

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 344 185**

21 Número de solicitud: 200900458

51 Int. Cl.:
C12N 15/29 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **18.02.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **19.08.2010**

Fecha de la concesión: **01.08.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **11.08.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
11.08.2011

73 Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular 95 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Sevilla (Titular 5%)

72 Inventor/es: **Valverde Albacete, Federico;**
Serrano Delgado, Aurelio y
Romero Rodríguez, José María

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Uso de una secuencia nucleotídica que regula el momento de la floración, plantas que la expresan y método para producirlas.**

57 Resumen:

Uso de una secuencia nucleotídica que regula el momento de la floración, plantas que la expresan y método para producirlas.

La presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica de un alga verde unicelular, *Chlamydomonas reinhardtii*, que es expresada en una célula vegetal procedente de una planta capaz de producir flores. La expresión de la secuencia se utiliza para modificar el momento de la floración de una planta que comprende las células vegetales transfectadas. Asimismo, la presente invención se refiere a un método para producir las células y/o las plantas de la invención.

ES 2 344 185 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Uso de una secuencia nucleotídica que regula el momento de la floración, plantas que la expresan y método para producirlas.

La presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica de un alga verde unicelular, *Chlamydomonas reinhardtii*, que es expresada en una célula vegetal procedente de una planta capaz de producir flores. La expresión de la secuencia se utiliza para modificar el momento de la floración de una planta que comprende las células vegetales transfectadas. Asimismo, la presente invención se refiere a un método para producir las células y/o las plantas de la invención.

Estado de la técnica anterior

La transición floral es un proceso de desarrollo crucial para las plantas porque el tiempo en que se reproducen determina el éxito del individuo y su descendencia. Para desencadenar la transición floral, las plantas deben coordinar la respuesta a diferentes señales externas e internas para poder inducir la expresión de los genes que disparan la transición del meristemo apical de vegetativo a reproductivo (Bäurle *et al.*, 2006. *Cell* 125: 655-664). El control de *CONSTANS* (*CO*) a nivel transcripcional y postraducciona, es central para la vía del fotoperiodo, una de las rutas más conservadas para la regulación de la transición floral (Kobayashi y Weigel. 2007. *Genes Dev.* 21: 2371-2384).

La transcripción de *CO* en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se controla mediante el reloj circadiano y el fotoperiodo, lo que induce una mayor abundancia del ARN mensajero de *CO* durante la fase diurna en un día largo de verano que en un día corto de invierno (Suárez-López *et al.*, 2001. *Nature* 410: 116-1120). Estos ritmos estacionales y diarios de los niveles del transcrito de *CO* se regulan por una ruta genética que incluye a los genes *GIGANTEA*, *FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1* y *CYCLIN DOF FACTOR 1* (Sawa *et al.*, 2007. *Science* 318: 261-265). La acumulación diurna de *CO* está influenciada por la luz, bajo el control del sistema de los fitocromos (Valverde *et al.*, 2004. *Science* 303: 1003-1006) y se degrada por el proteasoma durante la noche mediante la ubiquitina ligasa CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (*COP1*), un regulador clave del desarrollo fotomorfogénico de plántulas (Jang *et al.*, 2008. *EMBO J.* 27: 1277-1288). Estos ciclos diurnos y nocturnos de degradación de *CO*, junto a la regulación circadiana y estacional de la expresión del ARN mensajero de *CO* hacen que *CO* se active durante la tarde de un día largo. *CO* activo produce la expresión del integrador floral *FT* en el floema foliar y la proteína *FT* se mueve desde las hojas hasta el meristemo apical (Corbesier *et al.*, 2007. *Science* 316: 1030-1033). Una vez en el meristemo apical, *FT*, junto al factor de transcripción *FD*, induce la expresión de los integradores florales *APETALAI*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*), *LEAFY* y, eventualmente de los genes homeóticos florales que controlan el desarrollo de los órganos florales.

El módulo *CO-FT* está ampliamente distribuido en fanerógamas y gimnospermas y constituye uno de los elementos regulatorios más conservados en la inducción de la floración (Böhlenius *et al.*, 2006. *Science* 312: 1040-1043). En todas las plantas terrestres, incluyendo el musgo *Physcomitrella* (Zobell *et al.*, 2005. *Plant Biol.* 7: 266-275) y la licofita *Selaginella* (este trabajo), existen genes homólogos a *CO* (*CO-likes* o *COLs*), pero no se encuentran en bacterias, hongos, y animales (Robson *et al.*, 2001. *Plant J.* 28: 619-631). Sin embargo, con la excepción de algunos genes de plantas superiores como *HEADING DATE 1* (*HDI*) en arroz, (*PnCO*) en *Pharbitis nil* o recientemente el de remolacha (*BvCOL1*), ningún gen *COL* de la línea evolutiva de plantas ha podido complementar la mutación *co* de *Arabidopsis* y por tanto mostrar una función en la transición de fase vegetativa a floral. La proteína *COL1*, de *Arabidopsis*, con un porcentaje de similaridad de un 85% con respecto a *CO*, no tiene la misma función que *CO* ya que no consigue complementar al mutante *co* (Ledger *et al.*, 2001. *Plant J.* 26: 15-22). Intentos previos han fracasado a la hora de demostrar la presencia de un ortólogo verdadero de *CO* en el musgo *Physcomitrella* (Zobell *et al.*, 2005. *Plant Biol.* 7: 266-275).

Chlamydomonas reinhardtii es un alga verde unicelular que se usa como organismo modelo dada su facilidad de transformación, su potente genética, su versatilidad metabólica y su genoma haploide, cuya secuencia completa fue recientemente liberada (Merchant *et al.*, 2007. *Science* 318: 245-251). Ciertos procesos como la fototaxia, el crecimiento sincrónico y la acumulación de almidón se regulan mediante el reloj circadiano en *Chlamydomonas* (Mittag *et al.*, 2005. *Plant Physiol.* 137: 399-409) En ésta y otras microalgas verdes el crecimiento se sincroniza con el ciclo celular en determinados fotoperiodos, de manera que la mayor parte de la población de un cultivo se compondrá, en un momento determinado, de células en el mismo estadio de división (Bizova *et al.*, 2005. *Plant Physiol.* 137: 475-491). Se conoce un mutante de *Chlamydomonas* (*roc66*) que exhibe un periodo algo más amplio en su ritmo de crecimiento que el alga silvestre (Matsuo *et al.*, 2008. *Genes Dev.* 22: 918-930). Además, se ha demostrado que el reloj circadiano puede permitir la entrada en ciclo celular en *Chlamydomonas* (Goto y Johnson, 1995. *J. Cell Biol.* 129:1061-1069) y que el fotoperiodo tiene también una enorme influencia en esta señal y en la progresión del ciclo celular en *Ostreococcus tauri*, otra microalga verde (Moulager *et al.*, 2007. *Plant Physiol.* 144:1360-1369).

El adelanto de la producción de los frutos puede suponer una ventaja comercial. La búsqueda de herramientas genéticas que permitan aproximar la floración lo más posible a un determinado tiempo dentro del ciclo de cultivo, que haga coincidir la recolección del fruto con la época más adecuada de mercado, puede suponer un aumento del rendimiento en la producción de los cultivos experimentados.

Explicación de la invención

La presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos del alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* que es transflectada en una célula vegetal procedente de una planta capaz de producir flores. La expresión del gen se utiliza para modificar el momento de la floración de una planta que comprende las células vegetales que expresan la citada secuencia.

La secuencia SEQ ID NO: 1 y la secuencia aminoacídica de la proteína CONSTANS (CO) de *Arabidopsis thaliana* tienen una identidad de un 27% y la identidad con otras proteínas COL procedentes de plantas es de entre 20 y 30%. La baja identidad no hace pensar *a priori* en un posible uso relacionado con la función de las proteínas citadas, sobre todo, teniendo en cuenta que proteínas como COL1, cuyo gen pertenece al mismo genoma de *Arabidopsis thaliana*, tiene una identidad de un 85% con la proteína CO y sin embargo, no desempeña la misma función que CO, ya que parece no conseguir complementar la función de esta proteína en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes para CO (plantas *co*).

Por tanto, no se puede deducir, dado el bajo porcentaje de identidad mencionado anteriormente, que la secuencia SEQ ID NO: 1 sea funcionalmente equiparable a CO, como demuestra el hecho de que pueda complementar la mutación *co* e incluso promover floración temprana en *Arabidopsis*. La planta utilizada para llevar a cabo los experimentos de complementación e inducción de adelanto en la floración, *Arabidopsis thaliana* se ha venido utilizando como planta modelo en innumerables procesos biotecnológicos demostrando que los resultados obtenidos son extrapolables a cualquier otra especie de planta, especialmente los procesos conservados en el reino vegetal como es el caso de la regulación de la floración por medio de la proteína CO. La transformación de esta planta se ha empleado a modo de ejemplo porque las técnicas de transformación y seguimiento de la expresión de los genes recombinantes están optimizadas.

De los resultados obtenidos en la presente invención no deben conducirse a un análisis *ex post-facto*, ya que del porcentaje de identidad de un 27% de SEQ ID NO: 1 respecto de CO no se desprende un resultado presumible que haga pensar en un posible uso de SEQ ID NO: 1 para acelerar la floración de cualquier planta ya que solamente llevando a cabo la transformación de dicha secuencia en el genoma de la planta se puede comprobar el resultado en la floración. En definitiva, la identidad de los genes no hace obvia la funcionalidad de SEQ ID NO: 1.

La aplicación del uso de la secuencia SEQ ID NO: 1 de la presente invención en diferentes plantas cuyo fruto tenga interés comercial, puede suponer un adelanto sustancial de la floración y como consecuencia, puede adelantar la producción de los frutos, lo que supone una ventaja comercial respecto de los frutos producidos por plantas que no comprendan la proteína de la presente invención. Por otra parte, la estimulación del adelanto de la floración en los cultivos de plantas permitiría, en principio, intentar aproximar la floración lo más posible a un determinado tiempo dentro del ciclo de cultivo, que haga coincidir la posterior recolección del fruto con la época más adecuada de mercado, en una zona geográfica concreta. A menudo esto se concreta en el aumento de rendimiento en la producción de los cultivos experimentados.

En este sentido, el primer aspecto de la presente invención es el uso de un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica con al menos un 90% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1, para regular el momento de floración de una planta.

La secuencia SEQ ID NO: 1 es una secuencia aminoacídica codificada por una secuencia nucleotídica presente en el genoma del alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. El ácido nucleico aislado comprende al menos una secuencia nucleotídica que codifica o bien una secuencia con al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1 o bien que codifica para SEQ ID NO: 1. En estos aspectos de la presente invención, el ácido nucleico aislado puede ser la secuencia nucleotídica codificante (ADNc), como es el caso de SEQ ID NO: 14, o secuencias nucleotídicas con o sin intrones, por tanto queda incluida la secuencia de ADN genómico que codifica para SEQ ID NO: 1 (en adelante se harán referencia a las secuencias nucleotídicas como; secuencias nucleotídicas de la presente invención o de la invención). Es decir, incluyen secuencias de ácido nucleico cuyo producto de la transcripción, el ARN mensajero (ARNm) codifica para la misma secuencia de aminoácidos (en adelante, secuencia de aminoácidos de la presente invención o secuencia de aminoácidos de la invención). También se incluyen secuencias variantes degeneradas de las secuencias nucleotídicas de la invención, cuyo producto es una proteína con la misma función que la proteína codificada por la secuencia SEQ ID NO: 1. También se incluyen secuencias de aminoácidos que tengan modificaciones en su extremo N-terminal, C-terminal y/o en alguna posición aminoacídica interna de modo que la función de la proteína sea la misma que la que resulta de la traducción de la secuencia de ARNm transcrita a partir de la secuencia de nucleótidos de la invención. La secuencia de aminoácidos puede estar codificada por cualquier secuencia nucleotídica que de lugar a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la invención. Debido a que el código genético es degenerado, un mismo aminoácido puede ser codificado por diferentes codones (tripletes), por ello, la misma secuencia de aminoácidos puede ser codificada por distintas secuencias de nucleótidos.

Las secuencias aminoacídicas con, al menos, un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1 son secuencias homologas de otros organismos o algas unicelulares donde la proteína que codifican tiene una función idéntica a la proteína codificada por el citado gen. Las secuencias homologas se refieren a secuencias de especies distintas con expresiones fenotípicas similares que proceden de una secuencia ancestral común. Dentro de la homología de secuencia se distinguen dos tipos de homología: la ortología y la paralogía. Las secuencias ortólogas pertenecen a especies que tienen

ES 2 344 185 B1

un antepasado común. Las secuencias parálogas son aquellas que se encuentran en el mismo organismo y una procede de la duplicación de la otra. En este aspecto de la presente invención, se consideran todas las secuencias homologas, tanto ortólogas como parálogas, que tienen, al menos, un 90% de identidad con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1. Del mismo modo, quedan incluidas todas aquellas secuencias cuyo producto de la transcripción es idéntico a la secuencia de aminoácidos de la presente invención.

Una realización preferida es el uso de un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica de un alga verde con al menos un 50% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.

La identidad de la secuencia SEQ ID NO: 1, procedente de *Chlamydomonas reinhardtii* con respecto a secuencias aminoacídicas de otras algas verdes, como por ejemplo, pero sin limitarse, *Volvox*, es de alrededor de un 60%, por tanto, en esta realización de la presente invención se incluye cualquier ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica, procedente de un alga verde, con al menos un 50% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.

Otra realización preferida de la presente invención es el uso de un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 para regular el momento de floración de una planta.

Tal como se describe en el apartado de ejemplos de la presente invención, la floración de plantas modelo de *Arabidopsis thaliana* que han sido transformadas con una secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia de aminoácidos de la invención, son capaces de adelantar la floración respecto de plantas control que no contienen la secuencia SEQ ID NO: 1. Por tanto, la secuencia SEQ ID NO: 1 regula el momento de la floración de una planta. El término “regulación del momento de floración” se refiere a cambios del instante en el que se produce la transformación del meristemo apical vegetativo en meristemo floral, es decir, de la floración. Preferiblemente la secuencia de ácido nucleico de la invención se usa para adelantar el momento de la floración de una planta.

Otro aspecto más de la presente invención es el uso de un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según cualquiera de los aspectos anteriores (en adelante, vector de la invención) para regular el momento de floración de una planta.

El término “vector” se refiere a un fragmento de ADN que tiene la capacidad de replicarse en un determinado huésped y, como el término lo indica, puede servir de vehículo para multiplicar otro fragmento de ADN que haya sido fusionado al mismo (inserto). Inserto se refiere a un fragmento de ADN que se fusiona al vector; en el caso de la presente invención, el vector puede comprender cualquiera de las secuencias descritas según los aspectos anteriores que, fusionadas al mismo puede replicarse en el huésped adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, bacteriófagos o vectores virales, sin excluir otro tipo de vectores que se correspondan con la definición realizada de vector.

Un aspecto más es el uso de una célula transfectada con el vector de la invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 (en adelante, célula de la invención) para regular el momento de floración de una planta.

El término “célula” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una célula procariótica o eucariótica. La célula puede ser una bacteria capaz de replicar un ADN ajeno transformado como por ejemplo cualquiera de las cepas de la especie *Escherichia coli* o una bacteria capaz de transferir el ADN de interés al interior de una planta como por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens*. Preferiblemente, la célula hace referencia a una célula eucariótica vegetal y dentro de este grupo, más preferiblemente, a aquellas células pertenecientes al reino *Plantae*. Así pues, en el caso de que la célula sea vegetal, el término célula comprende, al menos, una célula del parénquima, célula meristemática o de cualquier tipo, diferenciada o indiferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición un protoplasto (célula de una planta que carece de pared celular).

El término “transfección” hace referencia a la introducción de material genético externo en células mediante plásmidos, vectores víricos (en este caso también se habla de transducción) u otras herramientas para la transferencia. El término transformación se prefiere para describir las transferencias no-virales de material genético en bacterias y células eucariotas no animales como hongos, algas o plantas.

Una realización preferida es el uso de la célula de la invención que comprende cualquier producto de la expresión del ácido nucleico aislado que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

El término “producto de la expresión” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a cualquier producto resultante de la expresión de la secuencia de nucleótidos según cualquiera de los aspectos anteriores. Así pues, como producto resultante de la expresión de la secuencia se entiende, por ejemplo, el ARN que se obtiene de la transcripción de la secuencia, el ARN procesado, la proteína resultante de la traducción del ARN o posteriores modificaciones de la secuencia nucleotídica en el interior de la célula siempre que la secuencia resultante tenga su origen en la secuencia original transferida.

ES 2 344 185 B1

Otra realización preferida es el uso según cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores donde el ácido nucleico aislado está unido funcionalmente a una secuencia reguladora de la expresión génica.

El ácido nucleico de la presente invención se une por su extremo 3' a una secuencia reguladora de la expresión génica. En la presente invención, el término "secuencia reguladora de la expresión génica" hace referencia a una secuencia de ácidos nucleicos que tenga efecto sobre la funcionalidad de la secuencia de ácido nucleico de la invención en lo que se refiere al comienzo de la transcripción de la secuencia de ADN o al inicio de traducción de la secuencia de ARN u otras secuencias no descritas. A modo de ejemplo, entre las secuencias reguladoras de la expresión génica contempladas en la presente invención están los promotores y otras menos comunes como determinados intrones.

Según una realización preferida, la secuencia reguladora de la expresión génica es SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

La secuencia SEQ ID NO: 2 hace referencia a la secuencia del promotor CaMV 35S, que produce una expresión constitutiva del gen al que precede en cualquier tejido de la planta. La secuencia SEQ ID NO: 3 hace referencia a parte de la secuencia reguladora de la expresión génica del gen *SUC2*, que codifica para una proteína transportadora de sacarosa. Esta secuencia provoca que el gen que precede sea expresado en las células acompañantes o células de compañía del tejido vascular del floema.

Según otra realización preferida, la planta a cuya regulación del momento de la floración se hace referencia según cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores, pertenece a la especie *Arabidopsis thaliana*. Según otra realización preferida la planta pertenece a la especie *Solanum lycopersicum*.

Otro aspecto de la presente invención es una célula aislada transfectada con un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica con al menos un 90% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.

El término "transfección" hace referencia a la introducción de material genético externo en células mediante plásmidos, vectores víricos (en este caso también se habla de transducción) u otras herramientas para la transferencia. El término transfección para métodos no-virales es usado en referencia a células eucarióticas de mamífero, mientras que el término transformación se prefiere para describir las transferencias no-virales de material genético en bacterias y células eucariotas no animales como hongos, algas o plantas. En el caso de la presente invención, el término transfección es equivalente al término transformación.

Según una realización preferida, la célula comprende una secuencia nucleotídica de un alga verde que codifica una secuencia aminoacídica con al menos un 50% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.

Otra realización preferida es una célula aislada transfectada con un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

En adelante, se hará referencia a las células anteriores como las células de la invención o las células de la presente invención.

El término "célula aislada" hace referencia a una célula que se obtiene de cualquier tipo de cultivo microbiológico (por ejemplo, pero sin limitarse, *E. coli* o *Agrobacterium tumefaciens*) o tejido vegetal. Preferiblemente la célula es una célula eucariótica procedente de una planta que es capaz de producir flores. Así pues, el término célula comprende, al menos, una célula del parénquima, célula meristemática o de cualquier tipo, diferenciada o indiferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición un protoplasto (célula de una planta que carece de pared celular). La célula vegetal comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 de forma estable o de forma transitoria.

Otro aspecto más de la presente invención es una planta que comprende la célula de la invención. Según una realización preferida, la planta pertenece a la especie *Arabidopsis thaliana*. Según otra realización preferida la planta pertenece a la especie *Solanum lycopersicum*. En adelante, haremos referencia a estas plantas mediante el término, las plantas de la invención o las plantas de la presente invención.

El término "planta" engloba cada una de las partes de la misma, que pueden ser conservadas o cultivadas de forma aislada o en combinación, así como el germoplasma. El germoplasma queda definido por aquel material biológico que contiene la variabilidad genética intraespecífica o por los materiales genéticos que pueden perpetuar una especie o una población de un organismo (ver más adelante semillas, propágulos o progenie). La planta debe comprender la célula de la presente invención de forma que se exprese en un tejido específico (en un momento concreto del desarrollo vegetativo o dependiendo de las condiciones ambientales en donde se desarrolla) o de forma constitutiva o de forma ectópica (que se expresa en otras células o tejidos diferentes de las habituales y esperadas).

Teniendo en cuenta que la proteína codificada por la secuencia de la presente invención desempeña de forma sorprendente una función que restituye la función del gen *CO* de plantas de *Arabidopsis thaliana* cuyo gen *CO* se ha eliminado de la secuencia genómica (mutante *co*), es de suponer, que la transferencia e inserción, en el lugar adecuado, de las secuencias de la invención a cualquier especie de planta donde el producto obtenido de las secuencias anteriores tenga la misma secuencia aminoacídica, origine como resultado plantas que expresan de forma funcional estas secuen-

ES 2 344 185 B1

5 cias, que desempeñan la misma función que el gen intrínseco *CO* de dichas plantas. En este sentido, preferiblemente, la planta se selecciona de las familias de plantas de la lista que comprende, pero sin limitarse, familia *Poaceae*, *Fabaceae*, *Lauraceae*, *Chenopodiaceae*, *Brassicaceae*, *Cucurbitaceae*, *Apiaceae*, *Solanaceae*, *Asteraceae*, *Annonaceae*, *Ebenaceae*, *Moraceae*, *Cactaceae*, *Cucurbitaceae*, *Rosaceae*, *Fabaceae*, *Rutaceae*, *Vitaceae*, *Actinidiaceae*, *Bromeliaceae*, *Musaceae*, *Fagaceae*, *Betulaceae*, *Juglandaceae*, *Anacardiaceae*, *Asteraceae*, *Oleaceae* o *Capparaceae*.

Preferiblemente, la planta de la familia *Cucurbitaceae* se selecciona, pero sin limitarse, de los géneros *Cucurbita*, *Cucumis*, *Citrullus* o *Lagenaria*.

10 Preferiblemente, la planta de la familia *Solanaceae* se selecciona, pero sin limitarse, de los géneros *Solanum* o *Capsicum*. Preferiblemente la planta del género *Solanum* se selecciona, pero sin limitarse, de las especies *S. tuberosum*, *S. lycopersicum* o *S. melongena*. Más preferiblemente la planta es de la especie *S. lycopersicum*. Preferiblemente la planta del género *Capsicum* se selecciona, pero sin limitarse, de las especies *C. angulosum*, *C. annuum*, *C. pendulum* o *C. minimum*.

15 Preferiblemente, la planta de la familia *Rosaceae* se selecciona, pero sin limitarse, de las subfamilias *Rosoideae*, *Maloideae* o *Prunoideae*.

20 Preferiblemente, la planta de la familia *Rutaceae* se selecciona, pero sin limitarse, del género *Citrus*. Más preferiblemente la planta es *C. aurantium*, *C. nobilis*, *C. grandis*, *C. limetta*, *C. limón*, *C. medica* o *C. paradisi*.

La planta de la invención puede contener cualquiera de las secuencias de la invención en homocigosis, heterocigosis o hemicigosis.

25 La planta de la invención puede conseguirse por transformación genética de células vegetales mediada por biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración de cualquiera de las secuencias de la invención en el ADN de la planta, ya sea éste genómico, cloroplástico o mitocondrial seguida de un programa de regeneración *in vitro* adecuado a las características y necesidades de la especie vegetal transformada. Asimismo, la planta también puede conseguirse por transferencia de cualquiera de las secuencias de la invención por cruzamiento, es decir, empleando polen de la planta de la invención para polinizar cualquier otra planta que no contenga cualquiera de las secuencias de la invención o polinizando los gineceos de plantas que contengan cualquiera de las secuencias de la invención con otro polen de plantas que no contengan estas secuencias. Los métodos para conseguir la planta de la invención no se limitan exclusivamente a los métodos descritos en este párrafo. Asimismo también se incluye la planta que comprende la célula de la presente invención de forma estable o de forma transitoria.

35 Polen, semilla, propágulo, progenie o parte de la planta que procede de cualquiera de las plantas descritas en la presente invención.

40 En la presente invención se tiene en cuenta el polen como transmisor de los caracteres genéticos y fenotípicos, que puede llevarse a cabo por la polinización de cualquier variedad vegetal compatible con el polen al que se hace referencia. De este modo se consigue una planta que comprende cualquiera de las secuencias de la presente invención y, tras los respectivos cruces y/o selecciones, se puede obtener una planta en la que la secuencia se integra de forma estable (aunque también pueden expresarse de forma transitoria) y en un número de copias adecuado para obtener los mismos caracteres deseables en las posteriores generaciones.

45 Los propágulos son partes de la planta que permiten la propagación o reproducción asexual en vegetales, por la que se obtienen nuevas plantas u órganos individualizados. Los tejidos de la porción separada deben recuperar la condición de meristemos para producir todo el conjunto de órganos de la planta. El propágulo se selecciona, pero sin excluir, de la lista que comprende estolones, rizomas, tubérculos o bulbos.

50 El término “progenie” hace referencia al resultado de la reproducción, es decir, el individuo o individuos producidos mediante la intervención de uno o más individuos parentales. Por ejemplo, la progenie de las plantas, obtenida mediante reproducción sexual, son las semillas, sin embargo la progenie de una planta puede ser cualquier célula resultante de la fusión de cualquier contenido celular, plasto, compartimento celular, ADN o cualquiera de sus combinaciones. En los procesos de división celular (como por ejemplo en el cultivo *in vitro*) la progenie son las células resultantes de la división.

Otro aspecto de la presente invención es un método para la obtención de la célula de la invención, que comprende:

- 60 a. insertar la secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 1 en un vector,
- b. transformar una célula con el vector obtenido según el apartado (a) y
- 65 c. seleccionar la célula transformada según el apartado (b) que comprende la secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 1.

La inserción de cualquiera de las secuencias de la invención en un vector se puede llevar a cabo por medio de los métodos de clonación que forman parte del conocimiento general común, mediante corte de las secuencias y el vector

ES 2 344 185 B1

con enzimas de restricción y su posterior ligación, de forma que la secuencia del vector integre la secuencia de la invención seleccionada. El vector ha sido definido en un párrafo anterior.

La selección del vector que comprende la secuencia de la invención escogida, puede llevarse a cabo mediante técnicas como;

- Selección de células que contengan los vectores de la invención mediante la adición de antibióticos al medio de cultivo. La resistencia de estas células a sustancias como los antibióticos está producida por la síntesis de moléculas codificadas por una secuencia contenida en la secuencia del vector.
- Digestión con enzimas de restricción mediante las cuales se obtenga un fragmento de alguna de las secuencias de la invención insertada en el vector.
- Detección de un gen indicador presente en el vector de transformación, cuya presencia en la planta indica la presencia de las secuencias de la invención.

La célula se obtiene de cualquier tipo de cultivo microbiológico (por ejemplo *E. coli* o *Agrobacterium tumefaciens*) o tejido vegetal.

La transformación genética de las células se lleva a cabo por medio de técnicas que forman parte del conocimiento general común, como por ejemplo, electroporación, transformación genética mediada por biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración de cualquiera de las secuencias de la invención en el ADN de la célula. Mediante estas técnicas se consigue introducir, de forma estable, un vector que incluye cualquiera de las secuencias de la invención, de forma que, tras sucesivas divisiones de la célula, la secuencia incorporada sigue expresándose. También se incluyen las células que comprenden cualquiera de las secuencias de la invención de forma transitoria.

La célula transformada con un vector que incluye cualquiera de las secuencias de la invención puede incorporar la secuencia en alguno de los ADN de la célula; nuclear, mitocondrial y/o cloroplástico (en este caso se suele insertar una secuencia de ADNt que contiene, entre otras secuencias, cualquiera de las secuencias de la invención), o, permanecer como parte de un vector que posee su propia maquinaria para autoreplicarse. La selección de la célula que ha incorporado cualquiera de las secuencias de la invención se lleva a cabo por medio de la adición de antibióticos al medio de cultivo que suministra nutrientes a las mismas. La resistencia de estas células a sustancias como los antibióticos está producida por la síntesis de moléculas codificadas por una secuencia contenida en la secuencia del vector o del ADNt del vector. También se puede seleccionar la célula que comprende SEQ ID NO: 1 mediante cualquier otra técnica que permita discriminar su presencia o ausencia y/o su expresión.

Otro aspecto de la presente invención es un método para obtener la planta de la invención que comprende:

- a. regenerar al menos una planta procedente de la célula obtenida según el apartado (c) del método anterior,
- b. seleccionar una o varias plantas regeneradas según el apartado (d) que expresa, al menos, la secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 1 y
- c. seleccionar una o varias plantas obtenidas según el apartado (b) que presenta un adelanto de la floración respecto de una planta control.

Las células seleccionadas, si son vegetales, pueden someterse a un programa de organogénesis o embriogénesis somática mediante el cual, tras la desdiferenciación de las mismas mediante una combinación adecuada de hormonas vegetales y otros compuestos, se da lugar a una planta completa que contiene el material genético de la célula original de la que procede. Además son necesarias condiciones de luz y temperatura idóneas para cada especie vegetal. Las células vegetales son totipotentes, es decir, contienen una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa. Una vez que se ha regenerado la planta procedente de la célula vegetal seleccionada, se lleva a cabo un análisis de la presencia y/o de la expresión de la secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 1 o de cualquier otra secuencia de la presente invención (secuencia promotora, etc...).

El método comprende, además, la selección de una planta que presenta un adelanto o retraso de la floración respecto de un control. Preferiblemente se seleccionan las plantas que presentan un adelanto de la floración respecto de las plantas control. Las plantas control son plantas que no contienen la secuencia de la invención que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1. Preferiblemente las plantas control contienen el resto de la secuencia del ADN de transferencia del vector que se ha empleado para insertar la secuencia nucleotídica de la invención en la célula vegetal. El control también puede ser una planta tipo salvaje cuyo material vegetal procede de las plantas transformantes (que comprenden la secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 1), antes de ser transformadas, que ha pasado por los mismos pasos de cultivo *in vitro* que las plantas de la invención o que no ha pasado por estos pasos de cultivo.

Según otra realización preferida, la secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia SEQ ID NO: 1, está unida funcionalmente a una secuencia reguladora de la expresión génica. La secuencia reguladora de la expresión génica determina, tal como se ha descrito anteriormente, el tejido vegetal en el que se expresan las secuencias de la invención y/o el momento en el que se expresan.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1

Muestra el fuerte parecido de SEQ ID NO: 1 respecto de las proteínas CO de plantas

- A. La estructura del gen se dedujo de las ESTs y amplificaciones por PCR utilizando ADNc de molde Parte superior y la secuencia genómica predecible según *Chlamydomonas genome database* (abajo).
- B. Relaciones evolutivas de proteínas CO y COL de la rama evolutiva de las plantas. La distancia del árbol está dibujada a escala, con las longitudes de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas usadas para inferir el árbol filogenético. Las relaciones evolutivas representan 1000 réplicas. Los principales grupos resultantes están marcados. Los asteriscos (*) indican valores *bootstrap* del 95% de confianza.

Figura 2

Muestra la expresión de *CrCO* bajo el control del promotor 35S

En adelante, la secuencia aminoacídica que codifica para SEQ ID NO: 1 se denominará *CrCO* y la proteína para la que codifica se denominará CrCO.

La expresión de *CrCO* bajo el control del promotor 35S complementa la mutación *co* y acelera la floración.

- A. Detección de ARNm de *CrCO* mediante RT-PCR en plantas recombinantes 35S::*CrCO*, en plantas en fondo *co-8* (*Ler*) (35S::*CrCO* #1) o plantas en fondo *co-10* (*col-0*) (35S::*CrCO* #2). Plantas *Wild type* (silvestres) *col-0* y *Ler*, así como los mutantes *co-8* fueron utilizados como controles negativos.
 - B. Plantas *co-8* y *co-10* mutantes, *col-0* y 35S::*CrCO* #2 crecidas en suelo durante 4 semanas en condiciones de día largo (LD). Las plantas son T3 homocigotas.
 - C. Detección de los niveles de ARNm de *FT* por RT-PCR en plantas 35S::*CrCO* incluyendo controles positivos (SUC2::*CO* y 35S::*CO*) y negativos (*co-8*).
- Las plantas fueron crecidas en suelo durante 2 semanas en condiciones de día largo y fueron recogidas al mediodía (ZT 4) y por la tarde (ZT16).
- D. Fenotipo de algunas líneas 35S::*CrCO*.

Figura 3

Muestra la acción de *CrCO* en la floración de *Arabidopsis* bajo un promotor exclusivo de floema

- A. La expresión de *CrCO* bajo el control del promotor específico de floema SUC2 (SEQ ID NO: 3) acelera la floración en plantas *col-0*. Si la expresión se dirige mediante el promotor específico de meristemo KNATI, la floración temprana no ocurre. Las plantas mutante *co-10*, silvestre *col-0* y 35S::*CO* (en fondo *col-0*) se utilizaron como control.
- B. Expresión de *CrCO* y *FT* en las mismas plantas que en A.
- C. Inmunodetección de la proteína CrCO con anticuerpos específicos para CO en extractos nucleares de plantas *col-0*, 35S::*CO* (*col-0*) y plantas *col-0* transformadas con SUC2::*CrCO* o KNAT1::*CrCO*. La detección de H3 se usó como control de carga. La flecha indica la banda específica de 45 KDa detectada en plantas 35S::*CrCO* y SUC2::*CrCO*.
- D. Detección de la fusión YFP:CrCO en núcleos de células epidérmicas de cebolla mediante microscopia confocal.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos que describen la obtención de una secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, el método para la producción de células y plantas que la expresan así como el uso de dicha secuencia para regular el momento de la floración de las plantas que lo expresan.

Ejemplo 1

Protocolos experimentales

1.1 Material experimental de plantas y algas

Para el análisis de la expresión génica y producción de proteínas se crecieron las plantas de *Arabidopsis thaliana* en diferentes fotoperiodos en fitotrones con condiciones controladas de 80% de humedad y 75 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ de intensidad de luz. Las plantas de *Arabidopsis* también se crecieron en medio sólido MS-agar suplementado con 1% (p/v) de sacarosa en diferentes fotoperiodos en un fitotrón SG-1400 (Radiber SA, España) a 65 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ de intensidad de luz. Las estirpes silvestre 21 gr, el mutante de pared celular CW15 y las líneas transgénicas de *C. reinhardtii* se crecieron en recipientes cónicos en agitación o en botellas cilíndricas aireadas en medio Sueoka o medio TAP en cámaras de cultivo controladas a 22°C. Para la inducción del promotor NIA1 se recogieron por centrifugación algas crecidas hasta fase exponencial media en medio Sueoka-amonio, se resuspendieron en medio Sueoka-nitrato y se crecieron en diferentes condiciones de cultivo. Se emplearon diferentes fotoperiodos desde condiciones de LD (16:8) hasta SD (8:16) con condiciones de luz de 30 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ (baja intensidad) o 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ (alta intensidad).

1.2 Clonación y análisis de *CrCO* (secuencia aminoacídica que codifica para SEQ ID NO: 1)

En adelante, la secuencia aminoacídica que codifica para SEQ ID NO: 1 se denominará *CrCO* y la proteína para la que codifica se denominará CrCO.

Se analizaron varios clones de la colección de ADNc del Centro de ADN de Kazusa para obtener la ORF completa de *CrCO*. La secuenciación de cuatro de estos ADNc (AV628196; Av628285; AV629179; AV638186) mostró una secuencia nucleotídica de ARNm única. La secuencia de aminoácidos deducida de CrCO tiene 410 residuos y posee tres dominios característicos: i) Dos dominios en dedo de zinc en el extremo amino-terminal llamados cajas-b implicados en interacción proteína-proteína; ii) Un dominio intermedio ácido posiblemente implicado en activación transcripcional; y iii) Un dominio carboxilo CCT (CO-COL-TOC1) que se ha sugerido su mediación en la interacción con el ADN y que está conservado en proteínas de plantas funcionalmente relacionadas con el oscilador central como *TOC1* u otros pseudo reguladores de respuesta.

1.3 Análisis del tiempo de floración

El tiempo de floración se analizó en plantas crecidas en tierra en cámaras con condiciones controladas en LD mediante el conteo de las hojas de roseta y caulinas del mismo tallo al menos en 10 individuos. Los datos se expresan como medias +/- error estándar de la media (s.e.m.).

1.4 Análisis filogenéticos

Las relaciones evolutivas entre las proteínas CO y CO-like se analizaron empleando las secuencias de aminoácidos deducidas de diferentes bases de datos y alineadas con el programa CLUSTALX. Este alineamiento se utilizó para generar diversos árboles evolutivos empleando diferentes criterios filogenéticos. Como estos árboles mostraban topologías muy similares, sólo se ha mostrado el que se realizó con el criterio de la mínima evolución (Fig. 1B). Se calcularon las relaciones evolutivas empleando el método de la Evolución Mínima (ME). El árbol consenso de atrapamiento calculado mediante 1000 réplicas representa la historia evolutiva de las proteínas analizadas. El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas usadas para calcular el árbol filogenético. El árbol ME fue rastreado empleando el algoritmo de *Neighbour-joining* a nivel de rastreo de 1. El algoritmo de *Neighbour-joining* se usó para generar el árbol inicial. Todas las posiciones que contenían huecos de desapareamientos o falta de datos fueron eliminadas sólo en las comparaciones de secuencias de apareamientos (opción de delección de apareamiento). Hubo en total 669 posiciones en el set de resultados finales. Los análisis filogenéticos se realizaron con el programa MEGA4. Los números de acceso de las secuencias usadas en el alineamiento se muestran en la tabla 1.

ES 2 344 185 B1

TABLA 1

Números de acceso de las proteínas COL

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Proteína	Nº acceso NCBI	Nº de gen TIGR
CO	Q39057	At5g15840
HD1	NP_910686	Os06g16370
CrCO	AM940003	--
AtCOL1	O50055	At5g15850
AtCOL2	Q96502	At3g02380
AtCOL3	Q9SK53	At2g24790
AtCOL4	Q940T9	At5g24930
AtCOL5	Q9FHH8	At5g57660
AtCOL6	Q8LG76	At1g68520
AtCOL7	Q9C9A9	At1g73870
AtCOL8	Q9M9B3	At1g49130
AtCOL9	Q9SSE5	At3g07650
AtCOL10	Q9LUA9	At5g48250
AtCOL11	O23379	At4g15250
AtCOL12	Q9LJ44	At3g21880
AtCOL13	O82256	At2g47890
AtCOL14	O22800	At2g33500
AtCOL15	Q9C7E8	At1g28050
AtCOL16	Q8RWD0	At1g25440
OsCOL1	XP_473042	Os04g42020
OsCOL2	XP_506861	Os02g39710
OsCOL3	BAD37550	Os06g44450
OsCOL4	BAD27992	Os02g08150
OsCOL5	NP_001057441	Os06g19444
OsCOL6	XP_467550	Os02g49230
OsCOL7	BAA33200	Os03g22770
OsCOL8	NP_910981	Os07g47140
OsCOL9	XP_469510	Os03g50310
PpCOL1	AB185925	--
PpCOL2	P000371	--
PpCOL3	P012466	--
SmCOL	C_1160095	--
VcCOL	C_10319	--
OtCOL	C_Chrom_00010305	--
GsCOL	GS55410	--

1.5 Análisis de expresión génica

El ARN completo procedente de Células de *Chlamydomonas* o plántulas de *Arabidopsis* se extrajo mediante el protocolo de TRIZOL (Invitrogen). Se monitorizó la expresión génica mediante el análisis *Northern blot* empleando sondas marcadas radiactivamente o mediante RT-PCR semicuantitativa empleando cebadores específicos para cada gen analizado y ADNc construido con el QIAGEN *Quick prime RT Kit*. Los niveles de expresión de los genes de α -TUBULINA (*TUA1*) o UBIQUITINA-10 (*UBQ*) se usaron como control en *Chlamydomonas* y *Arabidopsis* respectivamente. Para la expresión génica circadiana se empleó como control los niveles de expresión del gen *CABII*, que codifica para la proteína de unión a la clorofila a/b del fotosistema II de *Chlamydomonas*. Los datos se representan como la media de al menos tres experimentos diferentes. La lista completa de cebadores usados en este trabajo se muestra en la tabla 2.

TABLA 2

Lista de cebadores y condiciones de PCR

Gen	Cebadores	Producto (pb)
<i>CrCO</i>	SEQ ID NO: 4 (directo) SEQ ID NO: 5 (reverso)	447
<i>TUA1</i>	SEQ ID NO: 6 (directo) SEQ ID NO: 7 (reverso)	770
<i>FT</i>	SEQ ID NO: 8 (directo) SEQ ID NO: 9 (reverso)	560
<i>UBQ</i>	SEQ ID NO: 10 (directo) SEQ ID NO: 11 (reverso)	483

Para el gen *CrCO*, las condiciones de PCR son 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 60 segundos a 72°C. Para el gen *TUA1*, las condiciones de PCR son 27 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 60 segundos a 72°C. Para el gen *FT*, las condiciones de PCR son 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 60 segundos a 72°C. Para el gen *UBQ*, las condiciones de PCR son 20 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 60 segundos a 72°C.

En la columna 1 de la tabla 2 se muestra el nombre de las proteínas tal y como aparecen en las correspondientes figuras. En la columna 2 se muestra el número de acceso para las proteínas en la base de datos del *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI), o código de secuencia genómico del *DOE Joint Genome Institute* (JGI) (<http://www.jgi.doe.gov/>) para SmCOL, VcCOL, OtCOL. La secuencia aminoacídica de GsCOL puede extraerse de la página web del proyecto genómico de *Galdieria sulphuraria* (<http://genomics.msu.edu/gladieria/>). En la columna 3 se muestra para *Arabidopsis* y arroz el número de acceso del gen del *Institute for Genomic Research* (TIGR).

1.6 Técnicas inmunológicas y de análisis de proteínas

Se extrajeron las proteínas de material de plantas congelado mediante trituración en un mortero en presencia de nitrógeno líquido y un tampón de extracción: tris HCl 50 mM (pH 8.0); EDTA 1 mM (pH 8.0); glicerol 10% (v/v); KCl 50 mM; MgCl₂ 10 mM; PMSF 10 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas de la marca SIGMA. Las algas se rompieron con el mismo tampón mediante sonicación breve (2 veces durante 30 segundos en un sonicador Branson a 10 W de potencia). El extracto crudo de plantas y algas resultante se centrifugó a 16.000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. El precipitado se usó para la medida del almidón. Para el análisis por *Western blot* se emplearon anticuerpos contra CO y anti-H3, disponibles comercialmente (AbCAM), como controles nucleares.

1.7 Transformación de algas y plantas

Las plantas silvestres y mutantes de *Arabidopsis* se transformaron mediante la técnica de inmersión floral mediada por *Agrobacterium*. Para la expresión de *CrCO* en *Arabidopsis*, las plantas se transformaron con el vector *alligator*

ES 2 344 185 B1

2. Las plantas CrCOox se seleccionaron por la presencia de GFP en la semilla bajo el microscopio y se analizó su fenotipo floral en la primera generación. Se seleccionaron las plantas homocigotas directamente en esta generación cuando mostraban un 100% de fluorescencia en las silicuas.

5 Para generar proteínas fluorescentes de fusión para determinar la localización nuclear, se empleó el plásmido *pENSG-YFP:GW* (de la Dra Nieves Medina-Escobar, Universidad de Málaga). Este plásmido genera una fusión amino-terminal de la proteína YFP a proteínas expresadas por ADNc clonados en un sitio *gateway* en la parte 3' del gen *YFP*, bajo el control de un promotor 35S y son compatibles con la expresión en plantas mediada por *Agrobacterium*.

10 Para la construcción del vector inducible por nitrato que expresa *CrCO*, se introdujo el *cassette gateway* en pautas C (Invitrogen) en el sitio *EcoRV* del *polilinker* del vector *pNIA1* según las instrucciones del fabricante, obteniéndose el vector *pNIAG*. Un fragmento *HindIII* del vector *pHyg3*, que incluye el *cassette* de resistencia a higromicina, se introdujo en el sitio *HindIII* del vector *pBS SK+* y un fragmento *kpnI* en el mismo sitio del vector *pNIAG*, produciéndose el vector *pNIAHG*, que se confirmó estaba clonado en antisentido al *cassette gateway* por secuenciación. La ORF de *CrCO* se amplificó por PCR y se clonó en el vector *pDONR221* mediante recombinación. Los cebadores usados fueron SEQ ID NO: 12 (directo) y SEQ ID NO: 13. Mediante esta amplificación se obtuvo una secuencia de ADNc que se muestra en SEQ ID NO: 14 (*CrCO*). El vector de entrada de *CrCO* se usó como sustrato para una reacción L de recombinación en el vector *pNIAHG*, obteniéndose el vector final *pNIAHG::CrCO*. Las algas transformadas se seleccionaron mediante resistencia a higromicina en medio Sueoka-amonio y se comprobó la expresión del gen en presencia de nitrato.

20 El vector de producción de GST:CrCO se construyó mediante recombinación molecular del vector de entrada de *CrCO* y el plásmido *pDESRI5* (Invitrogen). La clonación y purificación en columnas de glutatión-sephadex (GE Healthcare) se realizó como describe el fabricante.

25

Ejemplo 2

Resultados

30

2.1. Identificación de un homólogo de *CONSTANS* en *C. reinhardtii*

35 En las bases de datos de ESTs (*Expression Sequence Tags*) pueden encontrarse frecuentemente ESTs de *CrCO*, pero sólo se pudo identificar un EST para el gen *COL* (*CONSTANS-LIKE*) EDP03468. Además, empleando cebadores diseñados para una parte interna del gen y como molde ADNc procedente de diferentes condiciones de crecimiento, no se pudo amplificar mediante PCR reversa (RT-PCR) ninguna señal de EDP03468. Por otro lado, se ha descrito que la expresión de *ROC66* es pequeña pero detectable y parece regularse por el reloj circadiano. Dada su gran divergencia de secuencia con *CO*, y su similitud a proteínas de la familia *COL*, *ROC66* podría considerarse un gen *COL* de algas. De manera significativa, en todas las condiciones de crecimiento estudiadas, la secuencia completa de *CrCO* podía ser amplificada mediante ensayos de RT-PCR, generándose un fragmento de unos 1.4 kb, lo que es consistente con el tamaño previsto para el gen en la última versión de la secuencia genómica de *C. reinhardtii* (Fig. 1A). La estructura del gen *CrCO* se generó mediante información recogida de los ESTs, de las amplificaciones de RT-PCR y de la secuencia predicha en la base de datos del genoma de *C. reinhardtii* (Fig. 1A). *CrCO* posee cuatro intrones que están conservados en la secuencia del gen de *Volvox cartieri* pero no en genes de plantas, del musgo *Physcomitrella patens* o de la licofita *Selaginella moeiiendorfi*. La secuencia codificante de *CrCO* (1230 nt) es similar a la de *CO* y su ARNm contiene secuencias cortas en los extremos 5' y 3'. La identidad completa de las secuencias de aminoácidos deducidas de *CO* y *CrCO* es de 27% y la similitud 37%. En la zona conservada de las cajas-b la identidad de aminoácidos llega hasta el 43%, mientras que en el dominio CCT la identidad llega al 78%. Las identidades con otras secuencias *COL* de plantas procedentes de bases de datos varía entre el 20 y el 30% (tabla 3). En conjunto, los resultados sugieren fuertemente que *CrCO* es el único homólogo verdadero de *CO* que se expresa con normalidad en *C. reinhardtii*.

55

60

65

ES 2 344 185 B1

TABLA 3

Identidad de secuencia de varios miembros representativos de la familia de proteínas COL del árbol evolutivo de las plantas

	CO	HD1	PpCOL1	SmCOL1	CrCO	VcCO	OtCOL	GsCOL
CO	100	46,6	34,8	36,4	26,7	26,9	24,3	23,0
HD1		100	33,0	32,6	26,1	25,7	22,1	21,0
PpCOL1			100	49,4	29,1	30,9	22,5	22,7
SmCOL				100	32,5	29,4	23,4	22,2
CrCO					100	62,2	19,8	22,2
VcCO						100	19,5	21,7
Oncol							100	19,0
GsCOL								100

Los números indican el porcentaje de identidad de aminoácidos entre cada pareja de proteínas. La identidad de CrCO con las secuencias de plantas es mayor que con las de proteínas COL de otras algas prasinofíceas como *Ostreococcus tauri* (OtCOL) o con el alga roja *Galdieria sulphuraria* (GsCOL). PpCOL.1: *Physcomitrella patens* COL1; SmCOL: *Selaginella moellendorfi* COL; VcCO: *Volvox cartieri* COL.

Se ha empleado la secuencia de aminoácidos deducida de CrCO, junto a otras secuencias de COs y COLs del linaje eucariótico fotosintético para generar un alineamiento y un árbol evolutivo (Fig. 1B). En el árbol de la Fig. 1B, CrCO se agrupa con *Volvox*-CO (VcCO), otra alga clorofícea que muestra una rudimentaria organización multicelular. La estructura génica y la posición de los intrones son similares entre las dos secuencias de algas, como era de esperar de la proximidad evolutiva de ambas especies (Fig. 1B). Esta rama basal está muy cerca del grupo I, que incluye a las proteínas CO y HD1, de las que se sabe que tienen un papel central en la floración por fotoperiodo en *Arabidopsis* y arroz respectivamente. Por el contrario, los homólogos de CO presentes en los proyectos genoma del alga verde marina unicelular *Ostreococcus tauri* y el alga roja *Galdieria sulphuraria* ramificaban lejos de este grupo (96% de atrapamiento) y junto a miembros COL del grupo II (Fig. 1B).

No se encontraron genes COL en los proyectos genoma o bases de datos de ETSs de diferentes especies que pertenecen a otros grupos taxonómicos como las Bacilariofitas (*Thalassiosira pseudonana* y *Phaeodactylum tricorutum*), Dinofitas (*Amphidium operculata*), Euglenofitas (*Euglena gracilis*) o Haptofitas (*Emiliana huxley*). Por todo ello, probablemente la rama evolutiva que finalmente evolucionó en las plantas terrestres incluía homólogos verdaderos de CO, aunque la secuenciación de nuevos genomas de algas podría modificar este escenario.

2.2. La expresión de *CrCO* en *Arabidopsis* bajo el control de diferentes promotores acelera la transición floral

Se clonó el ADNc completo de *CrCO* bajo el control del promotor 35S en un vector de expresión de plantas (ver métodos). La construcción anterior, que sobreexpresa *CrCO* se transformó en los mutantes nulos *co-8* y *co-10*, así como en los ecotipos silvestres *Ler* y *Columbia*. En las plantas transformantes se midió la expresión del gen *CrCO* mediante RT-PCR (Fig. 2). En todos los casos la expresión de *CrCO* bajo el promotor 35S (plantas 35S::*CrCO*) complementaba a la mutación *co* (Fig. 2A y Fig. 2B) y todas las plantas mostraban un fenotipo de floración temprana (tabla 4). Por otro lado, en las plantas transformantes de *Ler* y *Col-0*, se observaba una co-segregación directa entre el marcador del vector y el fenotipo de floración temprana, demostrando que *CrCO* también confería floración temprana en plantas silvestres (tabla 4).

TABLA 4

Tiempo de floración de plantas silvestres, mutantes y transgénicas en condiciones de cultivo de día largo (LD)

Genotipo de la planta	Nº total de hojas (\pm s.e.m.)
Ler	12.8 \pm 0.3
Col-0	19.9 \pm 0.5
<i>co-8 (Ler)</i>	33.2 \pm 0.7
<i>co-10 (col-0)</i>	39.7 \pm 0.8
35S:: <i>CO (col-0)</i>	5.8 \pm 0.1
SUC2:: <i>CO (Ler)</i>	7.4 \pm 0.2
35S:: <i>CrCO #1 (Ler)</i>	8.4 \pm 0.3
35S:: <i>CrCO #2 (col-0)</i>	13.2 \pm 0.3
SUC2:: <i>CrCO (col-0)</i>	8.6 \pm 0.2
KNAT1:: <i>CrCO (col-0)</i>	20.4 \pm 0.7
35S:: <i>CrCO #1 (co-8) (Ler)</i>	10.2 \pm 0.2
35S:: <i>CrCO #2 (co-10) (Col-0)</i>	13.6 \pm 0.4

En la tabla, los datos se muestran como la media \pm s.e.m. de 10 plantas contadas para el número total de hojas en condiciones de LD. El fondo genético de cada planta se muestra entre paréntesis al lado de cada genotipo. Las plantas transgénicas descritas en este trabajo son todas plantas T3 (de tercera generación).

También se verificó si las plantas que sobreexpresaban *CrCO* eran capaces de activar la expresión de la diana principal de *CO*, el integrador floral *FT*. Se crecieron plantas 35S::*CrCO* homocigotas en medio sólido en LD (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) y se analizó la expresión de *FT* a tiempos ZT 4 y ZT 16 (Fig. 2C). Se usaron plantas silvestres, mutantes *co* y plantas que sobreexpresaban *CO* (35S::*CO*) como controles. En todos los casos, el fenotipo de floración temprana de 35S::*CrCO* iba emparejado con niveles altos de expresión de *FT*, incluso durante la mañana, cuando los niveles de *FT* son bajos en las plantas silvestres (Fig. 2C). Las plantas 35S::*CrCO* también florecían temprano en condiciones SD no inductivas y esto iba acompañado de altos niveles de expresión de *FT*. Por ello, el fenotipo de floración temprana de las plantas transgénicas que expresaban *CrCO* puede probablemente atribuirse al mismo proceso descrito para la floración por fotoperiodo y mediado por *FT*. Las plantas 35S::*CO* muestran otros fenotipos pleiotrópicos asociados con la floración temprana como silicuas en forma de maza, un aumento de la esterilidad masculina y flores terminales. De forma similar, las plantas 35S::*CrCO* presentaban un tamaño reducido, defectos en la formación de silicuas, flores terminales y frecuentemente eran incapaces de producir semillas maduras, con flores que degeneraban en estados de desarrollo tardíos (Fig. 2D, a-d). Estas últimas plantas (Fig. 2D, c-d) mostraron un tamaño extremadamente pequeño, una floración extremadamente temprana, estimada tanto por días de floración como por número total de hojas, y también niveles muy altos de ARNm de *CrCO* y *FT*.

CO promueve la floración en LD mediante la expresión de una señal sistémica en los haces vasculares. Para averiguar si la expresión de *CrCO* específicamente en estos tejidos podía promover también la floración, se introdujo *CrCO* en plantas *col-0* de *Arabidopsis* bajo el control del promotor del transportador de sacarosa *SUC2*, que se conoce se expresa preferentemente en las células anexas del tejido vascular floemático. La expresión de *CrCO* bajo el promotor *SUC2* (plantas SUC2::*CrCO*) indujo floración temprana en las plantas silvestres *Col-0* (Fig. 3A y tabla 4) y complementó la mutación *co*. Las plantas transformadas con la construcción SUC2::*CrCO* tenían aproximadamente 8,6 \pm 0,2 hojas en el momento de la aparición del primer botón floral en condiciones LD, mientras que *Col-0* mostraba 19,9 \pm 0,5 hojas en las mismas condiciones (tabla 4). Sin embargo, cuando el ADNc de *CrCO* se expresó bajo el control del promotor del gen *KNAT1*, cuya expresión es exclusiva del meristemo apical, y se introdujo en plantas *Col-0*, no se alteró la floración (Fig. 3A y tabla 4). Las plantas KNAT1::*CrCO* florecían con 20,4 \pm 0,7 hojas (tabla 4). Para confirmar que el fenotipo de floración temprana observado en las plantas SUC2::*CrCO* se debía a la activación de la vía del fotoperiodo, se comprobó la expresión de *FT* mediante RT-PCR. Efectivamente, si se comparaba con las plantas control, *FT* se expresaba a altos niveles en estas plantas tanto en LD como en SD y ello era concomitante con altos niveles de expresión de *CrCO* (Fig. 3B). No obstante, aunque presentaban altos niveles de *CrCO*, no se observaron mayores niveles de expresión de *FT* comparado con plantas silvestres, cuando *CrCO* se expresaba bajo el control del promotor exclusivo de meristemo (Fig. 3B).

Mediante inmunoblots se mostró que las plantas que sobreexpresaban *CrCO* en fondo *Col-0* también mostraban altos niveles de producción de la proteína CrCO en extractos nucleares (Fig. 3C). Se probó también la presencia de la proteína CrCO mediante inmunoblots en plantas que expresaban *CrCO* bajo los promotores *SUC2* y *KNAT1* en fondo *Col-0*. De manera consistente con los datos de ARNm, la proteína podía detectarse en plantas 35S::*CrCO* y

ES 2 344 185 B1

SUC2::*CrCO*, pero no en el mutante *co-10* o en plantas donde la expresión de *CrCO* estaba controlada por el promotor *KNATI* (Fig. 3C).

5 La transformación de plantas con vectores que contenían fusiones traduccionales de CO a la Proteína Fluorescente Verde (GFP) había mostrado la presencia nuclear de la fusión GFP:CO. Se clonó *CrCO* en el plásmido pENSG-YFP:GW que produce una fusión amino-terminal con la variante amarilla de la GFP (YFP). Este vector se introdujo mediante bombardeo de partículas en células de la epidermis junto a un vector control que expresaba CO (YFP:CO) en la mismas condiciones. Como puede verse en la Fig. 3D, YFP:*CrCO* se detectó mediante microscopía confocal en el núcleo de manera similar a las plantas que sobreexpresaban la fusión YFP:CO, sugiriendo que CrCO también se localiza en el núcleo.

Ejemplo 3

CrCO es un verdadero ortólogo de *CO*

15 Aunque la proteína CrCO mantiene alrededor de un 27% de identidad con CO, las plantas transformadas con *CrCO* presentan un fenotipo de floración sorprendentemente temprana. Por el contrario, COL1, una duplicación en tándem de CO en *Arabidopsis*, que conserva más del 85% de identidad en aminoácidos con CO no puede complementar la mutación *co* si se expresa bajo un promotor 35S. Esto sugiere que la estructura de CrCO se asemeja a la de CO y que está involucrada probablemente en los mismos complejos nucleares que se han propuesto median la transcripción de *FT*. El hecho de que pueda complementar tanto a la mutación *co-8* en fondo *Ler* y a la mutación *co-10* en fondo Col-0 indica que CrCO puede reemplazar eficazmente a CO en el complejo supramolecular que supuestamente interviene en la modificación de la transcripción.

25 En la presente invención también se ha mostrado que al igual que CO, la expresión de *CrCO* bajo el control del promotor del gen específico de floema, *SUC2*, provoca floración temprana en *Arabidopsis*. Las plantas SUC2::*CrCO* mostraban niveles de expresión de *FT* mayores que las silvestres incluso en condiciones de SD no inductivas y ello podría explicar el fenotipo observado de floración temprana. Por el contrario, la expresión de *CrCO* bajo el promotor específico del gen meristemático *KNATI* no promueve floración temprana y no se detecta expresión de *FT*. Este es el caso también de las plantas *KNATI*::CO.

35 En conclusión, CrCO es funcional cuando se expresa específicamente en el tejido vascular, lo que apoya aún más la conservación de la función de CO en el gen homólogo de plantas a pesar de la gran distancia filogenética que existe entre ellos.

La dependencia fotoperiódica de la expresión y regulación génica supone un proceso fundamental para los organismos fotosintéticos dado que anticiparse a las señales luminosas diurnas y estacionales permite la elección del mejor momento del día o del año para realizar las transiciones de fase. En este sentido, las plantas han adaptado una regulación fotoperiódica para varios procesos clave que controlan el desarrollo como la dormancia, la formación de ramas o la transición floral. En esta vía regulatoria, las proteínas COL parecen tener un importante papel, ya que miembros de esta familia se regulan por la luz y el reloj circadiano. Al mismo tiempo están implicados en controlar procesos regulados por la luz como el control dependiente de PHYB de la elongación del hipocotilo, la ramificación o el tiempo de floración. Entre los muchos genes que regulan la transición floral, el módulo *CO-FT* parece encontrarse en la mayoría de las familias de dicotiledóneas y monocotiledóneas y está implicado en el control de la floración desde plantas herbáceas a árboles. A diferencia de otros sistemas de regulación de la floración como la vía de *FLC*/vernalización, que parece específica de algunas dicotiledóneas, los genes *COL* están presentes en los genomas de las briofitas como el musgo *Physcomitrella patens*, las licofitas como *Selaginella moellendorfi* y varias microalgas (descrito en la presente invención).

50 La complementación de la función de CO por *CrCO* en *Arabidopsis* resulta sorprendente porque implica que los genes *COL* han estado involucrados en la regulación circadiana y el control de la reproducción desde muy temprano dentro del linaje de las clorofitas y que estas características se han preservado durante su evolución. La mutación *co* no es letal en *Arabidopsis* o en otras plantas, aunque probablemente ha supuesto una característica crucial en la capacidad de las plantas de adaptarse a nuevos medios. En *Chlamydomonas*, el ciclo celular y el crecimiento se regulan por el reloj circadiano y el fotoperiodo, como se demuestra por el cambio en el pico de expresión de componentes clave del ciclo celular dependiendo de la longitud de noche/día. A raíz de los resultados presentados en la presente invención, se puede deducir que la conservación de la función de CO puede haber sido crítica para la capacidad de las plantas de responder a señales luminosas externas y promover transiciones de desarrollo.

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica con al menos un 90% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1, para regular el momento de floración de una planta.
2. Uso de un ácido nucleico según la reivindicación 1 que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica de un alga verde con al menos un 50% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 10 3. Uso de un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde la secuencia nucleotídica codifica la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
4. Uso de un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 5. Uso de una célula transfectada con el vector de expresión según la reivindicación 4.
6. Uso de la célula según la reivindicación 5 que comprende cualquier producto de la expresión del ácido nucleico aislado.
- 20 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde el ácido nucleico aislado está unido funcionalmente a una secuencia reguladora de la expresión génica.
8. Uso según la reivindicación 7 donde la secuencia reguladora de la expresión génica es SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
- 25 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde la planta pertenece a la especie *Arabidopsis thaliana*.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde la planta pertenece a la especie *Solanum lycopersicum*.
- 30 11. Célula aislada transfectada con un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica con al menos un 90% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.
12. Célula según la reivindicación 11 que comprende una secuencia nucleotídica de un alga verde que codifica una secuencia aminoacídica con al menos un 50% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 35 13. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12 que comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
- 40 14. Planta que comprende la célula según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.
15. Planta según la reivindicación 14 que pertenece a la especie *Arabidopsis thaliana*.
16. Planta según la reivindicación 14 que pertenece a la especie *Solanum lycopersicum*.
- 45 17. Polen, semilla, propágulo, progenie o parte de la planta que procede de cualquiera de las plantas según las reivindicaciones 14 a 16.
18. Método para la obtención de la célula según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende:
- 50 a. insertar la secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 1 en un vector,
- b. transformar una célula con el vector obtenido según el apartado (a) y
- 55 c. seleccionar la célula transformada según el apartado (b) que comprende la secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 1.
19. Método para obtener una planta según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 que comprende:
- 60 a. regenerar al menos una planta procedente de la célula obtenida según el apartado (c) de la reivindicación 18,
- b. seleccionar una o varias plantas regeneradas según el apartado (d) que expresa, al menos, la secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 1 y
- 65 c. seleccionar una o varias plantas obtenidas según el apartado (b) que presenta un adelanto de la floración respecto de una planta control.

ES 2 344 185 B1

20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19 donde la secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 1 está unida funcionalmente a una secuencia reguladora de la expresión génica.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

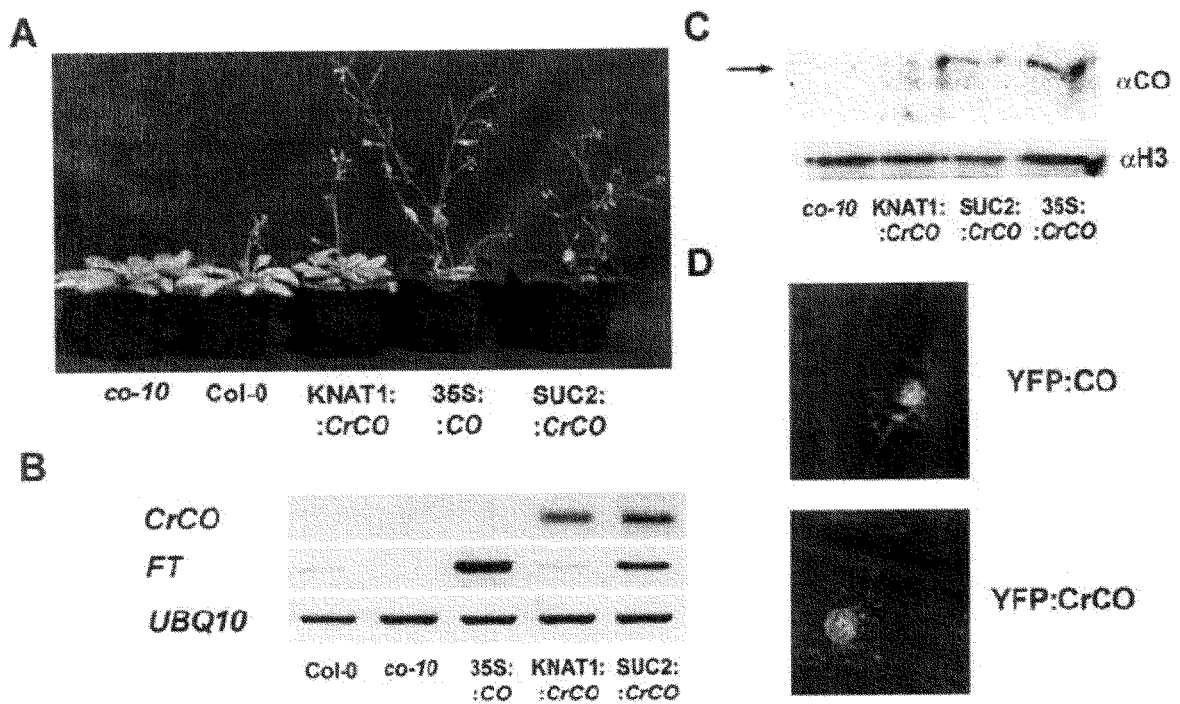


FIG. 3

ES 2 344 185 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Universidad de Sevilla

5

<120> Uso de una secuencia nucleotídica que regula el momento de la floración, plantas que la expresan y método para producirlas

10 <130> 1641.289

<160> 14

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 410

20 <212> PRT

<213> *Chlamydomonas reinhardtii*

<400> 1

25

Met Ser Ser Cys Val Val Cys Ala Ala Ala Ala Val Val Trp Cys Gln
1 5 10 15

30

Asn Asp Lys Ala Leu Leu Cys Lys Asp Cys Asp Val Arg Ile His Thr
20 25 30

35

Ser Asn Ala Val Ala Ala Arg His Thr Arg Phe Val Pro Cys Gln Gly
35 40 45

40

Cys Asn Lys Ala Gly Ala Ala Leu Tyr Cys Lys Cys Asp Ala Ala His
50 55 60

45

Met Cys Glu Ala Cys His Ser Ser Asn Pro Leu Ala Ala Thr His Glu
65 70 75 80

50

Thr Glu Pro Val Ala Pro Leu Pro Ser Val Glu Gln Gly Ala Ala Pro
85 90 95

Glu Pro Gln Val Leu Asn Met Pro Cys Glu Ser Val Ala Gln Ser Ala
100 105 110

55

Ala Ser Pro Ala Ala Trp Phe Val Asp Asp Glu Lys Met Gly Thr Thr
115 120 125

Ser Phe Phe Asp Ala Pro Ala Val Leu Ser Pro Ser Gly Ser Glu Ala
130 135 140

60

Val Val Pro Val Met Ser Ala Pro Ile Glu Asp Glu Phe Ala Phe Ala
145 150 155 160

65

Ala Ala Pro Ala Thr Phe Lys Glu Ile Lys Asp Lys Leu Glu Phe Glu
165 170 175

Ala Leu Asp Leu Asp Asn Asn Trp Leu Asp Met Gly Phe Asp Phe Thr

ES 2 344 185 B1

			180					185				190				
5	Asp	Ile	Leu	Ser	Asp	Gly	Pro	Ser	Asp	Val	Gly	Leu	Val	Pro	Thr	Phe
			195					200					205			
10	Asp	Ala	Val	Asp	Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	Val	Ala	Asp	Ala	Ile	Val	Pro
		210					215					220				
15	Thr	Phe	Glu	Glu	Glu	Gln	Pro	Gln	Leu	Gln	Gln	Gln	Glu	Pro	Leu	Val
	225					230					235					240
20	Leu	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Glu	Ser	Ala	Ala	Ser	Arg	Lys	Arg	Ala	Ala
					245					250					255	
25	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Pro	Ala	Ala	Lys	Val	Pro	Ala	Leu	Thr
				260					265					270		
30	His	Gln	Ala	Leu	Leu	Gln	Ala	Gln	Ala	Ala	Ala	Phe	Gln	Ala	Val	Pro
			275					280					285			
35	Gln	Ala	Ser	Ala	Leu	Phe	Phe	Gln	Pro	Gln	Met	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro
		290					295					300				
40	His	Leu	Pro	Leu	Leu	Gln	Gln	Pro	Met	Met	Pro	Ala	Ala	Val	Ala	Pro
	305					310					315					320
45	Ala	Pro	Val	Pro	Lys	Ser	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Leu	Ala
					325					330					335	
50	Ala	Gly	Ala	Asn	Leu	Thr	Arg	Glu	Gln	Arg	Val	Ala	Arg	Tyr	Arg	Glu
			340						345					350		
55	Lys	Arg	Lys	Asn	Arg	Ser	Phe	Ala	Lys	Thr	Ile	Arg	Tyr	Ala	Ser	Arg
			355					360					365			
60	Lys	Ala	Tyr	Ala	Glu	Ile	Arg	Pro	Arg	Ile	Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Lys
		370					375					380				
65	Lys	Glu	Glu	Ile	Glu	Ala	Trp	Lys	Ala	Ala	His	Gly	Gly	Asp	Asp	Ala
	385					390					395					400
70	Ile	Val	Pro	Glu	Val	Leu	Asp	Ala	Glu	Cys						
					405					410						

60 <210> 2
 <211> 534
 <212> DNA
 65 <213> Artificial Sequence
 <220>

ES 2 344 185 B1

<223> Secuencia reguladora de la expresión 35S

<400> 2

5
ccctgtcctc tccaaatgaa atgaacttcc ttatatagag gaagggcttt gccaagctta
60
gtgggattgt gcgtcatccc ttacgtcagt ggagatatca catcaatcca cttgctttga
10
120
agacgtgggt ggaacgtctt cttttccac gatgctcctc gtgggtgggg gtccatcttt
180
gggaccactg tcggcagagg catcttcaac gatggccttt cttttatcgc aatgatggca
15
240
tttgtaggag ccaccttct tttccactat cttcacaata aagtgacaga tagctgggca
300
atggaatccg aggaggtttc cggatattac cttttgttga aaagtctcaa ttgccctttg
20
360
gtcttctgag actgtatctt tgatattttt ggagtagaca agcgtgtcgt gctccaccat
420
gttgacgaag attttcttct tgtcattgag tcgtaagaga ctctgtatga actgttcgcc
25
480
agtctttacg gcgagttctg ttaggtcctc tatttgaatc tttgactcca tggg
534

30

<210> 3

<211> 2244

35 <212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 3

40
aactaggggt gcataatgat ggaacaaagc acaaatcttt taacgcaaac taactacaac
60
cttcttttgg ggtccccatc cccgacccta atgttttggg attaataaaa ctacaatcac
45
120
ttaccaaaaa ataaaagttc aaggccacta taatttctca tatgaaccta catttataaa
180
taaaatctgg tttcatatta atttcacaca ccaagttact ttctattatt aactgttata
50
240
atggaccatg aatcatttg catatgaact gcaatgatac ataatccact ttgttttgtg
300
ggagacattt accagatttc ggtaaattgg tattccccct tttatgtgat tggtcattga
55
360
tcattgttag tggccagaca tttgaactcc cgtttttttg tctataagaa ttcggaaca
420
tatagtatcc tttgaaaacg gagaacaaa taacaatgtg gacaaactag atataatttc
60
480
aacacaagac tatgggaatg attttaccca ctaattataa tccgatcaca aggtttcaac
540
gaactagttt tccagatatc aaccaaattt actttggaat taaactaact taaaactaat
65
600

ES 2 344 185 B1

660
tggttgttcg taaatggtgc tttttttttt tgcggatggt agtaaagggt tttatgtatt
660
ttatattatt agttatctgt tttcagtggt atgttgcttc atccataaag tttatatggt
5 720
ttttctttgc tctataactt atatataat atgagtttac agttatattt atacatttca
780
gatacttgat cggcattttt tttggtaaaa aatatatgca tgaaaaactc aagtgtttct
10 840
ttttaagga atttttaaat ggtgattata tgaatataat catatgtata tccgtatata
900
tatgtagcca gatagttaat ttttggggg atatttgaat tattaatggt ataataattct
15 960
ttcttttgac tcgtctgggt aaattaaaga acaaaaaaaaa cacatacttt tactgtttta
20 1020
aaaggttaaa ttaacataat ttattgatta caagtgtaa gtccatgaca ttgcatgtag
1080
gttcgagact tcagagataa cggaagagat cgataattgt gatcgtaca tccagatatg
25 1140
tatgtttaat tttcatttag atgtggatca gagaagataa gtcaactgt cttcataatt
1200
taagacaacc tcttttaata ttttcccaa acatgtttta tgtaactact ttgcttatgt
30 1260
gattgcctga ggatactatt attctctgtc tttattctct tcacaccaca tttaaatagt
35 1320
ttaagagcat agaaattaat ttttttcaa aagggtgatta tatgcatgca aaatagcaca
1380
ccatttatgt ttatattttc aaattattta atacatttca atatttcata agtgtgattt
40 1440
tttttttttt tgtcaatttc ataagtgatga tttgtcattt gtattaaaca attgtatcgc
45 1500
gcagtacaaa taaacagtgg gagaggtgaa aatgcagtta taaaactgtc caataattta
1560
ctaacacatt taaatatcta aaaagagtgt ttcaaaaaaaaa attcttttga aataagaaaa
50 1620
gtgatagata tttttacgct ttcgtctgaa aataaaacaa taatagttaa ttagaaaaat
1680
gttatcaccg aaaattattc tagtgccact cgctcggatc gaaattcgaa agttatattc
55 1740
tttcttttta cctaataata aatcacaag aaaaatcaat ccgaatataat ctatcaacat
60 1800
agtatatgcc cttacatatt gtttctgact tttctctatc cgaatttctc gcttcatggt
1860
ttttttttaa catattctca ttttaattttc attactatta tataactaaa agatggaaat
65 1920

ES 2 344 185 B1

aaaataaagt gtctttgaga atcgaacgtc catatcagta agatagtttg tgtgaaggta
1980

5 aaatctaaaa gatttaagtt ccaaaaacag aaaataatat attacgctaa aaaagaagaa
2040

aataattaata tacaaaacag aaaaaataa tatacgacag acacgtgtca cgaagatacc
2100

10 ctacgctata gacacagctc tgttttctct tttctatgcc tcaaggctct ctttaacttca
2160

ctgtctcctc ttcggataat cctatccttc tcttcctata aatacctctc cactcttcct
2220

15 cttcctccac cactacaacc acca
2244

20 <210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> *Chlamydomonas reinhardtii*

25

<400> 4

agtcgagcag ggcgctgc
18

30

<210> 5

<211> 19

35

<212> DNA

<213> *Chlamydomonas reinhardtii*

<400> 5

40

gggctcctgc tgctgtaac
19

45

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

50

<213> *Chlamydomonas reinhardtii*

<400> 6

attggcggtg gcgacgatgc
20

55

<210> 7

60

<211> 20

<212> DNA

<213> *Chlamydomonas reinhardtii*

65

ES 2 344 185 B1

<400> 7

ggctcgaagg cggcgttggt
20

5

<210> 8

<211> 20

10

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 8

15

ggtggagaag acctcaggaa

20

<210> 9

<211> 24

25

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 9

30

ttatcgcac acacactata taag
24

35

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

40

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 10

gatctttgcc ggaaaacaat tggaggatgg
30

45

<210> 11

50

<211> 30

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

55

<400> 11

cgacttgca ttagaaagaa agagataaca
30

60

<210> 12

<211> 74

65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

ES 2 344 185 B1

<223> Cebador directo para amplificar el gen CrCO

<400> 12

5 **ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgaaggagat agaaccatgt cgagttgcgt**
60

10 **cggtgtgcgcg gccg**
74

<210> 13

<211> 58

15 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> Cebador reverso para amplificar CrCO

<400> 13

25 **ggggaccact ttgtacaaga aagctggggtt cttagcactc agcgtccagg acctcggg**
58

<210> 14

30 <211> 1233

<212> DNA

<213> *Chlamydomonas reinhardtii*

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 344 185 B1

<400> 14

5 atgtcgagtt gcgtcgtgtg cgcggccgca gcggtcgttt ggtgccagaa tgacaaggcg
60
ctgctttgca aggactgcga tgtgcgcata cacaccagca acgcggtcgc tgcgcgcat
120
10 acccgcttcg tgccctgccca gggctgcaac aaggccggtg ctgcgctcta ctgcaagtgc
180
gacgccgcgc acatgtgcga ggcttgccac agctccaacc ccctagctgc tacgcacgag
240
15 accgagccgg tggcgccgct gccgtcagtc gagcagggcg ctgcaccgga gcctcaggtc
300
ctgaacatgc cctgcgagtc tgtggcgcag tctgcggcca gccccgcggc ttggtttgtg
360
20 gacgacgaga agatgggcac gaccagcttc tttgatgcgc ctgcggtgct gtcgccctcg
420
ggcagcgagg ccgtggtgcc cgtcatgtcc gccctatcg aggacgagtt tgcattcgcg
480
25 gccgccccgg cgacgttcaa ggaaatcaag gacaagctcg agttcgaggc tctggacctg
540
gacaacaact ggctcgacat gggcttcgat ttcactgata tcctgtccga cggccccctt
600
gatgtgggcc tggccccac cttc gatgcc gtcgatgagg ccgcggatgc cgtggctgac
660
35 gctatcgtgc ccaccttca ggaggagcag cccagttac agcagcagga gcccttggtg
720
ctggctcccg ccccgaggga gtcggctgct agccgcaagc gcgctgccgc cgaggaggcc
780
40 gcggaggagc cggccgcaa ggtgccggcc ctgactcacc aggcgctgct gcaggcgcag
840
45 gccgccgct tccaggccgt gccccaggcg tcagcgtgt tcttccagcc gcagatgctg
900
gccgcgctgc cgcacctgcc gctgctgcag cagcccatga tgccggcagc cgtcgccccg
960
50 gcgcccgtgc ccaagagcgg cagcgcgcc gccagcgcgg ccctcgccgc cggtgccaac
1020
ctgactcgcg agcagcgcgt ggcgcgctac cgcgagaagc ggaagaaccg ctccttcgcc
1080
55 aagaccatcc gctacgcttc ccgcaaggcg tatgaggaga tccgcccccg cattaagggc
1140
60 cgcttcgccca agaaggagga gattgaggcc tggaaggcgg cgcacggcgg cgacgacgcc
1200
attgttcccg aggtcctgga cgctgagtgc taa
1233
65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 344 185

② Nº de solicitud: 200900458

③ Fecha de presentación de la solicitud: 18.02.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MERCHANT S.S. et al., "The Chlamydomonas Genome Reveals the evolution of Key Animal and Plant Functions" Science (2007), vol. 318, pp. 245-250, & DATABASE UNIPROT [Online] 04 dic 2007 (04.12.2007), CONSTANS-like protein. Retrieved from EBI, accesion nº A8J936, todo el documento.	11-20
A		1-10
A	WO 9614414 A1 (JOHN INNES CENTRE) 17.05.1996, todo el documento.	1-20
A	KIM SJ. et al., "Molecular cloning and expression analysis of a CONSTANS homologue, Pncol1 from Pharbitis nil", Journal of experimental Botany (Agosto 2003), vol. 54, pp. 1879-1887, todo el documento.	1-20
A	YANO M. et al., "Hd1, a Major Photoperiod Sensitivity Quantitative Trait Locus in Rice, is Closely Related to the Arabidopsis Flowering Time Gene CONSTANS", The Plant Cell (Diciembre 2000), vol. 12, pp. 2473-2483, todo el documento.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

10.05.2010

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01H

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI SEQUENCES DATABASES

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.05.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SÍ
	Reivindicaciones 11-20	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MERCHANT S.S. ET AL., "The Chlamydomonas Genome Reveals the evolution of Key Animal and Plant Functions" Science (2007), vol. 318, pp. 245-250, & DATABASE UNIPROT [Online] 04 dec 2007 (04-12-2007), CONSTANS-like protein. Retrieved from EBI, accesion nº A8J936, todo el documento	--
D02	WO 9614414 A1 (JOHN INNES CENTRE) 17.05.1996, todo el documento	--
D03	KIM SJ. ET AL., "Molecular cloning and expression analysis of a CONSTANS homologue, Pncol1 from Pharbitis nil", Journal of experimental Botany (August 2003), vol. 54, pp. 1879-1887, todo el documento	--
D04	YANO M. ET AL., "Hd1, a Major Photoperiod Sensitivity Quantitative Trait Locus in Rice, is Closely Related to the Arabidopsis Flowering Time Gene CONSTANS", The Plant Cell (December 2000), vol. 12, pp. 2473-2483, todo el documento	--

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica que pertenece a la familia del gen CONSTANS. Esta secuencia, denominada CrCO, que pertenece al alga verde Chlamydomonas reinhardtii es expresada en una célula vegetal procedente de una planta capaz de producir flores y se utiliza para modificar el momento de floración de la planta.

1.- NOVEDAD

Esta Oficina considera que las reivindicaciones 1-20 cumplen con el requisito de novedad.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

Las reivindicaciones 11-20 se refieren a una célula transfectada con SEQ ID NO 1, a la planta, semilla etc.. así como a los respectivos métodos de obtención. El documento D01 refleja la divulgación previa de esta secuencia así como su pertenencia a la familia de las proteínas CONSTANS. En consecuencia, esta Oficina estima que dado el actual desarrollo del estado de la técnica en lo que se refiere a la obtención de plantas transgénicas, las reivindicaciones 11-20 tal y como se encuentran formuladas no cumplen el requisito de actividad inventiva.

El documento D02 se considera el estado de la técnica más cercano en cuanto al uso de la SEQ ID NO 1 para modificar el momento de floración de las plantas. El documento D02 se refiere al control genético del momento de floración en las plantas mediante el clonaje y expresión de los genes implicados en dicho control. En particular, se describe el clonaje y expresión del gen CONSTANS (CO) de Arabidopsis thaliana y genes homólogos de Brassica napus.

Otros dos genes homólogos de CONSTANS quedan reflejados en los documentos D03 y D04. El documento D03 describe el clonaje y la expresión de PnCOL1 de Pharbitis nil y D04 describe el gen Hd1 de arroz.

Las secuencias descritas en los documentos D02-D04 presentan bajos porcentajes de homología con SEQ ID NO 1 y no garantizarían a un experto en la materia la predicción inequívoca de la función y utilidad de SEQ ID NO 1. En este sentido, esta Oficina considera que las reivindicaciones 1-10 de la presente invención cumplen el requisito de actividad inventiva .