 8 transgenic lines with positive PCR results for *Sh2-Rev6-HS* which also displayed increases in the levels of the introduced protein (SH2+) were averaged and compared with all other lines (SH2-). The 8 PCR+ lines which are SH2+ are the lines for which increased levels of the introduced protein were detected. Basically, the SH2 levels were compared to those of the lines which were transgenic for only the herbicide resistance gene. Those experimental plants which produced 25% or more of the SH2 protein as compared to the production of SH2 by the lines which were transgenic for only the herbicide resistance gene were designated as "SH2+".

The SH2+ lines were compared to the other 19 lines ("SH2-") which lack any significant expression of the introduced protein. Thus, the 19 SH2- lines includes the 7 PCR+ lines which did not express significant levels of the SH2-REV6-HS protein and the 12 PCR- lines which did not express SH2-REV6-HS at all. The data is presented in Table II.

Table II. Comparison Between SH2+ and SH-

Number and Types of Lines		Seeds/ Plants	Individual Seed Wt.	Total Seed Wt.	Harvest Index	Heads	Plant Wt.	Flag Leaf Wt.	# of Plants
			(mg/kernel)	(g/plant)			(g/plant)	(g/plant)	
8 SH2+	Avg	78.23***	26.9***	2.18***	0.32***	6.00	4.29***	0.45**	100
	Std	45.50	4.10	1.35	0.10	2.93	2.29	0.21	
19 SH2-	Avg	50.86	23.80	1.30	0.25	5.66	3.44	0.39	231
	Std	33.65	4.70	0.94	0.13	2.38	1.99	0.18	
SH2+/SH2-		1.54***	1.13***	1.68***	1.25***	1.06	1.25***	1.15**	

*, **, *** indicate p values of less than or equal to: 0.05, 0.01, or 0.001, respectively, based on a t-test.

The data presented in Table II show that the total number of seeds per plant for the SH2+ lines increased about 54% in comparison to the total number of seeds per plant for the SH2- lines. Individual seed weight increased about 13% and the total seed yield increased about 68% for the SH2+ lines when compared to the SH2- lines. Harvest Index for the SH+ lines was about 25% greater than that for the SH2- lines. The SH2+ lines were also significantly bigger in total plant mass and in flag leaf weight (about +25% and about +15%, respectively).

Comparison Between Lines Homozygous and Heterozygous for *Sh2-Rev6-HS*. T1 plants found to be homozygous by progeny testing the T2 seeds were designated as "Homozygous SH2+". The seeds of Homozygous SH2+ plants are expected to have a greater dosage of the transgene than the other lines. In this comparison, the Homozygous SH2 plants were compared to SH2+ plants that were heterozygous (Heterozygous SH2+) and were also compared to the 12 PCR-lines.

Table III. Comparison Between Lines Homozygous and Heterozygous for <i>Sh2-Rev6-HS</i>									
Types of Lines		Seeds/Plants	Individual Seed Wt.	Total Seed Wt.	Harvest Index	Heads	Plant Wt.	Flag Leaf Wt.	# of Plants
			(mg/kernel)	(g/plant)			(g/plant)	(g/plant)	
Homozygous SH2+	Avg	97.1*	27.60	2.74*	0.30	7.59**	5.76	0.56	22
	Std	43.60	2.60	1.31	0.03	3.10	2.26	0.17	
Heterozygous SH2+	Avg	74.50	26.80	2.10	0.33	5.58	3.91	0.42	66
	Std	45.10	3.80	1.34	0.10	2.54	2.08	0.20	
SH2+ Homozygous/Heterozygous		1.30*	1.03	1.30*	-0.05	1.36**	1.47	1.33	22/66
SH2 Homozygous/12 PCR-		1.91***	1.16***	2.10***	1.16*	1.34**	1.67***	1.43***	22/148

*, **, *** indicate p values of less than or equal to: 0.05, 0.01, or 0.001, respectively, based on t tests.

The majority (approximately two-thirds) of the plants analyzed were determined to be heterozygous for *Sh2-Rev6-HS* and, therefore, only have half of the possible dosage of the transgene coding for SH2-REV6-HS.

To determine the effect of increased gene dosage, individual T₁ plants were determined to be homozygous or heterozygous by progeny testing the T₂ seeds harvested from the plants. Lack of segregation for the herbicide resistance marker gene was taken as evidence of homozygosity. A comparison of 22 SH2+ homozygous plants with heterozygous SH+ plants indicates that increasing the dosage of the *Sh2-Rev6-HS* transgene leads to even larger yield and plant growth increases over plants which do not contain or express the transgene. The results provided in Table III indicate an approximately 110% increase in total seed weight per plant compared to SH2+ heterozygous plants.

Example 3—Experiments with Rice

The transgenic rice plants are produced as described in the Materials and Methods. The resultant rice plants are analyzed as set forth in Examples 1 and 2.

Example 4—Experiments with Pea

The transgenic pea plants are produced as described in the Materials and Methods. The resultant pea plants are analyzed as set forth in Examples 1 and 2.

Example 5—Northern Analysis of SH2-REV6-HS Transgenic Rice Lines

Ten (10) or more developing seeds were harvested from individual T0 transgenic rice lines. All T0 transgenic lines were PCR positive for the *Sh2-Rev6-HS* transgene. RNA was prepared and analyzed according to standard techniques. Duplicate blots were probed with a small AGP subunit probe (Brittle-2) or the *Sh2-Rev6-HS* transgene coding sequences. The genotype labeled M202 is a varietal control.

As can be seen in Figure 1, RS1, RS4, RS10, RS20, and RS22 transgenic plants express the *Sh2-Rev6-HS* transgene, in contrast to untransformed M202 plant which does not express the transgene. Due to small differences in loading, minor differences in expression may or may not be due to the transgene. Significant differences in loading are not apparent in a duplicate blot probed with the Brittle-2 gene.

Example 6—AGP activity and T1 Seed Weight of SH2-REV6-HS Transgenic Lines

<u>Plant</u>	<u>AGP Activity</u>	<u>T1 Seed Weight</u>
M202	100	Comparable data for M202 not available
RS1	122	27.0 mg
RS2	127	27.5 mg
RS3	121	23.8 mg
RS4	120	27.1 mg
RS6	124	25.6 mg
RS8	122	21.9 mg
RS10	147	27.7 mg
RS17	106	20.0 mg
RS20	114	23.8 mg
RS21	100	22.7 mg
RS22	127	21.5 mg

AGP activity assays reflect a mean of three replicates performed using an extract prepared from a minimum of 10 developing seeds. Activities are expressed relative to the average value obtained for varietal control plant M202. T1 seed weights are averages of a random subsample of mature T1 seeds harvested from individual T0 transgenic lines.

At the AGP activity level, the majority of the *Sh2-Rev6-HS* transgenic rice lines have significant increases relative to M202. Lines RS17 and RS21 do not have significant increases in AGP activity. Line RS10 exhibits the highest level of overexpression of all lines at the RNA level and also has highest extractable AGP activity.

Example 7—RS1 T1 Growth Chamber Yield Study

Sixteen T1 plants (numbered 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 23, and 25, respectively) representing *Sh2-Rev6-HS* transgenic rice line RS1 were grown in a growth chamber and compared with five M202 and 5 of control transgenic line 97-3 (the 97-3 line carries only hygromycin resistance). The sixteen RS1 T1 plants and the 5 97-3 plants came from individual seeds germinated on petri plates using hygromycin selection and were then transplanted into soil. The 97-3 plants are homozygous for a hygromycin resistance gene locus and the RS1 T1 plants are heterozygous (12 of 16) or homozygous (4 of 16) for the hygromycin/*Sh2-Rev6-HS* transgene locus. The dosage of each RS1 T1 plant was determined by progeny tests. RS1 plants 10, 18, 19, and 20 are homozygous. Difficulty in establishing the M202 plants may be a consequence of their being direct seeded into soil. The results are shown in Table IV below.

Table IV.

Genotype	Panicle #	Total Seed #	Total Seed Wt.	Seed Wt./ Panicle	Seeds/ Panicle	Individual Seed Wt.	Harvest Index
M202	1	16	385	9.94	0.62	24.06	0.0258
	2	12	409	11.04	0.92	34.08	0.0270
	3	15	647	17.11	1.14	43.13	0.0264
	4	14	413	10.46	0.75	29.50	0.0253
	5	24	751	20.07	0.84	31.29	0.0267
	avg	16.2	521	13.724	0.85	32.41	0.0263
	std	4.12	149.32	4.10	0.17	6.28	0.0006
97-3	1	31	789	20.01	0.65	25.45	0.0254
	2	32	1040	27	0.84	32.50	0.0260
	3	28	688	17.85	0.64	24.57	0.0259
	4	18	623	16.08	0.89	34.61	0.0258
	5	32	895	23.57	0.74	27.97	0.0263
	avg	28.2	807	20.902	0.75	29.02	0.0259
	std	5.31	148.58	3.94	0.10	3.92	0.0003
RS1	1	33	943	24.35	0.74	28.58	0.0258
	3	18	686	17.48	0.97	38.11	0.0255
	4	26	932	25.91	1.00	35.85	0.0278
	5	14	540	14.51	1.04	38.57	0.0269
	6	33	891	24.76	0.75	27.00	0.0278
	7	32	889	23.97	0.75	27.78	0.0270
	10	20	587	15.23	0.76	29.35	0.0259
	13	12	562	14.63	1.22	46.83	0.0260
	15	20	585	15.14	0.76	29.25	0.0259
	17	17	678	17.84	1.05	39.88	0.0263
	18	9	538	13.94	1.55	59.78	0.0259
	19	23	609	16.05	0.70	26.48	0.0264
	20	19	594	15.96	0.84	31.26	0.0269
	22	11	553	14.25	1.30	50.27	0.0258
	23	18	559	14.77	0.82	31.06	0.0264
	25	19	708	19.27	1.01	37.26	0.0272
	avg	20.25	678.38	18.00	0.95	36.08	0.0265
	std	7.28	144.96	4.14	0.23	9.17	0.0007
	RS1 Compared to M202						
		1.25	1.30	1.31	1.12	1.11	0.94
	RS1 Compared to 97-3						
		0.72	0.84	0.86	1.27	1.24	0.94

**REFERENCES FOR WHICH A COMPLETE CITATION
IS NOT PROVIDED IN THE TEXT OF THE SPECIFICATION.**

- 5 Bae, J.M., Giroux, M., Hannah, L. (1990) Cloning and characterization of the *brittle-2* gene of maize. Maydica 35:317-322.
- Bhave, M.R., Lawrence, S., Barton, C., and Hannah, L.C. (1990) Identification and molecular characterization of *shrunk-2* cDNA clones of maize. Plant Cell 2:581-588.
- 10 Choi, S-B., Zhang, Y., Ito, H., Stephens, K., Winder, T., Edwards, G.E., and Okita, T.W. (1998) Increasing rice productivity by manipulation of starch biosynthesis during seed development. p. 137-149 In Feeding a world population of more than eight billion people: a challenge to science. Ed. J.C. Waterlow. Oxford University Press.
- 15 DuVick, D.N. (1992) Genetic contributions to advances in yield of United States maize. Maydica 37:69-79.
- Giroux, M.J., Shaw, J., Barry, G., Cobb, B.G., Greene, T., Okita, T., and Hannah, L.C. (1996) A single gene mutation that increases seed weight. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5824-5829.
- 20 Hannah, L.C., Giroux, M., and Boyer, C.D. (1993) Biotechnological modification of carbohydrates for sweet corn and maize improvement. Biotechnol. Hortic. Sci. Hortic. 55:177-197.
- 25 King, R.W., Wardlaw, I.F., and Evans, L.T. (1967) Effect of assimilate utilization on photosynthetic rate in wheat. Planta 77:261-276.
- Lanning, S.P., Talbert, L.E., McNeal, F.H., Alexander, W.L., McGuire, C.F., Bowman, H., Carlson, G., Jackson, G., Eckhoff, J., Kushnak, G. (1992) Registration of 'Hi-Line' wheat. Crop Science 32:283-284.
- 30 Martinez-Carrasco, R., and Thorne, G.N. (1979) Effects of crop thinning and reduced grain numbers per ear on grain size in two winter wheat varieties given different amounts of nitrogen. Ann. Appl. Biol. 92:383-393.
- 35 Sakulsingharoj, C., Choi, S-B., and Okita, T.W. (1999) Increasing rice productivity by molecular genetic manipulation of ADP-glucose pyrophosphorylase in starch biosynthesis. General Meeting of the International Program on Rice Biotechnology.
- 40 Stark, D.M., Timmerman, K., Barry, G.F., Preiss, J., and Kishore, G.M. (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP-glucose pyrophosphorylase. Science 258:287-292.
- 45 Sun, J., Okita, T.W., and Edwards, G.E. (1999) Modification of carbon partitioning, photosynthetic capacity, and O₂ sensitivity in Arabidopsis plants with low ADP-glucose pyrophosphorylase activity. Plant Physiology 119:267-276.

Zamski, E., and Grunberger, Y. (1995) Short- and long-eared high-yielding hexaploid wheat cultivars: which has unexpressed potential for higher yield? Annals of Botany 75:501-506.

5 Anderson, J.M. *et al.* (1989) The Encoded Primary Sequence of a Rice Seed ADP-glucose Pyrophosphorylase Subunit and its Homology to the Bacterial Enzyme. The Journal of Biology Chemistry 264(21):12238-12242.

10 Anderson, J.M. *et al.* (1991) Molecular characterization of the gene encoding a rice endosperm-specific ADPglucose pyrophosphorylase subunit and its developmental pattern of transcription. Gene 97:199-205.

Dickinson, D. B., and Preiss J. (1969) Presence of ADP-glucose Pyrophosphorylase in Shrunk-2 and Brittle-2 Mutants of Maize Endosperm. Plant Physiol. 44:1058-1062.

15 Muller-Rober, B.T. *et al.* (1990) One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. Mol. Gen. Genet. 224:136-146.

20 Morell, M., M. Bloom, J. Preiss (1988) Affinity Labeling of the Allosteric Activator Site(s) of Spinach Leaf ADP-glucose Pyrophosphorylase. The Journal of Biological Chemistry 263(2):633-637.

Nakata, Paul A. *et al.* (1991) Comparison of the primary sequences of two potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase subunits. Plant Molecular Biology 17:1089-1093.

25 Tsai, Chia-Yin, Oliver E. Nelson (1966) Starch-Deficient Maize Mutant Lacking Adenosine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylases Activity. Science 151:341-343.

30 Greene, T.W. and Hannah, L.C. (1998) Enhanced Stability of Maize Endosperm ADP-Glucose Pyrophosphorylase is Gained through Mutants that Alter Subunit Interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13342-13347.

35 Abbate, P.E., Andrade, F.H., Lazaro, L., Bariffi, J.F., Berardocco, H.G., Inza, V.H., and Marturano, F. (1998) Grain Yield Increase in Recent Argentine Wheat Cultivars. Crop Science 38:1203-1209.

Bindrahan, P.S., Sayre, K.D., and Solis-Moya, E. (1998) Identifying Factors that Determine Kernel Number in Wheat. Field Crops Research 58:223-234.

40 Evans, L.T., Wardlaw, I.F., and Fisher, R.A. (1975) Crop Physiology: Some Case Histories. Evans L.T., Edited. Cambridge, Cambridge University Press, 101-149.

45 Rogers S.G., Klee H.J., Horsch R.B., Farley R.T. 1987. Improved vectors for plant transformation: Expression cassette vectors and new selectable markers. Methods in Enzymol. 153:253-277.

Sivamani, E., Shen, P., Opalka, N., Beachy, R. N., and Fauquet, C. M. 1996. Selection of large quantities of embryogenic calli from indica rice seeds for production of fertile transgenic plants using the biolistic method. Plant Cell Reports 15:322-327.

- 5 Spiertz, J.H.J., van Keulen, H. (1980) Effects of Nitrogen and Water Supply on Growth and Grain Yield of Wheat. Proceedings of the Third International Wheat Conference. May 22-June 3, Madrid, Spain.

- 10 Thorne, G.N., and Wood, D.W. (1987) Effects of Radiation and Temperature on Tiller Survival, Grain Number and Grain Yield in Winter Wheat. Annals of Botany 59:413-426.

Vasil, V., Srivastava, V., Castillo, A.M., Fromm, M.E., and Vasil, I.K. 1993. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. Bio/Technology 11:1553-1558.

Weeks, J.T., Anderson, O.D., and Blechl, A.E. 1993. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). Plant Physiol. 102:1077-1084.

- 20 Whingwiri, E.E., Kuo, J., and Stern, W.R. (1981) The Vascular System in the Rachis of a Wheat Ear. Annals of Botany 48:189-201.

Johnson, C.W., Camahan, H.L., Tseng, S.T., Oster, J.J., and Hill, J.E. 1986. Registration of 'M-202' rice. Crop Science 26:198.

- 25 Fromm, M.E., Morrish, F., Armstrong, C., Williams, R., Thomas, J., and Klein, T.M. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. Bio/Technology 8:833-839.

Claims

I claim:

1. A method of increasing the number of seeds produced by a plant, wherein the method comprises:

- a. introducing into a plant a nucleic acid operably linked to a promoter, wherein the nucleic acid is selected from the group consisting of a nucleic acid comprising SEQ ID NO: 3, a nucleic acid which hybridizes with SEQ ID NO: 3 under high stringency conditions and encodes a polypeptide that retains biological activity of SH2-REV6-HS, a fragment of SEQ ID NO: 3 encoding a peptide that retains biological activity of SH2-REV6-HS, a nucleic acid encoding a polypeptide comprising SEQ ID NO: 4, or a fragment thereof that retains biological activity of SH2-REV6-HS, and a nucleic acid encoding an SH2HS or an SH2RTS polypeptide; and
- b. growing the plant produced in step a.

2. A method of increasing the biomass produced by a plant, wherein the method comprises:

- a. introducing into a plant a nucleic acid operably linked to a promoter, wherein the nucleic acid is selected from the group consisting of a nucleic acid comprising SEQ ID NO: 3, a nucleic acid which hybridizes with SEQ ID NO: 3 under high stringency conditions and encodes a polypeptide that retains biological activity of SH2-REV6-HS, a fragment of SEQ ID NO: 3 encoding a peptide that retains biological activity of SH2-REV6-HS, a nucleic acid encoding a polypeptide comprising SEQ ID NO: 4, or a fragment thereof that retains biological activity of SH2-REV6-HS, and a nucleic acid encoding an SH2HS polypeptide; and
- b. growing the plant produced in step a.

1 3. A method of increasing the Harvest Index of a plant, wherein the method
2 comprises:

- 3 a. introducing into a plant a nucleic acid operably linked to a promoter,
4 wherein the nucleic acid is selected from the group consisting of a
5 nucleic acid comprising SEQ ID NO: 3, a nucleic acid which
6 hybridizes with SEQ ID NO: 3 under high stringency conditions and
7 encodes a polypeptide that retains biological activity of SH2-REV6-
8 HS, a fragment of SEQ ID NO: 3 encoding a peptide that retains
9 biological activity of SH2-REV6-HS, a nucleic acid encoding a
10 polypeptide comprising SEQ ID NO: 4, or a fragment thereof that
11 retains biological activity of SH2-REV6-HS, and a nucleic acid
12 encoding an SH2HS polypeptide; and
13 b. growing the plant produced in step a.

1 4. The method of claim 1, 2, or 3 wherein the plant is a monocotyledonous plant.

1 5. The method of claim 4 wherein the plant is selected from the group consisting
2 of rice, wheat, barley, oats, sorghum, and millet plant.

1 6. The method of claim 1, 2, or 3 wherein the plant is a dicotyledonous plant.

1 7. The method of claim 6 wherein the plant is selected from the group consisting
2 of pea, alfalfa, birdsfoot trefoil, chickpea, chicory, clover, kale, lentil, prairie grass, small
3 burnet, soybean, and lettuce plant.

1 8. A method of increasing the flag leaf weight of a monocotyledonous plant,
2 wherein the method comprises:

- 3 a. introducing into a plant a nucleic acid operably linked to a promoter,
4 wherein the nucleic acid is selected from the group consisting of a
5 nucleic acid comprising SEQ ID NO: 3, a nucleic acid which
6 hybridizes with SEQ ID NO: 3 under high stringency conditions and

encodes a polypeptide that retains biological activity of SH2-REV6-HS, a fragment of SEQ ID NO: 3 encoding a peptide that retains biological activity of SH2-REV6-HS, a nucleic acid encoding a polypeptide comprising SEQ ID NO: 4, or a fragment thereof that retains biological activity of SH2-REV6-HS, and a nucleic acid encoding an SH2HS polypeptide; and

b. growing the plant produced in step a.

9. A method of increasing the number of seed heads produced by a monocotyledonous plant, wherein the method comprises:

a. introducing into a plant a nucleic acid operably linked to a promoter, wherein the nucleic acid is selected from the group consisting of a nucleic acid comprising SEQ ID NO: 3, a nucleic acid which hybridizes with SEQ ID NO: 3 under high stringency conditions and encodes a polypeptide that retains biological activity of SH2-REV6-HS, a fragment of SEQ ID NO: 3 encoding a peptide that retains biological activity of SH2-REV6-HS, a nucleic acid encoding a polypeptide comprising SEQ ID NO: 4, or a fragment thereof that retains biological activity of SH2-REV6-HS, and a nucleic acid encoding an SH2HS polypeptide; and

b. growing the plant produced in step a.

10. A method of increasing two or more traits of a dicotyledonous plant, wherein the traits are selected from the group consisting of the number of seeds, average seed weight, total seed weight, number of seed heads, Harvest Index and total plant weight, wherein the method comprises:

a. introducing into a plant a nucleic acid operably linked to a promoter, wherein the nucleic acid is selected from the group consisting of a nucleic acid comprising SEQ ID NO: 3, a nucleic acid which hybridizes with SEQ ID NO: 3 under high stringency conditions and encodes a polypeptide that retains biological activity of SH2-REV6-

- 10 HS, a fragment of SEQ ID NO: 3 encoding a peptide that retains
11 biological activity of SH2-REV6-HS, a nucleic acid encoding a
12 polypeptide comprising SEQ ID NO: 4, or a fragment thereof that
13 retains biological activity of SH2-REV6-HS, and a nucleic acid
14 encoding an SH2HS polypeptide; and
15 b. growing the plant produced in step a.

1 11. A method of increasing the yield of two or more traits of a monocotyledonous
2 plant, wherein the traits are selected from the group consisting of the number of seeds,
3 average seed weight, total seed weight, number of seed heads, flag leaf weight, Harvest Index
4 and total plant weight, wherein the method comprises:

- 5 a. introducing into a plant a nucleic acid operably linked to a promoter,
6 wherein the nucleic acid is selected from the group consisting of a
7 nucleic acid comprising SEQ ID NO: 3, a nucleic acid which
8 hybridizes with SEQ ID NO: 3 under high stringency conditions and
9 encodes a polypeptide that retains biological activity of SH2-REV6-
10 HS, a fragment of SEQ ID NO: 3 encoding a peptide that retains
11 biological activity of SH2-REV6-HS, a nucleic acid encoding a
12 polypeptide comprising SEQ ID NO: 4, or a fragment thereof that
13 retains biological activity of SH2-REV6-HS, and a nucleic acid
14 encoding an SH2HS polypeptide; and
15 b. growing the plant produced in step a.

1 12. The method of claim 1, 2, 3, 8, 9, 10, or 11 further comprising crossing the
2 plant obtained in step b with a second plant and harvesting and growing the seed which is
3 produced as a result of making the cross.

1 13. The method of claim 1, 2, 3, 8, 9, 10, or 11 further comprising harvesting seed
2 which is produced by selfing the plant obtained in step b and growing the harvested seed.

1 14. The method of claim 8, 9, or 11 wherein the plant is selected from the group
2 consisting of rice, wheat, barley, oats, sorghum, and millet plant.

1 15. The method of claim 1, 2, 3, 8, 9, 10, or 11 wherein the SH2HS polypeptide
2 is selected from the group consisting of SH2HS13, SH2HS14, SH2HS16, SH2HS33,
3 SH2HS39, SH2HS40, and SH2HS47, or a fragment of the SH2HS polypeptide that retains
4 biological activity of the SH2HS polypeptide.

1 16. The method of claim 1, 2, 3, 8, 9, 10, or 11 wherein the SH2RTS polypeptide
2 is selected from the group consisting of SH2RTS48-2 and SH2RTS60-1, or a fragment of the
3 SH2RTS polypeptide that retains biological activity of the SH2RTS polypeptide.

1 17. The method of claim 10 wherein the plant is selected from the group
2 consisting of pea, alfalfa, birdsfoot trefoil, chickpea, chicory, clover, kale, lentil, prairie grass,
3 small burnet, soybean, and lettuce plant.

1 18. A plant produced by the method of claim 1, 2, 3, 8, 9, 10, or 11.

1 19. A plant comprising a nucleic acid encoding the amino acid sequence as set
2 forth in SEQ ID NO: 4.

84 64
64

1/1

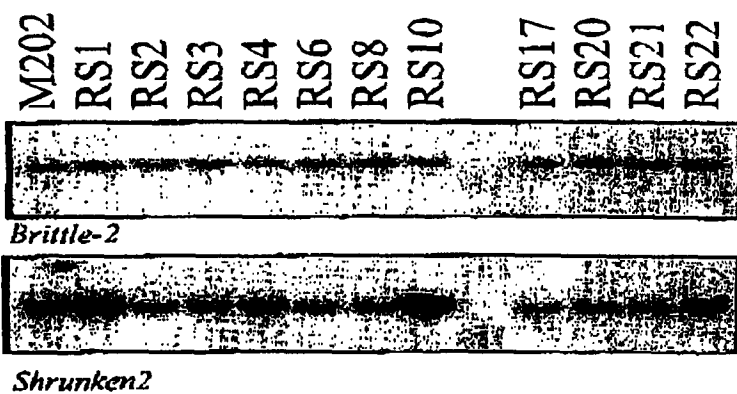


FIG. 1

SEQUENCE LISTING

<110> Giroux, Michael
 <120> Transgenic Plants with Increased Seed Yield, Biomass and Harvest Index
 <130> RDI-100
 <140> US 09/516,250
 <141> 2000-03-01
 <160> 6
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 1582
 <212> DNA
 <213> Zea mays
 <220>
 <221> CDS
 <222> (10)..(1563)
 <223> Shrunken-2 gene revertant form
 <220>
 <221> variation
 <222> (267)
 <223> k = g or t; amino acid 86 = Ala.
 <220>
 <221> variation
 <222> (1368)
 <223> r = a or g; amino acid 453 = Pro.
 <220>
 <221> variation
 <222> (1578)
 <223> k = g or t.
 <400> 1
 ggaggagat atg cag ttt gca ctt gca ttg gac acg aac tca ggt cct cac 51
 Met Gln Phe Ala Leu Ala Leu Asp Thr Asn Ser Gly Pro His
 1 5 10
 cag ata aga tct tgt gag ggt gat ggg att gac agg ttg gaa aaa tta 99
 Gln Ile Arg Ser Cys Glu Gly Asp Gly Ile Asp Arg Leu Glu Lys Leu
 15 20 25 30
 agt att ggg ggc aga aag cag gag aaa gct ttg aga aat agg tgc ttt 147
 Ser Ile Gly Gly Arg Lys Gln Glu Lys Ala Leu Arg Asn Arg Cys Phe
 35 40 45
 ggt ggt aga gtt gct gca act aca caa tgt att ctt acc tca gat gct 195
 Gly Gly Arg Val Ala Ala Thr Thr Gln Cys Ile Leu Thr Ser Asp Ala
 50 55 60
 tgt cct gaa act ctt cat tct caa aca cag tcc tct agg aaa aat tat 243
 Cys Pro Glu Thr Leu His Ser Gln Thr Gln Ser Ser Arg Lys Asn Tyr
 65 70 75

gct gat gca aac cgt gta tct gck atc att ttg ggc gga ggc act gga 291
 Ala Asp Ala Asn Arg Val Ser Xaa Ile Ile Leu Gly Gly Gly Thr Gly
 80 85 90

tct cag ctc ttt cct ctg aca agc aca aga gct acg cct gct gta cct 339
 Ser Gln Leu Phe Pro Leu Thr Ser Thr Arg Ala Thr Pro Ala Val Pro
 95 100 105 110

gtt gga gga tgt tac agg ctt att gat atc cct atg agt aac tgc ttc 387
 Val Gly Gly Cys Tyr Arg Leu Ile Asp Ile Pro Met Ser Asn Cys Phe
 115 120 125

aac agt ggt ata aat aag ata ttt gtg atg agt cag ttc aat tct act 435
 Asn Ser Gly Ile Asn Lys Ile Phe Val Met Ser Gln Phe Asn Ser Thr
 130 135 140

tgc ctt aac cgc cat att cat cgt aca tac ctt gaa ggc ggg atc aac 483
 Ser Leu Asn Arg His Ile His Arg Thr Tyr Leu Glu Gly Gly Ile Asn
 145 150 155

ttt gct gat gga tct gta cag gta tta gcg gct aca caa atg cct gaa 531
 Phe Ala Asp Gly Ser Val Gln Val Leu Ala Ala Thr Gln Met Pro Glu
 160 165 170

gag cca gct gga tgg ttc cag ggt aca gca gac tct atc aga aaa ttt 579
 Glu Pro Ala Gly Trp Phe Gln Gly Thr Ala Asp Ser Ile Arg Lys Phe
 175 180 185 190

atc tgg gta ctc gag gat tat tac agt cac aaa tcc att gac aac att 627
 Ile Trp Val Leu Glu Asp Tyr Tyr Ser His Lys Ser Ile Asp Asn Ile
 195 200 205

gta atc ttg agt ggc gat cag ctt tat cgg atg aat tac atg gaa ctt 675
 Val Ile Leu Ser Gly Asp Gln Leu Tyr Arg Met Asn Tyr Met Glu Leu
 210 215 220

gtg cag aaa cat gtc gag gac gat gct gat atc act ata tca tgt gct 723
 Val Gln Lys His Val Glu Asp Asp Ala Asp Ile Thr Ile Ser Cys Ala
 225 230 235

cct gtt gat gag agc cga gct tct aaa aat ggg cta gtg aag att gat 771
 Pro Val Asp Glu Ser Arg Ala Ser Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Asp
 240 245 250

cat act gga cgt gta ctt caa ttc ttt gaa aaa cca aag ggt gct gat 819
 His Thr Gly Arg Val Leu Gln Phe Phe Glu Lys Pro Lys Gly Ala Asp
 255 260 265 270

ttg aat tct atg aga gtt gag acc aac ttc ctg agc tat gct ata gat 867
 Leu Asn Ser Met Arg Val Glu Thr Asn Phe Leu Ser Tyr Ala Ile Asp
 275 280 285

gat gca cag aaa tat cca tac ctt gca tca atg ggc att tat gtc ttc 915
 Asp Ala Gln Lys Tyr Pro Tyr Leu Ala Ser Met Gly Ile Tyr Val Phe
 290 295 300

aag aae gat gca ctt tta gac ctt ctc aag tca aaa tat act caa tta 963
 Lys Lys Asp Ala Leu Leu Asp Leu Leu Lys Ser Lys Tyr Thr Gln Leu
 305 310 315

cat gac ttt gga tct gaa atc ctc cca aga gct gta cta gat cat agt 1011
 His Asp Phe Gly Ser Glu Ile Leu Pro Arg Ala Val Leu Asp His Ser
 320 325 330

gtg cag gca tgc att ttt acg ggc tat tgg gag gat gtt gga aca atc 1059
 Val Gln Ala Cys Ile Phe Thr Gly Tyr Trp Glu Asp Val Gly Thr Ile
 335 340 345 350

aaa tca ttc ttt gat gca aac ttg gcc ctc act gag cag cct tcc aag 1107
 Lys Ser Phe Phe Asp Ala Asn Leu Ala Leu Thr Glu Gln Pro Ser Lys
 355 360 365

ttt gat ttt tac gat cca aaa aca cct ttc ttc act gca ccc cga tgc 1155
 Phe Asp Phe Tyr Asp Pro Lys Thr Pro Phe Phe Thr Ala Pro Arg Cys
 370 375 380

ttg cct ccg acg caa ttg gac aag tgc aag atg aaa tat gca ttt atc 1203
 Leu Pro Pro Thr Gln Leu Asp Lys Cys Lys Met Lys Tyr Ala Phe Ile
 385 390 395

tca gat ggt tgc tta ctg aga gaa tgc aac atc gag cat tct gtg att 1251
 Ser Asp Gly Cys Leu Leu Arg Glu Cys Asn Ile Glu His Ser Val Ile
 400 405 410

gga gtc tgc tca cgt gtc acg tct gga tgt gaa ctc aag gac tcc gtg 1299
 Gly Val Cys Ser Arg Val Ser Ser Gly Cys Glu Leu Lys Asp Ser Val
 415 420 425 430

atg atg gga gcg gac atc tat gaa act gaa gaa gaa gct tca aag cta 1347
 Met Met Gly Ala Asp Ile Tyr Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu
 435 440 445

ctg tta gct ggg aag gtc ccr gtt gga ata gga agg aac aca aag ata 1395
 Leu Leu Ala Gly Lys Val Xaa Val Gly Ile Gly Arg Asn Thr Lys Ile
 450 455 460

agg aac tgt atc att gac atg aat gct agg att ggg aag aac gtg gtg 1443
 Arg Asn Cys Ile Ile Asp Met Asn Ala Arg Ile Gly Lys Asn Val Val
 465 470 475

atc aca aac agt aag ggc atc caa gag gct gat cac ccg gaa gaa ggg 1491
 Ile Thr Asn Ser Lys Gly Ile Gln Glu Ala Asp His Pro Glu Glu Gly
 480 485 490

tac tgc tac tac ata agg tct gga atc gtg gtg atc ctg aag aat gca 1539
 Tyr Ser Tyr Tyr Ile Arg Ser Gly Ile Val Val Ile Leu Lys Asn Ala
 495 500 505 510

acc atc aac gat ggg tct gtc ata tagatcggt gcgtktgct 1582
 Thr Ile Asn Asp Gly Ser Val Ile
 515

<210> 2

<211> 518

<212> PRT

<213> Zea mays

<220>

<221> -

<222> (86)

<223> Xaa = Ala, from degeneracy at position 267 in DNA sequence (X = g or c).

<220>

<221> -

<222> (453)

<223> Xaa ← Pro, from degeneracy at position 1368 in DNA sequence (r = a or g).

<400> 2

Met Gln Phe Ala Leu Ala Leu Asp Thr Asn Ser Gly Pro His Gln Ile
 1 5 10 15

Arg Ser Cys Glu Gly Asp Gly Ile Asp Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ile
 20 25 30

Gly Gly Arg Lys Gln Glu Lys Ala Leu Arg Asn Arg Cys Phe Gly Gly
 35 40 45

Arg Val Ala Ala Thr Thr Gln Cys Ile Leu Thr Ser Asp Ala Cys Pro
 50 55 60

Glu Thr Leu His Ser Gln Thr Gln Ser Ser Arg Lys Asn Tyr Ala Asp
 65 70 75 80

Ala Asn Arg Val Ser Xaa Ile Ile Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gln
 85 90 95

Leu Phe Pro Leu Thr Ser Thr Arg Ala Thr Pro Ala Val Pro Val Gly
 100 105 110

Gly Cys Tyr Arg Leu Ile Asp Ile Pro Met Ser Asn Cys Phe Asn Ser
 115 120 125

Gly Ile Asn Lys Ile Phe Val Met Ser Gln Phe Asn Ser Thr Ser Leu
 130 135 140

Asn Arg His Ile His Arg Thr Tyr Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Ala
 145 150 155 160

Asp Gly Ser Val Gln Val Leu Ala Ala Thr Gln Met Pro Glu Glu Pro
 165 170 175

Ala Gly Trp Phe Gln Gly Thr Ala Asp Ser Ile Arg Lys Phe Ile Trp
 180 185 190

Val Leu Glu Asp Tyr Tyr Ser His Lys Ser Ile Asp Asn Ile Val Ile
 195 200 205

Leu Ser Gly Asp Gln Leu Tyr Arg Met Asn Tyr Met Glu Leu Val Gln
 210 215 220

Lys His Val Glu Asp Asp Ala Asp Ile Thr Ile Ser Cys Ala Pro Val
 225 230 235 240

Asp Glu Ser Arg Ala Ser Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Asp His Thr
 245 250 255

Gly Arg Val Leu Gln Phe Phe Glu Lys Pro Lys Gly Ala Asp Leu Asn
 260 265 270

Ser Met Arg Val Glu Thr Asn Phe Leu Ser Tyr Ala Ile Asp Asp Ala
 275 280 285

89 69

Gln Lys Tyr Pro Tyr Leu Ala Ser Met Gly Ile Tyr Val Phe Lys Lys
 290 295 300
 Asp Ala Leu Leu Asp Leu Leu Lys Ser Lys Tyr Thr Gln Leu His Asp
 305 310 315 320
 Phe Gly Ser Glu Ile Leu Pro Arg Ala Val Leu Asp His Ser Val Gln
 325 330 335
 Ala Cys Ile Phe Thr Gly Tyr Trp Glu Asp Val Gly Thr Ile Lys Ser
 340 345 350
 Phe Phe Asp Ala Asn Leu Ala Leu Thr Glu Gln Pro Ser Lys Phe Asp
 355 360 365
 Phe Tyr Asp Pro Lys Thr Pro Phe Phe Thr Ala Pro Arg Cys Leu Pro
 370 375 380
 Pro Thr Gln Leu Asp Lys Cys Lys Met Lys Tyr Ala Phe Ile Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Cys Leu Leu Arg Glu Cys Asn Ile Glu His Ser Val Ile Gly Val
 405 410 415
 Cys Ser Arg Val Ser Ser Gly Cys Glu Leu Lys Asp Ser Val Met Met
 420 425 430
 Gly Ala Asp Ile Tyr Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu Leu Leu
 435 440 445
 Ala Gly Lys Val Xaa Val Gly Ile Gly Arg Asn Thr Lys Ile Arg Asn
 450 455 460
 Cys Ile Ile Asp Met Asn Ala Arg Ile Gly Lys Asn Val Val Ile Thr
 465 470 475 480
 Asn Ser Lys Gly Ile Gln Glu Ala Asp His Pro Glu Glu Gly Tyr Ser
 485 490 495
 Tyr Tyr Ile Arg Ser Gly Ile Val Val Ile Leu Lys Asn Ala Thr Ile
 500 505 510
 Asn Asp Gly Ser Val Ile
 515

<210> 3

<211> 1582

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<221> CDS

<222> (10)..(1563)

<223> Shrunken-2 gene revertant form, modified to be
heat stable

<220>

<221> variation

<222> (267)

<223> k = g or t; amino acid 86 = Ala.

<220>
 <221> variation
 <222> (1008)
 <223> y = c or t.

<220>
 <221> variation
 <222> (1368)
 <223> r = a or g; amino acid 453 = Pro.

<220>
 <221> variation
 <222> (1578)
 <223> k = g or t.

<400> 3

ggaggagat atg cag ttt gca ctt gca ttg gac acg aac tca ggt cct cac 51
 Met Gln Phe Ala Leu Ala Leu Asp Thr Asn Ser Gly Pro His
 1 5 10

cag ata aga tct tgt gag ggt gat ggg att gac agg ttg gaa aaa tta 99
 Gln Ile Arg Ser Cys Glu Gly Asp Gly Ile Asp Arg Leu Glu Lys Leu
 15 20 25 30

agt att ggg ggc aga aag cag gag aaa gct ttg aga aat agg tgc ttt 147
 Ser Ile Gly Gly Arg Lys Gln Glu Lys Ala Leu Arg Asn Arg Cys Phe
 35 40 45

ggt ggt aga gtt gct gca act aca caa tgt att ctt acc tca gat gct 195
 Gly Gly Arg Val Ala Ala Thr Thr Gln Cys Ile Leu Thr Ser Asp Ala
 50 55 60

tgt cct gaa act ctt cat tct caa aca cag tcc tct agg aaa aat tat 243
 Cys Pro Glu Thr Leu His Ser Gln Thr Gln Ser Ser Arg Lys Asn Tyr
 65 70 75

gct gat gca aac cgt gta tct gck atc att ttg ggc gga ggc act gga 291
 Ala Asp Ala Asn Arg Val Ser Xaa Ile Ile Leu Gly Gly Gly Thr Gly
 80 85 90

tct cag ctc ttt cct ctg acc agc aca aga gct acg cct gct gta cct 339
 Ser Gln Leu Phe Pro Leu Thr Ser Thr Arg Ala Thr Pro Ala Val Pro
 95 100 105 110

gtt gga gga tgt tac agg ctt att gat atc cct atg agt aac tgc ttc 387
 Val Gly Gly Cys Tyr Arg Leu Ile Asp Ile Pro Met Ser Asn Cys Phe
 115 120 125

aac agt ggt ata aat aag ata ttt gtg atg agt cag ttc aat tct act 435
 Asn Ser Gly Ile Asn Lys Ile Phe Val Met Ser Gln Phe Asn Ser Thr
 130 135 140

tcg ctt aac cgc cat att cat cgt aca tac ctt gaa ggc ggg atc aac 483
 Ser Leu Asn Arg His Ile His Arg Thr Tyr Leu Glu Gly Gly Ile Asn
 145 150 155

ttt gct gat gga tct gta cag gta tta gcg gct aca caa atg cct gaa 531
 Phe Ala Asp Gly Ser Val Gln Val Leu Ala Ala Thr Gln Met Pro Glu
 160 165 170

gag cca gct gga tgg ttc cag ggt aca gca gac tct atc aga aaa ttt 579
 Glu Pro Ala Gly Trp Phe Gln Gly Thr Ala Asp Ser Ile Arg Lys Phe
 175 180 185 190

atc tgg gta ctc gag gat tat tac agt cac aaa tcc att gac aac att 627
 Ile Trp Val Leu Glu Asp Tyr Tyr Ser His Lys Ser Ile Asp Asn Ile
 195 200 205

gta atc ttg agt ggc gat cag ctt tat cgg atg aat tac atg gaa ctt 675
 Val Ile Leu Ser Gly Asp Gln Leu Tyr Arg Met Asn Tyr Met Glu Leu
 210 215 220

gtg cag aaa cat gtc gag gac gat gct gat atc act ata tca tgt gct 723
 Val Gln Lys His Val Glu Asp Asp Ala Asp Ile Thr Ile Ser Cys Ala
 225 230 235

cct gtt gat gag agc cga gct tct aaa aat ggg cta gtg aag att gat 771
 Pro Val Asp Glu Ser Arg Ala Ser Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Asp
 240 245 250

cat act gga cgt gta ctt caa ttc ttt gaa aaa cca aag ggt gct gat 819
 His Thr Gly Arg Val Leu Gln Phe Phe Glu Lys Pro Lys Gly Ala Asp
 255 260 265 270

ttg aat tct atg aga gtt gag acc aac ttc ctg agc tat gct ata gat 867
 Leu Asn Ser Met Arg Val Glu Thr Asn Phe Leu Ser Tyr Ala Ile Asp
 275 280 285

gat gca cag aaa tat cca tac ctt gca tca atg ggc att tat gtc ttc 915
 Asp Ala Gln Lys Tyr Pro Tyr Leu Ala Ser Met Gly Ile Tyr Val Phe
 290 295 300

aag aaa gat gca ctt tta gac ctt ctc aag tca aaa tat act caa tta 963
 Lys Lys Asp Ala Leu Leu Asp Leu Leu Lys Ser Lys Tyr Thr Gln Leu
 305 310 315

cat gac ttt gga tct gaa atc ctc cca aga gct gta cta gat tay agt 1011
 His Asp Phe Gly Ser Glu Ile Leu Pro Arg Ala Val Leu Asp Tyr Ser
 320 325 330

gtg cag gca tgc att ttt acg ggc tat tgg gag gat gtt gga aca atc 1059
 Val Gln Ala Cys Ile Phe Thr Gly Tyr Trp Glu Asp Val Gly Thr Ile
 335 340 345 350

aaa tca ttc ttt gat gca aac ttg gcc ctc act gag cag cct tcc aag 1107
 Lys Ser Phe Phe Asp Ala Asn Leu Ala Leu Thr Glu Gln Pro Ser Lys
 355 360 365

ttt gat ttt tac gat cca aaa aca cct ttc ttc act gca ccc cga tgc 1155
 Phe Asp Phe Tyr Asp Pro Lys Thr Pro Phe Phe Thr Ala Pro Arg Cys
 370 375 380

ttg cct ccg acg caa ttg gac aag tgc aag atg aaa tat gca ttt atc 1203
 Leu Pro Pro Thr Gln Leu Asp Lys Cys Lys Met Lys Tyr Ala Phe Ile
 385 390 395

tca gat ggt tgc tta ctg aga gaa tgc aac atc gag cat tct gtg att 1251
 Ser Asp Gly Cys Leu Leu Arg Glu Cys Asn Ile Glu His Ser Val Ile
 400 405 410

gga gtc tgc tca cgt gtc agc tct gga tgt gaa ctg aag gac tcc gtg 1299
 Gly Val Cys Ser Arg Val Ser Ser Gly Cys Glu Leu Lys Asp Ser Val
 415 420 425 430

atg atg gga ggc gac atc tat gaa act gaa gaa gaa gct tca aag cta 1347
 Met Met Gly Ala Asp Ile Tyr Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu
 435 440 445

ctg tta gct ggg aag gtc ccr gtt gga ata gga agc aac aca aag ata 1395
 Leu Leu Ala Gly Lys Val Xaa Val Gly Ile Gly Arg Asn Thr Lys Ile
 450 455 460

agg aac tgt atc att gac atg aat gct agg att ggg aag aac gtg gtg 1443
 Arg Asn Cys Ile Ile Asp Met Asn Ala Arg Ile Gly Lys Asn Val Val
 465 470 475

atc aca aac agt aag ggc atc caa gag gct gat cac ccg gaa gaa ggg 1491
 Ile Thr Asn Ser Lys Gly Ile Gln Glu Ala Asp His Pro Glu Glu Gly
 480 485 490

tac tcg tac tac ata agg tct gga atc gtg gtg atc ctg aag aat gca 1539
 Tyr Ser Tyr Tyr Ile Arg Ser Gly Ile Val Val Ile Leu Lys Asn Ala
 495 500 505 510

acc atc aac gat ggg tct gtc ata tagatcggt gcgtktgcg 1582
 Thr Ile Asn Asp Gly Ser Val Ile
 515

<210> 4

<211> 518

<212> FRT

<213> Zea mays

<220>

<221> -

<222> (86)

<223> Xaa = Ala, from degeneracy at position 267 in DNA sequence (k = g or t).

<220>

<221> -

<222> (453)

<223> Xaa = Pro, from degeneracy at position 1368 in DNA sequence (r = a or g).

<400> 4

Met Gln Phe Ala Leu Ala Leu Asp Thr Asn Ser Gly Pro His Gln Ile
 1 5 10 15

Arg Ser Cys Glu Gly Asp Gly Ile Asp Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ile
 20 25 30

Gly Gly Arg Lys Gln Glu Lys Ala Leu Arg Asn Arg Cys Phe Gly Gly
 35 40 45

Arg Val Ala Ala Thr Thr Gln Cys Ile Leu Thr Ser Asp Ala Cys Pro
 50 55 60

Glu Thr Leu His Ser Gln Thr Gln Ser Ser Arg Lys Asn Tyr Ala Asp
 65 70 75 80

Ala Asn Arg Val Ser Xaa Ile Ile Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gln
 85 90 95

Leu Phe Pro Leu Thr Ser Thr Arg Ala Thr Pro Ala Val Pro Val Gly
 100 105 110

Gly Cys Tyr Arg Leu Ile Asp Ile Pro Met Ser Asn Cys Phe Asn Ser
 115 120 125

Gly Ile Asn Lys Ile Phe Val Met Ser Gln Phe Asn Ser Thr Ser Leu
 130 135 140

Asn Arg His Ile His Arg Thr Tyr Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Ala
 145 150 155 160

Asp Gly Ser Val Gln Val Leu Ala Ala Thr Gln Met Pro Glu Glu Pro
 165 170 175

Ala Gly Trp Phe Gln Gly Thr Ala Asp Ser Ile Arg Lys Phe Ile Trp
 180 185 190

Val Leu Glu Asp Tyr Tyr Ser His Lys Ser Ile Asp Asn Ile Val Ile
 195 200 205

Leu Ser Gly Asp Gln Leu Tyr Arg Met Asn Tyr Met Glu Leu Val Gln
 210 215 220

Lys His Val Glu Asp Asp Ala Asp Ile Thr Ile Ser Cys Ala Pro Val
 225 230 235 240

Asp Glu Ser Arg Ala Ser Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Asp His Thr
 245 250 255

Gly Arg Val Leu Gln Phe Phe Glu Lys Pro Lys Gly Ala Asp Leu Asn
 260 265 270

Ser Met Arg Val Glu Thr Asn Phe Leu Ser Tyr Ala Ile Asp Asp Ala
 275 280 285

Gln Lys Tyr Pro Tyr Leu Ala Ser Met Gly Ile Tyr Val Phe Lys Lys
 290 295 300

Asp Ala Leu Leu Asp Leu Leu Lys Ser Lys Tyr Thr Gln Leu His Asp
 305 310 315 320

Phe Gly Ser Glu Ile Leu Pro Arg Ala Val Leu Asp Tyr Ser Val Gln
 325 330 335

Ala Cys Ile Phe Thr Gly Tyr Trp Glu Asp Val Gly Thr Ile Lys Ser
 340 345 350

Phe Phe Asp Ala Asn Leu Ala Leu Thr Glu Gln Pro Ser Lys Phe Asp
 355 360 365

Phe Tyr Asp Pro Lys Thr Pro Phe Phe Thr Ala Pro Arg Cys Leu Pro
 370 375 380

Pro Thr Gln Leu Asp Lys Cys Lys Met Lys Tyr Ala Phe Ile Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Cys Leu Leu Arg Glu Cys Asn Ile Glu His Ser Val Ile Gly Val
 405 410 415

73
93 73

WO 01/64928

PCT/US01/06622

10

Cys Ser Arg Val Ser Ser Gly Cys Glu Leu Lys Asp Ser Val Met Met
420 425 430
Gly Ala Asp Ile Tyr Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu Leu Leu
435 440 445
Ala Gly Lys Val Xaa Val Gly Ile Gly Arg Asn Thr Lys Ile Arg Asn
450 455 460
Cys Ile Ile Asp Met Asn Ala Arg Ile Gly Lys Asn Val Val Ile Thr
465 470 475 480
Asn Ser Lys Gly Ile Gln Glu Ala Asp His Pro Glu Glu Gly Tyr Ser
485 490 495
Tyr Tyr Ile Arg Ser Gly Ile Val Val Ile Leu Lys Asn Ala Thr Ile
500 505 510
Asn Asp Gly Ser Val Ile
515

<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 5
ctggatgtga actcaaggac tccgtg

26

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

25
45

SEQUENCE LISTING

<110> Research & Development Institute, Inc. & Giroux, Michael

<120> Transgenic Plants with Increased Seed Yield, Biomass and Harvest Index

<130> RDI-100C2

<140> PCT/US01/06622

<141> 2001-03-01

<150> US 09/516,250

<151> 2000-03-01

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1582

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<221> CDS

<222> (10)..(1563)

<223> Shrunk-2 gene revertant form

<220>

<221> variation

<222> (267)

<223> k = g or t; amino acid 86 = Ala.

<220>

<221> variation

<222> (1368)

<223> r = a or g; amino acid 453 = Pro.

<220>

<221> variation

<222> (1578)

<223> k = g or t.

<400> 1

ggaggagat atg cag ttt gca ctt gca ttg gac acg aac tca ggt cct cac 51

Met Gln Phe Ala Leu Ala Leu Asp Thr Asn Ser Gly Pro His

1 5 10

cag ata aga tct tgt gag ggt gat ggg att gac agg ttg gaa aaa tta 99

Gln Ile Arg Ser Cys Glu Gly Asp Gly Ile Asp Arg Leu Glu Lys Leu

15 20 25 30

agt att ggg ggc aga aag cag gag aaa gct ttg aga aat agg tgc ttt	147
Ser Ile Gly Gly Arg Lys Gln Glu Lys Ala Leu Arg Asn Arg Cys Phe	
35 40 45	
ggt ggt aga gtt gct gca act aca caa tgt att ctt acc tca gat gct	195
Gly Gly Arg Val Ala Ala Thr Thr Gln Cys Ile Leu Thr Ser Asp Ala	
50 55 60	
tgt cct gaa act ctt cat tct caa aca cag tcc tct agg aaa aat tat	243
Cys Pro Glu Thr Leu His Ser Gln Thr Gln Ser Ser Arg Lys Asn Tyr	
65 70 75	
gct gat gca aac cgt gta tct gck atc att ttg ggc gga ggc act gga	291
Ala Asp Ala Asn Arg Val Ser Ala Ile Ile Leu Gly Gly Gly Thr Gly	
80 85 90	
tct cag ctc ttt cct ctg aca agc aca aga gct acg cct gct gta cct	339
Ser Gln Leu Phe Pro Leu Thr Ser Thr Arg Ala Thr Pro Ala Val Pro	
95 100 105 110	
ggt gga gga tgt tac agg ctt att gat atc cct atg agt aac tgc ttc	387
Val Gly Gly Cys Tyr Arg Leu Ile Asp Ile Pro Met Ser Asn Cys Phe	
115 120 125	
aac agt ggt ata aat aag ata ttt gtg atg agt cag ttc aat tct act	435
Asn Ser Gly Ile Asn Lys Ile Phe Val Met Ser Gln Phe Asn Ser Thr	
130 135 140	
tcg ctt aac cgc cat att cat cgt aca tac ctt gaa ggc ggg atc aac	483
Ser Leu Asn Arg His Ile His Arg Thr Tyr Leu Glu Gly Gly Ile Asn	
145 150 155	
ttt gct gat gga tct gta cag gta tta gcg gct aca caa atg cct gaa	531
Phe Ala Asp Gly Ser Val Gln Val Leu Ala Ala Thr Gln Met Pro Glu	
160 165 170	
gag cca gct gga tgg ttc cag ggt aca gca gac tct atc aga aaa ttt	579
Glu Pro Ala Gly Trp Phe Gln Gly Thr Ala Asp Ser Ile Arg Lys Phe	
175 180 185 190	
atc tgg gta ctc gag gat tat tac agt cac aaa tcc att gac aac att	627
Ile Trp Val Leu Glu Asp Tyr Tyr Ser His Lys Ser Ile Asp Asn Ile	
195 200 205	
gta atc ttg agt ggc gat cag ctt tat cgg atg aat tac atg gaa ctt	675
Val Ile Leu Ser Gly Asp Gln Leu Tyr Arg Met Asn Tyr Met Glu Leu	
210 215 220	
gtg cag aaa cat gtc gag gac gat gct gat atc act ata tca tgt gct	723
Val Gln Lys His Val Glu Asp Asp Ala Asp Ile Thr Ile Ser Cys Ala	
225 230 235	
cct gtt gat gag agc cga gct tct aaa aat ggg cta gtg aag att gat	771

77
77

Pro	Val	Asp	Glu	Ser	Arg	Ala	Ser	Lys	Asn	Gly	Leu	Val	Lys	Ile	Asp	
240						245					250					
cat	act	gga	cgt	gta	ctt	caa	ttc	ttt	gaa	aaa	cca	aag	ggt	gct	gat	819
His	Thr	Gly	Arg	Val	Leu	Gln	Phe	Phe	Glu	Lys	Pro	Lys	Gly	Ala	Asp	
255					260					265					270	
ttg	aat	tct	atg	aga	gtt	gag	acc	aac	ttc	ctg	agc	tat	gct	ata	gat	867
Leu	Asn	Ser	Met	Arg	Val	Glu	Thr	Asn	Phe	Leu	Ser	Tyr	Ala	Ile	Asp	
				275					280					285		
gat	gca	cag	aaa	tat	cca	tac	ctt	gca	tca	atg	ggc	att	tat	gtc	ttc	915
Asp	Ala	Gln	Lys	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Ala	Ser	Met	Gly	Ile	Tyr	Val	Phe	
			290					295					300			
aag	aaa	gat	gca	ctt	tta	gac	ctt	ctc	aag	tca	aaa	tat	act	caa	tta	963
Lys	Lys	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Lys	Ser	Lys	Tyr	Thr	Gln	Leu	
		305					310					315				
at	gac	ttt	gga	tct	gaa	atc	ctc	cca	aga	gct	gta	cta	gat	cat	agt	1011
His	Asp	Phe	Gly	Ser	Glu	Ile	Leu	Pro	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	His	Ser	
	320					325					330					
gtg	cag	gca	tgc	att	ttt	acg	ggc	tat	tgg	gag	gat	gtt	gga	aca	atc	1059
Val	Gln	Ala	Cys	Ile	Phe	Thr	Gly	Tyr	Trp	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Ile	
335					340					345					350	
aaa	tca	ttc	ttt	gat	gca	aac	ttg	gcc	ctc	act	gag	cag	cct	tcc	aag	1107
Lys	Ser	Phe	Phe	Asp	Ala	Asn	Leu	Ala	Leu	Thr	Glu	Gln	Pro	Ser	Lys	
				355					360					365		
ttt	gat	ttt	tac	gat	cca	aaa	aca	cct	ttc	ttc	act	gca	ccc	cga	tgc	1155
Phe	Asp	Phe	Tyr	Asp	Pro	Lys	Thr	Pro	Phe	Phe	Thr	Ala	Pro	Arg	Cys	
			370					375					380			
ttg	cct	ccg	acg	caa	ttg	gac	aag	tgc	aag	atg	aaa	tat	gca	ttt	atc	1203
Leu	Pro	Pro	Thr	Gln	Leu	Asp	Lys	Cys	Lys	Met	Lys	Tyr	Ala	Phe	Ile	
		385					390					395				
tca	gat	ggt	tgc	tta	ctg	aga	gaa	tgc	aac	atc	gag	cat	tct	gtg	att	1251
~~Ser~~	Asp	Gly	Cys	Leu	Leu	Arg	Glu	Cys	Asn	Ile	Glu	His	Ser	Val	Ile	
	400					405					410					
gga	gtc	tgc	tca	cgt	gtc	agc	tct	gga	tgt	gaa	ctc	aag	gac	tcc	gtg	1299
Gly	Val	Cys	Ser	Arg	Val	Ser	Ser	Gly	Cys	Glu	Leu	Lys	Asp	Ser	Val	
415					420					425					430	
atg	atg	gga	gcg	gac	atc	tat	gaa	act	gaa	gaa	gaa	gct	tca	aag	cta	1347
Met	Met	Gly	Ala	Asp	Ile	Tyr	Glu	Thr	Glu	Glu	Glu	Ala	Ser	Lys	Leu	
				435					440					445		
ctg	tta	gct	ggg	aag	gtc	ccr	gtt	gga	ata	gga	agg	aac	aca	aag	ata	1395
Leu	Leu	Ala	Gly	Lys	Val	Pro	Val	Gly	Ile	Gly	Arg	Asn	Thr	Lys	Ile	

78
75

450	455	460	
agg aac tgt atc att gac atg aat gct agg att ggg aag aac gtg gtg			1443
Arg Asn Cys Ile Ile Asp Met Asn Ala Arg Ile Gly Lys Asn Val Val			
465	470	475	
atc aca aac agt aag ggc atc caa gag gct gat cac ccg gaa gaa ggg			1491
Ile Thr Asn Ser Lys Gly Ile Gln Glu Ala Asp His Pro Glu Glu Gly			
480	485	490	
tac tcg tac tac ata agg tct gga atc gtg gtg atc ctg aag aat gca			1539
Tyr Ser Tyr Tyr Ile Arg Ser Gly Ile Val Val Ile Leu Lys Asn Ala			
495	500	505	510
acc atc aac gat ggg tct gtc ata tagatcggct gcgtktgcg			1582
Thr Ile Asn Asp Gly Ser Val Ile			
515			

<10> 2
<211> 518
<212> PRT
<213> Zea mays

<400> 2

Met Gln Phe Ala Leu Ala Leu Asp Thr Asn Ser Gly Pro His Gln Ile			
1	5	10	15
Arg Ser Cys Glu Gly Asp Gly Ile Asp Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ile			
20	25	30	
Gly Gly Arg Lys Gln Glu Lys Ala Leu Arg Asn Arg Cys Phe Gly Gly			
35	40	45	
Arg Val Ala Ala Thr Thr Gln Cys Ile Leu Thr Ser Asp Ala Cys Pro			
50	55	60	
Glu Thr Leu His Ser Gln Thr Gln Ser Ser Arg Lys Asn Tyr Ala Asp			
65	70	75	80
Asn Arg Val Ser Ala Ile Ile Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gln			
85	90	95	
Leu Phe Pro Leu Thr Ser Thr Arg Ala Thr Pro Ala Val Pro Val Gly			
100	105	110	
Gly Cys Tyr Arg Leu Ile Asp Ile Pro Met Ser Asn Cys Phe Asn Ser			
115	120	125	
Gly Ile Asn Lys Ile Phe Val Met Ser Gln Phe Asn Ser Thr Ser Leu			
130	135	140	
Asn Arg His Ile His Arg Thr Tyr Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Ala			

79
79

145		150		155		160
Asp Gly Ser Val	Gln Val Leu Ala Ala Thr	Gln Met Pro Glu Glu Pro				
	165	170			175	
Ala Gly Trp Phe	Gln Gly Thr Ala Asp Ser Ile Arg Lys Phe Ile Trp					
	180	185			190	
Val Leu Glu Asp Tyr Tyr Ser His Lys Ser Ile Asp Asn Ile Val Ile						
	195	200			205	
Leu Ser Gly Asp Gln Leu Tyr Arg Met Asn Tyr Met Glu Leu Val Gln						
	210	215			220	
Lys His Val Glu Asp Asp Ala Asp Ile Thr Ile Ser Cys Ala Pro Val						
	225	230			235	240
Asp Glu Ser Arg Ala Ser Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Asp His Thr						
	245	250			255	
Gly Arg Val Leu Gln Phe Phe Glu Lys Pro Lys Gly Ala Asp Leu Asn						
	260	265			270	
Ser Met Arg Val Glu Thr Asn Phe Leu Ser Tyr Ala Ile Asp Asp Ala						
	275	280			285	
Gln Lys Tyr Pro Tyr Leu Ala Ser Met Gly Ile Tyr Val Phe Lys Lys						
	290	295			300	
Asp Ala Leu Leu Asp Leu Leu Lys Ser Lys Tyr Thr Gln Leu His Asp						
	305	310			315	320
Phe Gly Ser Glu Ile Leu Pro Arg Ala Val Leu Asp His Ser Val Gln						
	325	330			335	
Ala Cys Ile Phe Thr Gly Tyr Trp Glu Asp Val Gly Thr Ile Lys Ser						
	340	345			350	
Phe Phe Asp Ala Asn Leu Ala Leu Thr Glu Gln Pro Ser Lys Phe Asp						
	355	360			365	
Tyr Asp Pro Lys Thr Pro Phe Phe Thr Ala Pro Arg Cys Leu Pro						
	370	375			380	
Pro Thr Gln Leu Asp Lys Cys Lys Met Lys Tyr Ala Phe Ile Ser Asp						
	385	390			395	400
Gly Cys Leu Leu Arg Glu Cys Asn Ile Glu His Ser Val Ile Gly Val						
	405	410			415	
Cys Ser Arg Val Ser Ser Gly Cys Glu Leu Lys Asp Ser Val Met Met						
	420	425			430	

80
80

Gly Ala Asp Ile Tyr Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu Leu Leu
435 440 445

Ala Gly Lys Val Pro Val Gly Ile Gly Arg Asn Thr Lys Ile Arg Asn
450 455 460

Cys Ile Ile Asp Met Asn Ala Arg Ile Gly Lys Asn Val Val Ile Thr
465 470 475 480

Asn Ser Lys Gly Ile Gln Glu Ala Asp His Pro Glu Glu Gly Tyr Ser
485 490 495

Tyr Tyr Ile Arg Ser Gly Ile Val Val Ile Leu Lys Asn Ala Thr Ile
500 505 510

Asn Asp Gly Ser Val Ile
515

<210> 3
<211> 1582
<212> DNA
<213> Zea mays

<220>
<221> CDS
<222> (10)..(1563)
<223> Shrunk-2 gene revertant form, modified to be
heat stable

<220>
<221> variation
<222> (267)
<223> k = g or t; amino acid 86 = Ala.

<220>
<221> variation
<222> (1008)
<223> y = c or t.

<220>
<221> variation
<222> (1368)
<223> r = a or g; amino acid 453 = Pro.

<220>
<221> variation
<222> (1578)
<223> k = g or t.

<400> 3
ggaggagat atg cag ttt gca ctt gca ttg gac acg aac tca ggt cct cac 51

81
10
51

Met Gln Phe Ala Leu Ala Leu Asp Thr Asn Ser Gly Pro His
1 5 10

cag	ata	aga	tct	tgt	gag	ggt	gat	ggg	att	gac	agg	ttg	gaa	aaa	tta	99
Gln	Ile	Arg	Ser	Cys	Glu	Gly	Asp	Gly	Ile	Asp	Arg	Leu	Glu	Lys	Leu	
15					20					25					30	
agt	att	ggg	ggc	aga	aag	cag	gag	aaa	gct	ttg	aga	aat	agg	tgc	ttt	147
Ser	Ile	Gly	Gly	Arg	Lys	Gln	Glu	Lys	Ala	Leu	Arg	Asn	Arg	Cys	Phe	
				35					40					45		
ggt	ggt	aga	gtt	gct	gca	act	aca	caa	tgt	att	ctt	acc	tca	gat	gct	195
Gly	Gly	Arg	Val	Ala	Ala	Thr	Thr	Gln	Cys	Ile	Leu	Thr	Ser	Asp	Ala	
			50					55					60			
tgt	cct	gaa	act	ctt	cat	tct	caa	aca	cag	tcc	tct	agg	aaa	aat	tat	243
Cys	Pro	Glu	Thr	Leu	His	Ser	Gln	Thr	Gln	Ser	Ser	Arg	Lys	Asn	Tyr	
		65					70					75				
gct	gat	gca	aac	cgt	gta	tct	gck	atc	att	ttg	ggc	gga	ggc	act	gga	291
Ala	Asp	Ala	Asn	Arg	Val	Ser	Ala	Ile	Ile	Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	
	80					85					90					
tct	cag	ctc	ttt	cct	ctg	aca	agc	aca	aga	gct	acg	cct	gct	gta	cct	339
Ser	Gln	Leu	Phe	Pro	Leu	Thr	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Pro	Ala	Val	Pro	
	95				100					105					110	
gtt	gga	gga	tgt	tac	agg	ctt	att	gat	atc	cct	atg	agt	aac	tgc	ttc	387
Val	Gly	Gly	Cys	Tyr	Arg	Leu	Ile	Asp	Ile	Pro	Met	Ser	Asn	Cys	Phe	
				115					120					125		
aac	agt	ggt	ata	aat	aag	ata	ttt	gtg	atg	agt	cag	ttc	aat	tct	act	435
Asn	Ser	Gly	Ile	Asn	Lys	Ile	Phe	Val	Met	Ser	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	
			130					135					140			
tcg	ctt	aac	cgc	cat	att	cat	cgt	aca	tac	ctt	gaa	ggc	ggg	atc	aac	483
Ser	Leu	Asn	Arg	His	Ile	His	Arg	Thr	Tyr	Leu	Glu	Gly	Gly	Ile	Asn	
		145					150					155				
ttt	gct	gat	gga	tct	gta	cag	gta	tta	gcg	gct	aca	caa	atg	cct	gaa	531
Phe	Ala	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Val	Leu	Ala	Ala	Thr	Gln	Met	Pro	Glu	
	160					165					170					
gag	cca	gct	gga	tgg	ttc	cag	ggt	aca	gca	gac	tct	atc	aga	aaa	ttt	579
Glu	Pro	Ala	Gly	Trp	Phe	Gln	Gly	Thr	Ala	Asp	Ser	Ile	Arg	Lys	Phe	
	175				180					185					190	
atc	tgg	gta	ctc	gag	gat	tat	tac	agt	cac	aaa	tcc	att	gac	aac	att	627
Ile	Trp	Val	Leu	Glu	Asp	Tyr	Tyr	Ser	His	Lys	Ser	Ile	Asp	Asn	Ile	
				195				200						205		
gta	atc	ttg	agt	ggc	gat	cag	ctt	tat	cgg	atg	aat	tac	atg	gaa	ctt	675
Val	Ile	Leu	Ser	Gly	Asp	Gln	Leu	Tyr	Arg	Met	Asn	Tyr	Met	Glu	Leu	

210										215										220																				
gtg	cag	aaa	cat	gtc	gag	gac	gat	gct	gat	atc	act	ata	tca	tgt	gct	723																								
Val	Gln	Lys	His	Val	Glu	Asp	Asp	Ala	Asp	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Ala																									
225										230										235																				
cct	gtt	gat	gag	agc	cga	gct	tct	aaa	aat	ggg	cta	gtg	aag	att	gat	771																								
Pro	Val	Asp	Glu	Ser	Arg	Ala	Ser	Lys	Asn	Gly	Leu	Val	Lys	Ile	Asp																									
240										245										250																				
cat	act	gga	cgt	gta	ctt	caa	ttc	ttt	gaa	aaa	cca	aag	ggg	gct	gat	819																								
His	Thr	Gly	Arg	Val	Leu	Gln	Phe	Phe	Glu	Lys	Pro	Lys	Gly	Ala	Asp																									
255										260										265										270										
ttg	aat	tct	atg	aga	gtt	gag	acc	aac	ttc	ctg	agc	tat	gct	ata	gat	867																								
Leu	Asn	Ser	Met	Arg	Val	Glu	Thr	Asn	Phe	Leu	Ser	Tyr	Ala	Ile	Asp																									
275										280										285																				
gat	gca	cag	aaa	tat	cca	tac	ctt	gca	tca	atg	ggc	att	tat	gtc	ttc	915																								
Asp	Ala	Gln	Lys	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Ala	Ser	Met	Gly	Ile	Tyr	Val	Phe																									
290										295										300																				
aag	aaa	gat	gca	ctt	tta	gac	ctt	ctc	aag	tca	aaa	tat	act	caa	tta	963																								
Lys	Lys	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Lys	Ser	Lys	Tyr	Thr	Gln	Leu																									
305										310										315																				
cat	gac	ttt	gga	tct	gaa	atc	ctc	cca	aga	gct	gta	cta	gat	tay	agt	1011																								
His	Asp	Phe	Gly	Ser	Glu	Ile	Leu	Pro	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Tyr	Ser																									
320										325										330																				
gtg	cag	gca	tgc	att	ttt	acg	ggc	tat	tgg	gag	gat	gtt	gga	aca	atc	1059																								
Val	Gln	Ala	Cys	Ile	Phe	Thr	Gly	Tyr	Trp	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Ile																									
335										340										345										350										
aaa	tca	ttc	ttt	gat	gca	aac	ttg	gcc	ctc	act	gag	cag	cct	tcc	aag	1107																								
Lys	Ser	Phe	Phe	Asp	Ala	Asn	Leu	Ala	Leu	Thr	Glu	Gln	Pro	Ser	Lys																									
355										360										365																				
ttt	gat	ttt	tac	gat	cca	aaa	aca	cct	ttc	ttc	act	gca	ccc	cga	tgc	1155																								
Phe	Asp	Phe	Tyr	Asp	Pro	Lys	Thr	Pro	Phe	Phe	Thr	Ala	Pro	Arg	Cys																									
370										375										380																				
ttg	cct	ccg	acg	caa	ttg	gac	aag	tgc	aag	atg	aaa	tat	gca	ttt	atc	1203																								
Leu	Pro	Pro	Thr	Gln	Leu	Asp	Lys	Cys	Lys	Met	Lys	Tyr	Ala	Phe	Ile																									
385										390										395																				
tca	gat	ggg	tgc	tta	ctg	aga	gaa	tgc	aac	atc	gag	cat	tct	gtg	att	1251																								
Ser	Asp	Gly	Cys	Leu	Leu	Arg	Glu	Cys	Asn	Ile	Glu	His	Ser	Val	Ile																									
400										405										410																				
gga	gtc	tgc	tca	cgt	gtc	agc	tct	gga	tgt	gaa	ctc	aag	gac	tcc	gtg	1299																								
Gly	Val	Cys	Ser	Arg	Val	Ser	Ser	Gly	Cys	Glu	Leu	Lys	Asp	Ser	Val																									
415										420										425										430										

atg atg gga gcg gac atc tat gaa act gaa gaa gaa gct tca aag cta 1347
Met Met Gly Ala Asp Ile Tyr Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu
435 440 445

ctg tta gct ggg aag gtc ccr gtt gga ata gga agg aac aca aag ata 1395
Leu Leu Ala Gly Lys Val Pro Val Gly Ile Gly Arg Asn Thr Lys Ile
450 455 460

agg aac tgt atc att gac atg aat gct agg att ggg aag aac gtg gtg 1443
Arg Asn Cys Ile Ile Asp Met Asn Ala Arg Ile Gly Lys Asn Val Val
465 470 475

atc aca aac agt aag ggc atc caa gag gct gat cac ccg gaa gaa ggg 1491
Ile Thr Asn Ser Lys Gly Ile Gln Glu Ala Asp His Pro Glu Glu Gly
480 485 490

tac tcg tac tac ata agg tct gga atc gtg gtg atc ctg aag aat gca 1539
Tyr Ser Tyr Tyr Ile Arg Ser Gly Ile Val Val Ile Leu Lys Asn Ala
495 500 505 510

acc atc aac gat ggg tct gtc ata tagatcggt gcgtktgcg 1582
Thr Ile Asn Asp Gly Ser Val Ile
515

<210> 4
<211> 518
<212> PRT
<213> Zea mays

<400> 4
Met Gln Phe Ala Leu Ala Leu Asp Thr Asn Ser Gly Pro His Gln Ile
1 5 10 15

Arg Ser Cys Glu Gly Asp Gly Ile Asp Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ile
20 25 30

Gly Gly Arg Lys Lys Gln Glu Lys Ala Leu Arg Asn Arg Cys Phe Gly Gly
35 40 45

Ig Val Ala Ala Thr Thr Gln Cys Ile Leu Thr Ser Asp Ala Cys Pro
50 55 60

Glu Thr Leu His Ser Gln Thr Gln Ser Ser Arg Lys Asn Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ala Asn Arg Val Ser Ala Ile Ile Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gln
85 90 95

Leu Phe Pro Leu Thr Ser Thr Arg Ala Thr Pro Ala Val Pro Val Gly
100 105 110

Gly Cys Tyr Arg Leu Ile Asp Ile Pro Met Ser Asn Cys Phe Asn Ser
115 120 125

Gly Ile Asn Lys Ile Phe Val Met Ser Gln Phe Asn Ser Thr Ser Leu
130 135 140

Asn Arg His Ile His Arg Thr Tyr Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Ala
145 150 155 160

Asp Gly Ser Val Gln Val Leu Ala Ala Thr Gln Met Pro Glu Glu Pro
165 170 175

Ala Gly Trp Phe Gln Gly Thr Ala Asp Ser Ile Arg Lys Phe Ile Trp
180 185 190

Val Leu Glu Asp Tyr Tyr Ser His Lys Ser Ile Asp Asn Ile Val Ile
195 200 205

Leu Ser Gly Asp Gln Leu Tyr Arg Met Asn Tyr Met Glu Leu Val Gln
210 215 220

Lys His Val Glu Asp Asp Ala Asp Ile Thr Ile Ser Cys Ala Pro Val
225 230 235 240

Asp Glu Ser Arg Ala Ser Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Asp His Thr
245 250 255

Gly Arg Val Leu Gln Phe Phe Glu Lys Pro Lys Gly Ala Asp Leu Asn
260 265 270

Ser Met Arg Val Glu Thr Asn Phe Leu Ser Tyr Ala Ile Asp Asp Ala
275 280 285

Gln Lys Tyr Pro Tyr Leu Ala Ser Met Gly Ile Tyr Val Phe Lys Lys
290 295 300

Asp Ala Leu Leu Asp Leu Leu Lys Ser Lys Tyr Thr Gln Leu His Asp
305 310 315 320

Phe Gly Ser Glu Ile Leu Pro Arg Ala Val Leu Asp Tyr Ser Val Gln
325 330 335

Ala Cys Ile Phe Thr Gly Tyr Trp Glu Asp Val Gly Thr Ile Lys Ser
340 345 350

Phe Phe Asp Ala Asn Leu Ala Leu Thr Glu Gln Pro Ser Lys Phe Asp
355 360 365

Phe Tyr Asp Pro Lys Thr Pro Phe Phe Thr Ala Pro Arg Cys Leu Pro
370 375 380

Pro Thr Gln Leu Asp Lys Cys Lys Met Lys Tyr Ala Phe Ile Ser Asp
385 390 395 400

88
105 85

Gly Cys Leu Leu Arg Glu Cys Asn Ile Glu His Ser Val Ile Gly Val
405 410 415

Cys Ser Arg Val Ser Ser Gly Cys Glu Leu Lys Asp Ser Val Met Met
420 425 430

Gly Ala Asp Ile Tyr Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu Leu Leu
435 440 445

Ala Gly Lys Val Pro Val Gly Ile Gly Arg Asn Thr Lys Ile Arg Asn
450 455 460

Cys Ile Ile Asp Met Asn Ala Arg Ile Gly Lys Asn Val Val Ile Thr
465 470 475 480

Asn Ser Lys Gly Ile Gln Glu Ala Asp His Pro Glu Glu Gly Tyr Ser
485 490 495

r Tyr Ile Arg Ser Gly Ile Val Val Ile Leu Lys Asn Ala Thr Ile
500 505 510

Asn Asp Gly Ser Val Ile
515

<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 5
ctggatgtga actcaaggac tccgtg

26

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 6
ggcttaacta tgcggcatca gagg

24

86
86
86

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:
IPEA/ EP

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty and hereby elects all eligible States (except where otherwise indicated).

For International Preliminary Examining Authority use only			
Identification of IPEA		Date of receipt of DEMAND	
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference	
International application No. PCT/US01/06622	International filing date (day/month/year) 01/03/2001	(Earliest) Priority date (day/month/year) 01/03/2000	
Title of invention Transgenic Plants with Increased Seed Yield, Biomass and Harvest Index			
Box No. II APPLICANT(S)			
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) RESEARCH & DEVELOPMENT INSTITUTE, INC. 1711 West College Bozeman, Montana 59715 US		Telephone No.	
		Facsimile No.	
		Teleprinter No.	
		Applicant's registration No. with the Office	
State (that is, country) of nationality: US		State (that is, country) of residence: US	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) GIROUX, MICHAEL 1104 Mountain Ash Avenue Bozeman, Montana 59718			
State (that is, country) of nationality: US		State (that is, country) of residence: US	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) 			
State (that is, country) of nationality:		State (that is, country) of residence:	
☐ Further applicants are indicated on a continuation sheet.			

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The following person is ☒ agent ☐ common representativeand ☐ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.☒ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation.
The address must include postal code and name of country.)PERRY, ROBERT E.
Gill, Jennings & Every
Broadgate House
7 Eldon Street
London EC2M 7LH
England

Telephone No.

207-377-1377

Facsimile No.

207-377-1310

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

Statement concerning amendments:

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filed

the description

☐ as originally filed☐ as amended under Article 34

the claims

☐ as originally filed☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)☐ as amended under Article 34

the drawings

☐ as originally filed☐ as amended under Article 342. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of 20 months from the priority date unless the International Preliminary Examining Authority receives a copy of any amendments made under Article 19 or a notice from the applicant that he does not wish to make such amendments (Rule 69.1(d)). (This check-box may be marked only where the time limit under Article 19 has not yet expired.)

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: English

☒ which is the language in which the international application was filed.☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.☐ which is the language of publication of the international application.☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.

Box No. V ELECTION OF STATES

The applicant hereby elects all eligible States (that is, all States which have been designated and which are bound by Chapter II of the PCT)

excluding the following States which the applicant wishes not to elect:

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. (V), for the purposes of international preliminary examination:

- | | | | |
|--|---|-------|--------|
| 1. translation of international application | : | _____ | sheets |
| 2. amendments under Article 34 | : | _____ | sheets |
| 3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19 | : | _____ | sheets |
| 4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19 | : | _____ | sheets |
| 5. letter | : | _____ | sheets |
| 6. other (specify) | : | _____ | sheets |

For International Preliminary Examining Authority use only

received not received

☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|--|--|
| 1. ☐ fee calculation sheet | 5. ☐ statement explaining lack of signature |
| 2. ☐ original separate power of attorney | 6. ☐ sequence listing in computer readable form |
| 3. ☐ original general power of attorney | 7. ☐ other (specify): |
| 4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: | |

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).



Doran R. Pace

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.

☐ The applicant has been informed accordingly.

4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the period of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.

5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

89
109

MEMORIA DESCRIPTIVA
DE LA
SOLICITUD DE PATENTE
PCT EN FASE NACIONAL

SOBRE

**“ PLANTAS TRANSGENICAS QUE
PRESENTAN UN MAYOR RENDIMIENTO EN
SEMILLAS, UNA MAYOR BIOMASA Y UN
MAYOR INDICE DE COSECHA ”**

PRIORIDAD: US-09/516.250 De: **Marzo 01 de 2000**
SOLICITUD INTERNACIONAL: PCT/US 01/06.622 De: **Marzo 01 de 2001**

SOLICITADA POR: **RESEARCH & DEVELOPMENT INSTITUTE,
INC.**

DOMICILIO: **1711 West College, Bozeman, Montana 59715
- ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

APODERADA: **DRA.: MARGARITA CASTELLANOS A.**

PLANTAS TRANSGENICAS QUE PRESENTAN UN MAYOR RENDIMIENTO EN SEMILLAS, UNA MAYOR BIOMASA Y UN MAYOR INDICE DE COSECHA

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a la mejora de la producción de las plantas, tanto la producción de las semillas de las plantas como la producción de la biomasa de las plantas. Más específicamente, la presente invención se refiere a plantas transgénicas que presentan una mayor producción de semillas y una mayor producción de biomasa en comparación con las plantas no-transgénicas que tienen el mismo trasfondo genético. Más específicamente aún, la presente invención se refiere a plantas que son transgénicas de *Sh2-Rev6-HS*, y también se refiere a métodos para producir plantas de dicho tipo.

Antecedentes de la Invención

La ADP glucosa pirofosforilasa (AGP) es una de las enzimas primarias que intervienen en la biosíntesis del almidón y del glucógeno en los organismos tales como las plantas, algas, hongos y bacterias, en particular las plantas. La AGP cataliza la reacción siguiente:



La ADP-glucosa, que es el producto de la reacción precedente, es el principal donante de glucosa en la biosíntesis del almidón en las plantas y en la biosíntesis del glucógeno por las bacterias.

La AGP se halla ampliamente distribuida a través del reino vegetal. Se halla presente en las plantas monocotiledóneas tales como el trigo, arroz, cebada y maíz, como también en las plantas dicotiledóneas tales como la espinaca, papa y guisantes. También se la encuentra en algunas bacterias productoras de almidón, tales como el *E.coli*. La AGP de las plantas existe en forma de tetrámero (de 210 a 240 kDa) compuesto de dos subunidades pequeñas (de 50 a 55 kDa) y de dos subunidades grandes (de 51 a 60 kDa), a diferencia de la AGP bacteriana

que parece consistir en cuatro unidades de igual tamaño. También se ha demostrado que la AGP es producida en las cianobacterias y en las algas, en las cuales su estructura tetrámera es similar a la de las plantas, es decir dos subunidades grandes y dos subunidades pequeñas, en lugar de la estructura homotetrámera hallada en las bacterias comunes.

Debido a la importancia comercial del almidón, principalmente como materia alimenticia pero también como importante producto químico industrial, se han efectuado muchas investigaciones para aislar y caracterizar el ácido nucleico que codifica la AGP. La AGP de las plantas consiste en dos subunidades proteínicas diferentes. En el endosperma del maíz, la AGP es codificada por los genes Shrunken-2 (Sh2) y Brittle-2 (Bt2) (Bhave et al., 1990 y Bae et al., 1990). El Sh2 codifica la subunidad grande que tiene un peso molecular previsto de 57.179 Da, mientras que el Bt2 codifica la subunidad pequeña que tiene un peso molecular de 52.224 Da. La aislación de los ácidos nucleicos que codifican las AGPs de diversas otras plantas también ha sido objeto de informes: el ADNc de la subunidad pequeña (Anderson et al., 1989), y el ADN genómico (Anderson et al., 1991), del arroz; los ADNcs de las subunidades pequeñas y grandes de la hoja de espinaca (Morell et al., 1988); y los ADNcs de las subunidades pequeñas y grandes del tubérculo de la papa (Muller-Rober et al., 1990; y Nakata et al., 1991).

Por otra parte, se ha investigado cómo alterar la expresión de la AGP en las plantas, a efectos de regular la síntesis del almidón. En el documento EP 455.316 se provee un plásmido que comprende un ADN que codifica la AGP colocada en una orientación invertida, siendo el resultado la transcripción del ARNm anti-sentido en una planta anfitriona. Dicha patente muestra que las papas transgénicas que comprenden el plásmido presentan una menor actividad de la AGP y una menor concentración del almidón en comparación con las plantas no transformadas. La Patente de los Estados Unidos número 5.773.693 revela un

método para incrementar el contenido de la sucrosa en la planta del guisante mediante la supresión o reducción de la expresión de una cualquiera o de ambas subunidades de AGP. El método comprende la transformación de una planta de guisante mediante un plásmido que comprende ácido nucleico que codifica la subunidad Sh2 o Bt2, o ambas, en una orientación anti-sentido con respecto al promotor y al terminador.

En cambio, la Patente de los Estados Unidos No. 5.977.437 enseña un método para incrementar la velocidad y/o el rendimiento de la producción de almidón en una planta, que comprende introducir en una planta un ácido nucleico que codifica la AGP del endosperma de la cebada vinculada operativamente a un péptido plástido de tránsito. El documento EP 634.491 revela un método para disminuir el contenido de aceite en las semillas mediante el incremento de la cantidad de almidón, que comprende transformar una célula vegetal mediante un ácido nucleico que comprende un promotor, y un ADN que codifica una proteína de fusión que comprende un péptido plástido de tránsito, amino terminal, una enzima AGP, y una secuencia de terminación de transcripción 3' no traducida, obteniéndose células vegetales transformadas, y regenerándose plantas transformadas a partir de las células vegetales transformadas. Finalmente, en la Patente de los Estados Unidos No. 5.792.290 se revela el ácido nucleico que codifica la AGP del trigo, y se enseña la inserción de copias extras del gen de AGP en un genoma de planta mediante transformación a efectos de reforzar la producción del almidón, y la inserción del complemento del ARNm que codifica la AGP endógena a efectos de reducir la producción del almidón.

El endosperma del maíz es el sitio de mayor deposición de almidón durante el desarrollo del grano de cereal. Los mutantes del endosperma del maíz, el Sh2 y el Bt2, tienen contenidos de almidón considerablemente reducidos, correspondientes a niveles deficientes de actividad de AGP. Las mutaciones de

ambos genes han demostrado reducir la actividad de AGP en aproximadamente el 95 % (Tsai et al., 1966; Dickinson et al., 1969). La falta de AGP y una disminución de los niveles de almidón, en comparación con los del endosperma de tipo salvaje, tienen como resultados granos encogidos, frágiles y/o colapsados en momentos de la madurez de las semillas. Además, se ha observado que las actividades enzimáticas aumentan con la dosificación de los alelos *Sh2* y *Bt2* funcionales de tipo salvaje, mientras que las enzimas mutantes tienen propiedades cinéticas alteradas.

La AGP es el paso limitador de la velocidad, en la biosíntesis del almidón en las plantas. Stark et al. colocaron una forma mutante de AGP de *E.coli* en tubérculos de papa y obtuvieron un incremento del 35 % en el contenido de almidón (Stark et al., 1992). La AGP es una enzima alostérica, es decir, su actividad es regulada mediante la vinculación de un efector con un sitio alostérico. En las plantas, el efector positivo de la AGP es el 3-fosfoglicerato (3-PGA), y el efector negativo es el fosfato (Dickinson et al., 1969). La inhibición de AGP por el fosfato es verosímilmente la principal limitación sobre la biosíntesis del almidón en las plantas (Giroux et al., 1996).

Giroux et al. (1996; Patentes Estadounidenses No. 5.872.216 y 5.589.618, cada una de las cuales es incorporada en la presente en su totalidad, a título de referencia) han utilizado in vivo, una mutagénesis sitio-específica para crear breves mutaciones de inserción en una región del gen de la cual se sabe que interviene en la regulación alostérica de AGP. Las mutaciones simples del gen *Sh2* que contienen una inserción de un residuo tirosina o serina adicional tuvieron como resultado una reducción de la actividad de AGP y de la cantidad de proteína SH2. Un revertante específico que contiene un residuo tirosina adicional y un residuo serina adicional, incrementaron el peso de las semillas en un 11-18%. Estos últimos revertantes recibieron la designación de "*Sh2-m1Rev6*" (en la

presente, este gen recibe la designación "*Sh2-Rev6*"). Giroux et al. (1996) también han descubierto que el incremento del peso de las semillas del *Sh2-m1Rev6* no debía atribuirse solamente a un aumento del contenido de almidón, si bien hubo un incremento en el contenido absoluto de almidón en la variante que expresaba el *Sh2-m1Rev6*. Giroux et al. (1996) han sugerido que la mayor síntesis del almidón causada por el *Rev6* crea un mayor hundimiento en la semilla, lo cual lleva a una mayor síntesis de los otros componentes de la semilla. Las mutaciones en AGP que confieren una mayor estabilidad térmica a una planta que expresa AGP mutante, han sido reveladas en la Patente Estadounidense No. 6.069.300 y en la solicitud PCT publicada WO 99/58698.

La modulación de la resistencia al hundimiento de una planta es uno de los métodos para incrementar el rendimiento de la cosecha. Las hojas y otros tejidos verdes activos en la fotosíntesis, reciben comúnmente la designación de "fuente", y aquellas partes en las cuales tiene lugar el almacenamiento, reciben la designación de "hundimiento". En aquellos cereales tales como el maíz, arroz y trigo, el hundimiento principal es el endosperma, y el peso individual de las semillas es un determinante primario de rendimiento del grano (Duvick et al., 1992). Tal como ha sido puesto en evidencia por Giroux et al. (1996) el hacer que la AGP del endosperma del maíz sea insensible a la inhibición debida al fosfato, incrementa el peso individual de las semillas sin afectar drásticamente el contenido del almidón (Patentes Estadounidenses Nos. 5.650.557 y 5.872.216).

A lo largo de los años, el deseo de obtener elevados rendimientos biológicos ha suscitado un interés por manipular la estructura de las plantas a efectos de obtener plantas en las cuales las formas de las partes económicamente útiles constituyan una proporción de las plantas tan amplia como sea compatible con el vigor y salud aceptables de las plantas. Las tentativas por aumentar el rendimiento mediante la alteración de la contribución relativa de los

diferentes componentes del rendimiento de los granos, tal como las orejas o cabezas por planta, granos por cabeza o granos por oreja, tamaño de los granos, etcétera, han demostrado carecer éxito debido a que los incrementos en uno de los componentes tienden a ser acompañados por reducciones en otro componente (Wilson, D. (1981) Plant Breeding II. K. Frey Edited, Iowa, Iowa State University Press, pág. 255). Sin embargo, los incrementos de rendimiento debidos a un incremento en la proporción del grano con respecto a las partes vegetativas, han sido comunes en los cultivos de cereales (Wilson, D. (1981) Plant Breeding II, K. Frey Edited, Iowa, Iowa State University Press, pág. 255).

Langer y Hill (Langer, R.H.M. y Hill, G.D. (1991), Agricultural Plants, segunda Edición, Cambridge, Cambridge University Press, pág. 341), afirman que es posible obtener mayores rendimientos mediante la mejora del Índice de Cosecha (HI, Harvest Index), ya que el HI vincula el rendimiento biológico (Y_{biol}) con el rendimiento económico (Y_{econ}), de la siguiente manera:

$$Y_{biol} \times HI = Y_{econ}$$

Cabe destacar que los tratamientos que afectan al HI también afectarán al Y_{biol} , pero no necesariamente en el mismo grado o en el mismo sentido. Por ejemplo, en los cereales es posible incrementar los rendimientos biológicos mediante la aplicación de nitrógeno a poblaciones de alta densidad en la presencia de agua adecuada. El resultado previsto es un pesado crecimiento vegetativo, pero una reducida transmisión luminosa en la copa o dosel, una pobre formación de los granos y un pobre desarrollo conducirán a un bajo índice de cosecha. En cambio, los cereales de paja corta se caracterizan por un índice de cosecha más elevado. Los cultivares cortos y erguidos de arroz que rinden de 4 a 5 t por hectárea⁻¹ han demostrado tener un Índice de Cosecha de aproximadamente 0,53 a 0,56, a diferencia de 0,39 a 0,42 para los cultivares altos frondosos con un rendimiento de aproximadamente 2,4 ton de granos por

hectárea (Langer, R. H. M. y Hill, G. D. (1991), Agricultural Plants Segunda Edición, Cambridge, Cambridge University Press, pág. 341). Similarmente, en el caso del trigo, los cultivares de tipo enano y semi-enano procedentes del programa de cultivo de plantas mejicanas, tienen un índice de cosecha más elevado. Sin embargo, las plantas cortas también pueden producir poco grano. Por lo tanto, es necesario evaluar tanto el rendimiento biológico como el Índice de Cosecha en los programas de cultivo y selección de plantas.

La presente invención provee un método para incrementar la producción de las semillas y para incrementar la producción de la biomasa de las plantas. Más específicamente, la presente invención provee plantas transgénicas que tienen una mayor cantidad total de semillas, semillas de mayor peso individual, un mayor peso total de semillas por planta, como también una mayor biomasa aérea de la planta, y un mejor Índice de Cosecha en comparación con las plantas no transgénicas que tienen el mismo antecedente genético. La producción de plantas con incrementos en todos estos parámetros como resultado de un transgen, es bastante imprevista si se tienen en cuenta las relaciones normales entre fuente y hundimiento en las plantas.

Breve Resumen de la Invención

La presente invención provee métodos para producir plantas que tienen una mayor producción de plantas, tanto en cuanto la producción de las semillas de la planta, como en cuanto a la producción de biomasa de la planta. La presente invención también provee plantas producidas mediante los métodos revelados, siendo las plantas de tipo monocotiledóneo y de tipo dicotiledóneo.

Más específicamente, la presente invención provee métodos para incrementar la cantidad de las semillas producidas por las plantas, incrementar la biomasa producida por las plantas, o incrementar el índice de cosecha de las plantas mediante la introducción, en dichas plantas, de un ácido nucleico

operativamente vinculado a un promotor; siendo el ácido nucleico el del *SH2-REV6-HS* (SEC ID NO:3), un ácido nucleico que se hibridiza con el *SH2-REV6-HS* bajo condiciones de alta severidad y que codifica un polipéptido que retiene la actividad biológica de la proteína *SH2-REV6-HS* (SEC ID NO: 4), un fragmento de *SH2-REV6-HS* que codifica un péptido que retiene la actividad biológica del *SH2-REV6-HS*, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO:4, o un fragmento de la misma que retiene la actividad biológica del *SH2-REV6-HS*, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido *SH2HS* o *SH2RTS*. Es preferible que el polipéptido *SH2HS* sea el polipéptido *SH2HS33*. Los métodos incluyen además el cultivar las plantas producidas mediante dichos métodos. La presente invención también incluye las plantas producidas mediante dichos métodos.

Los métodos de la presente invención son aplicables a las plantas monocotiledóneas tales como el arroz, el trigo, cebada, avenas, sorgo y mijo y a las plantas dicotiledóneas tales como los guisantes, alfalfa, trébol de pata de pájaro, garbanzo, achicoria, trébol, col, lenteja, hierba de las praderas, pimpinela pequeña, soja y lechuga.

La invención también provee métodos para incrementar el peso de la hoja bandera de las plantas monocotiledóneas mediante la introducción en dichas plantas de un ácido nucleico operativamente vinculado a un promotor; siendo el ácido nucleico el del *SH2-REV6-HS* (SEC ID NO:3), un ácido nucleico que se hibrida con el *SH2-REV6-HS* bajo condiciones de alta severidad y que codifica un polipéptido que retiene la actividad biológica de la proteína *SH2-REV6-HS* (SEC ID NO: 4), un fragmento de *SH2-REV6-HS* que codifica un péptido que retiene la actividad biológica del *SH2-REV6-HS*, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO:4, o un fragmento de la misma que retiene la actividad biológica de *SH2-REV6-HS*, o un ácido nucleico que codifica

un polipéptido SH2HS o SH2RTS. Es preferible que el polipéptido SH2HS sea el polipéptido SH2HS33. Los métodos incluyen además el cultivar las plantas producidas mediante dichos métodos. La presente invención también incluye las plantas producidas mediante dichos métodos.

La invención también provee métodos para incrementar la cantidad de cabezas de semillas producidas por las plantas monocotiledóneas mediante la introducción en dichas plantas de un ácido nucleico operativamente vinculado a un promotor; siendo el ácido nucleico el del *SH2-REV6-HS* (SEC ID NO:3), un ácido nucleico que se hibrida con el *SH2-REV6-HS* bajo condiciones de alta severidad y que codifica un polipéptido que retiene la actividad biológica de la proteína SH2-REV6-HS (SEC ID NO: 4), un fragmento de *SH2-REV6-HS* que codifica un péptido que retiene la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO:4, o un fragmento de la misma que retiene la actividad biológica del SH2-REV6-HS, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido SH2HS o SH2RTS. Es preferible que el polipéptido SH2HS sea el polipéptido SH2HS33. Los métodos incluyen además el cultivar las plantas producidas mediante dichos métodos. La presente invención también incluye las plantas producidas mediante dichos métodos.

La invención provee también métodos para incrementar dos o más rasgos de plantas dicotiledóneas mediante la introducción en dichas plantas de un ácido nucleico operativamente vinculado a un promotor; siendo el ácido nucleico el del *SH2-REV6-HS* (SEC ID NO:3), un ácido nucleico que se hibrida con el *SH2-REV6-HS* bajo condiciones de alta severidad y que codifica un polipéptido que retiene la actividad biológica de la proteína SH2-REV6-HS (SEC ID NO: 4), un fragmento de *SH2-REV6-HS* que codifica un péptido que retiene la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO:4, o un fragmento de la misma que retiene la actividad

biológica del SH2-REV6-HS, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido SH2HS o un polipéptido SH2RTS. Es preferible que el polipéptido SH2HS sea el polipéptido SH2HS33. Los métodos incluyen además el cultivar las plantas producidas mediante dichos métodos. La presente invención también incluye las plantas producidas mediante dichos métodos.

La invención también provee métodos para incrementar el rendimiento de dos o más rasgos de las plantas monocotiledóneas mediante la introducción en dichas plantas de un ácido nucleico operativamente vinculado a un promotor; siendo el ácido nucleico el del *SH2-REV6-HS* (SEC ID NO:3), un ácido nucleico que se hibrida con el *SH2-REV6-HS* bajo condiciones de alta severidad y que codifica un polipéptido que retiene la actividad biológica de la proteína SH2-REV6-HS (SEC ID NO: 4), un fragmento de *SH2-REV6-HS* que codifica un péptido que retiene la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO:4, o un fragmento de la misma que retiene la actividad biológica del SH2-REV6-HS, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido SH2HS o un polipéptido SH2RTS. Es preferible que el polipéptido SH2HS sea el polipéptido SH2HS33. Los métodos incluyen además el cultivar las plantas producidas mediante dichos métodos. La presente invención también incluye las plantas producidas mediante dichos métodos.

La invención incluye además cruzar las plantas obtenidas mediante los métodos anteriormente mencionados, con una o más plantas distintas, y cultivar y cosechar la semilla que se obtiene como resultado de los cruces.

La presente invención incluye además cosechar las semillas producidas mediante el selfing de las plantas obtenidas mediante los métodos anteriormente mencionados, y cultivar la semilla cosechada.

120 100
100

La presente invención provee plantas que incluyen un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del SH2-REV6-HS (SEC ID NO: 4) o un fragmento de la misma que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS.

La presente invención provee plantas que incluyen un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína SH2HS o una proteína SHRTS, o un fragmento del mismo que conserva la actividad biológica de una proteína SH2HS o una proteína SH2RTS. En una forma de realización preferida, el polipéptido SH2HS tiene la secuencia de aminoácidos del SH2HS33.

Breve Descripción del Dibujo

La Figura 1 muestra un análisis de Northern blot de líneas de arroz transgénicas *Sh2-Rev6-HS*.

Descripción detallada de la Invención

1.- Definiciones

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "AGP" significa ADP glucosa pirofosforilasa.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "alelo" se refiere a cualquiera de entre diversas formas alternativas de un gen.

Tal como se lo utiliza en la presente, la expresión "actividad biológica" se refiere a cualquier actividad funcional de un polipéptido SH2 mutante de la invención, como ser los polipéptidos SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS. La actividad funcional de los polipéptidos en cuestión incluye, pero no se limita a, un incremento de la cantidad total de semillas, el incremento del peso individual de las semillas, el incremento del peso total de las semillas por planta, el incremento de la biomasa aérea de las plantas, el incremento del Índice de Cosecha, y la insensibilidad al fosfato, y una mayor estabilidad térmica.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "*Bt2*" se refiere al gen Brittle-2 que codifica la subunidad pequeña de AGP. Tal como se lo utiliza en la

1.37
+01
-01

presente, el término "*bt2*" se refiere a una forma mutante del gen *Bt2*, que hace que los granos del maíz sean de una textura frágil al ser secados.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "cereal" significa, en función del contexto, ya sea: 1) una planta gramínea, tal como maíz, o: 2) el grano de una planta gramínea.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "planta de cultivo" se refiere a cualquier planta cultivada por cualquier razón comercial, lo cual incluye, pero no se limita a, las finalidades siguientes: producción de semillas, producción de granos, producción de heno, usos ornamentales, producción de frutas, producción de bayas, producción de legumbres, producción de aceite, producción de proteínas, producción de forraje, ensilado, pastoreo, campos de golf, céspedes, producción de flores, paisajismo, control de la erosión, abono verde, mejora de las condiciones de cultivo/salud del suelo, producción de productos y drogas farmacéuticas, producción de aditivos para alimentos, productos para fumar, producción de pulpa y producción de maderas. Las plantas de cultivo particulares de interés para la presente invención incluyen, pero no se limitan, a: trigo, arroz, maíz, cebada, centeno, remolacha azucarera, patatas, batatas, soja, algodón, tomates, canola y tabaco.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "polinización cruzada" o "entrecruzado" se refiere a que el polen de una flor en una planta es aplicado (natural o artificialmente) al óvulo (estigma) de una flor en otra planta.

Tal como se lo utiliza en la presente, la expresión "cultivar" se refiere a una variedad, cepa o raza, de planta que haya sido producida mediante técnicas hortícolas o agrícolas y que normalmente no se encuentra en las poblaciones salvajes.

Tal como se los utiliza en la presente, los términos "dicotiledóneas", "dicotiledones" o "dicot" son sinónimos y se refieren a cualquiera de diversas

22 102
102

plantas florescentes que tiene dos hojas de semilla embriónicas o cotiledones que usualmente aparecen en la germinación. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tabaco, soja, papa, batata, rábano, lechuga, colza y manzanos.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "hoja bandera" se refiere a la hoja más superior en un tallo o caña frutante (fértil); la hoja inmediatamente debajo de la inflorescencia o cabeza de semilla.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "genotipo" se refiere a la composición genética de una célula individual, cultivo de células, planta, o grupo de plantas.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "grano" se refiere, en función de su contexto, a: 1) las gramíneas cereales consideradas como un grupo; o 2) el fruto de una o más de las gramíneas cereales.

Tal como se los utiliza en la presente, los términos "gramínea/s" se refiere a una planta que pertenece a la familia de las Poáceas.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "Índice de Cosecha" es la proporción de masa total vegetal cosechada. Es la relación entre el peso del grano/(peso del grano más el peso de la planta). Esto es idéntico al HI anteriormente mencionado (ver también, Langer y Hill, 1991), en lo cual HI vincula el rendimiento biológico y el rendimiento económico, e HI es la relación entre los rendimientos económico/biológico. El rendimiento económico (Y_{econ}) es el peso del grano, mientras que el rendimiento biológico (Y_{biol}) es el peso del grano más el peso de la planta. El peso del grano es sinónimo del peso total de la semilla.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "heterocigoto" se refiere a una célula o planta individual diploide o poliploide que tiene alelos (formas de un gen dado) diferentes en por lo menos un lugar.

103
123
103

Tal como se lo utiliza en la presente, el termino "heterocigo" se refiere a la presencia de diferentes alelos (formas de un gen dado) en un lugar de gen particular.

Tal como se lo utiliza en la presente, el termino "homocigoto" se refiere a una célula o planta individual que tiene los mismos alelos en uno o más lugares.

Tal como se lo utiliza en la presente, el termino "homocigo" se refiere a la presencia de alelos idénticos en uno o más lugares en segmentos cromosómicos homólogos.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "híbrido" se refiere a cualquier planta individual que resulte de un cruce entre progenitores que difieran en uno o más genes.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "endógamo" o "línea endógama" se refiere a una cepa relativamente de casta.

Tal como se lo utiliza en la presente, se afirma que una molécula de ácido nucleico está "aislada" cuando la molécula de ácido nucleico está sustancialmente separada de ácido nucleico contaminante que codifique otros polipéptidos que no son la fuente de ácido nucleico.

Tal como se los utiliza en la presente, la expresión "línea", referida a un tipo de planta, significa plantas auto- fertilizantes o de fertilización cruzada, y apomictos facultativos de línea simple, que tienen ampliamente el mismo trasfondo genético, que son similares en sus características esenciales y distintivas.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "lugar o locus" (pluralidad: "loci") se refiere a cualquier sitio que ha sido definido genéticamente. Un lugar puede ser un gen, o parte de un gen, o una secuencia de ADN que tenga algún rol regulador, y puede estar ocupado por diferentes secuencias.

104
124
100

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "selección de masas" se refiere a una forma de selección en la cual las plantas individuales son seleccionadas y la siguiente generación es propagada del agregado de sus semillas.

Tal como se los utiliza en la presente, los términos "monocotiledóneas", "monocotiledones" o "monocot" son sinónimos y se refieren a cualquiera de diversas plantas florescentes que tiene un único cotiledón en la semilla. Los ejemplos de monocotiledóneas incluyen, pero no se limitan a, arroz, trigo, cebada, maíz y lirios.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "Northern Blot" se refiere al análisis de ARN por electroforésis de ARN en geles de agarosa para fraccionar el ARN de acuerdo con tamaño seguido por transferencia del ARN a partir de gel a un soporte sólido, tal como nitrocelulosa o membrana de nilón. El ARN inmovilizado es seguidamente sondeado mediante una sonda rotulada para detectar especies del ARN complementarias a la sonda utilizada. Las manchas Northern son una herramienta standard de los biólogos moleculares (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1985).

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "polinización abierta" se refiere a una población de plantas que se halla libremente expuesta a algún flujo de genes, a diferencia de la polinización cerrada en la cual existe una barrera efectiva contra el flujo de los genes.

Tal como se utiliza en la presente, las expresiones "población de polinización abierta", o "variedad de polinización abierta" significan plantas normalmente capaces de por lo menos alguna fertilización cruzada, seleccionadas de acuerdo con un estándar, que pueden mostrar una variación pero que también tienen una o más características genotípicas o fenotípicas

105
125
100

mediante las cuales la población o la variedad puede ser diferenciada de otros. Un híbrido que no tiene barreras a la polinización cruzada es una población de polinización abierta, o una variedad de polinización abierta.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "óvulo" se refiere al gametofito hembra, mientras que el término "polen" se refiere al gametofito macho.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "fenotipo" se refiere a las características observables de una célula individual, cultivo de células, planta, o grupo de plantas, que resulte de la interacción entre aquella composición genética individual (es decir, genotipo) y el entorno.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "progenie" se refiere a los descendientes de una planta en particular (auto-cruce) o par de plantas (cruzadas o retro-cruzadas). Los descendientes pueden ser de la generación F_1 , F_2 , o de cualquier generación subsiguiente. Típicamente, los progenitores son el donante del polen y el donante del óvulo que son cruzados para obtener la planta progenie de la presente invención. Los progenitores se refieren también a los progenitores F_1 de una planta híbrida de la presente invención (las plantas F_2). Finalmente, los progenitores se refieren a un progenitor recurrente que es retrocruzado a plantas híbridas de la presente invención a efectos de producir otra planta híbrida de la presente invención.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "Reacción en Cadena de Polimerasa" es sinónima de "RCP" y se refiere a técnicas en las cuales se utilizan los ciclos de desnaturalización, "annealing" [proceso de enfrentamiento y apareamiento de dos hebras de nucleótidos o parte de esas hebras] con cebadores de oligonucleótidos, y extensión con polimerasa de ADN, para ampliar la cantidad de copias de una secuencia de ADN objetivo.

Tal como se lo utiliza en la presente, el termino "revertante" se refiere a un gen *Sh2* mutado (es decir, mutado con respecto al gen *Sh2* de tipo salvaje) en el cual el mutante resulta en un fenotipo de grano de tipo salvaje (es decir, una semilla rechoncha, no una semilla encogida tal como el fenotipo mostrado por el genotipo mutante *sh2sh2*). Un genotipo revertante tendría más actividad de AGP que un genotipo *sh2sh2* y puede tener más o menos actividad de AGP que un genotipo *Sh2* de tipo salvaje. Típicamente, los revertantes tienen un fenotipo de semilla de tipo salvaje con por lo menos alrededor del 30 % de actividad de AGP en comparación con el tipo salvaje normal (es decir, no revertante). En algunos casos, el término "revertante" puede referirse a la célula o planta que contiene el gen *Sh2* mutado.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "arroz" se refiere a cualquiera de las especies *Oryza*, lo cual incluye, pero no se limita a, *O. Sativa*, *O. Glaberrima*, *O. perennis*, *O. nivara*, y *O. breviligulata*. Por lo tanto, tal como se lo utiliza en la presente, la expresión "arroz" se refiere a cualquier tipo de arroz, lo cual incluye, pero no se limita a, cualquier arroz cultivado, cualquier arroz salvaje, cualesquiera cruces de arroz intra- e inter-especies, todas las variedades de arroz, todos los genotipos de arroz y todos los cultivares de arroz.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "auto polinizado" o "autopolinización" significa que el polen de una flor en una planta es aplicado (artificial o naturalmente) al óvulo (estigma) de la misma flor, o de otra flor, en la misma planta.

Tal como se lo utiliza en la presente, el termino "*Sh2*" se refiere al gen Shrunken-2 que codifica la subunidad grande de AGP. A veces puede el término referirse a la célula o planta que contiene el genotipo *Sh2*.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "*sh2*" se refiere a una forma mutante del gen *Sh2*, que hace que los granos de maíz se encojan o colapsen al

107
127
P2

secarse. A veces puede el termino referirse a la célula o planta que contiene el genotipo *Sh2*.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "*Sh2hs*" se refiere a los mutantes del gen *Shrunken-2* que codifican variantes termo-estables de la AGP del endosperma del maíz. A veces puede el termino referirse a la célula o planta que contiene el genotipo *Sh2hs*. El termino "SH2HS" se refiere a polipéptidos codificados por *Sh2hs*. Una realización preferida considerada en la presente invención se refiere al gen *Sh2hs33* que codifica el polipéptido que en la presente recibe la designación SH2HS33. El polipéptido SH2HS33 contiene la mutación HS33 descrita en la Patente de los Estados Unidos No, 6.069.300 y en la solicitud de PCT publicada WO 99/586698. Otras realizaciones contempladas para el empleo en los métodos de la presente invención incluyen, aunque sin limitarse a, los polinucleótidos *Sh2hs13*, *Sh2hs14*, *Sh2hs16*, *Sh2hs39*, *Sh2hs40* y *Sh2hs47* los cuales codifican a los polipéptidos designados en la presente SH2HS13, SH2HS14, SH2HS16, SH2HS39, SH2HS40 y SH2HS47, respectivamente. Los polipéptidos SH2HS13, SH2HS14, SH2HS16, SH2HS39, SH2HS40 y SH2HS47 contienen las mutaciones HS13, HS14, HS16, HS39, HS40 y HS47, respectivamente, que se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 6.069.300 y en la solicitud de PCT publicada WO 99/586698.

Como se utiliza en la presente, el término "*Sh2rts*" se refiere a mutantes revertantes sensibles a la temperatura del gen *Shrunken-2* los cuales codifican variantes termo-estables de AGP del endoesperma de maíz. Algunas veces, el término puede hacer referencia a la célula o planta que contiene el genotipo *Sh2rts*. El término "SHRTS" se refiere a polipéptidos codificados por *Sh2rts*. Ejemplos de realizaciones contempladas para uso en los métodos de la presente invención incluyen, aunque no se limitan a, los polinucleótidos *Sh2rts48-2* y *Sh2rts60-1* los cuales codifican los polipéptidos a los que se hace referencia en la

presente como SH2RTS48-2 y SH2RTS60-1, respectivamente. Los polipéptidos SH2RTS48-2 y SH2RTS60-2 contienen las mutaciones RTS48-2 y RTS60-2, respectivamente, descritas en la patente de los Estados Unidos No. 6.069.300 y en la solicitud de PCT publicada WO 99/586698.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "*Sh2hs33*" se refiere a una mutación de un solo punto en *Sh2* que aumenta la estabilidad de AGP del endosperma del maíz mediante interacciones acentuadas entre las subunidades. La mutación es un cambio de His-a-Tyr en la posición de aminoácidos 333 (Greene y Hannah, 1998). A veces el término puede referirse a la célula o planta que contiene el genotipo *Sh2Hs33*.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "*Sh2-Rev6*" es sinónima de "*Sh2-m1-Rev6*" y se refiere a las variantes del gen *Shrunken-2*. El producto polipéptido del gen *Sh2-Rev6* contiene dos aminoácidos adicionales, la tirosina y la serina, insertadas entre los aminoácidos 494 y 495 del polipéptido *Sh2* de tipo salvaje. El endosperma de maíz codificado por *Sh2-Rev6* expresa una AGP que es insensible a fosfato y que tiene como resultado un mayor peso de las semillas del maíz (Giroux et al., 1996; Patentes Estadounidenses No. 5.650.557 y 5.872.216). A veces el término puede referirse a la célula o planta que contiene el genotipo *Sh2-Rev6*.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "*Sh2-Rev6-HS*" es sinónima de "*Sh2-m1Rev6-HS*" y se refiere a una variante termo-estable del gen *Sh2-Rev6*, en la cual His ha sido sustituido por Tyr en la posición 333. A veces puede el término referirse a la célula o planta que contiene el genotipo *Sh2-Rev6-HS*. La mutación HS33 de AGP de maíz, junto con otras mutaciones que confieren estabilidad térmica, han sido reveladas en la Patente Estadounidense No. 6.069.300 y en la solicitud PCT publicada WO 99/58698, y se las considera específicamente para ser utilizados en los métodos de la presente invención.

Tal como se utiliza en la presente, el término "*Sh2hs33*" se refiere a una variante genética termoestable específica del *Sh2*. La variante contiene una mutación His a Tyr en la posición 333 del gen *Sh2* del maíz de tipo salvaje (Greene y Hannah, 1998). La mutación hace que la actividad de AGP del endosperma del maíz sea termoestable. A veces puede el término referirse a la célula o planta que contiene el genotipo *Sh2hs33*.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "encogido y frágil" describe la morfología de tipos específicos de granos de un maíz. En un grano frágil y encogido, el endosperma se halla considerablemente colapsado. Por ello, el endosperma antes del secado es como un saco lleno de líquido que se desarrolla con poco almidón. Durante el secado, el grano se encoge y colapsa en forma de una estructura angular con marcadas concavidades y textura frágil (Coe et al., 1988).

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "sintético" se refiere a un conjunto de progenies derivadas intercruzando un conjunto específico de clones o líneas propagadas mediante semillas. Un sintético puede contener mezclas de semillas resultantes de una fertilización cruzada, auto-fertilización, y fertilización sib.

Tal como se los utiliza en la presente, los términos " T_1 , T_2 , T_3 ,..." se refieren a generaciones sucesivas de células o plantas que se rastrean hacia atrás a una línea de células derivadas de cultivos de tejidos particulares o transformadas, designadas como T_0 , o la generación progenitora. En cuanto a las plantas, las plantas producidas directamente a partir de las células transformadas reciben la designación de generación T_0 . Las semillas producidas mediante selfing de las plantas de la generación T_0 reciben la denominación de semillas T_1 . Cuando las semillas T_1 han germinado, las plantas resultantes reciben la designación de

generación T_1 ó progenie T_1 . Las semillas producidas por la generación T_1 reciben la designación de semillas T_2 .

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "retoño" se refiere a un brote lateral que surge a nivel del terreno. Cada uno de los retoños que fueron contados en los estudios de la presente, tenía una cabeza en el vástago del brote.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "transformación" se refiere a la transferencia de ácido nucleico (es decir, de un polímero nucleótido) en una célula. Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "transformación genética" se refiere a la transferencia e incorporación de ADN, especialmente ADN recombinante, en una célula.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "transgénico" se refiere a células, cultivos de células, plantas, y progenie de plantas que han recibido una secuencia de ácido nucleico, extraña o modificada, mediante uno de los diversos métodos de transformación, en los cuales la secuencia de ácidos nucleicos, extraña o modificada, es de la misma especie, o de una especie diferente, que la especie de la planta que recibe la secuencia de ácido nucleico extraña o modificada. El ácido nucleico extraño o modificado, utilizado para producir dichas células transgénicas, cultivos de células, plantas y progenie de dichas plantas, incluye genes, fragmentos de genes como también secuencias de ácidos nucleicos que codifican un producto que tiene por lo menos una actividad o función biológica. Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "planta transgénica" y "planta transformada", son sinónimas, como también lo son los términos "línea transgénica" y "línea transformada". Tal como se las utiliza en la presente, las frases "planta correspondiente no-transgénica" y "línea correspondiente no transgénica", se refieren a las células, cultivos de células, plantas y progenie de plantas que no han recibido el gen extraño o modificado

131 #

que si han recibido las células "transgénicas", cultivos de células, plantas y progenie de plantas.

Tal como se la utiliza en la presente, el término "variedad" significa una subdivisión de una especie, que consiste en el grupo de individuos dentro de la especie que son distintos en forma o función de disposiciones similares de individuos.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "trigo" se refiere a cualquier especie de *Triticum*, lo cual incluye, pero no se limita a: *T. aestivum*, *T. monococcum*, *T. tauschii* y *T. turgidum*. Por lo tanto, tal como se lo utiliza en la presente, el término "trigo" se refiere a cualquier tipo de trigo que incluye, pero no se limita a, todo trigo cultivado, todo tipo de trigo salvaje, cualquier especie de trigo, todas las intra- e inter-especies de cruces de trigo, todas las variedades del trigo, todos los genotipos de trigo y todos los cultivares de trigo. Los trigos cultivados incluyen, pero no se limitan al trigo einkorn, durum y común.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "tipo salvaje" se refiere al alelo de presentación natural de un gen particular. A veces el término se refiere a la célula o a la planta que contiene los alelos de tipo salvaje, del gen particular.

II.- Ácidos nucleicos que codifican *Sh2-Rev6* y *Sh2-Rev6-HS*

Giroux et al (1996) han aislado y secuenciado el ADN y ADNc genómicos que codifican el *Sh2-Rev6*. La secuencia de nucleótidos del *Sh2-Rev6* está provista en la SEC ID NO:1, y la secuencia de aminoácidos de SH2-REV6 ha sido provista en la SEC ID NO:2 (ver también las Patente Estadounidense No. 5.650.557 y 5.872.216). Las semillas de maíz que contienen por lo menos un alelo *Sh2-Rev6* funcional han sido registrados ante el ATCC (American Type Culture Collection), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 EE.UU., el 16 de mayo de 1999 y bajo el número de acceso asignado ATCC 97624 (ver, columna 5 de las Patentes Estadounidenses Nos- 5,650.557 y 5.872.216).

H2
B2 A2

El *Sh2-Rev6* fue objeto de modificación ulterior mediante la alteración de su His a Tyr en la posición aminoácido 333 de manera de producir la variante *Sh2-Rev6-HS* (Greene y Hannah et al., 1998; Patente Estadounidense No 6.069.300). La secuencia de nucleótidos de *Sh2-Rev6-HS* ha sido provista en la SEC ID NO:3 y la secuencia de aminoácidos de SH2-REV6-HS ha sido provista en la SEC ID NO: 4.

Tal como se los utiliza en la presente, *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-HS* incluyen las variantes específicamente identificadas y caracterizadas en la presente, como también las variantes alélicas, variantes de sustitución conservativas y homólogos que pueden ser aislados / generados y caracterizados sin experimentación indebida para lo cual se siguen métodos bien conocidos para las personas con pericia en el arte.

La homología o identidad a nivel de aminoácido o de nucleótido es determinada mediante el análisis **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool), para lo cual se utiliza el algoritmo utilizado en los programas **blastp**, **blastn**, **blastx**, **tblastn** y **tblastx** (Karlin et al., 1990, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 87, 2264-2268, y Altschul, 1993, J. Mol. Evol., 36, 290 – 300, incorporados en la presente en su totalidad, a título de referencia), que son adaptados para la investigación por similitud de secuencia. La solución utilizada por el programa BLAST consiste en primero considerar los segmentos similares entre una secuencia analizada y una secuencia de la base de datos, y seguidamente evaluar el significado estadístico de todas las concordancias que se identifican, y finalmente resumir solamente aquellas concordancias que satisfagan un umbral preseleccionado de significado. Para una exposición de los problemas básicos en la investigación por similitud de bases de datos de secuencias (ver Altschul et al., 1994, Nature Genetics, 6, 119-129, incorporada en la presente en su totalidad, a título de referencia). Los parámetros de búsqueda para **histograma**, **descripciones**,

alineaciones, expect (es decir, el umbral de significancia estadística para informar sobre las concordancias en función de las secuencias de la base de datos), **corte, matriz y filtro**, se hallan en los ajustes de error. La matriz de puntaje por default utilizado por blastp, blastx, tblastn, y tblastx, es la matriz BLOSUM62 (Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89, 10915-10919, incorporada en la presente en su totalidad, a título de referencia). Para el blastn, la matriz de puntaje es establecida por las relaciones de M (es decir, el puntaje de premio para un par de residuos concordantes)/N (es decir, el puntaje de penalización para residuos no concordantes), siendo los valores de default para M y N, iguales a 5 y -4, respectivamente.

Las expresiones "genes *Sh2-Rev6*", "genes *Sh2-Rev6-HS*", y "genes *Sh2hs33*", incluyen todas las variantes alélicas de los genes *Sh2-Rev6* y genes *Sh2-Rev6-HS* ejemplificados en la presente, en lo cual aquellas variantes alélicas codifican proteínas que resultan en uno o más de las mismas características fisiológicas que las de las proteínas producidas por los genes *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-HS* revelados en la presente.

Las moléculas de ácido nucleico *Sh2-Rev6*, *Sh2Hs33*, y *Sh2-Rev6-HS*, o los fragmentos de los mismos, utilizados en la presente invención también pueden ser sintetizadas mediante métodos bien conocidos en el arte. También es posible producir la molécula mediante técnicas de ingeniería genética, mediante la construcción del ADN mediante cualquier técnica aceptada, clonando el ADN en un vehículo de expresión y transfectando el vehículo en una célula que expresará las proteínas SH2-REV6, SH2HS33, y SH2-REV6-HS. Ver por ejemplo, los métodos indicados en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1985.

Se da por entendido que todos los polinucleótidos que codifican la totalidad o una porción de los polipéptidos de la presente invención, como ser las

proteínas SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS, también se incluyen en la presente, siempre y cuando codifican un polipéptido con una o más de las actividades funcionales de las proteínas en cuestión anteriormente mencionadas. Por lo tanto, todo fragmento de polinucleótidos que tenga las actividades de las proteínas SH2-REV6, SH2HS33 y de SH2-REV6-HS expuestas en la presente, son abarcadas por la presente invención.

Las secuencias de polinucleótidos de la invención incluyen secuencias ADN, ADNc, ADN sintético y ARN que codifican los polipéptidos de la presente invención, como ser por ejemplo, las proteínas SH2-REV6, SH2HS33 y SH-REV6-HS. Dichos polinucleótidos también incluyen los polinucleótidos que se presentan en la naturaleza, sintéticos y manipulados intencionalmente. Por ejemplo, dichas secuencias de polinucleótidos pueden incluir ADN genómico que puede incluir, o no, intrones que se presentan naturalmente. Más aun, dicho ADN genómico puede ser obtenido en asociación con regiones promotoras o secuencias poli A. A título de otro ejemplo, las porciones de la secuencia de ARNm pueden ser alteradas debido a los patrones de desdoblamiento de ARN alternantes o a la utilización de promotores alternados para la transcripción del ARN. Y a título de otro ejemplo más, los polinucleótidos *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33*, y *Sh2-Rev6-HS* pueden ser sometidos a mutaciones adicionales mediante la utilización de por ejemplo, mutagénesis sitio-dirigida y entremezclado de ADN.

Los polinucleótidos de la invención incluyen además secuencias que son degeneradas como resultado del código genético. Se dice que el código genético es degenerado porque más de un triple de nucleótidos puede codificar el mismo aminoácido. Hay 20 aminoácidos naturales, la mayoría de los cuales son especificados por más de un codón. Las personas con pericia en el arte apreciarán que como resultado de la degenerabilidad del código genético, una multitud de secuencias de nucleótidos, algunos de los cuales llevan una mínima

415
35
15

homología de secuencias de nucleótidos con respecto a las secuencias de nucleótidos de los polinucleótidos en cuestión, como ser *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-HS* pueden ser utilizados en la presente invención. Por ello, la totalidad de las secuencias de nucleótidos degeneradas son incluidas en la presente invención siempre y cuando la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos en cuestión, por ejemplo, los polipéptidos *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-HS* codificados por la secuencia de nucleótidos queda funcionalmente sin cambiar o mantienen una función sustancialmente similar. La invención considera específicamente todas y cada una de las posibles variaciones de secuencia de péptidos o nucleótidos que podrían ser hechas seleccionando combinaciones en base a las elecciones de posibles aminoácidos y codones hechas de acuerdo con el código genético triplete standard tal como se aplica a las secuencias de polinucleótidos de la invención, tal como se ejemplifica mediante *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-HS*, y todas estas variantes han de ser consideradas específicamente descritas en la presente.

La invención también incluye los fragmentos (porciones, segmentos) de las secuencias reveladas en la presente que de manera selectiva se hibridan a polinucleótidos de la presente invención, como ser por ejemplo *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-HS*. La hibridación selectiva, tal como se utiliza en la presente, se refiere a la hibridación bajo condiciones severas (Ver por ejemplo, las técnicas en Maniatis et al., (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press), que diferencia entre secuencias de nucleótidos relacionadas y no relacionadas. Los fragmentos activos de la invención, que son complementarios al ARNm y al filamento codificante del ADN, tienen usualmente al menos alrededor de 15 nucleótidos, más usualmente por lo menos 20 nucleótidos, preferiblemente 30 nucleótidos, y más preferible aun, tal vez 50 nucleótidos o más.

Las "condiciones severas" son aquellas que: (1) utilizan una baja intensidad iónica y elevadas temperaturas para lavar, por ejemplo tampón fosfato de sodio 0,5 M pH 7,2, EDTA 1 mM pH 8,0 en SDS al 7 % ya sea a 65°C ó a 55°C, o (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como la formamida, por ejemplo formamida al 50% (vol/vol) con albúmina de suero bovino al 0,1%, Ficoll al 0,1%, polivinilpirrolidona al 0,1%, tampón fosfato de sodio 0,05 M a pH 6,5 con NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M a 42°C. Un ejemplo específico es el que incluye la utilización de formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1%, 5x solución de Denhardt, ADN de espermatozoos de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1%, y sulfato de dextrano al 10% a 55°C, con lavados a 55°C en 0,2 x SSC y SDS al 0,1%. Una persona con pericia puede fácilmente determinar y variar las condiciones de severidad de manera adecuada para obtener una señal de hibridación clara y detectable. Las moléculas preferidas son aquellas que se hibridan bajo las condiciones anteriormente mencionadas de manera de obtener los complementos de *Sh2-Rev6*, *Sh2Hs33* y *Sh2-Rev6-HS* y que codifican una proteína funcional.

La presente invención utiliza moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas mutantes SH2 en cuestión, como ser *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-HS*, que se hibridan con moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias que son complementarias a los polinucleótidos en cuestión que codifican *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-HS* bajo condiciones de suficiente severidad para obtener una señal clara. Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "ácido nucleico" se define como un ARN o ADN que codifica los polipéptidos de la invención, como ser, por ejemplo, los polipéptidos *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-HS* o las secuencias de ARN o ADN que son complementarias a los ácidos nucleicos que codifican tales péptidos, o secuencias de ARN o ADN que se

hibridan a dichos ácidos nucleicos y se mantienen establemente unidas a los mismos bajo condiciones severas, o secuencias de ARN o ADN que codifican polipéptidos que comparten por lo menos un 60% de identidad de secuencia, o por lo menos 65% de identidad de secuencia, o por lo menos 70% de identidad de secuencia, o por lo menos 75% de identidad de secuencia, o por lo menos 80% de identidad de secuencia, o por lo menos 85% de identidad de secuencias, preferiblemente por lo menos 90% de identidad de secuencia, y más preferiblemente por lo menos 95% de identidad de secuencia con las proteínas de la presente invención, como ser *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-HS*.

La presente invención provee además fragmentos de uno cualquiera de moléculas de ácidos nucleicos codificantes. Tal como se utiliza en la presente, un fragmento de una molécula de ácido nucleico codificante se refiere a una pequeña porción de la totalidad de la secuencia codificadora de proteína. La magnitud del fragmento será determinada por el uso previsto. Por ejemplo, si el fragmento es elegido de manera de codificar una porción activa de la proteína, el fragmento deberá ser lo suficientemente grande para codificar la(s) región(es) funcionales de la proteína. Por ejemplo, los fragmentos de la invención codifican los dominios o regiones de SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS de la presente invención que intervienen en la regulación alostérica de AGP. Si el fragmento ha de ser utilizado como una sonda de ácido nucleico o cebador de RCP, entonces la longitud del fragmento es elegida de manera de obtener una cantidad relativamente pequeña de positivos falsos durante el sondeo y cebado.

Los fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos codificadoras de la presente invención (es decir, los oligonucleótidos sintéticos) que son utilizados como sondas o cebadores específicos para la RCP (reacción en cadena de polimerasa), o para sintetizar secuencias de genes que codifican proteínas de la invención, pueden ser fácilmente sintetizados mediante técnicas químicas, por

ejemplo el método del fosfotriéster de Matteucci et al. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3185 – 3191) o utilizando métodos de síntesis automatizados. Además, es fácil preparar segmentos de ADN más largos mediante métodos bien conocidos, tales como la síntesis de un grupo de oligonucleótidos que definen varios segmentos modulares del gen, seguido por ligación de oligonucleótidos para construir el gen modificado completo.

Las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la presente invención pueden además ser modificadas de manera de contener un rótulo detectable para fines de diagnóstico y de sondeo. En el arte se conoce una variedad de dichos rótulos, los cuales pueden ser fácilmente utilizados junto con las moléculas codificadoras descritas en la presente. Los rótulos adecuados incluyen, pero no se limitan a, la biotina, los nucleótidos radioetiquetados, y similares. Una persona con pericia en el arte puede utilizar cualquiera de los rótulos conocidos en el arte para obtener una molécula de ácido nucleico codificadora rotulada.

Es posible efectuar modificaciones en la estructura primaria propiamente dicha, mediante supresión, adición, o alteración de los aminoácidos incorporados en la secuencia proteínica, durante la traducción, sin destruir la actividad de la proteína. Dichas sustituciones u otras alteraciones tienen como resultado que las proteínas tienen una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico que recae dentro de los alcances considerados de la presente intención.

III.- Aislación de Otras Moléculas de Ácido Nucleico Relacionadas

Tal como se describe en la presente, la identificación y caracterización de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención, como ser aquellas que codifican una proteína SH2-REV6, SH2HS33 o SH2-REV6-HS o un fragmento de una proteína SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS, permite a una persona con pericia en el arte aislar moléculas de ácido nucleico que codifican otros miembros de la familia de las proteínas, además de las secuencias descritas en la presente.

139 119

Además, las moléculas de ácido nucleico reveladas en la presente permiten a una persona con pericia en el arte aislar moléculas de ácido nucleico que codifican otros miembros de la familia de las proteínas, además del SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS revelados en la presente.

Esencialmente, una persona con pericia en el arte puede fácilmente utilizar cualquiera de las secuencias de aminoácidos reveladas en la presente a efectos de generar sondas anticuerpo para seleccionar genotecas de expresión preparadas a partir de las células adecuadas. Típicamente, el antisuero policlonal tomado de mamíferos tales como conejos inmunizados con la proteína purificada o con anticuerpos monoclonales puede ser utilizado para sondear una genoteca de expresión de ADNc o genómica, a efectos de obtener la adecuada secuencia codificadora para otros miembros de la familia de las proteínas. La secuencia de ADNc clonada puede ser expresada en forma de una proteína de fusión, ser expresada directamente mediante la utilización de sus propias secuencias de control, o ser expresada mediante construcciones en las cuales se utilizan secuencias control adecuadas para el huésped particular utilizado para la expresión de la enzima.

Como alternativa, una porción de la secuencia codificadora descrita en la presente puede ser sintetizada y utilizada como una sonda para recuperar el ADN que codifica un miembro de la familia de las proteínas, a partir de cualquier organismo. Los oligómeros que contienen aproximadamente 18 a 20 nucleótidos (que codifican aproximadamente 6 a 7 aminoácidos de estiramiento) son preparados y utilizados para seleccionar el ADN genómico o las genotecas de ADNc a efectos de obtener la hibridación bajo condiciones severas o bajo condiciones de suficiente severidad para eliminar un nivel indebido de positivos falsos.

Adicionalmente, es posible preparar pares de cebadores oligonucleótidos para ser utilizados en una reacción en cadena de polimerasa (RCP) a efectos de selectivamente clonar una molécula de ácido nucleico codificadora. Un ciclo de RCP desnaturalizar/"anneal"/extender para utilizar dichos cebadores de RCP es bien conocido en el arte, y puede ser fácilmente adaptado para ser utilizado en la aislación de otras moléculas de ácido nucleico codificadoras.

IV.- Producción de Proteínas Recombinantes mediante una Molécula de ADN recombinante (ADNr)

La presente invención provee además métodos para producir polipéptidos de la invención, como ser SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-Rev6-HS mediante la utilización de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente. En términos generales, la producción de una forma recombinante de una proteína implica típicamente los pasos siguientes: primero se obtiene una molécula de ácido nucleico que codifica, por ejemplo, una proteína SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS o un fragmento de una proteína SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS. Si la secuencia codificadora no es interrumpida por intrones, es directamente adecuada para su expresión en cualquier huésped. La molécula de ácido nucleico es seguidamente colocada preferiblemente en un enlace operable con secuencias de control adecuadas, como anteriormente descrito, de manera de formar una unidad de expresión que contiene el marco de lectura abierta de la proteína. Se utiliza la unidad de expresión para transformar un huésped adecuado, y el huésped transformado es cultivado bajo condiciones que permitan la producción de la proteína recombinante. Opcionalmente, la proteína recombinante es aislada del medio o de las células; la recuperación y purificación de la proteína puede no ser necesaria en algunos casos en los cuales pueden tolerarse algunas impurezas.

Cada uno de los pasos precedentes puede ser efectuado en una variedad de maneras. Por ejemplo, las secuencias codificadoras deseadas pueden ser obtenidas a partir de fragmentos genómicos y ser utilizadas directamente en huéspedes adecuados. La construcción de los vectores de expresión que son operables en una variedad de huéspedes, es llevada a cabo utilizando replicones y secuencias de control adecuados, como anteriormente indicado. Las secuencias de control, los vectores de expresión, y los métodos de transformación dependen del tipo de célula huésped utilizado para expresar el gen, y han sido expuestos con detalle en lo que precede. Los sitios de restricción adecuados pueden, si no se encuentran normalmente disponibles, ser adicionados en las extremidades de la secuencia codificadora de manera de proveer un gen extirpable para inserción en dichos vectores. Una persona con pericia en el arte puede fácilmente adaptar cualquier sistema de expresión - huésped, conocido en el arte, para su utilización junto con las moléculas de ácido nucleico de la invención a efectos de producir una proteína recombinante.

V.- Proteínas SH2-REV6, SH2HS33, y SH2-REV6-HS

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión proteína SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS se refiere a una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por el polinucleótido de SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS, a las variantes alélicas de las mismas y las sustituciones conservativas de los mismos que tienen una actividad SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS. Además, los polipéptidos utilizados en la presente invención incluyen las proteínas codificadas por *SH2-REV6*, *SH2HS33* y *SH2-REV6-HS*, como también los polipéptidos y fragmentos, particularmente aquellos que tienen la actividad biológica de SH2-REV6, SH2HS33, y SH2-REV6-HS y también aquellos que tienen una identidad de secuencia de por lo menos el 65%, con respecto a los polipéptidos codificados por SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS o la porción

relevante, o por lo menos una identidad del 70%, o una identidad de por lo menos el 75%, o una identidad de por lo menos el 80%, o una identidad de por lo menos el 85%, con respecto a los polipéptidos codificados por SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS o la porción relevante, y más preferentemente una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con respecto a los polipéptidos codificados por SH2-REV6, SH2HS33, y SH2-REV6-HS, o la porción relevante, y más preferente aún una similitud de secuencia de por lo menos el 95%, con respecto a los polipéptidos codificados por SH2-REV6, SH2HS33, y SH2-REV6-HS o la porción relevante, y también incluyen las porciones de dichos polipéptidos. Una persona con pericia en el arte reconocerá si una secuencia de aminoácidos de interés se haya dentro del dominio funcional de una proteína, tal como el dominio o región de SH2-REV6, SH2HS33, y SH2-REV6-HS que interviene en la regulación alostérica de AGP. Por lo tanto es posible que una proteína homóloga tenga una homología de menos del 40% a lo largo de la longitud de la secuencia de aminoácidos, pero una homología mayor del 90% en un dominio funcional.

Las proteínas SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS utilizadas en la presente invención, incluyen las variantes específicamente identificadas y caracterizadas en la presente descritas, como también sus variantes alélicas, variantes de sustitución conservativas y homólogos que puedan ser aisladas o generadas y caracterizadas sin una indebida experimentación siguiendo los métodos bien conocidos por una persona con pericia en el arte.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "sustancialmente puro/a" se refiere a los polipéptidos de la presente invención, como ser los polipéptidos SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS que se hallan sustancialmente exentas de otras proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los cuales se hallan naturalmente asociados. Una persona con pericia en el arte puede purificar los

polipéptidos en cuestión utilizando las técnicas standard para la purificación de proteínas.

La invención también utiliza secuencias de aminoácidos que codifican los polipéptidos aislados de la invención, como ser los polipéptidos SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS. Los polipéptidos de la invención incluyen aquellos que difieren de las proteínas SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS ejemplificadas, como resultado de variaciones conservadoras. Tal como se las utiliza en la presente, las expresiones "variación conservadora" o "sustitución conservadora" sirven para indicar el reemplazo de un residuo aminoácido por otro residuo biológicamente similar. No es probable que las variaciones o sustituciones conservadoras modifiquen la configuración de la cadena de polipéptidos. Los ejemplos de variaciones, o de sustituciones, conservadoras, incluyen el reemplazo de un residuo hidrófobo tal como la isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de la arginina por la lisina, del ácido glutámico por el ácido aspártico, o de la glutamina por la asparagina, y similares. Por ello, todas las sustituciones conservadoras se hallan incluidas en la invención, siempre y cuando los polipéptidos en cuestión codificados por la secuencia de nucleótidos queden sin modificar funcionalmente, o similar.

Tal como se utiliza en la presente, un polipéptido aislado de la presente invención, como ser una proteína SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS, puede ser de longitud completa o cualquier homólogo, de dichas proteínas, como ser, por ejemplo, las proteínas SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS, en las cuales se han suprimido aminoácidos (por ejemplo, una versión truncada de la proteína, tal como un péptido), insertada, invertida, sustituida y/o derivada (por ejemplo por glicosilación, fosforilación, acetilación, miristoilación, prenilación, palmitoilación, amidación y/o adición de glicosilfosfatidil inositol). Dichas proteínas modificadas

incluyen aquellas que retienen por lo menos una de las actividades funcionales de las proteínas en cuestión, o que producen por lo menos una de las características fisiológicas producidas como resultado de la expresión de las proteínas en cuestión. Un homólogo de las proteínas en cuestión es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que es suficientemente similar a las proteínas en cuestión, como ser las secuencias de aminoácidos de las proteínas SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS que una secuencia de ácido nucleico codificadora del homólogo es capaz de hibridar bajo condiciones severas, con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las proteínas en cuestión (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las proteínas SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS). En lo que precede se han expuesto las condiciones de severidad adecuadas.

Los homólogos de las proteínas en cuestión, incluyendo los homólogos de las proteínas SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS pueden ser el resultado de una variación alélica de un gen que codifica la proteína. Por ejemplo, los homólogos de las proteínas SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS pueden ser producidos mediante técnicas conocidas en el arte, lo cual incluye, pero no se limita a, las modificaciones directas a un gen que codifica una proteína, por ejemplo mediante la utilización de técnicas de ADN clásicas o recombinantes para llevar a cabo una mutagénesis aleatoria o apuntada.

Pueden resultar modificaciones menores de la secuencia primaria de aminoácidos de una proteína de la presente invención en aquellas proteínas que tienen una actividad sustancialmente equivalente en comparación con las proteínas en cuestión, (por ejemplo, SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS) producidas mediante los genes descritos en la presente. Tal como se la utiliza en la presente, la expresión "equivalente funcional" de una proteína en cuestión es una proteína que tiene una actividad biológica o una característica inmunológica que es sustancialmente similar a una actividad biológica o a una característica

inmunológica de la proteína en cuestión. La expresión "equivalente funcional" tiene por objeto incluir los fragmentos, variantes, análogos, homólogos, o derivados químicos de una molécula que poseen la actividad biológica de las proteínas, como ser , SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS codificadas por los genes de la presente invención.

Las expresiones "proteínas SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS", "proteínas SH2-REV6", "proteínas SH2HS33" y "proteínas SH2-REV6-HS" incluyen la totalidad de las variantes alélicas de dichas proteínas que poseen una actividad normal de SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS . En general, las variantes alélicas de las proteínas SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS tienen una secuencia de aminoácidos ligeramente diferente que la específicamente codificada por los genes utilizados en la presente invención, pero serán capaces de producir los fenotipos ejemplificados. Las variantes alélicas, si bien poseen una secuencia de aminoácidos ligeramente diferente de las mencionadas individualmente en lo que precede, poseerán la capacidad de producir un fenotipo que exhibe semillas de mayor peso individual y total, mayor cantidad de semillas, un mayor Índice de Cosecha (IH) y una mayor masa vegetal aérea.

Los métodos de la presente invención pueden ser utilizados por una persona con pericia en el arte para producir plantas con un peso de semilla total e individual mayor, una mayor cantidad de semillas, un mayor índice de cosecha y una masa vegetal total incrementada.

Los solicitantes además enseñan métodos para reconocer las variaciones en las secuencias de ADN de polinucleótidos, como ser *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-HS* de la presente invención. Uno de estos métodos implica la introducción de una molécula de ácido nucleico (también conocida como sonda) que tiene una secuencia que es complementaria a los genes de *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-HS* utilizados en la invención bajo condiciones de

126
126
126

hibridación suficientes, tal como entenderían las personas con pericia en el arte. Otro método para reconocer una variación de secuencias de ADN asociado con los polinucleótidos de la presente invención, incluyendo *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-HS*, es dirigir el análisis de secuencias de ADN mediante múltiples métodos bien conocidos en el arte. Otra forma de realización es la que implica la detección de la variación en las secuencias de ADN en los polinucleótidos en cuestión, tal como se representa mediante diferentes géneros, especies, cepas, variedades o cultivares de plantas. Las secuencias de polinucleótidos de la invención, por ejemplo, *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-HS* pueden ser utilizadas como sondas para detectar la presencia de genes correspondientes en otras plantas. Tal como se expuso en lo que precede, las secuencias de *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-HS* han sido determinadas y son fácilmente disponibles para una persona con pericia en el arte. En una realización, las secuencias se vincularan específicamente a un alelo de un gen *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* o *Sh2-Rev6-HS* o a un fragmento del mismo, y en otra realización se vinculará a alelos múltiples. Dichos métodos de detección incluyen la reacción en cadena de polimerasa, el análisis del polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (RFLP) y el análisis conformacional de monofilamento.

Las sondas de diagnóstico útiles en dichos ensayos de la invención incluyen los anticuerpos de los polipéptidos de la presente invención, como ser SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales, producidos mediante técnicas standard bien conocidos en el arte. (Ver: Harlow & Lane's Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Pueden ser utilizados para detectar una proteína de la invención mediante su vinculación a la proteína y subsiguiente detección del complejo anticuerpo – proteína mediante ELISA, Western blot o similar. Los anticuerpos también pueden ser producidos a partir de secuencias de

147 427
-128

péptidos de las proteínas en cuestión, como ser SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS mediante la utilización de técnicas standard conocidas en el arte (Ver: Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, 1994). También es posible preparar fragmentos de antisueros monoclonales o policlonales que contienen la porción inmunológicamente significativa.

Los ensayos para detectar o medir los polipéptidos en cuestión, por ejemplo, los polipéptidos SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS, en una muestra biológica con una sonda anticuerpo, pueden basarse en cualquier formato disponible. Por ejemplo, en los inmuno-ensayos en los cuales los polipéptidos SH2-REV6, SH2HS33 y SH2-REV6-HS son el analito, la muestra de ensayo, típicamente una muestra biológica, es sometida a incubación con anticuerpos anti- SH2-REV6, SH2HS33 o SH2-REV6-HS bajo condiciones que permiten la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Pueden utilizarse varios formatos, tales como el ensayo "sándwich" en el cual el anticuerpo vinculado a un soporte sólido es sometido a incubación junto con la muestra de ensayo; lavado, sometido a incubación junto con un segundo anticuerpo, etiquetado, al analito; y el soporte es lavado nuevamente. El analito es detectado determinando si el segundo anticuerpo está vinculado al soporte. En un formato competitivo, que puede ser sea heterogéneo sea homogéneo, usualmente se somete a incubación una muestra de ensayo junto con un anticuerpo y un antígeno competitivo etiquetado, sea secuencial sea simultáneamente. Dichos formatos, y otros, son bien conocidos en el arte.

VI.- Métodos de Transformación

Los métodos para producir plantas transgénicas son bien conocidos por las personas con la pericia habitual en el arte. Las plantas transgénicas pueden ser hoy en día producidas mediante una variedad de diferentes métodos de transformación que incluyen, pero no se limitan a, los siguientes, electroporación,

128
148 128

microinyección, bombardeo con microproyectiles, también conocido como aceleración de partículas o bombardeo biolístico; transformación mediada por virus; y transformación mediada por *Agrobacterium* (ver por ejemplo las Patentes Estadounidenses Nos 5.405.765, 5.472.869; 5.538.877, 5.538.880, 5.550.318, 5.641.664, 5.736.369 y 5.736.369; Watson et al (1992) Recombinant DNA, Scientific American Books; Hinchey et al. (1988) Bio/Tech 6: 915-922 (1988); McCabe et al. Bio/Tech 6: 923-926; Toriyama et al. (1988), Bio/Tech 6: 1072-1074; Fromm et al. (1990) Bio/Tech 8: 833-839; Mullins et al. (1990) Bio/Tech 8: 833 – 839; y, Raineri et al. (1990) Bio/Tech: 8:33 –38).

A.- Transformación mediada por *Agrobacterium*

La transformación mediada por *Agrobacterium* es el método más ampliamente utilizado para introducir un vector de expresión en las plantas (Horsch et al. (1985) Science 227: 1229). *A. Tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias del suelo fitopatógenas que transforman genéticamente las células de las plantas. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, llevan genes que son los responsables de la transformación genética de la planta (Kado, C.I. (1991), Crit. Rev. Plant. Sci 10:1). Gruber et al (1993) "Vectors for Plant Transformation" en Methods in Plant Molecular Biology y Biotechnology, Glick, B.R., y Thompson, J.E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton), págs 89.-119), Miki et al. (1993) "Procedures for Introducing Foreign DNA in Plants" en: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B.R., and Thompson, J.E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton), págs 67-88, y Moloney et al (1989) Plant Cell Reports 8:238, proveen descripciones de sistemas vectores *Agrobacterium* y métodos para la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*.

Los métodos de transformación mediados por *Agrobacterium* han sido utilizados principalmente para transformar plantas dicotiledóneas. La

transformación mediada por *Agrobacterium* en dicotiledóneas facilita la entrega de piezas más grandes de ácido nucleico heterólogo, en comparación con otros métodos de transformación tales como el bombardeo de partículas, electroporación, y el método de transformación mediado por polietilenglicol. Además, la transformación mediada por *Agrobacterium* parece dar como resultado pocos cambios en la disposición de los genes, y más típicamente da como resultado la integración de bajos números de copias de genes en el cromosoma de la planta.

Las monocotiledóneas no son un huésped natural del *Agrobacterium*. A pesar de que la transformación mediada por *Agrobacterium* ha sido objeto de informe para espárragos, (Bytebier et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5354-5349) y para el *Dioscore publifera* (Schafer et al. (1987) Nature 327:529-532), por lo general se creía que las plantas en la familia Gramineae no podían ser transformadas con el *Agrobacterium* (Potrykus I. (1987) Biotechnology 8:535-543). Sin embargo, recientemente en la patente de los Estados Unidos número 5.981.840, de Zhao et al., se reveló la transformación mediada por *Agrobacterium* en el maíz. El método de Zhao et al. incluye los siguientes pasos: poner en contacto por lo menos un embrión inmaduro de una planta de maíz con *Agrobacterium* capaz de transferir por lo menos un gen a dicho embrión; co-cultivar los embriones con *Agrobacterium*; cultivar a los embriones en un medio que comprende sales N6, un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento del *Agrobacterium*, y un agente selectivo para seleccionar los embriones que expresan el gen; y regenerar las plantas que expresan el gen.

B. Transformación Mediada por Microprojectiles:

En el proceso de bombardeo de microprojectiles, al que también se hace referencia como al proceso biolístico, el transporte del ADN es mediado por partículas muy pequeñas de material biológicamente inerte. Cuando las partículas

inertes son recubiertas con ADN y aceleradas a una velocidad apropiada, una o más de las partículas son capaces de entrar en una o más de las células cuando el ADN es liberado de la partícula y es expresado en la célula. Mientras que algunas de las células son dañadas fatalmente por el proceso de bombardeo, algunas de las células receptoras sobreviven, reteniendo de forma estable el ADN introducido, y lo expresan. Sanford et al. provee una descripción general de un instrumento para el bombardeo con partículas apropiado (Sanford et al. (1987) Particulate Sci. Technol. 5:27-37).

El proceso del bombardeo de microproyectiles ha sido utilizado para introducir exitosamente genes que codifican nuevas características genéticas a una variedad de plantas, incluyendo la cebolla, el algodón, el maíz, el tabaco, el arroz, el trigo, el girasol, la soja y ciertos vegetales (patente de los Estados Unidos número 4.945.050; Sanford et al. (1988) Trends in Biotechnology 6:299; Sanford et al. (1988) Part Sci. Technol 5:27; J. J. Finer and M. D. McMullen (1990) Plant Cell Reports 8:586-589; y Gordon-Kamm (1990) The Plant Cell 2:603; Klein et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:4305-4309). A pesar de la transformación por medio del bombardeo de microproyectiles es menos específico en cuanto a la especie y al genotipo que la transformación con *Agrobacterium*, la frecuencia de eventos estables de transformación logrados siguiendo el bombardeo puede ser bastante baja, en parte debido a la ausencia de un mecanismo natural para mediar la integración de una molécula de ADN o gen responsable de una característica fenotípica deseada en el ADN genómico de una planta. Se ha reportado que la transformación por medio de pistola de partículas de, por ejemplo el algodón, produce no más de una planta transgénica clonal por cada 100-500 meristemas apuntadas para su transformación. Sólo un 0,1 a un 1% de estas transformaciones fueron capaces de transmitir ADN extraño a su progenie (WO 92/15675). Las células tratadas con bombardeo de partículas deben ser

regeneradas en plantas enteras, lo cual requiere procedimientos de cultivo de tejidos estériles, que demandan mucho tiempo de trabajo y en la mayoría de las plantas de cultivo generalmente depende del genotipo, particularmente en el caso del algodón. También se ha informado sobre frecuencias de transformación similarmente bajas para otras especies de plantas. Otras desventajas del bombardeo de microproyectiles incluyen la incapacidad de controlar el lugar donde se hiere el tejido de una planta, y por lo tanto, el lugar al cual es administrado el agente transformador. La incapacidad de dirigir tejidos de líneas germinales se debe en parte a las bajas eficiencias de transformación logradas mediante el bombardeo de microproyectiles. Además, el bombardeo frecuentemente da como resultado la administración de más de una copia del ADN o gen transformador en el genoma de la célula de la planta transformada, lo cual puede tener efectos de deterioro en la planta regenerada y transformada. La fragmentación del ADN a ser insertado puede también ocurrir cuando se transforma ADN por medio del bombardeo de microproyectiles, dando como resultado plantas transgénicas con solamente una porción del gen que está siendo insertado.

Se han hecho intentos para hacer una mejora en la eficiencia del bombardeo de microproyectiles. Por ejemplo, en el documento EPA 0486 233 se describe el tratado de tejidos bombardeados con *Agrobacterium* transportando el gen de interés. Es por medio del impacto de alta velocidad de las partículas densas de los microproyectiles que se genera una disposición de micro heridas que crean un ambiente que es particularmente inductivo para la infección por el *Agrobacterium*. Sin embargo, las células transformadas de la planta aún deben ser regeneradas como plantas enteras, y las plantas transformadas fértiles y estables deben ser seleccionadas de la población total de plantas regeneradas. La organogénesis y la embriogénesis somática han sido utilizadas para regenerar

plantas. Sin embargo, la organogénesis produce con frecuencia plantas quiméricas que contienen tanto células transformadas como células no transformadas, y la embriogénesis somática, a pesar de ser superior a la organogénesis, es altamente dependiente del genotipo en la mayoría de las plantas de cultivo.

Se han hecho esfuerzos para administrar el agente transformador o ADN a tejidos de líneas germinales para que el agente o el ADN sea incorporado directamente al ADN de las células en estos tejidos, particularmente al ADN de las células huevo de la planta. En la patente de los Estados Unidos número 5.994.624, Trolinder et al. se describe un método de transformación implanta que provee un método mejorado para administrar agentes transformadores a tejidos de plantas. El método utiliza un dispositivo de inyección sin aguja que es capaz de insertar una pequeña corriente a alta presión de una solución a través de las muchas capas de células del tejido de la planta. El agente transformador es administrado a los tejidos florales de una planta, de esta manera facilitando la administración de un agente transformador que comprende un gen de interés a las células de líneas germinales de la planta. La corriente a alta presión provista por el dispositivo de inyección asegura que el cultivo de *Agrobacterium* o la solución de ADN penetre en las muchas capas de células del tejido floral de la planta sin provocar un daño masivo al tejido, como el que se provoca por medio de inyección directa con una jeringa dotada con una aguja, o por medio del bombardeo de partículas. El método puede ser utilizado para transformar células de plantas y tejidos, incluyendo células de cultivo de tejidos embrionicas, tejidos meristemáticos y callos de plantas, que pueden regenerarse en plantas enteras. Además, el método puede ser utilizado para transformar células de plantas y tejidos seleccionados del grupo que consiste en algodón, granos de soja, alfalfa,

lino, tabaco, girasol, maní, frutilla, tomate, guisante, arveja, calabaza, pimienta, maíz, sorgo, cebada, avena, centeno, trigo, arroz, col, y papa.

A pesar de que Klein et al. (Klein et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 4305-4309; Klein et al. (1988) Bio/technol. 6:59-563; Klein et al. (1989) Plant Physiol. 91:440-444) provee protocolos para el bombardeo de células de cultivo en suspensión de maíz no regenerable, hasta hace poco no se habían publicado protocolos para el bombardeo de cultivos de callos o células de maíz que pueden ser regeneradas. Lundquist et al. (Patente de los Estados Unidos número 6.013.863) describe la administración de ADN en cultivos de callos de maíz regenerables por medio del proceso de bombardeo de partículas, el cual da como resultado un alto nivel de viabilidad para unas pocas células transformadas. El método puede ser aplicable para producir plantas transgénicas estables y fértiles de otros cereales gramíneas. Dwight et al. (Patente los Estados Unidos número 5.990.387) revela un método para producir una planta *Zea mays* fértil, transformada en forma estable. Los métodos comprenden los siguientes pasos: proveer un ADN extraño que comprende un vector de expresión que transporta un gen que codifica una característica agronómica; proveer un callo embriónico de maíz, un cultivo de suspensión, o un embrión inmaduro aislado de una planta; introducir el ADN extraño en el callo embriónico, cultivo en suspensión o embrión inmaduro aislado de una planta por uno o más bombardeos de micro partículas; y regenerar la planta *Zea mays* transgénica fértil. Las plantas que pueden ser transformadas exitosamente por el método de Dwight et al. incluyen al maíz, centeno, la cebada, el trigo, sorgo, la avena, mijo, arroz, girasol, alfalfa, semilla de colza y soja.

Biswas et al. describe la generación de plantas de arroz transgénicas por bombardeo de microproyectiles de racimos de células embriónicas (Biswas et al. (1998) Plant Science, 133:203-210), y Yao et al. revela la producción de plantas

134
134
134

de cebada transgénicas por medio de la administración directa de ADN plásmido en microesporas de cebada utilizando microproyectiles de alta velocidad (Yao et al. (1997) Genome, 40:570-581). Christou et al. informa de los parámetros que influyen la transformación estable de callos embriógenos de arroz y la recuperación de plantas transgénicas utilizando aceleración de partículas por descargas eléctricas (Christou et al. (1995) Annals of Botany 75: 407-413).

C. Métodos Alternativos de Transformación

Otros métodos para la administración física de ADN a plantas incluyen la sonicación de células objetivo (Zhang et al. (1991) Bio/Technology 9:996) y la fusión de liposomas o esferoplastos (Deshayes et al. (1985) EMBO J. 4: 2731, Christou et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3962). También se ha informado de la toma directa de ADN en protoplastos utilizando precipitación con CaCl_2 , alcohol polivinílico o poli-L-ornitina (Hain et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199: 161 y Draper et al. (1982) Plant Cell Physiol. 23: 451). Nobre et al. informa de la regeneración de plantas transgénicas fértiles de cebada utilizando transformación mediana por PEG de protoplastos de órgano escutiforme (Nobre et al. (1997) Barley Genetics Newsletter, 27:16-17). Se ha descrito también la electroporación de protoplastos y células enteras y tejidos (Donn et al. (1990) Abstracts of VIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC, A2-38, p 53; D'Halluin et al. (1992) Plant Cell 4:1495-1505 y Spencer et al. (1994) Plant Mol. Biol. 24: 51-61). De hecho, D'Halluin et al. (Patente de los Estados Unidos número 6.002.070) describe un método rápido y eficiente para transformar plantas monocotiledóneas por medio de la electroporación. El método de D'Halluin comprende la electroporación de ADN de interés en tejido intacto capaz de formar callos embriógenos compactos o callos embriógenos compactos obtenidos a partir de tejido intacto.

135
135

Otra tecnología para la producción de plantas transgénicas es la transformación mediada por whisker por medio de la cual ciertos materiales, cuando son incubados con tejido de plantas, facilitan la entrada de moléculas de ADN en las células de las plantas. Se ha propuesto que los materiales que promueven la absorción de ADN, principalmente el carburo de silicona, cumplen su función pero dañan la superficie de la célula. Para una revisión del tema, referirse al documento Wang et al. (1995) In Vitro Cell. Dev. Biol. 34: 101-4.

VII. Transgenes

Los genes introducidos exitosamente en plantas utilizando metodologías de ADN recombinante incluyen, pero no se limitan a, aquellos que codifican las siguientes características: almacenaje de proteínas en las semillas, incluyendo las proteínas de almacenaje en las semillas de legumbre 7S modificadas (Patentes de los Estados Unidos números 5.508.468, 5.559.223 y 5.576.203); tolerancia o resistencia a los herbicidas (Patentes de los Estados Unidos números 5.498.544 y 5.554.798; Powell et al. (1986) Science 232:738-743; Kaniewski et al. (1990) Bio/Tech 8:750-754; Day et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6721-6725); fitasa (Patente de los Estados Unidos número 5.593.963); resistencia a las plagas bacterianas, hongos, nemátodos e insectos, incluyendo la resistencia a los insectos lepidópteros conferida por el gen Bt (Patentes de los Estados Unidos números 5.597.945 y 5.597.946; Hilder et al. Nature 330:160-163; Johnson et al. (1989) Proc Natl. Acad. Sci. USA 86:9871-9875; Perlak et al. (1990) Bio/Tech 8:939-943); las lectinas (Patente de los Estados Unidos número 5.276.269); y el color de las flores (Meyer et al. (1987) Nature 330:677-678; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289 (1990); van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-299).

VIII. Unidades de Expresión para Expresar ADN Exógeno en una Planta

La presente invención provee además células huéspedes transformadas con una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de la presente

136
136

invención. La célula huésped puede ser procariota o eucariota. Las células eucariotas útiles para la expresión de una proteína de la presente invención no están limitadas, siempre y cuando la línea celular sea compatible con los métodos de cultivo de células y con la propagación del vector de expresión y expresión del producto genético. Las células huéspedes eucariotas preferidas incluyen cualquier tipo de especie de planta.

Cualquier huésped procariota puede ser utilizado para expresar una molécula de ADNr que codifica una proteína de la invención. El huésped procariota preferido es el E. coli.

La transformación de células huéspedes apropiadas con una molécula de ADNr de la presente invención es lograda por medio de métodos bien conocidos que dependen típicamente del tipo de vector utilizado y del sistema de huésped empleado. Con respecto a la transformación de células huéspedes procariotas, los métodos de electroporación y tratamiento con sales son típicamente empleados, ver por ejemplo, Cohen et al. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110-2114; y Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Con respecto a la transformación de células vertebradas con vectores que contienen ADNr, los métodos de electroporación y de tratamiento de sales o lípidos catiónicos son típicamente empleados, ver, por ejemplo Graham et al. (1973) Virology 52: 456-467; y Wigler et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1373-1376.

Las células transformadas con éxito, es decir, células que contienen una molécula de ADNr de la presente invención, pueden ser identificadas por medio de técnicas bien conocidas, que incluyen la selección de un marcador seleccionable. Por ejemplo, las células que se tienen como resultado de la introducción de un ADNr de la presente invención pueden ser clonadas para producir colonias individuales. Las células provenientes de esas colonias pueden

ser cosechadas, lisadas y su contenido de ADN examinado para investigar la presencia del ADNr utilizando un método como el que describe Southern, (1975) J. Mol. Biol. 98: 503-517; o Berent et al. (1985) Biotech Histochem 3: 208; o las proteínas producidas a partir de la célula ensayada por medio de un método inmunológico.

Tal como se ha explicado anteriormente en la presente, varias realizaciones de la presente invención emplean unidades de expresión (o vectores o sistemas de expresión) para expresar una secuencia de ácido nucleico suministrada en forma exógena, como ser la secuencia que codifica a la proteína SH2-REV6, SH2HS33, y SH2-REV6-HS en una planta. Los métodos para generar unidades/sistemas/vectores de expresión para ser utilizados en plantas son bien conocidos en el arte y pueden ser adaptados con facilidad para su uso en la expresión de las secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas de la presente invención, como ser las proteínas SH2-REV6, SH2HS33, y SH2-REV6-HS en una célula de planta. Una persona capacitada puede fácilmente utilizar cualquier sistema de planta/vector/expresión adecuado en los métodos de la presente siguiendo la descripción que se provee en la presente.

Los elementos del control de expresión utilizados para regular la expresión de la proteína pueden ser el elemento de control de expresión que se encuentra normalmente asociado con la secuencia de codificación (elemento de expresión homóloga) o puede ser el elemento de control de expresión heterólogo. En el arte se conocen una amplia variedad de elementos de control de expresión homólogos y heterólogos y pueden ser fácilmente utilizados para hacer unidades de expresión para ser utilizadas en la presente invención. Las regiones de iniciación de transcripción, por ejemplo, pueden incluir cualquiera de las regiones de iniciación opinas, como la octopina, la manopina, la nopalina y similares que son encontradas en los plásmidos Ti del *Agrobacterium tumefaciens*. Como una

138
138

alternativa, pueden utilizarse promotores virales de plantas, como el promotor 35S de virus mosaico del coliflor para controlar la expresión de genes en una planta. Finalmente, los promotores de las plantas como el promotor prolifera, promotores específicos de la fruta, promotor Ap3, promotores de impacto térmico, promotores específicos de semillas, etcétera pueden también ser utilizados. Los promotores más preferidos serán más activos en las plántulas.

Un promotor constitutivo (como el promotor CaMV o el Nos), un promotor específico de un órgano (como el promotor E8 del tomate) o un promotor inducible está típicamente ligado a la región de codificación de la proteína o al antisentido mediante la utilización de técnicas estándar que son bien conocidas en el arte. La unidad de expresión puede ser optimizada empleando elementos suplementarios como terminadores de transcripción y/o elementos reforzadores.

Por lo tanto, para la expresión en plantas, las unidades de expresión contendrán típicamente, además de la secuencia de proteínas, una región promotora de la planta, un sitio de inicio de transcripción y una secuencia de terminación de transcripción. Los sitios únicos de enzimas de restricción en los extremos 5' y 3' de la unidad de expresión están típicamente incluidos para permitir una fácil inserción en un vector ya existente.

En la construcción de combinaciones de genes o antisentidos promotores/estructurales heterólogos, el promotor está posicionado preferiblemente a aproximadamente la misma distancia desde el lugar del inicio de la transcripción heteróloga que lo está del lugar del inicio de la transcripción en su posición natural. Como se sabe en el arte, sin embargo, alguna variación en esta distancia puede ser acomodada sin pérdida de la función del promotor.

Además de una secuencia de promotor, el cassette de expresión puede contener también una corriente descendente de la región de terminación de transcripción del gen estructural para proveer una terminación eficiente. La región

de terminación puede ser obtenida a partir del mismo gen que la secuencia del promotor, o puede obtenerse a partir de diferentes genes. Si el ARNm codificado por el gen estructural debe procesarse eficientemente, las secuencias del ADN las cuales dirigen la poliadenilación del ARN son también agregadas comúnmente a la construcción del vector. Las secuencias de poliadenilación incluyen, pero no se limitan a la señal de sintasa octopina del *Agrobacterium* (Gielen et al. (1984) EMBO J 3: 835-846) o la señal de la sintasa nopalina (Depicker et al. (1982) Mol. And Appl. Genet 1: 561-573).

La unidad de expresión resultante es ligada o de otra forma es construida para estar incluida en un vector el cual es apropiado para una transformación mayor de la planta. Típicamente, el vector también contendrá un marcador de gen seleccionable por medio del cual las células transformadas de la planta pueden ser identificadas en el cultivo. Habitualmente, el marcador de gen codificará la resistencia a los antibióticos. Estos marcadores incluyen la resistencia al G418, higromicina, bleomicina, kanamicina, y la gentamicina. Luego de transformar las células de la planta, aquellas células que tienen el vector serán identificadas por su capacidad de crecer en un medio que contiene un antibiótico en particular. Las secuencias de replicación, de origen bacteriano o viral, son generalmente también incluidas para permitir que el vector sea clonado en un huésped bacteriano o bacteriófago, preferiblemente se incluye un huésped amplio de origen de replicación procariota. Un marcador seleccionable para bacterias debería también ser incluido para permitir la selección de células bacterianas que soportan la construcción deseada. Los marcadores seleccionables procariotas adecuados pueden también incluir la resistencia a antibióticos como la kanamicina o la tetraciclina.

Otras funciones adicionales para la codificación de secuencias de ADN pueden también estar presentes en el vector, como se sabe en el arte. Por

160 140
+40

ejemplo, en el caso de las transformaciones del *Agrobacterium*, las secuencias de T-ADN serán también incluidas para la transferencia subsecuente a cromosomas de plantas.

Las secuencias de polinucleótidos de la presente invención, como ser las secuencias *Sh2-Rev6*, *Sh2hs33* y *Sh2-Rev6-Hs* utilizadas en la presente invención pueden también ser fusionadas a varias otras moléculas de ácido nucleico tales como las Etiquetas de Secuencia Expresada (EST's), epítopes o marcadores de proteínas fluorescentes.

Las EST son fragmentos de genes, típicamente de longitud de entre 300 hasta 400 nucleótidos, secuenciados a partir del extremo 3' o 5' de los clones complementarios de ADN (ADNc). Casi 30.000 EST de *Arabidopsis thaliana* han sido producidas por un consorcio francés y un consorcio norteamericano (Delseny et al. (1997) FEBS Lett. 405(2): 129-132; *Arabidopsis thaliana* Database, <http://genome-www.stanford.edu/Arabidopsis>). Para un tratado del análisis de patrones de expresión de genes derivados de grandes bases de datos EST, referirse, por ejemplo a M. R. Fannon (1996) TIBTECH 14: 294-298.

Las sondas de proteínas fluorescentes compatibles biológicamente, particularmente la proteína fluorescente verde autoensamblante (GFP) del calamar *Aequorea victoria*, han revolucionado de investigación en la biología molecular, de las células, debido a que permiten la visualización de acontecimientos bioquímicos en células vivientes (Murphy et al. (1997) Curr. Biol. 7(11):870-876; Grebenok et al. (1997) Plant J. 11(3):573-586; Pang et al. (1996) Plant Physiol. 112(3); Chiu et al. (1996) Curr. Biol. 6 (3):325-330; Plautz et al., (1996) Gene 173(1):83-87; Sheen et al. (1995) Plant J. 8 (5):777-784).

La mutagénesis dirigida al sitio ha sido utilizada para desarrollar una versión más soluble de la GFP de codón modificado, llamada GFP modificada soluble (smGFP). Cuando se la introdujo al *Arabidopsis*, se observó una mayor

fluorescencia comparada con la GFP de codón modificado, lo cual implica que la GFPsm es "más brillante" debido a que más de la misma se halla presente en una forma soluble y funcional (Davis et al. (1998) Plant Mol. Biol. 36(4): 521-528). Al fusionar genes que codifican la GFP y la beta-glucuronidasa (GUS), los investigadores han sido capaces de crear un conjunto de construcciones informantes bifuncionales las cuales son optimizadas para ser utilizadas en sistemas de expresión transitoria y estable en plantas, incluyendo el *Arabidopsis* (Quaadvlieg et al. (1998) Plant. Mol. Biol. 37 (4):715-727).

Berger et al. (Berg et al. (1998) Dev. Biol. 194(2):226-234) informan del aislamiento de una línea marcadora de GFP para células epidermales de hipocotilo de *Arabidopsis*. Las proteínas de fusión GFP han sido utilizadas para localizar y caracterizar un número de genes de *Arabidopsis*, incluyendo el geranilgeranilpírofosfato (GGPP) (Zhu et al. (1997) Plant Mol. Biol. 35 (3): 331-341).

IX. Métodos de Mejora Genética

Poblaciones Polinizadas Abiertas. La mejora de las poblaciones polinizadas abiertas de los cultivos como ser el centeno, muchos cereales y la remolacha azucarera, césped de pastoreo, legumbres tales como la alfalfa y el trébol, y cultivos de árboles tropicales como cacao, cocos, la palma de aceite y algunos cauchos, depende esencialmente de cambiar las frecuencias genéticas hacia la fijación de alelos favorables al tiempo que se mantiene un alto grado (pero lejos del máximo) de carácter heterocigoto. La uniformidad de las poblaciones de este tipo es imposible y la precisión en una variedad polinizada abierta es un aspecto estadístico de la población como un todo, no una característica de las plantas individuales. De esta manera, la heterogeneidad de poblaciones polinizadas abiertas contrasta con la homogeneidad (o virtualmente lo hace) de líneas congénitas, clones e híbridos.

102 142

Los métodos para mejorar poblaciones caen naturalmente en dos grupos, aquellos que se basan puramente en la selección del fenotipo, llamada normalmente selección en masa, y aquellos que se basan en la selección con pruebas de progenie. La mejora de las inter-poblaciones utiliza el concepto de las poblaciones abiertas de cultivo; permitiendo que los genes fluyan de una población a la otra. Las plantas en una población (cultivos, cepas, ecotipo o cualquier fuente de plasma germinal) son cruzadas naturalmente (es decir, por el viento) o a mano o por abejas (comúnmente *Apis mellifera* L. o *Megachile rotundata* F.) con plantas de otras poblaciones. La selección es aplicada para mejorar una población (o algunas veces ambas) aislando plantas con características deseables de ambas fuentes.

Existen también dos métodos primarios para mejorar poblaciones polinizadas abiertas. En primer lugar, está la situación en la cual una población es cambiada en masa por un procedimiento de selección elegida. El resultado es una población mejorada la cual puede propagarse indefinidamente por un apareamiento al azar con la misma bajo aislamiento. En segundo lugar, la variedad sintética llega al mismo resultado final de una mejora en la población, pero en sí misma no puede propagarse; debe ser reconstruida a partir de líneas parentales o clones. Los procedimientos para la mejora genética de plantas con el propósito de mejorar poblaciones polinizadas abiertas son bien conocidos para aquellos con pericia en el arte, y las revisiones completas de los procedimientos de mejora genética utilizados rutinariamente para mejorar plantas polinizadas cruzadas se proveen en numerosos textos y artículos, incluyendo: Allard (1960) Principles of Plant Breeding, John Wiley & Sons, Inc; Simmonds (1979) Principles of Crop Improvement, Longman Group Limited; Hallauer and Miranda (1981) Quantitative Genetics in Maize Breeding, Iowa State University Press; y Jensen (1988) Plant Breeding Methodology, John Wiley & Sons, Inc.

Selección en Masa. En la selección en masa, las plantas deseables individuales son elegidas, cosechadas, y las semillas sin ensayos de progenie son preparadas para producir la siguiente generación. Dado que la selección se basa únicamente en el progenitor maternal, y no existe control sobre la polinización, la selección en masa se asemeja a un apareamiento al azar con selección. Tal como se menciona anteriormente, el propósito de la selección en masa es el de aumentar la proporción de genotipos superiores en la población.

Sintéticos. Una variedad sintética es producida cruzando entre sí un número de genotipos seleccionados para una buena capacidad de combinación en todas las combinaciones híbridas posibles, con el mantenimiento subsecuente de la variedad por medio de la polinización abierta. Si los progenitores son (más o menos innatos) líneas propagadas de semillas, como en algunas remolachas y arvejas (Vicia) o clones, como en los pastos de hierbas, tréboles y alfalfa, en un principio no representa diferencia alguna. Los progenitores son seleccionados sobre la habilidad de combinación general, algunas veces por medio de cruza de ensayo o cruza superiores, más generalmente por medio de policruzas. Las líneas de semillas progenitoras pueden ser deliberadamente innatas (es decir, por medio de una auto polinización o un cruce de familiares). Sin embargo, incluso si los progenitores no son deliberadamente innatos, la selección entre líneas durante el mantenimiento de la línea asegurará que ocurra alguna cruce en la propia planta. Los progenitores clonales, por supuesto, permanecerán sin cambio alguno y altamente heterocigos.

Si una planta sintética puede ir desde la parcela de producción de las semillas de progenitores al granero o primero debe ser sometida a uno o dos ciclos de multiplicación depende de la producción de la semilla y la escala de la demanda de la semilla. En la práctica, el pasto y los tréboles son generalmente

multiplicados una o dos veces y son por lo tanto considerablemente eliminados del sintético original.

Si bien algunas veces se utiliza la selección en masa, el ensayo de la progenie es generalmente preferido para las policruzas, debido a su simpleza operacional y su obvia importancia para el objetivo, a saber, la explotación de la capacidad de combinación en general en un sintético.

El número de líneas progenitoras o clones que entran en un sintético varía ampliamente. En la práctica, los números de líneas progenitoras varían desde 10 a varios cientos, siendo entre 100 y 200 el promedio. Podría esperarse que los sintéticos de base ancha formados a partir de cien o más clones sean más estables durante la multiplicación de las semillas que los sintéticos de base angosta.

Híbridos. Un híbrido es una planta individual, resultado de una cruce entre progenitores de diferentes genotipos. Los híbridos de explotación comercial son en la actualidad utilizados extensamente en muchos cultivos, incluyendo el maíz (cereal), el sorgo, remolacha, el girasol y el brócoli. Los híbridos pueden también ser producidos en el trigo y el arroz. Los híbridos pueden ser formados de muchas formas diferentes, incluyendo la cruce directa de dos progenitores (híbridos de cruce simple), cruzando un único híbrido cruzado con otro progenitor (híbridos triples, o de cruce triple), o cruzando dos tipos diferentes de híbridos (híbridos cuádruples, o de cruce doble).

Estrictamente hablando, la mayoría de los individuos en un cultivo exterior (por ejemplo, polinizado abierto) son híbridos, pero el término está reservado habitualmente para casos en los cuáles los progenitores son individuos cuyos genomas son lo suficientemente distintos como para ser reconocidos como especies o subespecies diferentes. Los híbridos pueden ser fértiles o estériles dependiendo de diferencias cualitativas y/o cuantitativas en los genomas de los

dos progenitores. La heterosis, o el vigor del híbrido, está asociado habitualmente con el carácter heterócigo aumentado lo cual da como resultado un vigor de crecimiento aumentado, supervivencia, y fertilidad de los híbridos, en comparación con las líneas progenitoras las cuales fueron utilizadas para formar al híbrido. Una máxima heterosis es lograda habitualmente cruzando dos líneas genéticamente diferentes, altamente endógamas.

La producción de híbridos es una industria bien desarrollada, que involucra la producción aislada de ambas líneas progenitoras y los híbridos los cuales son el resultado de la cruce de estas líneas. Para un tratado detallado del proceso de producción de híbridos, referirse a, por ejemplo, Wright, Commercial Hybrid Seed Production 8:161-176, In Hybridization of Crop Plants, supra.

X. Número de Semillas, Obtención de Granos, Capacidad de Inmersión en el Trigo.

El número de las semillas de trigo y el rendimiento subsecuente de granos es afectado por la competencia entre inflorescencias (Whingwiri et al., 1981). El rendimiento de trigo es siempre inferior que el potencial del espigón, debido a una incapacidad para asimilar suministros o una competencia entre los flósculos que limita el tamaño de las semillas y/o su número (Zamski y Grunberger, 1995). Las plantas de trigo saludables y bien crecidas siempre producen más brotes (cabezas potenciales) y flósculos (semillas potenciales) que cabezas y semillas. Un factor significativo para el control del número de semillas es la resistencia a la inmersión de las semillas en desarrollo (Thorne y Wood, 1987). Una revisión de esta área (Evans et al. 1975) indica que para el trigo, en muchos casos el rendimiento está limitado por la capacidad a la inmersión de las semillas en desarrollo. Las limitaciones impartidas por una baja resistencia a la inmersión pueden verse como un conjunto reducido de granos, un número reducido de cabeza de trigo, y un peso de las semillas individuales reducido. En el trigo, por lo

general se cree que el índice de flujo de asimilación con las cabezas en desarrollo determina la supervivencia de los flósculos iniciados y juega un rol significativo en la determinación del número final de granos (Spiertz y vanKeulen, 1980; Abbate et al. 1998). Posiblemente, el método más efectivo para incrementar la cantidad de granos en el trigo es el de modificar el flujo de asimilación para desarrollar granos (Bindraban et al. 1998). El trigo transgénico de la presente invención que contiene una resistencia aumentada a la inmersión confirma esta hipótesis.

Todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes provisionales, y publicaciones referidas o citadas en la presente están incorporadas en su totalidad a modo de referencia en la medida en que no sean incompatibles con las enseñanzas explícitas de esta memoria descriptiva.

Materiales y Métodos

I.- Producción de Plantas Transgénicas

Los vectores de acuerdo con la invención pueden ser utilizados para transformar plantas de la forma que se desee, para hacer plantas de acuerdo con la invención como se trata en la presente.

Transformación del Trigo. Los métodos que se describen en Weeks et al. (1993) y Vasil et al. (1993) han sido adoptados con modificaciones menores para transformar la variedad "Hi-Line" del trigo (Lanning et al., 1992). La técnica, tal como es practicada en forma rutinaria, utiliza inicialmente embriones inmaduros aislados de variedades de trigo, aproximadamente siete días después de la antesis.

El dispositivo Biolistic PDS-1000 He (Bio-Rad Laboratories, USA) fue utilizado para transformar los tejidos de trigo por medio del bombardeo de microproyectiles.

Se utilizaron discos de ruptura de 105,5 Kg/cm² (1500 psi) para los callos de trigo. Los otros procedimientos tales como la esterilización de los discos de

ruptura, macrotransportadores, pantallas bloqueadoras, etcétera, estaban estrictamente de acuerdo con el manual del fabricante.

Transformación del Arroz. Los métodos descritos por Sivamani et al. (1996) pueden ser adoptados para transformar cultivos de arroz "M202" (Johnson et al. 1986). La técnica, de acuerdo a cómo es practicada en forma rutinaria, utiliza inicialmente callos embriógenos cultivados a partir de semillas maduras.

Se utiliza el dispositivo Biolistic PDS-1000 He (Bio-Rad laboratories, USA) para transformar los tejidos del arroz por medio del bombardeo de microproyectiles.

Para los callos de arroz se utilizan discos de ruptura de 105,5 kg/cm² (1500 psi). Otros procedimientos tales como la esterilización de los discos de ruptura, macrovehículos, cribas de detención, etcétera se hallan estrictamente de acuerdo con el manual del fabricante.

Transformación de los guisantes. Los métodos descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 5.286.635 (ejemplo 9) y No. 5.773.693 (Ejemplo V) pueden ser adoptados con modificaciones menores para transformar el guisante del cultivar (*Pisum sativum* L.) del guisante "Pea Green Arrow" (provisto comercialmente por Park Seed®). El material explante del guisante es transformado por incubación con células de *Agrobacterium* que llevan la secuencia *Sh2-Rev6-HS*. El explante de guisante es preferiblemente obtenido a partir de la plúmula de la semilla del guisante, y los brotes transformados son preferentemente inducidos directamente en el material explante sin pasar por una fase de callo. Las plantas de guisante transformadas enteras pueden ser regeneradas a partir de los brotes transformados por radiculación y subsiguiente plantación en el suelo. El ADN exógeno de *Sh2-Rev6-HS* será establemente incorporado en los cromosomas de la planta "Pea Green Arrow" regenerada que será capaz de expresar el gen.

148
148

II.- Los Plásmidos

Trigo.- el plásmido ADN pRQ101 que contiene la secuencia codificadora del gen *Bar* (Fromm et al., 1990) bajo el control del promotor CaMV 35S con el intrón *Adhl* y el terminador NOS, fue utilizado como marcador seleccionable para seleccionar el tejido de trigo transgénico.

Arroz.- En calidad de marcador seleccionable para el arroz, se utilizó el plásmido ADN pLTAB222 que contiene la secuencia codificadora de la higromicina B fosfotransferasa bajo el control del promotor ubiquitina del maíz (Sivamini et al., 1996).

Guisante.- En calidad de marcador seleccionable para el guisante, puede utilizarse la secuencia codificadora de la resistencia contra la cefotaxima de acuerdo con la Patente Estadounidense No. 5.773.693. Este antibiótico anti-*Agrobacterium* puede ser utilizado en el medio de selección y regeneración (500 mg/l) para cultivar los callos de guisante.

General.- Los genes marcadores (es decir, *Bar*, resistencia contra la higromicina, o cefotaxima) eran de una construcción diferente que los genes *Sh2-Rev6-HS*.

Para la introducción de los genes *Sh2-Rev6-HS* en los cereales, se creó el plásmido pSh2-Rev6-HS. Además de contener el ADNc de *Sh2-Rev6-HS*, el plásmido también contenía el promotor *Sh2*, el primer intrón *Shl*, y el terminador NOS (Rogers et al., 1987). Específicamente, el plásmido pSh2-Rev6-HS contiene los siguientes fragmentos nucleótidos vinculados en la dirección 5' a 3': nucleótidos -1084 a + 36 del promotor *Sh2*; 8 nucleótidos de polivinculador; dos C's; nucleótidos del casete de intrón 1 *Shl* que contiene los nucleótidos +43 a +52 del exón 1 de *Shl*, nucleótidos +53 a +1080 del intrón 1 de *Shl* y nucleótidos +1081 a 1097 del exón 2 de *Shl*; un C; 13 nucleótidos de polivinculador que contiene un sitio de restricción *BamHI*; ADNc que codifica *Sh2-Rev6-HS* (SEC ID

NO :3); 18 nucleótidos de polivinculador que contienen los sitios de restricción KpnI y SstI; y el ácido nucleico del terminador NOS. La secuencia de ácidos nucleicos del promotor *Sh2* ha sido revelada por Shaw y Hannah (1992), Plant Physiology 98: 1214 –1216. La numeración de la secuencia del casete intrón *Sh1* ha sido mostrada en Zack y Otros (1986) Maydica , 31, 5-16, y los efectos del casete de intrón *Sh1* sobre la expresión transitoria de los genes ha sido descrita por Clancy et al (1994) Plant Science, 98, 151 – 161) y por Vasil et al. (1989) Plant Science , 91, 1575-1579). Los 3 C's adicionales (2 en la extremidad 5' y 1 en la extremidad 3') son nucleótidos derivados por subclonación. El plásmido incluye péptido de tránsito y sitio de partida consensuado. El plásmido pSH2-Rev6-HS utilizado en la presente solicitud es provisto por la Florida State University.

Para la introducción de *Sh2-Rev6-HS* en las dicotiledóneas tal como el guisante, el plásmido anteriormente mencionado es modificado tal que el promotor *Sh2* es sustituido por un promotor específico de semillas de dicotiledóneas tal como el promotor vicilina del guisante (Patente Estadounidense No. 5.773.693). Hay otros promotores y/o construcciones adecuados para la expresión del *Sh2-Rev6-HS* en dicotiledóneas, bien conocidos por la persona con pericia en el arte (ver por ejemplo la Patente Estadounidense No. 5.773.693).

III.- Selección y Regeneración de Plantas Transgénicas

Trigo.- las plantas de trigo transgénicas fueron obtenidas a partir de embriones inmaduros bombardeados mediante los métodos descritos por Weeks et al. (1993) y por Vasil et al. (1993) mediante selección por bialaphos (Meiji Seika Kaisha Ltd., Japón). Los callos resistentes del trigo son transferidos a un medio a efectos de inducir la producción tanto de brotes como de raíces.

Arroz.- Las plantas de arroz transgénicas fueron obtenidas a partir de los callos embriogénos bombardeados de arroz mediante la técnica de Sivamani et al. (1996) mediante selección por higromicina. Los callos resistentes del arroz son

180
170

transferidos a un medio a efectos de inducir la producción tanto de brotes como de raíces.

Guisante.- Las plantas de guisante transgénicas pueden ser obtenidas a partir de callos transformados mediante *Agrobacterium*, de explantes de guisante mediante el método de la Patente Estadounidense No. 5.773.693 mediante selección por cefotaxima.

Los brotes de guisante pueden ser radiculados por transferencia a tapones Sorbarod (Baumgartner Papiers SA, Suiza) y embebidos en YRM líquido de acuerdo con la Patente Estadounidense No. 5.773.693 (Ejemplo V).

General.- Las plántulas putativas transgénicas fueron transferidas al invernadero y se las dejó autofertilizar. Para el trigo, típicamente más del 75% de dichas plántulas son escapes, y las plantas transgénicas verdaderas fueron seleccionadas rociando las plantas con glufosinato al 0,1% (Liberty®, Agrevo Inc.).

IV.- Cebadores para RCP

Hemos utilizado un cebador específico para *Sh2* y un cebador específico para NOS para RCP para confirmar la presencia de transgen *Sh2-Rev6-HS* en las plantas transgénicas. El cebador 5' era el MC4Sh2, un 26-mero que es específico para las secuencias de *Sh2* en la construcción:

5' CTG GAT GTG AAC TCA AGG ACT CCG TG 3' (SEC ID NO. 5).

El cebador 3' era el MC35PUC19, un 24-mero específico para la estructura básica puc de la siguiente construcción:

5' GGC TTA ACT ATG CGG CAT CAG AGC 3' (SEC ID NO: 6).

Los cebadores producen un producto de RCP de 826 pb (309 pb de ADNc de *Sh2*, 260 pb de NOS, y 257 pb de pUC19).

A continuación se dan ejemplos que ilustran procedimientos para llevar la invención a la práctica. Dichos ejemplos no tienen por objeto delimitar la

151
151

invención. Todos los porcentajes se expresan en peso, y todas las proporciones de las mezclas de solventes se expresan en volumen, a menos que se diga otra cosa.

Ejemplo 1.- Análisis Genético de Plantas de Trigo Transgénicas

El conjunto inicial de transformantes de trigo rindió una cantidad de transformantes independientes que fueron transgénicos para *Sh2-Rev6-HS* y/o resistencia contra el basta.

Las plantas T_0 fueron dejadas germinar y madurar en el invernadero bajo condiciones controladas.

Los transformantes de trigo seleccionados fueron analizados por RCP para establecer la presencia del transgen introducido y para determinar los datos de la segregación de las semillas T_1 a efectos de establecer la resistencia contra el basta.

La selección por RCP de las plantas de trigo transgénicas utilizó MC4Sh2 y MC35PUC19 (secuencias de cebador anteriormente mencionadas) para establecer la presencia de *Sh2-Rev6-HS* en muestras de ADN genómicas preparadas a partir de tejido de hoja en base a protocolos de RCP standard.

Fueron ensayadas 27 líneas independientes de trigo transgénico. Todas las 27 líneas transgénicas resultaron ser positivas en cuanto a la resistencia contra el basta. Quince de las 27 líneas transgénicas resultaron ser positivas en cuanto a la presencia del transgen *Sh2-Rev6-HS*, y las otras 12 no dieron positivo en cuanto a la presencia del transgen *Sh2-Rev6-HS*.

Ejemplo 2.- Análisis de fenotipos de las Plantas Transgénicas de Trigo

Fueron recolectados varios rasgos fenotípicos, y se los analizó para cada una de las 27 plantas de trigo transgénicas cultivadas en un invernadero. Tal como se mencionó anteriormente, la totalidad de las 27 líneas transgénicas llevaba el gen de la resistencia contra herbicidas. Dichos rasgos incluían lo

siguiente: cantidad de semillas por planta (Semillas/planta); peso individual de las semillas (Peso de las Semillas Individuales) en miligramos por grano (mg/grano); Índice de Cosecha (Harvest Index); peso total de las semillas (Peso Total de las Semillas) en gramos por planta (g/planta); cantidad de cabezas de granos por planta (cabezas); peso total de la planta (Peso de la planta) en gramos por planta (g/planta); y peso de las hojas bandera (Peso de las Hojas Bandera) en gramos por planta (g/planta).

Las semillas fueron uniformemente secadas en una incubadora a 37°C hasta una humedad de entre aproximadamente 10% y aproximadamente 14%.

Las partes aéreas de las plantas fueron cosechadas en momentos de su madurez y secadas uniformemente hasta una humedad de aproximadamente 0% en una incubadora a 125°C. Los pesos de las plantas secas y los pesos de las hojas bandera secas fueron ajustados a efectos de reflejar los pesos con el mismo contenido de humedad que la de las semillas (es decir, de aproximadamente 10% a aproximadamente 14%). Las raíces no fueron recolectadas.

El peso de la planta representa el peso total de las partes "aéreas" de la planta que no incluye el peso total de las semillas de la planta y el peso de la hoja bandera de la planta.

El Índice de cosecha (HI) fue calculado como sigue:

$$HI = \{(\text{peso total de las semillas})/(\text{peso total de las semillas} + \text{Peso de la planta} + \text{peso de la hoja bandera})\}$$

Para la cantidad de cabezas de trigo por planta, la cantidad de cabezas fue contada sin tener en cuenta cuántas semillas había en una cabeza en particular.

Los datos de fenotipo fueron analizados en varias maneras distintas, como anteriormente mencionado.

153
173 153

Comparación entre Líneas RCP + y RCP-. Esta comparación fue hecha para todas las *líneas* transgénicas (15 líneas) con resultados RCP positivos (RCP+) para Sh2-Rev6-HS contra todas las líneas transgénicas (12 líneas) con los resultados de la RCP negativos (RCP-) para Sh2-Rev6-HS . Por lo tanto, las líneas RCP+ llevan tanto el gen de la resistencia contra los herbicidas como el gen Sh2-Rev6-HS, mientras que las líneas RCP- llevan solamente los genes de resistencia contra los herbicidas. Los resultados han sido consignados en la Tabla 1.

Tabla I.- Comparación entre las Líneas RCP+ y RCP-									
Canti- dad y tipos de líneas		Semillas/ Plantas	Peso indivi- dual de las semi- llas	Peso total de las semi- llas	Indice de cose- cha	Ca- be- zas	Peso de la planta	Peso de hoja bande- ra	# de plan- tas
			(mg/ grano)	(g/ planta)		#	(g/ planta)	(g/ planta)	
15 RCP+	Prom. Stand.	63,68** 10,59	25,2*** 1,8	1,73** 0,34	0,30** 0,08	5,71 0,86	3,74 2,38	0,40 0,20	183
12 PCR-	Prom. Stand.	53,50 9,6	24,10 1,5	1,37 0,26	0,25 0,10	5,82 0,81	3,64 1,74	0,41 0,18	148
PCT+/ RCP-		1,19*	1,05***	1,26**	1,17**	0,98	1,03	0,97	

*, **, *** indican valores de p inferiores o iguales a: 0,05, 0,01 ó 0,001 respectivamente, en base a un ensayo t.

Comparación entre SH2+ y SH2-. En la segunda comparación, solamente las 8 líneas transgénicas con resultados de RCP positivos para *Sh2-Rev6-HS* que también presentaron incrementos en los niveles de la proteína introducida (SH2+) fueron promediadas y comparadas con todas las otras líneas (SH2-). Las

154
179 154

8 líneas de la RCP+ que son SH2+ son las líneas para las cuales se detectaron mayores niveles de la proteína introducida. Básicamente, los niveles de SH2 fueron comparados con los de las líneas que eran transgénicas solamente para el gen de la resistencia contra los herbicidas. Aquellas plantas experimentales que produjeron 25% o más de la proteína SH2 en comparación con la producción de SH2 por las líneas que eran transgénicas para solamente el gen de resistencia contra los herbicidas recibieron la designación de "SH2+".

Las líneas SH2+ fueron comparadas con las otras 19 líneas ("SH2-") que carecen de cualquier expresión significativa de la proteína introducida. Por lo tanto, las 19 líneas SH2 incluyen las 7 líneas RCP+ que no expresaban niveles significativos de la proteína SH2-REV6-HS y las 12 líneas RCP- que no expresaban el SH2-REV6-HS en absoluto. Los datos se presentan en la Tabla II.

Tabla II.- Comparación entre SH2+ y SH-									
Canti- dad y tipo de líneas		Semillas/ Plantas	Peso indivi- dual de las semi- llas	Peso total de las semi- llas	Indice de cose- cha	Ca- be- zas	Peso de la planta	Peso de hoja bande- ra	# de las plan- tas
			(mg/ grano)	(g/ planta)		#	(g/ planta)	(g/ planta)	
8 SH2+	Prom.	78,23***	26,9***	2,19***	0,32***	6,00	4,29***	0,45**	100
	Stand.	45,50	4,10	1,35	0,10	2,93	2,29	0,21	
19 SH2-	Prom.	50,86	23,80	1,30	0,25	5,66	3,44	0,39	231
	Stand.	33,65	4,70	0,94	0,13	2,38	1,99	0,18	
SH2+/ SH2-		1,54***	1,13***	1,68***	1,25***	1,06	1,25***	1,15**	

*, **, *** indican valores de p inferiores o iguales a: 0,05, 0,01 ó 0,001 respectivamente, en base a un ensayo t.

175 155

Los datos presentados en la Tabla II muestran que la cantidad total de semillas por planta para las líneas SH2+ incrementó en aproximadamente 54 % en comparación con la cantidad total de semillas por planta para las líneas SH2-. El peso individual de las semillas aumentó en aproximadamente un 13 %, y el rendimiento total de las semillas aumentó en aproximadamente el 68% para las líneas SH2+ en comparación con las líneas SH2-. El Índice de Cosecha para las líneas SH+ era aproximadamente un 25 % mayor que para las líneas SH2-. Las líneas SH2+ era también significativamente más grandes en masa total de la planta y en el peso de la hoja bandera (en aproximadamente +25% y en aproximadamente +15%, respectivamente).

Comparación entre Líneas Homócigo y Heterócigo en cuanto a Sh2-Rev6-HS.

Las plantas T₁ que demostraron ser homócigas mediante el ensayo de progenie de las semillas T₂, recibieron la designación de "Homoz SH2+". Se espera que las semillas de las plantas Homoz SH2+ tengan una dosis mayor del transgen que las otras líneas. En esta comparación, las plantas Homoz SH2 fueron comparadas con plantas SH2+ que eran heterócigas (Heteroz SH2+), y fueron también comparadas con las 12 líneas RCP-

Tabla III.- Comparación entre líneas homócigas y heterócigas para Sh2-Rev6-HS									
tipo de líneas		Semillas/ Plantas	Peso indivi- dual de de las semillas	Peso total de las semi- llas	Indice de cose- cha	Ca- be- zas	Peso de la planta	Peso de hoja ban- dera	# de las plan- tas
			(mg/ grano)	(g/ planta)		#	(g/ planta)	(g/ planta)	
Homoz. SH2+	Prom.St and.	97,1* 43,60	27,60 2,60	2,74* 1,31	0,30 0,03	7,59** 3,10	5,76 2,25	0,56 0,17	22
Heteroz SH2+	Prom. Stand.	74,50 45,10	26,80 3,80	2,10 1,34	0,33 0,10	5,58 2,54	3,91 2,08	0,42 0,20	66
Homoz/		1,30	1,03	1,30*	-0,05	1,36**	1,47	1,33	22/66

156
175 186

heteroz SH2									
Homoz/ "H2 12 PCR-		1,91***	1,16***	2,10***	1,16*	1,34**	1,67***	1,43***	22/ 148

*, **, *** indican valores de p inferiores o iguales a: 0,05, 0,01 ó 0,001 respectivamente, en base a un ensayo t.

La mayoría (aproximadamente los 2/3) de las plantas analizadas resultaron ser heterócigas para el *Sh2-Rev6-HS* y por ello tienen solamente la mitad de la dosis posible del transgen que codifica el SH2-REV6-HS.

Para determinar el efecto de la mayor dosificación de los genes, se determinó que las plantas T₁ individuales eran homócigas o heterócigas mediante el ensayo de progenie de las semillas T₂ cosechadas de las plantas. La falta de segregación para el gen marcador de la resistencia a los herbicidas fue tomada como evidencia del carácter homócigo. Una comparación de 22 plantas homócigas SH2+ con plantas heterócigas SH+ indica que el aumento de la dosis del transgen *Sh2-Rev6-HS* lleva a una rendimiento mayor aun y mayor desarrollo de la planta con respecto a las plantas que no contienen o expresan el transgen. Los resultados provistos en la Tabla III indican un incremento de aproximadamente el 110% en el peso total de semillas por planta en comparación con las plantas heterócigas SH2+.

Ejemplo 3.- Experimentos con arroz

Las plantas de arroz transgénicas son producidas tal como se describe en Materiales y Métodos. Las plantas de arroz resultantes son analizadas tal como se indica en los Ejemplos 1 y 2.

Ejemplo 4.- Experimentos con guisantes

157
172 157

Las plantas de guisante transgénicas son producidas tal como se describe en Materiales y Métodos. Las plantas de guisante resultantes son analizadas tal como se indica en los Ejemplos 1 y 2.

Ejemplo 5.- Análisis Northern de Líneas de Arroz SH2-REV6-HS Transgénicas

Diez (10) o más semillas en desarrollo fueron cosechadas a partir de líneas de arroz T0 transgénicas individuales. La totalidad de las líneas transgénicas T0 eran RCP positivas para el transgen *Sh2-Rev6-HS*. Se preparó el ARN y se lo analizó mediante las técnicas standard. Los blots duplicados fueron sondeados con una sonda subunidad pequeña AGP (Brittle-2) o mediante las secuencias codificadoras de transgen *Sh2-Rev6-HS*. El genotipo etiquetado M202 es un control relativo a la variedad.

Tal como puede apreciarse en la Figura 1, las plantas transgénicas RS1, RS4, RS10, RS20 y RS22, expresan el transgen *Sh2-Rev6-HS*, a diferencia de la planta M202 no transformada que no expresa el transgen. Debido a pequeñas diferencias en la carga, las diferencias menores en la expresión pueden deberse o no al transgen. Las diferencias significativas en la carga no son evidentes en un blot duplicado sondeado con el gen Brittle-2.

Ejemplo 6.- Actividad de la AGP y Peso de Semillas T1 de las Líneas Transgénicas SH2-REV6-HS

Planta	Actividad de AGP	Peso de Semilla T1
M202	100	No se dispone de datos comparables para M202
RS1	122	27,0 mg
RS2	127	27,5 mg
RS3	121	23,8 mg
RS4	120	27,1 mg
RS6	124	25,6 mg
RS8	122	21,9 mg
RS10	147	27,7 mg

158
178 158

RS17	106	20,0 mg
RS20	114	23,8 mg
RS21	100	22,7 mg
RS22	127	21,5 mg

Los ensayos de la actividad de AGP reflejan una media de tres replicaciones llevadas a cabo mediante un extracto preparado a partir de un mínimo de 10 semillas en desarrollo. Las actividades se expresan referidas al valor promedio obtenido para la planta de control relativo a la variedad M202. Los pesos de las semillas T1 son promedios de una submuestra aleatoria de semillas T1 maduras cosechadas a partir de líneas transgénicas T0 individuales.

A nivel de la actividad de la AGP, la mayoría de las líneas de arroz transgénicas *Sh2-Rev6-HS* tienen incrementos significativos con respecto al M202. Las líneas RS17 y RS21 no tienen incrementos significativos en la actividad de la AGP. La línea RS10 presenta el mayor nivel de sobre-expresión de todas las líneas al nivel del ARN y también la máxima actividad de AGP extraíble.

Ejemplo 7- Estudio del Rendimiento en la Cámara de Desarrollo, del RS1 T1

Dieciséis plantas T1 (numeradas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 23 y 25, respectivamente) representativas de la línea transgénica de arroz *RS1 Sh2-Rev6-HS* fueron cultivadas en una cámara de desarrollo y comparadas con cinco M202 y 5 de la línea transgénica de control 97-3 (la línea 97-3 lleva solamente la resistencia a la higromicina). Las dieciséis plantas RS1 T1 y las 5 plantas 97-3 provinieron de semillas individuales germinadas en platos de petri mediante la utilización de la selección por higromicina y fueron seguidamente transplantadas en suelo. Las plantas 97-3 son homocigas para un locus de gen de resistencia a la higromicina y las plantas RS1 T1 son heterocigas (12 de 16) u homocigas (4 de 16) para el locus del transgen higromicina/*Sh2-Rev6-HS*. La dosis de cada planta RS1 T1 fue determinada mediante ensayos de progenie. Las plantas RS1 10, 18, 19 y 20, son homocigas. La dificultad para establecer las

159
170 + 189

plantas M202 puede ser una consecuencia de que se han sembrado directamente en la tierra. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla IV.

Tabla IV

Genotipo	Panicula #	Total		Peso total Sem		Semillas/ind.		Indice de Cosecha
		Peso #	Peso Sem	Panicula	Panicula	Peso Sem.		
M202	1	15	365	9.34	0.32	24.56	0.0252	0.31
	2	12	403	11.04	0.32	34.33	0.0270	0.39
	3	15	647	17.11	1.14	43.13	0.0264	0.33
	4	14	413	10.46	0.75	33.50	0.0253	0.33
	5	24	751	20.07	0.34	31.29	0.0257	0.35
	avg	16.2	521	13.724	0.35	32.41	0.0253	0.36
	std	4.12	149.32	4.10	0.17	6.23	0.0005	0.03
97-3	1	31	739	20.01	0.35	25.45	0.0254	0.35
	2	32	1040	27	0.34	32.50	0.0250	0.38
	3	28	565	17.35	0.34	24.57	0.0259	0.32
	4	13	523	16.28	0.39	34.51	0.0258	0.37
	5	32	555	23.57	0.74	27.97	0.0253	0.37
	avg	28.2	607	20.902	0.75	29.32	0.0259	0.36
	std	5.31	143.53	3.64	0.13	3.92	0.0003	0.02
RS1	1	33	543	24.35	0.74	25.53	0.0255	0.34
	3	18	535	17.43	0.37	38.11	0.0255	0.30
	4	26	502	25.31	1.00	25.35	0.0273	0.36
	5	14	540	14.51	1.04	33.57	0.0289	0.34
	6	33	551	24.76	0.75	27.00	0.0273	0.34
	7	32	539	23.97	0.75	27.73	0.0270	0.35
	10	20	527	15.23	0.73	29.35	0.0259	0.31
	13	12	562	14.63	1.22	46.33	0.0250	0.32
	15	20	565	15.14	0.75	29.25	0.0259	0.32
	17	17	575	17.34	1.05	39.88	0.0253	0.33

160
160

13	9	533	13.94	1.55	59.78	0.0259	0.40
19	23	509	16.05	0.70	26.46	0.0264	0.33
20	19	534	15.96	0.34	31.26	0.0259	0.31
22	11	553	14.25	1.30	50.27	0.0258	0.39
23	13	559	14.77	0.82	31.05	0.0264	0.31
25	19	708	19.27	1.51	37.25	0.0272	0.36
avg	20.25	573.33	13.00	0.95	35.03	0.0265	0.34
std	7.23	144.96	4.14	0.23	9.17	0.0007	0.03

RS1 comparado con M202

1.25 1.30 1.31 1.12 1.11 1.01 0.94

RS1 comparado con 97-3

0.72 0.34 0.36 1.27 1.24 1.02 0.94

Si bien este estudio inicial de RS1 indica una gran variabilidad entre y dentro de los genotipos, algunas observaciones pueden ser válidas. Primero, que las plantas RS1 T1 promediaron un mayor peso de semillas por panícula que cualquiera de los genotipos de control. Segundo, que las RS1 T1 tuvieron un promedio superior de semillas por panícula que cualquiera de los genotipos de control. Este componente de rendimiento, cantidad de semillas por panícula, es el parámetro positivamente afectado más grande en los experimentos de transformación del trigo que han sido llevados a cabo mediante el uso de *Sh2-Rev6-HS*.

La precedente descripción detallada ha sido dada solamente por razones de claridad de comprensión y no debe servir para deducir limitaciones

10/ 161
161

innecesarias, ya que las modificaciones serán obvias para las personas con pericia en el arte.

Si bien la invención ha sido descrita en relación con formas de realización específicas de la misma, debe entenderse que es capaz de experimentar modificaciones ulteriores, y que la presente solicitud tiene por objeto abarcar cualesquiera variaciones, usos o adaptaciones de la invención, siguiéndose en términos generales los principios de la invención e incluyéndose las desviaciones con respecto a la presente revelación tal como las conocidas en la práctica habitual o usual en el arte del cual la presente invención forma parte y tal como puede ser aplicada a los aspectos esenciales de la misma, anteriormente mencionadas, y sin salirse de los alcances de las reivindicaciones adjuntas.

02 162
15

REFERENCIAS PARA LAS CUALES NO SE PROVEE UNA TRANSCRIPCION
COMPLETA EN EL TEXTO DE LA MEMORIA DESCRIPTIVA

Bac, J.M., Giroux, M. Hannah, L. (1990) Cloning and characterization of the brittle-2 gene of maize (Clonación y caracterización del gen brittle-2 del maíz), Maydica 35: 317-322.

Bhave, M.R., Lawrence, S., Barton, C., and Hannah, L.C. (1990) Identification and molecular characterization of shrunken-2 cDNA clones of maize (identificación y caracterización molecular de los clones de ADNc shrunken-2- del maíz), Plant Cell 2:581-588.

Choi, S.B., Zhang, Y., Ito, H., Stephens, K, Winder, T., Edwards, G.E., y Okita, T.W. (1998) Increasing rice productivity by manipulation of starch biosynthesis during seed development. (Incremento de la productividad del arroz mediante la manipulación de la biosíntesis del almidón durante el desarrollo de las semillas) pag. 137-149 In Feeding a world population of more than eight billion people: a challenge to science. Ed. J.C. Waterlow. Oxford University Press.

Duvick, D.N. (1992) Genetic contributions to advances in yield of United States maize (Aportes Genéticos a los avances del rendimiento del maíz en los EE.UU.), Maydica 37:69-79.

Giroux, MS., Shaw, J., Barry, G., Cobb, B.G., Greene, T., Okita, T., y Hannah, LC. (1996) A single gene mutation that increases seed weight (Mutación de un solo gen que incrementa el peso de las semillas), Proc. Natl. Acad. Sci, EE.UU., 93:5824- 5829.

Hannah, L.C., Giroux, M., y Boyer, C.D. (1993) Biotechnological modification of carbohydrates for sweet corn and maize improvement (modificación biotecnológica de carbohidratos para la mejora de maíz dulce y maíz), Biotechnol. Hortic. Sci. Hortic, 55:177~197.

183 163

King, R.W., Wardlaw, L.F., y Evans, L.T. (1967) Effect of assimilate utilization on photosynthetic rate in wheat (efecto de la utilización de asimilados en la velocidad fotosintética en el trigo), Planta 77:261-276.

Lanning, S.P. Talbert, L.E. McNeal, F.H. Alexander, W.L. McGuire, C.F. Bowman, H. Carlson, G. Jackson, C. Eckhoff, J. Kushnak, O. (1992) Registration of "Hi-Line" wheat (Registración del trigo "Hi-Line"), Crop Science 32:283-214.

Martinez-Carrasco, R., y Thorne, G.N. (1979) Effects of crop thinning and reduced grain numbers per ear on grain size in two winter wheat varieties given different amounts of nitrogen (Efectos del podado de la planta de cultivo y de menores cantidades de granos por oreja en el tamaño del grano en dos variedades invernales de trigo cuando las mismas reciben diferentes cantidades de nitrógeno). Ann. Appl. Biol. 92:383-393.

Sakulsingharoj, C., Choi, S-B., y Okita, T.W. (1999) Increasing rice productivity by molecular genetic manipulation of ADP-glucose pyrophosphorylase in starch biosynthesis (Incremento de la productividad del arroz mediante el manipuleo por genética molecular de la ADP-glucosa pirofosforilasa en la biosíntesis del almidón), General Meeting of the International Program on Rice Technology.

Stark, D.M., Timmeman, K., Barry, C.F., Preiss, J., y Kishore, G.M. (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase (Regulación de la cantidad de almidón en los tejidos de las plantas mediante ADP glucosa pirofosforilasa), Science 258:287- 292.

Sun, J., Okita, T.W., y Edwards, G.E. (1999) Modification of carbon partitioning, photosynthetic capacity, and O₂ sensitivity in Arabidopsis plants with low ADP-glucose pyrophosphorylase activity (Modificación del desdoblamiento del carbono, capacidad de fotosíntesis, y sensibilidad al oxígeno en las plantas de Arabidopsis con baja actividad de ADP-glucosa pirofosforilasa). Plant Physiology 119:267-276.

84 164
F9

Zamski, E., y Grunberger, Y. (1995) Short-and long-eared high-yielding hexaploid wheat cultivars: which has unexpressed potential for higher yield? (cultivares de trigo hexaploide de alto rendimiento de orejas cortas y largas: ¿cuál de ellos tiene un potencial no expresado para un mayor rendimiento?). Annals of Botany 75:501-506.

Anderson, J.M. et al. (1989) The Encoded Primary Sequence of a Rice Seed ADP-glucose Pyrophosphorylase Subunit and its Homology to the Bacterial Enzyme (La secuencia primaria codificada de la Subunidad de una ADP-glucosa pirofosforilasa de las semilla de arroz y su homología con la enzima bacteriana). The Journal of Biology Chemistry 264(21):12238-12242.

Anderson, J.M. et al. (1991) Molecular characterization of the gene encoding a rice endosperm-specific ADPglucose pyrophosphorylase subunit and its developmental pattern of transcription (Caracterización molecular del gen que codifica una subunidad ADP glucosa pirofosforilasa endosperma-específica del arroz, y el patrón del desarrollo de su transcripción), Gene 97-199-205.

Dickinson, D. B., y Preiss J. (1969) Presence of ADP-glucose Pyrophosphorylase in Shrunken-2 and Brittle-2 Mutants of Maize Endosperm. (Presencia de la ADP-glucosa pirofosforilasa en los mutantes Shrunken-2 y Brittle-2 del endosperma de maíz), Plant Physiol. 44:1058-1062.

Muller-Rober, B.T. et al (1990) One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose (uno de dos genes diferentes de la ADP glucosa pirofosforilasa de la papa responde fuertemente a elevados niveles de sucrosa), Mol. Gen. Genet. 224.136-146.

Morell, M., M. Bloom, J. Preiss (1988) Affinity Labeling of the Allosteric Activator Site(s) of Spinach Leaf ADP-glucose Pyrophosphorylase (Etiquetado de afinidad

185 165 15

del (de los) sitio(s) del activador alostérico de la ADP glucosa pirofosforilasa de la hoja de espinaca), The Journal of Biological Chemistry 263(2):633--637.

Nakata, Paul A. et al. (1991) Comparison of the primary sequences of two potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase subunits (Comparación entre las secuencias primarias de dos subunidades de ADP-glucosa pirofosforilasa de tubérculos de papa), Plant Molecular Biology, 17:1089-1093.

Tsai, Chia-Yin, Oliver E. Nelson (1966) Starch-Deficient Maize Mutant Lacking Adenosine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylsases Activity (Mutante del maíz deficiente en almidón que carece de la actividad de la adenosina difosfato glucosa pirofosforilasa), Science 151:341-343.

Greene, T.W. y Hannah, L.C. (1998) Enhanced Stability of Maize Endosperm ADP- Glucose Pyrophosphorylase is Gained through Mutants that Alter Subunit Interactions (Se obtiene una mayor estabilidad del ADP-glucosa pirofosforilasa del endosperma del maíz mediante mutantes que alteran las interacciones de las subunidades). Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:13342-13347.

Abbate, P.E., Andrade, F.H., Lazaro, L., Bariffi, J.F., Berardocco, H.G., Inza, V.H., y Marturano, F. (1998) Grain Yield Increase in Recent Argentine Wheat Cultivars. (Aumento del rendimiento de los granos en cultivares de trigo argentinos recientes), Crop Science 38:1203-1209.

Bindraban, P. S., Sayre, K. D., y Solis-Moya, E. (1998) Identifying Factors that Determine Kernel Number in Wheat (Identificación de los factores que determinan la cantidad de granos en el trigo), Field Crop Research 58:223-234.

Evans, L.T., Wardlaw, I.F., y Fisher, R.A. (1975) Crop Physiology: Some case Histories (fisiología de las plantas de cultivo: historias de algunos casos), Evans L.T., Edited. Cambridge, Cambridge University Press, 101-149.

Rogers S.G., Klee H.J., Horsch R.B., Farley R.T. 1987. Improved vectors for plant transformation: Expression cassette vectors and new selectable markers (vectores

185 166 168

mejorados para la transformación de plantas: vectores de casetes de expresión y nuevos marcadores seleccionables), Methods in Enzymol., 153:253-277.

Sivamani, E., Shen, P., Opalka, N., Beachy, R. N., y Fauquet, C. M. 1996. Selection of large quantities of embryogenic calli from indica rice seeds for production of fertile transgenic plants using the biolistic method (Selección de grandes cantidades de callos embriogénicos a partir de semillas de arroz indica para la producción de plantas transgénicas fértiles mediante el método biolístico), Plant Cell Reports 15:322-327.

Spiertz, J.H.J., van Keulen, H (1980) Effects of Nitrogen and Water Supply on Growth and Grain Yield of Wheat (efectos del suministro de nitrógeno y agua en el desarrollo y rendimiento del grano del trigo), Proceedings of the Third International Wheat Conference 2 de Mayo – 3 de Junio, Madrid, España,

Thorne, G.N., y Wood, D.W. (1987) Effects of Radiation and Temperature on Tiller Survival, Grain Number and Grain Yield in Winter Wheat (Efectos de la radiación y de la temperatura en la supervivencia de los retoños, cantidad de granos y rendimiento de los granos, en el trigo invernal), Annals of Botany 59:413-426.

Vasil, V., Srivastava, V., Castillo, A.M., Fromm, M.E., y Vasil, I.K. 1993. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos (Producción Rápida de plantas de trigo transgénicas mediante el bombardeo directo de embriones inmaduros cultivados), Bio/Technology 11:1553-1558.

Weeks, J.T., Anderson, O.D., y Blechl, A.E. 1993. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*) (producción rápida de múltiples líneas independientes de trigo transgénico fértil) (*Triticum aestivum*). Plant Physiol., 102: 1077-1084.

37 167 127

Whingwiri, E.E., Kuo, J., y Stern, W.R. (1981) The Vascular System in the Rachis of a Wheat Ear (Sistema vascular en la raquis de una oreja de trigo), Annals of Botany, 48:189-201.

Johnson, C.W., Carnahan, H.L., Tseng, S.T., Oster, J.J., y Hill, J.E. 1986. Registration of "M-202" rice (Registración del arroz "M-202"), Crop Science 26:198.

Fromm, M.E., Morrish, F. Armstrong, C. Williams, R. Thomas, J., y Klein, T.M. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants (Herencia y expresión de genes quiméricos en la progenie de plantas de maíz transgénicas), Bio/Technology, 8::833-839.

188 168
168

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Research & Development Institute, Inc. & Giroux, Michael
<120> Plantas Transgénicas con Mayor Rendimiento de las Semillas, Biomasa e
Indice de Cosecha
<130> RDI-100C2
<140> PCT/US01/06622
<141> 2001-03-01
<150> US 09/516.250
<151> 2000-03-01
<160> 6
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 1582
<212> ADN
<213> Zea mays
<220>
<221> CDS
<222 (10)(1563)
<223> forma revertante del gen Shrunk-2
<220>
<221> variación
<222> (267)
<223> k = g ó t; aminoácido 86 = Ala
<220>
<221> variación
<222> (1368)
<223> r = a ó g; aminoácido 453 = Pro
<220>
<221> variación
<222> (1578)
<223> k = g ó t
<400> 1

ggaggagat atg cag ttt gca ctt gca ttg gac acg aac tca ggt cct cac 51
Met Gln Phe Ala Leu Ala Leu Asp Thr Asn Ser Gly Pro His
1 5 10

cag ata aga tct tgt gag ggt gat ggg att gac agg ttg gaa aaa tta 99
Gln Ile Arg Ser Cys Glu Gly Asp Gly Ile Asp Arg Leu Glu Lys Leu
15 20 25 30

109 169 169

agt att ggg ggc aga aag cag gag aaa gct ttg aga aat agg tgc ttt	147
Ser Ile Gly Gly Arg Lys Gln Glu Lys Ala Leu Arg Asn Arg Cys Phe	
35 40 45	
ggt ggt aga gtt gct gca act aca caa tgt att ctt acc tca gat gct	195
Gly Gly Arg Val Ala Ala Thr Thr Gln Cys Ile Leu Thr Ser Asp Ala	
50 55 60	
tgt cct gaa act ctt cat tct caa aca cag tcc tct agg aaa aat tat	243
Cys Pro Glu Thr Leu His Ser Gln Thr Gln Ser Ser Arg Lys Asn Tyr	
65 70 75	
gct gat gca aac cgt gta tct gck atc att ttg ggc gga ggc act gga	291
Ala Asp Ala Asn Arg Val Ser Ala Ile Ile Leu Gly Gly Gly Thr Gly	
80 85 90	
tct cag ctc ttt cct ctg aca agc aca aga gct acg cct gct gta cct	339
Ser Gln Leu Phe Pro Leu Thr Ser Thr Arg Ala Thr Pro Ala Val Pro	
95 100 105 110	
gtt gga gga tgt tac agg ctt att gat atc cct atg agt aac tgc ttc	387
Val Gly Gly Cys Tyr Arg Leu Ile Asp Ile Pro Met Ser Asn Cys Phe	
115 120 125	
aac agt ggt ata aat aag ata ttt gtg atg agt cag ttc aat tct act	435
Asn Ser Gly Ile Asn Lys Ile Phe Val Met Ser Gln Phe Asn Ser Thr	
130 135 140	
tcg ctt aac cgc cat att cat cgt aca tac ctt gaa ggc ggg atc aac	483
Ser Leu Asn Arg His Ile His Arg Thr Tyr Leu Glu Gly Gly Ile Asn	
145 150 155	
ttt gct gat gga tct gta cag gta tta gcg gct aca caa atg cct gaa	531
Phe Ala Asp Gly Ser Val Gln Val Leu Ala Ala Thr Gln Met Pro Glu	
160 165 170	
gag cca gct gga tgg ttc cag ggt aca gca gac tct atc aga aaa ttt	579
Glu Pro Ala Gly Trp Phe Gln Gly Thr Ala Asp Ser Ile Arg Lys Phe	
175 180 185 190	
atc tgg gta ctc gag gat tat tac agt cac aaa tcc att gac aac att	627
Ile Trp Val Leu Glu Asp Tyr Tyr Ser His Lys Ser Ile Asp Asn Ile	
195 200 205	
gta atc ttg agt ggc gat cag ctt tat cgg atg aat tac atg gaa ctt	675
Val Ile Leu Ser Gly Asp Gln Leu Tyr Arg Met Asn Tyr Met Glu Leu	
210 215 220	
gtg cag aaa cat gtc gag gac gat gct gat atc act ata tca tgt gct	723
Val Gln Lys His Val Glu Asp Asp Ala Asp Ile Thr Ile Ser Cys Ala	
225 230 235	
cct gtt gat gag agc cga gct tct aaa aat ggg cta gtg aag att gat	771

100 170 170

Pro Val Asp Glu Ser Arg Ala Ser Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Asp	
240 245 250	
cat act gga cgt gta ctt caa ttc ttt gaa aaa cca aag ggt gct gat	819
His Thr Gly Arg Val Leu Gln Phe Phe Glu Lys Pro Lys Gly Ala Asp	
255 260 265 270	
ttg aat tct atg aga gtt gag acc aac ttc ctg agc tat gct ata gat	867
Leu Asn Ser Met Arg Val Glu Thr Asn Phe Leu Ser Tyr Ala Ile Asp	
275 280 285	
gat gca cag aaa tat cca tac ctt gca tca atg ggc att tat gtc ttc	915
Asp Ala Gln Lys Tyr Pro Tyr Leu Ala Ser Met Gly Ile Tyr Val Phe	
290 295 300	
aag aaa gat gca ctt tta gac ctt ctc aag tca aaa tat act caa tta	963
Lys Lys Asp Ala Leu Leu Asp Leu Leu Lys Ser Lys Tyr Thr Gln Leu	
305 310 315	
cat gac ttt gga tct gaa atc ctc cca aga gct gta cta gat cat agt	1011
His Asp Phe Gly Ser Glu Ile Leu Pro Arg Ala Val Leu Asp His Ser	
320 325 330	
gtg cag gca tgc att ttt acg ggc tat tgg gag gat gtt gga aca atc	1059
Val Gln Ala Cys Ile Phe Thr Gly Tyr Trp Glu Asp Val Gly Thr Ile	
335 340 345 350	
aaa tca ttc ttt gat gca aac ttg gcc ctc act gag cag cct tcc aag	1107
Lys Ser Phe Phe Asp Ala Asn Leu Ala Leu Thr Glu Gln Pro Ser Lys	
355 360 365	
ttt gat ttt tac gat cca aaa aca cct ttc ttc act gca ccc cga tgc	1155
Phe Asp Phe Tyr Asp Pro Lys Thr Pro Phe Phe Thr Ala Pro Arg Cys	
370 375 380	
ttg cct ccg acg caa ttg gac aag tgc aag atg aaa tat gca ttt atc	1203
Leu Pro Pro Thr Gln Leu Asp Lys Cys Lys Met Lys Tyr Ala Phe Ile	
385 390 395	
tca gat ggt tgc tta ctg aga gaa tgc aac atc gag cat tct gtg att	1251
Ser Asp Gly Cys Leu Leu Arg Glu Cys Asn Ile Glu His Ser Val Ile	
400 405 410	
gga gtc tgc tca cgt gtc agc tct gga tgt gaa ctc aag gac tcc gtg	1299
Gly Val Cys Ser Arg Val Ser Ser Gly Cys Glu Leu Lys Asp Ser Val	
415 420 425 430	
atg atg gga gcg gac atc tat gaa act gaa gaa gaa gct tca aag cta	1347
Met Met Gly Ala Asp Ile Tyr Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu	
435 440 445	
ctg tta gct ggg aag gtc ccc gtt gaa ata gga agg aac aca aag ata	1395
Leu Leu Ala Gly Lys Val Ser Val Gly Ile Gly Arg Asn Thr Lys Ile	

191 171

450										455										460											
agg aac tgt atc att gac atg aat gct agg att ggg aag aac gtg gtg																															1443
Arg Asn Cys Ile Ile Asp Met Asn Ala Arg Ile Gly Lys Asn Val Val																															
465											470										475										
atc aca aac agt aag ggc atc caa gag gct gat cac ccg gaa gaa ggg																															1491
Ile Thr Asn Ser Lys Gly Ile Gln Glu Ala Asp His Pro Glu Glu Gly																															
480											485										490										
tac tcg tac tac ata agg tct gga atc gtg gtg atc ctg aag aat gca																															1539
Tyr Ser Tyr Tyr Ile Arg Ser Gly Ile Val Val Ile Leu Lys Asn Ala																															
495	500										505										510										
acc atc aac gat ggg tct gtc ata tagatcggt gcgktktgcg																															1582
ar Ile Asn Asp Gly Ser Val Ile																															
515																															

<210> 2
 <211> 518
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 2

Met Gln Phe Ala Leu Ala Leu Asp Thr Asn Ser Gly Pro His Gln Ile																															
1	5										10										15										
Arg Ser Cys Glu Gly Asp Gly Ile Asp Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ile																															
	20										25										30										
Gly Gly Arg Lys Gln Glu Lys Ala Leu Arg Asn Arg Cys Phe Gly Gly																															
	35										40										45										
Arg Val Ala Ala Thr Thr Gln Cys Ile Leu Thr Ser Asp Ala Cys Pro																															
	50										55										60										
Glu Thr Leu His Ser Gln Thr Gln Ser Ser Arg Lys Asn Tyr Ala Asp																															
65	70										75										80										
Ala Asn Arg Val Ser Ala Ile Ile Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gln																															
	85										90										95										
Leu Phe Pro Leu Thr Ser Thr Arg Ala Thr Pro Ala Val Pro Val Gly																															
	100										105										110										
Gly Cys Tyr Arg Leu Ile Asp Ile Pro Met Ser Asn Cys Phe Asn Ser																															
	115										120										125										
Gly Ile Asn Lys Ile Phe Val Met Ser Gln Phe Asn Ser Thr Ser Leu																															
	130										135										140										
Asn Arg His Ile His Arg Thr Tyr Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Ala																															

172
192 172

145		150		155		160
Asp Gly Ser Val	Gln Val Leu Ala Ala Thr Gln Met Pro Glu Glu Pro					
	165		170		175	
Ala Gly Trp Phe	Gln Gly Thr Ala Asp Ser Ile Arg Lys Phe Ile Trp					
	180		185		190	
Val Leu Glu Asp Tyr Tyr Ser His Lys Ser Ile Asp Asn Ile Val Ile						
	195		200		205	
Leu Ser Gly Asp Gln Leu Tyr Arg Met Asn Tyr Met Glu Leu Val Gln						
	210		215		220	
Lys His Val Glu Asp Asp Ala Asp Ile Thr Ile Ser Cys Ala Pro Val						
	225		230		235	240
Asp Glu Ser Arg Ala Ser Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Asp His Thr						
	245		250		255	
Gly Arg Val Leu Gln Phe Phe Glu Lys Pro Lys Gly Ala Asp Leu Asn						
	260		265		270	
Ser Met Arg Val Glu Thr Asn Phe Leu Ser Tyr Ala Ile Asp Asp Ala						
	275		280		285	
Gln Lys Tyr Pro Tyr Leu Ala Ser Met Gly Ile Tyr Val Phe Lys Lys						
	290		295		300	
Asp Ala Leu Leu Asp Leu Leu Lys Ser Lys Tyr Thr Gln Leu His Asp						
	305		310		315	320
Phe Gly Ser Glu Ile Leu Pro Arg Ala Val Leu Asp His Ser Val Gln						
	325		330		335	
Ala Cys Ile Phe Thr Gly Tyr Trp Glu Asp Val Gly Thr Ile Lys Ser						
	340		345		350	
Phe Phe Asp Ala Asn Leu Ala Leu Thr Glu Gln Pro Ser Lys Phe Asp						
	355		360		365	
Phe Tyr Asp Pro Lys Thr Pro Phe Phe Thr Ala Pro Arg Cys Leu Pro						
	370		375		380	
Pro Thr Gln Leu Asp Lys Cys Lys Met Lys Tyr Ala Phe Ile Ser Asp						
	385		390		395	400
Gly Cys Leu Leu Arg Glu Cys Asn Ile Glu His Ser Val Ile Gly Val						
	405		410		415	
Cys Ser Arg Val Ser Ser Gly Cys Glu Leu Lys Asp Ser Val Met Met						
	420		425		430	

193 173

Gly Ala Asp Ile Tyr Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu Leu Leu
435 440 445

Ala Gly Lys Val Pro Val Gly Ile Gly Arg Asn Thr Lys Ile Arg Asn
450 455 460

Cys Ile Ile Asp Met Asn Ala Arg Ile Gly Lys Asn Val Val Ile Thr
465 470 475 480

Asn Ser Lys Gly Ile Gln Glu Ala Asp His Pro Glu Glu Gly Tyr Ser
485 490 495

Tyr Tyr Ile Arg Ser Gly Ile Val Val Ile Leu Lys Asn Ala Thr Ile
500 505 510

Asn Asp Gly Ser Val Ile
515

<210> 3

<211> 1582

<212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> CDS

<222 (10)(1563)

<223> forma revertante del gen Shrunken-2, modificado para que sea estable al calor

<220>

<221> variación

<222> (267)

<223> k = g ó t; aminoácido 86 = Ala

<220>

<221> variación

<222> (1008)

<223> y = c ó t.

<220>

<221> variación

<222> (1368)

<223> r = a ó g; aminoácido 453 = Pro

<220>

<221> variación

<222> (1578)

<223> k = g ó t

<400> 3

ggaggagat atg cag ttt gca ctt gca ttg gac agc aac tta ggt cct cac 51

174
190 170

Met Gln Phe Ala Leu Ala Leu Asp Thr Asn Ser Gly Pro His
1 5 10

cag	ata	aga	tct	tgt	gag	ggg	gat	ggg	att	gac	agg	ttg	gaa	aaa	tta	99
Gln	Ile	Arg	Ser	Cys	Glu	Gly	Asp	Gly	Ile	Asp	Arg	Leu	Glu	Lys	Leu	
15					20					25					30	
agt	att	ggg	ggc	aga	aag	cag	gag	aaa	gct	ttg	aga	aat	agg	tgc	ttt	147
Ser	Ile	Gly	Gly	Arg	Lys	Gln	Glu	Lys	Ala	Leu	Arg	Asn	Arg	Cys	Phe	
				35					40					45		
ggg	ggg	aga	gtt	gct	gca	act	aca	caa	tgt	att	ctt	acc	tca	gat	gct	195
Gly	Gly	Arg	Val	Ala	Ala	Thr	Thr	Gln	Cys	Ile	Leu	Thr	Ser	Asp	Ala	
			50					55				60				
tgt	cct	gaa	act	ctt	cat	tct	caa	aca	cag	tcc	tct	agg	aaa	aat	tat	243
Cys	Pro	Glu	Thr	Leu	His	Ser	Gln	Thr	Gln	Ser	Ser	Arg	Lys	Asn	Tyr	
		65					70					75				
gct	gat	gca	aac	cgt	gta	tct	gck	atc	att	ttg	ggc	gga	ggc	act	gga	291
Ala	Asp	Ala	Asn	Arg	Val	Ser	Ala	Ile	Ile	Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	
	80					85				90						
tct	cag	ctc	ttt	cct	ctg	aca	agc	aca	aga	gct	acg	cct	gct	gta	cct	339
Ser	Gln	Leu	Phe	Pro	Leu	Thr	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Pro	Ala	Val	Pro	
95					100					105					110	
gtt	gga	gga	tgt	tac	agg	ctt	att	gat	atc	cct	atg	agt	aac	tgc	ttc	387
Val	Gly	Gly	Cys	Tyr	Arg	Leu	Ile	Asp	Ile	Pro	Met	Ser	Asn	Cys	Phe	
			115						120					125		
aac	agt	ggg	ata	aat	aag	ata	ttt	gtg	atg	agt	cag	ttc	aat	tct	act	435
Asn	Ser	Gly	Ile	Asn	Lys	Ile	Phe	Val	Met	Ser	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	
			130					135					140			
tcg	ctt	aac	cgc	cat	att	cat	cgt	aca	tac	ctt	gaa	ggc	ggg	atc	aac	483
Ser	Leu	Asn	Arg	His	Ile	His	Arg	Thr	Tyr	Leu	Glu	Gly	Gly	Ile	Asn	
		145					150					155				
ttt	gct	gat	gga	tct	gta	cag	gta	tta	gcg	gct	aca	caa	atg	cct	gaa	531
Phe	Ala	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Val	Leu	Ala	Ala	Thr	Gln	Met	Pro	Glu	
	160					165					170					
gag	cca	gct	gga	tgg	ttc	cag	ggg	aca	gca	gac	tct	atc	aga	aaa	ttt	579
Glu	Pro	Ala	Gly	Trp	Phe	Gln	Gly	Thr	Ala	Asp	Ser	Ile	Arg	Lys	Phe	
175					180					185					190	
atc	tgg	gta	ctc	gag	gat	tat	tac	agt	cac	aaa	tcc	att	gac	aac	att	627
Ile	Trp	Val	Leu	Glu	Asp	Tyr	Tyr	Ser	His	Lys	Ser	Ile	Asp	Asn	Ile	
			195						200					205		
gta	atc	ttg	agt	ggc	gat	cag	ctt	tat	cgg	atg	aat	tac	atg	gaa	ctt	675
Val	Ile	Leu	Ser	Gly	Asp	Gln	Leu	Tyr	Arg	Met	Asn	Tyr	Met	Glu	Leu	

175
135 155

210

215

220

gtg cag aaa cat gtc gag gac gat gct gat atc act ata tca tgt gct 723
Val Gln Lys His Val Glu Asp Asp Ala Asp Ile Thr Ile Ser Cys Ala
225 230 235

cct gtt gat gag agc cga gct tct aaa aat ggg cta gtg aag att gat 771
Pro Val Asp Glu Ser Arg Ala Ser Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Asp
240 245 250

cat act gga cgt gta ctt caa ttc ttt gaa aaa cca aag ggt gct gat 819
His Thr Gly Arg Val Leu Gln Phe Phe Glu Lys Pro Lys Gly Ala Asp
255 260 265 270

gtg aat tct atg aga gtt gag acc aac ttc ctg agc tat gct ata gat 867
Leu Asn Ser Met Arg Val Glu Thr Asn Phe Leu Ser Tyr Ala Ile Asp
275 280 285

gat gca cag aaa tat cca tac ctt gca tca atg ggc att tat gtc ttc 915
Asp Ala Gln Lys Tyr Pro Tyr Leu Ala Ser Met Gly Ile Tyr Val Phe
290 295 300

aag aaa gat gca ctt tta gac ctt ctc aag tca aaa tat act caa tta 963
Lys Lys Asp Ala Leu Leu Asp Leu Leu Lys Ser Lys Tyr Thr Gln Leu
305 310 315

cat gac ttt gga tct gaa atc ctc cca aga gct gta cta gat tay agt 1011
His Asp Phe Gly Ser Glu Ile Leu Pro Arg Ala Val Leu Asp Tyr Ser
320 325 330

gtg cag gca tgc att ttt acg ggc tat tgg gag gat gtt gga aca atc 1059
Val Gln Ala Cys Ile Phe Thr Gly Tyr Trp Glu Asp Val Gly Thr Ile
335 340 345 350

tca ttc ttt gat gca aac ttg gcc ctc act gag cag cct tcc aag 1107
Lys Ser Phe Phe Asp Ala Asn Leu Ala Leu Thr Glu Gln Pro Ser Lys
355 360 365

ttt gat ttt tac gat cca aaa aca cct ttc ttc act gca ccc cga tgc 1155
Phe Asp Phe Tyr Asp Pro Lys Thr Pro Phe Phe Thr Ala Pro Arg Cys
370 375 380

ttg cct ccg acg caa ttg gac aag tgc aag atg aaa tat gca ttt atc 1203
Leu Pro Pro Thr Gln Leu Asp Lys Cys Lys Met Lys Tyr Ala Phe Ile
385 390 395

tca gat ggt tgc tta ctg aga gaa tgc aac atc gag cat tct gtg att 1251
Ser Asp Gly Cys Leu Leu Arg Glu Cys Asn Ile Glu His Ser Val Ile
400 405 410

gga gtc tgc tca cgt gtc agc tct gga tgt gaa ctc aag gac tcc gtg 1299
Gly Val Cys Ser Arg Val Ser Ser Gly Cys Glu Leu Lys Asp Ser Val
415 420 425 430

176
196

atg atg gga gcg gac atc tat gaa act gaa gaa gaa gct tca aag cta 1347
Met Met Gly Ala Asp Ile Tyr Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu
435 440 445

ctg tta gct ggg aag gtc ccr gtt gga ata gga agg aac aca aag ata 1395
Leu Leu Ala Gly Lys Val Pro Val Gly Ile Gly Arg Asn Thr Lys Ile
450 455 460

agg aac tgt atc att gac atg aat gct agg att ggg aag aac gtg gtg 1443
Arg Asn Cys Ile Ile Asp Met Asn Ala Arg Ile Gly Lys Asn Val Val
465 470 475

atc aca aac agt aag ggc atc caa gag gct gat cac ccg gaa gaa ggg 1491
Ile Thr Asn Ser Lys Gly Ile Gln Glu Ala Asp His Pro Glu Glu Gly
480 485 490

ac tcg tac tac ata agg tct gga atc gtg gtg atc ctg aag aat gca 1539
Tyr Ser Tyr Tyr Ile Arg Ser Gly Ile Val Val Ile Leu Lys Asn Ala
495 500 505 510

acc atc aac gat ggg tct gtc ata tagatcggct gcgtktgcg 1582
Thr Ile Asn Asp Gly Ser Val Ile
515

<210> 4
<211> 518
<212> PRT
<213> Zea mays

<400> 4
Met Gln Phe Ala Leu Ala Leu Asp Thr Asn Ser Gly Pro His Gln Ile
1 5 10 15

Arg Ser Cys Glu Gly Asp Gly Ile Asp Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ile
20 25 30

Gly Gly Arg Lys Gln Glu Lys Ala Leu Arg Asn Arg Cys Phe Gly Gly
35 40 45

Arg Val Ala Ala Thr Thr Gln Cys Ile Leu Thr Ser Asp Ala Cys Pro
50 55 60

Glu Thr Leu His Ser Gln Thr Gln Ser Ser Arg Lys Asn Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ala Asn Arg Val Ser Ala Ile Ile Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gln
85 90 95

Leu Phe Pro Leu Thr Ser Thr Arg Ala Thr Pro Ala Val Pro Val Gly
100 105 110

197 177 172

Gly Cys Tyr Arg Leu Ile Asp Ile Pro Met Ser Asn Cys Phe Asn Ser
115 120 125

Gly Ile Asn Lys Ile Phe Val Met Ser Gln Phe Asn Ser Thr Ser Leu
130 135 140

Asn Arg His Ile His Arg Thr Tyr Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Ala
145 150 155 160

Asp Gly Ser Val Gln Val Leu Ala Ala Thr Gln Met Pro Glu Glu Pro
165 170 175

Ala Gly Trp Phe Gln Gly Thr Ala Asp Ser Ile Arg Lys Phe Ile Trp
180 185 190

Val Leu Glu Asp Tyr Tyr Ser His Lys Ser Ile Asp Asn Ile Val Ile
195 200 205

Leu Ser Gly Asp Gln Leu Tyr Arg Met Asn Tyr Met Glu Leu Val Gln
210 215 220

Lys His Val Glu Asp Asp Ala Asp Ile Thr Ile Ser Cys Ala Pro Val
225 230 235 240

Asp Glu Ser Arg Ala Ser Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Asp His Thr
245 250 255

Gly Arg Val Leu Gln Phe Phe Glu Lys Pro Lys Gly Ala Asp Leu Asn
260 265 270

Ser Met Arg Val Glu Thr Asn Phe Leu Ser Tyr Ala Ile Asp Asp Ala
275 280 285

Gln Lys Tyr Pro Tyr Leu Ala Ser Met Gly Ile Tyr Val Phe Lys Lys
290 295 300

Asp Ala Leu Leu Asp Leu Leu Lys Ser Lys Tyr Thr Gln Leu His Asp
305 310 315 320

Phe Gly Ser Glu Ile Leu Pro Arg Ala Val Leu Asp Tyr Ser Val Gln
325 330 335

Ala Cys Ile Phe Thr Gly Tyr Trp Glu Asp Val Gly Thr Ile Lys Ser
340 345 350

Phe Phe Asp Ala Asn Leu Ala Leu Thr Glu Gln Pro Ser Lys Phe Asp
355 360 365

Phe Tyr Asp Pro Lys Thr Pro Phe Phe Thr Ala Pro Arg Cys Leu Pro
370 375 380

Pro Thr Gln Leu Asp Lys Cys Lys Met Lys Tyr Ala Phe Ile Ser Asp
385 390 395 400

178
178

Gly Cys Leu Leu Arg Glu Cys Asn Ile Glu His Ser Val Ile Gly Val
405 410 415

Cys Ser Arg Val Ser Ser Gly Cys Glu Leu Lys Asp Ser Val Met Met
420 425 430

Gly Ala Asp Ile Tyr Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu Leu Leu
435 440 445

Ala Gly Lys Val Pro Val Gly Ile Gly Arg Asn Thr Lys Ile Arg Asn
450 455 460

Cys Ile Ile Asp Met Asn Ala Arg Ile Gly Lys Asn Val Val Ile Thr
465 470 475 480

Asn Ser Lys Gly Ile Gln Glu Ala Asp His Pro Glu Glu Gly Tyr Ser
485 490 495

Tyr Tyr Ile Arg Ser Gly Ile Val Val Ile Leu Lys Asn Ala Thr Ile
500 505 510

Asn Asp Gly Ser Val Ile
515

<210> 5

<221> 26

<222> ADN

<223> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: cebador de RCP

<400> 5

ctggatgtga actcaaggac tccgtg

26

<220> 6

<221> 24

<222> ADN

<223> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: cebador de RCP

<400> 6

ggcttaacta tgcggcatca gagc

24

179
177

REIVINDICACIONES

1.- Un método para incrementar la cantidad de semillas producidas por una planta, comprendiendo el método:

a.- introducir en una planta un ácido nucleico operablemente vinculado a un promotor, siendo el ácido nucleico seleccionado entre el grupo consistente en un ácido nucleico que comprende la SEC ID NO:3, un ácido nucleico que se hibrida con la SEC ID NO:3 bajo condiciones de elevada severidad y que codifica un polipéptido que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un fragmento de la SEC ID NO:3 que codifica un péptido que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un ácido núcleo que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO:4, o fragmento del mismo que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, y un ácido nucleico que codifica un polipéptido SH2HS o SH2RTS; y

b.- cultivar la planta producida en el paso a.

2.- Un método para incrementar la biomasa producida por una planta, comprendiendo el método:

a.- introducir en una planta un ácido nucleico operablemente vinculado a un promotor, siendo el ácido nucleico seleccionado entre el grupo consistente en un ácido nucleico que comprende la SEC ID NO:3, un ácido nucleico que se hibrida con la SEC ID NO:3 bajo condiciones de elevada severidad y que codifica un polipéptido que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un fragmento de la SEC ID NO:3 que codifica un péptido que mantiene la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la

200 180 180

SEC ID NO:4, o fragmento del mismo que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, y un ácido nucleico que codifica un polipéptido SH2HS; y

b.- cultivar la planta producida en el paso a.

3.- Un método para incrementar el Índice de Cosecha de una planta, comprendiendo el método:

a.- introducir en una planta un ácido nucleico operablemente vinculado a un promotor, siendo el ácido nucleico seleccionado entre el grupo consistente en un ácido nucleico que comprende la SEC ID NO:3, un ácido nucleico que se hibrida con la SEC ID NO:3 bajo condiciones de elevada severidad y que codifica un polipéptido que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un fragmento de la SEC ID NO:3 que codifica un péptido que mantiene la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO:4, o fragmento del mismo que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, y un ácido nucleico que codifica un polipéptido SH2HS; y

b.- cultivar la planta producida en el paso a.

4.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3, en el cual la planta es una planta monocotiledónea.

5.- El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual la planta es seleccionada entre el grupo consistente en arroz, trigo, cebada, avena, sorgo y mijo.

6.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3, en el cual la planta es una planta dicotiledónea.

7.- El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual la planta es seleccionada entre el grupo consistente en guisante, alfalfa, trébol pata de pájaro, garbanzo, achicoria, trébol, col, lenteja, césped de pradera, pimpinela pequeña, soja y lechuga.

201 181
184

8.- Un método para incrementar el peso de la hoja bandera de una planta monocotiledónea, comprendiendo el método:

a.- introducir en una planta un ácido nucleico operablemente vinculado a un promotor, siendo el ácido nucleico seleccionado de entre el grupo consistente en un ácido nucleico que comprende la SEC ID NO:3, un ácido nucleico que se hibrida con la SEC ID NO:3 bajo condiciones de elevada severidad y que codifica un polipéptido que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un fragmento de la SEC ID NO:3 que codifica un péptido que mantiene la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO:4, o fragmento del mismo que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, y un ácido nucleico que codifica un polipéptido SH2HS; y

b.- cultivar la planta producida en el paso a.

9.- Un método para incrementar la cantidad de cabezas de las semillas producidas por una planta monocotiledónea, comprendiendo el método:

a.- introducir en una planta un ácido nucleico operablemente vinculado a un promotor, siendo el ácido nucleico seleccionado entre el grupo consistente en un ácido nucleico que comprende la SEC ID NO:3, un ácido nucleico que se hibrida con la SEC ID NO:3 bajo condiciones de elevada severidad y que codifica un polipéptido que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un fragmento de la SEC ID NO:3 que codifica un péptido que mantiene la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO:4, o fragmento del mismo que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, y un ácido nucleico que codifica un polipéptido SH2HS; y

b.- cultivar la planta producida en el paso a.

10.- Un método para incrementar dos o más rasgos de una planta dicotiledónea, siendo los rasgos seleccionados entre el grupo consistente en:

182
202 182

cantidad de semillas, peso promedio de las semillas, peso total de las semillas, cantidad de cabezas de semillas, Índice de Cosecha, y peso total de la planta, comprendiendo el método:

a.- introducir en una planta un ácido nucleico operablemente vinculado a un promotor, siendo el ácido nucleico seleccionado entre el grupo consistente en un ácido nucleico que comprende la SEC ID NO:3, un ácido nucleico que se hibrida con la SEC ID NO:3 bajo condiciones de elevada severidad y que codifica un polipéptido que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un fragmento de la SEC ID NO:3 que codifica un péptido que mantiene la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO:4, o fragmento del mismo que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, y un ácido nucleico que codifica un polipéptido SH2HS; y

b.- cultivar la planta producida en el paso a.

11.- Un método para incrementar el rendimiento de dos o más rasgos de una planta monocotiledónea, siendo los rasgos seleccionados entre el grupo consistente en: cantidad de semillas, peso promedio de las semillas, peso total de las semillas, cantidad de cabezas de semillas, peso de la hoja bandera, Índice de Cosecha, y peso total de la planta, comprendiendo el método:

a.- introducir en una planta un ácido nucleico operablemente vinculado a un promotor, siendo el ácido nucleico seleccionado entre el grupo consistente en un ácido nucleico que comprende la SEC ID NO:3, un ácido nucleico que se hibrida con la SEC ID NO:3 bajo condiciones de elevada severidad y que codifica un polipéptido que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un fragmento de la SEC ID NO:3 que codifica un péptido que mantiene la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO:4, o fragmento del mismo que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, y un ácido nucleico que codifica un polipéptido SH2HS; y

b.- cultivar la planta producida en el paso a.

12.- El método de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3, 8, 9, 10 ú 11, que además comprende cruzar la planta obtenida en el paso b. con una segunda planta y cosechar y cultivar la semilla que se obtiene como resultado de hacer el cruce.

13.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 8, 9, 10 u 11, que además comprende cosechar la semilla que es producida mediante el selfing de la planta obtenida en el paso b y cultivando la semilla cosechada.

14.- El método de acuerdo con la reivindicación 8, 9 u 11, en el cual la planta es seleccionada entre el grupo consistente en plantas de arroz, trigo, cebada, avena, sorgo, y mijo.

15.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 8, 9, 10 u 11, en el cual el polipéptido SH2HS es seleccionado entre el grupo que consiste en SH2HS13, SH2HS14, SH2HS16, SH2HS33, SH2HS39, SH2HS40 y SH2HS47, o un fragmento del polipéptido SH2HS que conserva actividad biológica del polipéptido SH2HS.

16.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 8, 9, 10 u 11, en el cual el polipéptido SH2RTS es seleccionado entre el grupo que consiste en SH2RTS48-2 y SH2RTS60-1, o un fragmento del polipéptido SH2RTS que conserva actividad biológica del polipéptido SH2RTS.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el cual la planta es seleccionada entre el grupo consistente en guisante, alfalfa, trébol pata de pájaro, garbanzo, achicoria, trébol, col, lenteja, césped de pradera, pimpinela pequeña, soja y lechuga.

18. Una planta producida mediante el método de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 8, 9, 10 u 11.

184
70/1/104

19. Una planta que comprende un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos indicada como SEC ID NO:4.

185
105/18

RESUMEN

La presente invención provee métodos para producir plantas con una mayor producción de semillas y de biomasa. Más específicamente, la presente invención provee métodos para producir plantas que tienen mayores rendimientos para una cantidad de rasgos de las plantas, que incluyen la cantidad de semillas, peso de las semillas, cantidad de cabezas de semillas, peso de la hoja bandera y peso total de la planta. La presente invención también provee métodos para mejorar el Índice de Cosecha de una planta. En una forma de realización preferida, los métodos comprenden introducir en una planta un ácido nucleico, siendo el ácido nucleico seleccionado de entre el grupo consistente en un ácido nucleico que comprende la SEC ID NO:3, un ácido nucleico que se hibridiza con la SEC ID NO: 3 bajo condiciones de elevada severidad y que codifica un polipéptido que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un fragmento de la SEC ID NO: 3 que codifica un péptido que mantiene la actividad biológica del SH2-REV6-HS, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 4, o fragmento del mismo que conserva la actividad biológica del SH2-REV6-HS, y un ácido nucleico que codifica un polipéptido SH2HS o un polipéptido SH2RTS. La presente invención también abarca las plantas obtenidas mediante los métodos provistos en la presente.

205 186
185

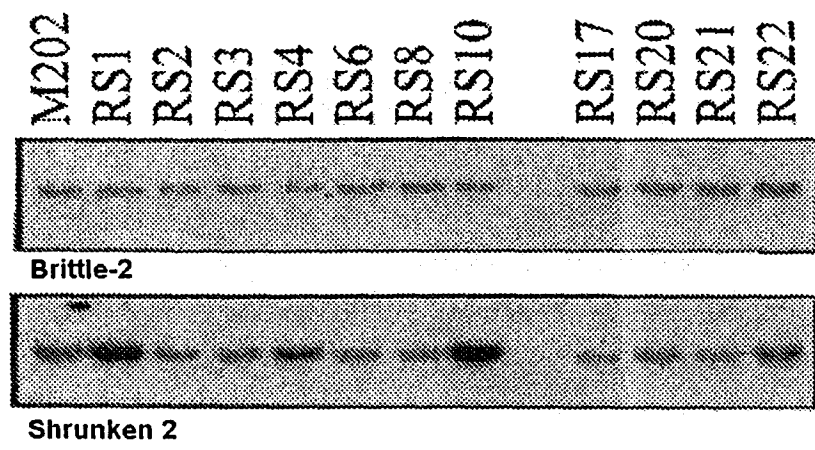


FIG. 1

PATENT COOPERATION TREAT

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

PERRY, Robert E.
GILL JENNINGS & EVERY
Broadgate House
7 Eldon Street
London EC2M 7LH
GRANDE BRETAGNE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

30.04.02

Applicant's or agent's file reference

REPO6886EP

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US 01/ 06622

International filing date (day/month/year)

01/03/2001

Priority date (day/month/year)

01/03/2000

Applicant

RESEARCH & DEVELOPMENT INSTITUTE, INC. et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices)(Article 39(1))(see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/

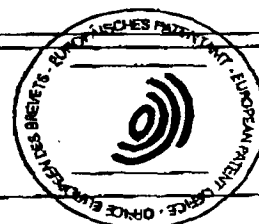


European Patent Office, Gitschiner Str. 103
D-10969 Berlin - Germany
Tel.: (+49-30) 25901-0
Fax: (+49-30) 25901-840

Authorized officer

ALDRIDGE S

Tel. (+49-89) 2399 2828



PATENT COOPERATION TREAT.

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference REP06886EP	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/US 01/ 06622	International filing date (day/month/year) 01/03/2001	Priority date (day/month/year) 01/03/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/82		
Applicant RESEARCH & DEVELOPMENT INSTITUTE, INC. et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This **REPORT** consists of a total of 2 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consists of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 28/09/2001	Date of completion of this report 29/04/2002
Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office, Gitschiner Str. 103 D-10969 Berlin - Germany Tel.: (+49-30) 25901-0 Fax: (+49-30) 25901-840	Authorized officer DE BUNDEL E R J Tel. (+49-89) 2399 2828



**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application NoPCT/US 01/ 06622

189
200
10

I. Basis of the report

The basis of this international preliminary examination is the application as originally filed.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The question of whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step, or to be industrially applicable has not been the subject of the international preliminary examination in respect of the claims which have not been searched (Article 17(2)(a) or (3) and Rule 66.1(e) PCT); see also international search report).

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

To the extent that the international preliminary examination has been carried out (see item III above), the following is pointed out:

In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in at least some of the claims, which have been the subject of an international search report, does not appear to meet the criteria mentioned in Article 33(1) PCT, i.e. does not appear to be novel and/or to involve an inventive step (see international search report, in particular the documents cited X and/or Y and corresponding claim references).

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

USUARIO RADICADOR

PATENTE DE INVENCION [X]

MODELO DE UTILIDAD

- | | | |
|---|-----|-----|
| • Indicación de que se solicita la concesión de una patente | [X] | [X] |
| • Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [X] | [X] |
| • Descripción de la invención | [X] | [X] |
| • Dibujos de ser estos pertinentes | [X] | [X] |
| • Comprobante de Pago de las tasas establecidas | [X] | [X] |

COMPLETA [X]

INCOMPLETA

[X] [X]

DISEÑO INDUSTRIAL []

- | | | |
|---|-----|-----|
| • Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial. | [] | [] |
| • Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. | [] | [] |
| • Representación gráfica y foto gráfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño. | [] | [] |
| • Comprobante de pago de las tasas establecidas. | [] | [] |

COMPLETA []

INCOMPLETA

[] []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- | | | |
|--|-----|-----|
| • Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. | [] | [] |
| • Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. | [] | [] |
| • Representación gráfica del esquema de trazado | [] | [] |
| • Comprobante de pago de las tasas establecidas. | [] | [] |

COMPLETA []

INCOMPLETA

[] []

Firma Responsable

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha Radicación: 02677192 00000000

Folios: 189

Fecha (AMD): 2002-08-30 15:27:55

Tramite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Carrera 13 No. 27-00 Piso 2 mezzanina

Conmutador: 362 06 40

Fax: 350 52 20 e-mail: info@sic.gov.co

Bogotá D.C. - Colombia