

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 316**

21 Número de solicitud: 201030915

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **14.06.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**29.12.2011**

62 Número de la solicitud inicial: **P 200900088**

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Martín Trillo, Mar;**  
**Rodríguez Buey, María Luisa y**  
**Cubas Domínguez, Pilar**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Gen regulador de la ramificación de plantas, promotores, construcciones genéticas que lo contienen y usos.**

57 Resumen:

Gen regulador de la ramificación de plantas, promotores, construcciones genéticas que lo contienen y usos.

La presente invención se refiere a un gen que codifica para un factor de transcripción de la familia TCP y que tiene un papel biológico en el desarrollo y crecimiento de las ramas. También se refiere a los promotores de la transcripción de dicho gen, a las construcciones genéticas que los contienen y a sus usos para modificar la arquitectura de las plantas.

## DESCRIPCIÓN

Gen regulador de la ramificación de plantas, promotores, construcciones genéticas que lo contienen y usos.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular, la biotecnología y la mejora vegetal, y específicamente se refiere a genes que codifican para factores de transcripción de la familia TCP y que tienen un papel biológico en el desarrollo de las yemas axilares y el crecimiento de las ramas. También se refiere a los promotores de la transcripción de dichos genes, a las construcciones genéticas que los contienen y a sus usos, incluyendo el empleo de agentes que modulen la expresión de estos genes, para modificar la arquitectura de las plantas.

10 **Estado de la técnica anterior**

Una de las cuestiones centrales en biología es el efecto que tiene la evolución de los genomas en la diversidad morfológica. Los planes corporales están determinados por las rutas genéticas de desarrollo ampliamente conservadas en grandes grupos taxonómicos. Cambios en la actividad de los genes que controlan estas vías, dan lugar a alteraciones en los patrones morfológicos. La mayoría de estos cambios son deletéreos, pero unos pocos pueden dar lugar a la evolución de la forma.

20 En las plantas angiospermas los patrones de ramificación se determinan por la posición en que se forman las ramas. Las ramas se generan a partir de meristemos formados en las axilas de las hojas tras la germinación de las semillas. Los meristemos axilares (MA) dan lugar a yemas axilares, estructuras que contienen ramas preformadas con entrenudos cortos, primordios foliares, nuevos MA y, a menudo, meristemos florales. Las yemas pueden permanecer inactivas durante largos periodos de tiempo, o brotar dando lugar a ramas por elongación de los entrenudos, en respuesta a señales ambientales o endógenas. Esta decisión determina la arquitectura de la planta y afecta a aspectos claves de la vida de la planta, tales como la cantidad de nutrientes que recibirá cada eje de crecimiento, la altura de la planta, la protección solar de los frutos, la eficiencia en la absorción de la luz o su visibilidad para los polinizadores.

Los genes que controlan la iniciación de los MA, el desarrollo de las yemas y su brotación han sido caracterizados en varias especies de angiospermas. Estos estudios indican que el desarrollo de las yemas axilares está controlado por rutas genéticas conservadas que evolucionaron antes de la radiación de las plantas con flores. La iniciación de MA está controlada por los genes *Ls/LAS/MONOCULM1* y los genes *Blind/RAX1* en tomate (*Solanum lycopersicum*), *Arabidopsis*, y arroz. La auxina y la estrigolactona, hormonas sintetizadas en los ápices de los brotes y en la raíz, respectivamente, promueven la señalización a larga distancia para suprimir la ramificación en varias especies. La síntesis y la respuesta a las estrigolactonas a través de la vía conservada *MAX/RMS*, descrita en *Arabidopsis* y guisante, se ha encontrado también en monocotiledóneas *petunia* (*Petunia hybrida*), y arroz. Los genes que actúan dentro de las yemas retrasando su desarrollo y crecimiento también están conservados. El gen *Teosinte branched1* (*Tb1*) aislado en maíz y en otras monocotiledóneas codifica para un factor de transcripción de la familia TCP. Los genes TCP, exclusivos de plantas, codifican para factores de transcripción que contienen el llamado dominio TCP, secuencia de 59 aminoácidos con una región básica y un dominio hélice-lazo-hélice, que confiere capacidad de unión DNA y a otras proteínas (Cubas *et al.*, 1999. *Plant Journal*. 18:215-222), que se expresa en los MA y en las yemas axilares, donde suprime su crecimiento. *Tb1* también controla la floración y el desarrollo de la inflorescencia. En dicotiledóneas, la duplicación de *Tb1* ha dado lugar a tres tipos de genes (*CYC1*, *CYC2* y *CYC3*) uno de los cuales, el tipo *CYC1*, parece haber retenido la mayor parte de la actividad supresora de la ramificación, al menos en *Arabidopsis*, donde este gen recibe el nombre de *BRANCHED1* (*BRC1*). *BRC1* actúa dentro de las yemas impidiendo su desarrollo. *BRC1* está controlado a nivel transcripcional por la ruta *MAX* y responde a estímulos ambientales y de desarrollo suprimiendo la ramificación.

A pesar de que los genes que tienen un papel clave en el control del desarrollo axilar están muy conservados, la diversidad de los modelos de ramificación encontrados en angiospermas sugiere que la modulación de este proceso ha divergido en los diferentes grupos filogenéticos (clados), lo que es soportado por la diferente regulación de los genes de tipo *MAX* en guisante, *Arabidopsis* y arroz. Es muy posible que la evolución función y regulación de los genes tipo *BRC1* también haya jugado un importante papel en esta evolución. Al contrario que las alteraciones en las vías de señalización, que a menudo generan efectos pleiotrópicos no deseados, las modificaciones en la regulación de factores de transcripción que se expresan localmente, como *BRC1*, que actúa exclusivamente en las yemas axilares, podría ser más fácilmente toleradas. Los reguladores transcripcionales han jugado un papel clave en la evolución de muchos rasgos morfológicos. De hecho, durante la domesticación del maíz, la mejora genética para obtener plantas con una fuerte dominancia apical, dio lugar a la selección de plantas que sobreexpresaban *Tb1*. *CYCLOIDEA*, otro factor de transcripción de la familia TCP, ha sido responsable de la evolución de la simetría bilateral floral, una innovación morfológica que ha evolucionado independientemente en distintos clados.

El control del desarrollo de las yemas axilares tiene un gran potencial aplicado ya que conocer sus bases genéticas nos puede permitir controlar la arquitectura de plantas de interés agronómico.

65 Por *inhibición del desarrollo axilar* podemos promover el crecimiento en un único eje favoreciendo tallos largos y con pocos nudos como es deseable, por ejemplo, en especies de leñosas que se explotan para producción de madera, otras que se cultivan a alta densidad como ciertas gramíneas o aquellas en las que los tallos laterales son una traba para la recolección mecanizada. Podemos favorecer el aporte de nutrientes a los ejes que están desarrollando frutos (Ej. tomate) o prolongar la vida media de almacenamiento de ciertos productos cuyos brotes reducen su calidad (Ej.

patatas, cebollas, ajos). La mejora clásica ha permitido obtener variedades con un único tallo o “*monostem*” en algunas especies (Ej. girasol), sin embargo en otras (Ej. tabaco, tomate) no se ha conseguido disponer de este carácter en líneas de alta producción. Las técnicas alternativas empleadas para obtener plantas con un único tallo (eliminación manual de las ramas laterales, aplicación de productos químicos) no sólo encarecen la producción sino que favorecen la propagación de enfermedades y pueden conllevar problemas de contaminación ambiental.

Favoreciendo el desarrollo axilar, podemos generar arquitecturas arbustivas y aumentar la producción de hojas y flores, elementos apreciados en especies ornamentales o en aquellas en las que las hojas o los frutos son los productos de consumo. El incremento de la formación de retoños tiene también interés en especies que se utilizan para el tapizado de terrenos, en las que se valora el crecimiento compacto (Ej. gramíneas de césped o pasto). Sería de gran valor ecológico fomentar el crecimiento intercalar en especies rastreras adaptadas a terrenos áridos amenazados por la erosión en los que la hierba resulta costosa de mantener. La producción de nuevos brotes también tiene importancia en propagación vegetativa y cultivo *in vitro*.

Por último, en ciertas especies de leñosas el control de la brotación de las yemas axilares cuya regulación fisiológica y hormonal es comparable a la de herbáceas tiene gran importancia económica. En vides, cerezos, manzanos, y otras leñosas, las yemas axilares requieren una exposición al frío de días o semanas para brotar. Estas especies se han empezado a cultivar en países cálidos (Ej. Brasil y Tailandia) en los que no se suelen alcanzar temperaturas bajas, por lo que los agricultores se ven obligados a emplear, para hacer brotar las yemas, tratamientos químicos muy tóxicos (ácido cianhídrico, dinitro-orthocresol), o costosos tratamientos hormonales de rápida degradación y que producen efectos no deseados.

Las Solanáceas, y entre ellas la tomatera (*Solanum lycopersicum*) y la patata (*Solanum tuberosum*), son plantas de gran importancia económica, en las que algunas de sus características de interés agronómico dependen de la actividad de sus yemas axilares. La brotación de las yemas altera la relación entre la producción y consumo de fotoasimilados, pudiendo afectar a la producción.

Por tanto en campos como la agricultura, la silvicultura y la horticultura, resultaría de elevado interés poder controlar el desarrollo de las yemas axilares y la elongación de ramas.

### Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han aislado e investigado el papel de los genes ortólogos de *Teosinte branched1* de maíz y *BRANCHED1* (*BRC1*) de *Arabidopsis* en dos especies de la familia *Solanaceae*, la tomatera (*Solanum lycopersicum* L.) y la patata (*Solanum tuberosum* L.). Estos genes codifican para factores de transcripción de la familia TCP. Las proteínas TCP, exclusivas de plantas, son factores de transcripción con un dominio BHLH que confiere capacidad de unión DNA y a otras proteínas. En *Arabidopsis* se ha demostrado el papel de *BRC1* como represor durante la iniciación de los meristemos axilares, el desarrollo de las yemas y el crecimiento de las ramas.

Los autores han encontrado que existen dos genes relacionados con *BRC1* en cada especie (denominados *SIBRC1L1* y *SIBRC1L2*, en tomatera y *StBRC1L1* y *StBRC1L2* en patata). También han demostrado que, en ambas especies, *BRC1L1* y *BRC1L2* juegan un papel fundamental en la supresión del desarrollo de las yemas axilares y la elongación de las ramas. En patata, *StBRC1L1* y *StBRC1L2* controlan también la formación de los estolones y su ramificación, y la brotación de los ojos de los tubérculos. *BRC1L1* y *BRC1L2* se expresan específicamente en yemas axilares pero sus niveles de expresión son diferentes para cada gen. El fenotipo de pérdida de función de cada uno indica que, aunque ambos controlan la ramificación, cada gen presenta un cierto grado de especialización y divergencia funcional: en patata, *StBRC1L1* controlaría preferentemente la ramificación de los estolones y *StBRC1L2* la elongación de ramas aéreas; en tomatera, *SIBRC1L2* podría tener un papel mas importante que *SIBRC1L1* en el control de la elongación de las ramas.

Por tanto, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas producto de estos genes, promotores y las construcciones genéticas producto de esta invención constituyen una valiosa herramienta para la manipulación del desarrollo de las yemas axilares, y el control de la ramificación, para incrementar el rendimiento de las plantas, y en particular de la patata y el tomate. La invención también se refiere a las construcciones genéticas que comprenden estas secuencias, así como células transformadas, vectores y plantas transgénicas que las incorporan. Además, se refiere a agentes moduladores de la expresión, y por tanto de la actividad biológica, de estos genes, así como nuevas composiciones incluyendo estos agentes moduladores, y los usos de estas secuencias, construcciones genéticas, agentes moduladores y composiciones para la manipulación de las yemas axilares, el crecimiento y la ramificación de las plantas, y en particular de la tomatera y de patata.

La presente invención también comprende métodos para manipular la arquitectura de las plantas, en particular la ramificación, y por tanto el rendimiento de dichas plantas incorporando las construcciones de expresión y/o inhibición de la invención.

En el caso particular de estas dos especies de *Solanaceae*, la inhibición de la expresión de los nuevos genes (*SIBRC1L1*, *SIBRC1L2*, *StBRC1L1*, *StBRC1L2*) mediante tecnología de interferencia de RNA (RNAi), incrementa la ramificación aérea en el caso de la tomatera (solo la inhibición de *SIBRC1L2*) y, en el caso de patata aumenta además la producción de estolones y su ramificación, incrementando el rendimiento agrícola de esta especie. Incrementar la

## ES 2 371 316 A1

5 expresión de estos nuevos genes, por el contrario, daría lugar a una reducción en el número de ramas, en el caso de la tomatera, favoreciendo el aporte de nutrientes a los ejes que están desarrollando frutos, y evitando el empleo de técnicas alternativas empleadas para obtener plantas con un único tallo (como la poda manual de las ramas laterales o la aplicación de productos químicos) que no sólo encarecen la producción, sino que favorecen la propagación de enfermedades y pueden conllevar problemas de contaminación ambiental.

10 Por tanto, un primer aspecto de esta invención se refiere a un polinucleótido de ARN o ADN aislado, de ahora en adelante primer polinucleótido de la invención, capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 1, seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

- 10 a) al menos un 95%, o
- 15 b) al menos un 99%.

15 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido de ARN o ADN aislado es capaz de traducirse a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

20 Otro aspecto de esta invención se refiere a un polinucleótido de ARN o ADN aislado, de ahora en adelante segundo polinucleótido de la invención, capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 2 seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

- 20 a) al menos un 95%, o
- 25 b) al menos un 99%.

30 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido de ARN o ADN aislado es capaz de traducirse a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2.

30 Otro aspecto de esta invención se refiere a un polinucleótido de ARN o ADN aislado, de ahora en adelante tercer polinucleótido de la invención, capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 3 seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

- 35 a) al menos un 95%, o
- 40 b) al menos un 99%.

40 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido de ARN o ADN aislado es capaz de traducirse a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.

45 Otro aspecto de esta invención se refiere a un polinucleótido de ARN o ADN aislado, de ahora en adelante cuarto polinucleótido de la invención, capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 4 seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

- 45 a) al menos un 95%, o
- 50 b) al menos un 99%.

50 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido de ARN o ADN aislado es capaz de traducirse a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4.

55 El gen *SIBRC1L1* se traduce a dos proteínas, una larga, de 346 aminoácidos (SEQ ID NO: 1) y otra corta, de 325 aminoácidos (SEQ D NO: 50). Por tanto, otro aspecto de esta invención se refiere a un polinucleótido de ARN o ADN aislado, de ahora en adelante undécimo polinucleótido de la invención, capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 50 seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

- 60 a) al menos un 95%, o
- 65 b) al menos un 99%.

65 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido de ARN o ADN aislado es capaz de traducirse a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 50.

## ES 2 371 316 A1

Los autores de la presente invención también han detectado las secuencias reguladoras de la expresión de dichos genes, que son capaces de dirigir la expresión de un gen de interés en meristemos axilares pero no en meristemos apicales en tomate. El empleo de un promotor como el proporcionado por esta invención permite manipular genéticamente las plantas y obtener plantas con características mejoradas, permitiendo modificar la arquitectura vegetal alterando el crecimiento o desarrollo de sus yemas axilares sin alterar el crecimiento del eje principal.

Por tanto, otro aspecto de esta invención se refiere a un polinucleótido de ARN o ADN aislado, de ahora en adelante quinto polinucleótido de la invención, capaz de dirigir la expresión de un gen de interés en las yemas axilares, que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 5 seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

- a) al menos un 95%, o
- b) al menos un 99%.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido de ARN o ADN aislado presenta la secuencia nucleotídica que se recoge en la SEQ ID NO: 5.

Otro aspecto de esta invención se refiere a un polinucleótido de ARN o ADN aislado, de ahora en adelante sexto polinucleótido de la invención, capaz de dirigir la expresión de un gen de interés en las yemas axilares, que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 6 seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

- a) al menos un 95%, o
- b) al menos un 99%.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido de ARN o ADN aislado presenta la secuencia nucleotídica que se recoge en la SEQ ID NO: 6.

Puede esperarse que el grado de identidad/similaridad de las proteínas homólogas a las recogidas en las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 (para la tomatera), y SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 (para la patata), sean, en distintas variedades y subespecies de *Solanum lycopersicum* L. y *Solanum tuberosum* L, de al menos de un 80% o mayor, y más preferiblemente de al menos un 85%, un 90, un 95% o un 99%. La correspondencia entre la(s) secuencia(s) aminoacídica(s) de la(s) secuencia(s) putativa(s) y las secuencias recogidas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1999).

El término “homología”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza entre dos o más secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Puesto que dos secuencias se consideran homólogas si tienen el mismo origen evolutivo, en general, se asume que valores superiores de similitud o identidad del 95% indicarían homología. Podemos considerar, por tanto, que porcentajes de identidad de, al menos, un 99%, podrían mantener la función de las secuencias aminoacídicas ortólogas recogidas en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

El término “ortólogo” hace referencia a estructuras homólogas de especies distintas, que tienen un antepasado común, y en concreto, a la semejanza entre dos o más secuencias de nucleótidos o aminoácidos.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12: 287 (1984) Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLAST, BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1999).

En otro aspecto de la invención se proporciona una construcción genética de ADN o ARN, de ahora en adelante primera construcción genética de la invención, que comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:

a) secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, el primer polinucleótido de la invención, o la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 1, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*, o

b) secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende el primer polinucleótido de la invención, operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc.

## ES 2 371 316 A1

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el promotor es el quinto polinucleótido de la invención.

En otro aspecto de la invención se proporciona una construcción genética de ADN o ARN, de ahora en adelante segunda construcción genética de la invención, que comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:

- 5
- a) secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, el segundo polinucleótido de la invención, o la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 2, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*, o
  - 10 b) secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende el segundo polinucleótido de la invención, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc.

15 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el promotor es el sexto polinucleótido de la invención.

En otro aspecto de la invención se proporciona una construcción genética de ADN o ARN, de ahora en adelante tercera construcción genética de la invención, que comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:

- 20
- a) secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, el tercer polinucleótido de la invención, o la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 3, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*, o
  - 25 b) secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende el tercer polinucleótido de la invención, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc.

30 En otro aspecto de la invención se proporciona una construcción genética de ADN o ARN, de ahora en adelante cuarta construcción genética de la invención, que comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:

- 35
- a) secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, el cuarto polinucleótido de la invención, o la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 4, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*, o
  - 40 b) secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende el cuarto polinucleótido de la invención, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc.

45 En otro aspecto de la invención se proporciona una construcción genética de ADN o ARN, de ahora en adelante quinta construcción genética de la invención, que comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:

- 50
- a) secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, el undécimo polinucleótido de la invención, o la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 50, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*, o
  - 55 b) secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende el undécimo polinucleótido de la invención, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc.

En otro aspecto de la invención se proporciona una construcción genética de ADN o ARN, de ahora en adelante sexta construcción genética de la invención, que comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:

- 60
- a) secuencia de nucleótidos, que comprende el quinto polinucleótido de la invención, o
  - b) secuencia de nucleótidos, que comprende el sexto polinucleótido de la invención,
- 65 operativamente enlazada con un gen de interés. Dicha construcción permite dirigir la expresión del gen de interés específicamente en yemas axilares.

## ES 2 371 316 A1

Un gran número de estas construcciones, sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia y forman parte de la presente invención.

5 Un “vector” es un replicón, o un vector integrativo, al que se ha unido otro segmento polinucleótido, para realizar la replicación y/o expresión del segmento unido.

Un “replicón” es cualquier elemento genético que se comporta como una unidad autónoma de replicación polinucleotídica dentro de una célula; esto es, capaz de replicarse bajo su propio control.

10 Un vector integrativo es cualquier elemento genético que se integra y se mantiene estable en el genoma de una célula.

“Secuencia de control” se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión ribosomal, y señales de terminación; en eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores y, en ocasiones, silenciadores. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

20 Como se usa aquí, el término “promotor” hace referencia a una región del ADN aguas arriba del punto de inicio de la transcripción, y en el particular, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula vegetal, sea el origen del promotor una planta o no. Ejemplos de promotores incluyen, pero no se limitan a, promotores obtenidos de plantas, virus de plantas, y bacterias que pueden expresar genes en células de plantas, como *Agrobacterium* o *Rhizobium*.  
25 Ejemplos de promotores bajo el control del desarrollo incluyen promotores que preferentemente inician la transcripción en ciertos tejidos, tales como hojas, raíces, o semillas. Tales promotores se denominan en esta memoria como preferentes de un tipo de tejidos. Hay otros promotores que inician la transcripción en un determinado tipo de tejidos, y se denominan como “tejido específicos”. Un promotor “inducible” o “reprimible” es un promotor que se encuentra bajo el control del medio ambiente. Ejemplos de condiciones ambientales que pueden afectar la transcripción son las  
30 condiciones anaeróbicas, o la presencia de luz. Los promotores de tejido específico, tejido preferido, específicos de un tipo celular, o promotores inducibles son tipos constituyen la clase de promotores “no constitutivos”. Un promotor “constitutivo” es un promotor que está activo en la mayoría de las condiciones ambientales.

35 “Unidos de forma operativa” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a una secuencia que se transcribe a la secuencia nucleotídica de la invención, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

40 Una “secuencia codificadora” o “secuencia codificante” es una secuencia de polinucleótidos que se transcribe a mRNA y/o se traduce a un polipéptido cuando está bajo control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan mediante un codón de inicio de traducción en el extremo 5’ y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3’. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a mRNA, cDNA, y secuencias de polinucleótidos recombinantes.

45 Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA).

50 Los términos “secuencia aminoacídica”, “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de los polinucleótidos de la invención, o las construcciones genéticas de la invención, en la producción de células y plantas transgénicas que presentan una arquitectura vegetal modificada.

55 En esta memoria se entiende como “arquitectura vegetal” la suma de las propiedades estructurales observables de un organismo (vegetal), por ejemplo, la tendencia de las plantas a crecer vertical o arbustivamente, junto con las propiedades funcionales constituyen el fenotipo de dicho organismo, que es el resultado de la interacción entre el genotipo y el medio ambiente.

60 Por “planta” en esta memoria, se entienden todos los organismos que pueden ser clasificados dentro del reino *Viridiplantae*, que incluye las algas verdes y a las plantas terrestres (*Embryophyta*).

65 Los organismos del género *Solanum* pertenecen al Superreino *Eukaryota*, Reino *Viridiplantae*, Phylum *Streptophyta*, Subclase *Asteridae*, Orden *Solanales*, Familia *Solanaceae*. *Solanum tuberosum* es el nombre científico de la patata, y *Solanum lycopersicum* el de la tomatera.

## ES 2 371 316 A1

En otro aspecto de la invención se proporciona un método para modificar la arquitectura vegetal de una planta, que comprende:

5 a) transfectar los polinucleótidos o las construcciones genéticas de la invención en una célula o cultivo de células vegetales hospedantes,

b) crecer la célula o el cultivo de células vegetales hospedantes en un medio adecuado, hasta regenerar una planta completa.

10 Un “hospedador”, “célula hospedadora” ó “célula hospedante” como se emplea en esta memoria se refiere a un organismo, célula o tejido, particularmente a una célula vegetal, que sirve como diana o recipiente de los elementos transfectados (por ejemplo, los polinucleótidos o las construcciones genéticas de la invención). Una célula hospedadora u hospedador puede indicar, también, una célula u hospedador que expresa una proteína recombinante de interés (por  
15 ejemplo, el producto de la expresión de los polinucleótidos de la invención) donde la célula hospedadora se transforma con un vector de expresión conteniendo los polinucleótidos de la invención o también los promotores de la invención que dirigen la expresión de un gen de interés.

20 Se entiende por “transfectar” ó “transgénesis” en esta memoria al proceso de transferir ADN no propio a un organismo, que pasa de esta manera a denominarse “transgénico”.

25 El término “transgénico” se usa en el contexto de la presente invención para describir plantas en las que se ha incorporado de forma estable una secuencia de ADN no propio, y en concreto los polinucleótidos o las construcciones genéticas de la invención.

30 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la célula, el cultivo de células vegetales y/o la planta pueden clasificarse taxonómicamente en la especie *Solanum tuberosum* L. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la célula, el cultivo de células vegetales y/o la planta pueden clasificarse taxonómicamente en la especie *Solanum lycopersicum*.

35 El método para modificar la arquitectura vegetal de una planta proporcionado por la invención comprende cualquier proceso de transformación de plantas en el que los elementos alógenos introducidos comprenden los polinucleótidos de la invención o las construcciones genéticas de la invención.

40 En otro aspecto de la invención se proporciona un método para expresar un gen de interés en los meristemos axilares de una planta que comprende:

a) transfectar los polinucleótidos o las construcciones genéticas de la invención en una célula o cultivo de células vegetales hospedantes,

b) crecer la célula o el cultivo de células vegetales hospedantes en un medio adecuado, hasta regenerar una planta completa.

45 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la célula, el cultivo de células vegetales y/o la planta pueden clasificarse taxonómicamente en la especie *Solanum tuberosum* L. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la célula, el cultivo de células vegetales y/o la planta pueden clasificarse taxonómicamente en la especie *Solanum lycopersicum*.

50 El método para expresar un gen de interés en los meristemos axilares de una planta proporcionado por la invención comprende cualquier proceso de transformación de plantas en el que los elementos alógenos introducidos comprenden los polinucleótidos de la invención o las construcciones genéticas de la invención.

55 Los polinucleótidos y algunas de las construcciones genéticas de la presente invención se expresan de forma regulada temporal y espacialmente (por ejemplo, en determinados estadios del desarrollo y en ciertos tejidos, yemas axilares) y a niveles controlados. Un aspecto de la presente invención consiste en alterar (incrementando o disminuyendo) dichos niveles de expresión.

60 La presente invención también comprende agentes moduladores de la expresión de las proteínas codificadas por los polinucleótidos de la invención, y/o de los genes constitutivos que codifican para estas proteínas en la tomatara y la patata (*SIBRC1L1*, *SIBRC1L2*, *StBRC1L1* y *StBRC1L2*). Con el desarrollo de la tecnología antisentido, secuencias de nucleótidos específicamente complementarios a una determinada secuencia de ADN o ARN, podrían formar complejos y bloquear la transcripción o traducción. Además, con el progreso del silenciamiento génico post-transcripcional, y en particular del ARN de interferencia (RNA interferente o RNAi), se han desarrollado herramientas que permiten  
65 la inhibición específica de la expresión de un gen. La inhibición de la expresión de los genes *SIBRC1L1*, *SIBRC1L2*, *StBRC1L1* y *StBRC1L2* constituiría por ende la inhibición de su actividad biológica, permitiendo la modulación de dicha actividad en la planta.



## ES 2 371 316 A1

En el contexto de la presente invención, *SIBRC1L1* se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína SIBRC1L1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- 5 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1, o la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 50,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- 10 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1 o con la SEQ ID NO: 50.
- 15 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína SIBRC1L1.

Una secuencia nucleotídica capaz de traducirse a la SEQ ID NO: 1 podría ser, pero sin limitarse a, la secuencia que se recoge en la SEQ ID NO: 7.

En el contexto de la presente invención, *SIBRC1L2* se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína SIBRC1L2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- 25 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- 30 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2.
- 35 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína SIBRC1L2.

Una secuencia nucleotídica capaz de traducirse a la SEQ ID NO: 2 podría ser, pero sin limitarse a, la secuencia que se recoge en la SEQ ID NO: 8.

En el contexto de la presente invención, *StBRC1L1* se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína StBRC1L1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- 45 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 3,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- 50 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 3.
- 55 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína StBRC1L1.

60 Una secuencia nucleotídica capaz de traducirse a la SEQ ID NO: 3 podría ser, pero sin limitarse a, la secuencia que se recoge en la SEQ ID NO: 9.

En el contexto de la presente invención, *StBRC1L2* se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína StBRC1L2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- 65 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 4,

## ES 2 371 316 A1

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

5 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 4.

en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína StBRC1L2.

10

Una secuencia nucleotídica capaz de traducirse a la SEQ ID NO: 4 podría ser, pero sin limitarse a, la secuencia que se recoge en la SEQ ID NO: 10.

15 Además, debido a la existencia de diferentes alelos, la secuencia aminoacídica a la que se traduce el gen *StBRC1L2* puede variar, recogiendo en una secuencia alternativa en la SEQ ID NO: 51. Una secuencia nucleotídica capaz de traducirse a la SEQ ID NO: 51 podría ser, pero sin limitarse a, la secuencia que se recoge en la SEQ ID NO: 52.

20 Por “polinucleótidos antisentido” se entienden cadenas de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos que pueden inhibir la actividad de estos genes por uno de estos dos mecanismos:

1- Interfiriendo la transcripción, al hibridar con el gen estructural o en una región reguladora o promotora del gen que codifica para estos factores de transcripción (*SIBRC1L1*, *SIBRC1L2*, *StBRC1L1* y *StBRC1L2*). Puesto que la transcripción o expresión es bloqueada de manera efectiva por la hibridación del oligonucleótido antisentido con el ADN, disminuye la producción de estos factores de transcripción.

25

2- La unión del oligonucleótido antisentido en el citoplasma con el mRNA, interfiriendo con la formación del complejo de traducción propiamente dicho, inhibiendo la traducción del mRNA a proteína.

30

El silenciamiento génico post-transcripcional, y en particular del ARN de interferencia también da lugar a una menor producción de estos factores de transcripción. El ARN interferente o ARN de interferencia (ARNi, *interfering RNA* ó *iRNA*), es una molécula de ARN que provoca la degradación del ARN de genes específicos. En esta memoria, dentro del ARN de interferencia se incluye tanto el siRNA (*small interfering RNA* ó *ARNip*), como el tsRNA (“*trans-splicing RNA*”), VIGS (“*Virus induced gene silencing*”) y el miRNA o microARN. Los siRNA son hebras de ARN doble banda perfectamente complementarias de aproximadamente 20-21 nucleótidos (nt) con 2 nucleótidos libres en cada extremo 3'. Cada hebra de ARN tiene un grupo fosfato 5' y un grupo hidroxilo (-OH) 3'. Esta estructura proviene del procesamiento llevado a cabo por Dicer, una enzima que corta hebras largas de ARN doble banda (dsRNA, *double strand RNA*) en siRNAs. Una de las hebras del siRNA (la antisentido) se ensambla en un complejo proteico denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), que utiliza la hebra de siRNA como guía para identificar el ARN mensajero complementario. El complejo RISC cataliza el corte del ARNm complementario en dos mitades, que son degradadas por la maquinaria celular, bloqueando así la expresión del gen. Los miRNAs son pequeños ARN interferentes que se generan a partir de precursores específicos codificados en el genoma, que al transcribirse se pliegan en horquillas (*hairpins*) intramoleculares que contienen segmentos de complementariedad imperfecta. El procesamiento de los precursores ocurre generalmente en dos etapas, catalizado por dos enzimas, Drosha en el núcleo y Dicer en el citoplasma. Una de las hebras del miRNA (la antisentido), como ocurre con los siRNAs, se incorpora a un complejo similar al RISC. Dependiendo del grado de complementariedad del miRNA con el ARNm, los miRNAs pueden bien inhibir la traducción del ARNm o bien inducir su degradación. Sin embargo, a diferencia con la vía de los siRNAs, la degradación de ARNm mediada por miRNAs se inicia con la eliminación enzimática de la cola de poly-A del ARNm.

50

Por tanto, podría ser cualquier siRNA ó miRNA capaz de hibridar una molécula de ácido nucleico que codifique estos factores de transcripción (*SIBRC1L1*, *SIBRC1L2*, *StBRC1L1* y *StBRC1L2*). ó una construcción de ARN que al menos contenga una cualquiera de las secuencias de nucleótidos posibles de siRNA ó miRNA capaces de inhibir la traducción de las proteínas ortólogas de *BRC1* de la invención, y sin perjuicio de que adicionalmente formen parte de la presente invención cualquiera de las secuencias y construcciones de RNA de la invención anteriormente descritas que sean objeto de modificaciones, preferentemente químicas, que conduzcan a una mayor estabilidad frente a la acción de ribonucleasas y con ello a una mayor eficiencia. Sin que dichas modificaciones supongan la alteración de su mecanismo de acción, que es la unión específica al complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*), activándolo y manifestando una actividad helicasa que separa las dos hebras dejando solo la hebra antisentido asociada al complejo.

60

Adicionalmente resulta evidente para un experto en la materia que una gran cantidad de polinucleótidos de mRNA pueden traducirse a las proteínas *SIBRC1L1*, *SIBRC1L2*, *StBRC1L1* y *StBRC1L2* como consecuencia, por ejemplo, de que el código genético es degenerado. Cualquier siRNA ó miRNA capaz de inhibir la traducción de estos mRNA también forman parte de la invención.

65

Los autores de la presente invención han desarrollado cuatro secuencias de RNA interferente, dos de ellas dirigidas a reducir los niveles del mRNA de los genes *SIBRC1L1* y *SIBRC1L2* de la tomatara (séptimo - SEQ ID NO: 11 - y octavo - SEQ ID NO: 12- polinucleótido de la invención, respectivamente) y dos de ellas dirigidas a reducir los niveles

de mRNA de los genes StBRC1L1 y StBRC1L2 de la patata (noveno y décimo polinucleótido de la invención, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 respectivamente). Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia que se selecciona de la lista que comprende la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 ó SEQ ID NO: 14.

5 Las secuencias de RNA interferente de la invención servirían para modificar la arquitectura vegetal de las plantas, y en concreto de la tomatera y de la patata. Tal y como se demuestra en los ejemplos de la presente invención, la inhibición del gen *SIBRC1L1* de la tomatera no produce una modificación aparente (respecto de la elongación de las ramas aéreas) de la arquitectura de la planta (o de su fenotipo). Esto es indicativo de que, aunque ambos genes controlan la ramificación, cada uno presenta un cierto grado de especialización y divergencia funcional de forma que en tomatera, *SIBRC1L2* podría tener un papel más importante que *SIBRC1L1* en el control de la elongación de ramas. Por otro lado, en patata, *StBRC1L1* controlaría preferentemente la ramificación de los estolones y *StBRC1L2* la elongación de ramas aéreas.

15 También forman parte de la presente invención una construcción genética de ADN, la cual dirigiría la transcripción *in vitro* o intracelular de la secuencia siRNA, miRNA, o construcción de ARN de la invención, y que comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias: a) secuencia de nucleótidos de ADN, preferentemente de doble cadena, que comprende, al menos, la secuencia del siRNA o miRNA de la invención o de la construcción de ARN de la invención para su transcripción, o, b) secuencia de nucleótidos de ADN, preferentemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia que se transcribe a la secuencia de ARN de la invención operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc... Dicha construcción genética podría ser usada en la modificación de la arquitectura de las plantas. Muchas de estas construcciones, sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook *et al.* 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Ejemplos de estas construcciones serían, pero sin limitarse, los plásmidos de DNA binario utilizados para la generación de las líneas 35SCaMV:: SIBRC1L1 RNAi, 35SCaMV:: SIBRC1L2 RNAi, 35SCaMV:: StBRC1L1 RNAi y 35SCaMV:: StBRC1L2 RNAi, y que se recogen en la Fig. 7 de esta memoria.

30 La preparación de otras secuencias de siRNA o miRNA de la invención o de las construcciones de RNA de la invención serían evidentes para un experto en la materia, y se podría llevar a cabo por síntesis química, lo cual permite además la incorporación de modificaciones químicas tanto en los distintos nucleótidos del producto como la incorporación de otros compuestos químicos en cualquiera de los extremos. Por otro lado, la síntesis también podría realizarse enzimáticamente utilizando cualquiera de las RNA polimerasas disponibles. La síntesis enzimática también permite alguna modificación química de los productos o RNAs inhibidores.

El diseño de las secuencias de nucleótidos del siRNA o miRNA de la invención también sería evidente para un experto en la materia. Así, para el siRNA se podría realizar mediante un diseño aleatorio en el que se seleccionen 19-25 bases del mRNA diana sin tener en cuenta la secuencia o la información posicional que tiene en el transcrito. Otra alternativa no limitativa de la presente invención sería el diseño convencional mediante parámetros simples desarrollados por los pioneros de la técnica (Calipel *et al.*, 2003. *J Biol Chem.* 278(43): 42409-42418) completados con un análisis BLAST de nucleótidos. Otra posibilidad podría ser un diseño racional, en el que se emplee un procedimiento informático dirigido a identificar las dianas óptimas de siRNA en un mRNA. Las secuencias diana se analizan en grupos de 19 nucleótidos a la vez y se identifican las que tienen mejores características en función de un algoritmo que incorpora un gran número de parámetros termodinámicos y de secuencia.

55 Los anticuerpos capaces de unirse a las proteínas SIBRC1L1, SIBRC1L2, StBRC1L1 y StBRC1L2 pueden ser empleados para inhibir la actividad de dichas proteínas, modulando por tanto dicha actividad. Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, el agente modulador se selecciona de entre anticuerpos, fragmentos de los mismos, o cualquiera de sus combinaciones. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de las proteínas SIBRC1L1, SIBRC1L2, StBRC1L1 y StBRC1L2 y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores.

60 El término "anticuerpo" tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con las proteínas *SIBRC1L1*, *SIBRC1L2*, *StBRC1L1* y *StBRC1L2*. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub> que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina. Puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal.

65 Un "anticuerpo o polipéptido recombinante" (rAC) es uno que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del polipéptido, o produce el polipéptido como resultado de la recombinación homóloga.

## ES 2 371 316 A1

Estos rAC se pueden expresar y dirigir hacia subcompartimentos celulares específicos cuando se les incorpora las secuencias apropiadas para el tráfico intracelular. Estos anticuerpos se denominan *intrabodies*, y han demostrado su eficacia no sólo para desviar proteínas de su compartimento habitual o bloquear interacciones entre proteínas implicadas en vías de señalización, sino también para activar proteínas intracelulares.

Forman también parte de la invención las construcciones genéticas de DNA capaces de transcribirse a un péptido, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, para su uso en la modificación de la arquitectura vegetal. Dicha construcción genética de DNA dirigiría la transcripción *in vitro* o intracelular de la secuencia del anticuerpo o fragmento del mismo, y comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias: a) secuencia de nucleótidos de DNA, preferentemente de doble cadena, que comprende, al menos, la secuencia codificante del anticuerpo de la invención o del fragmento de anticuerpo de la invención para su transcripción *in vitro*, o intracelular, b) secuencia de nucleótidos de DNA, preferentemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante de la secuencia de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc. para su uso en la modificación de la arquitectura de las plantas.

Las ribozimas también podrían utilizarse como agentes moduladores de la actividad de las proteínas SIBRC1L1, SIBRC1L2, StBRC1L1 y StBRC1L2. Un “ribozima” tal y como se entiende en la presente invención, se refiere a un polinucleótido catalítico (típicamente RNA), que puede construirse para reconocer específicamente, por hibridación, un mRNA y fragmentarlo o eliminar su expresión. Las ribozimas pueden introducirse en la célula como moléculas de RNA catalíticas o como construcciones genéticas que se expresan a moléculas catalíticas de RNA.

Forman también parte de la invención las composiciones que comprenden los oligonucleótidos antisentido (siRNA, miRNA o la construcción de ARN), los anticuerpos, o las construcciones genéticas moduladoras de la expresión de los genes *SIBRC1L1*, *SIBRC1L2*, *StBRC1L1* y *StBRC1L2* de la invención. Las composiciones de la presente invención permiten la transfección del siRNA, miRNA o la construcción de ARN de la invención al interior de una célula, *in vivo* o *in vitro*. La transfección se podría llevar a cabo, pero sin limitarnos a, transfección directa o vectores que faciliten el acceso del siRNA, miRNA o la construcción de ARN al interior de la célula. Así, ejemplos de estos vectores son, sin limitarse a, virus, plásmidos binarios de DNA no virales, y conjugados moleculares. Así, por ejemplo, los siRNA de la presente invención, así como ARN o ADN precursores de estos siRNA, miRNA o construcciones de ARN pueden conjugarse con péptidos de liberación u otros compuestos para favorecer el transporte de estos RNA al interior de la célula.

Otro aspecto se refiere a una semilla, de ahora en adelante semilla de la invención, cuyo material genético integra los polinucleótidos aislados de la invención (incluyendo también los agentes moduladores, como por ejemplo, pero sin limitarnos, los recogidos en las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14) o las construcciones genéticas de la invención. En una realización preferida, la semilla de la invención puede clasificarse taxonómicamente como pertenecientes a la especie *Solanum tuberosum* L. En una realización preferida, la semilla de la invención puede clasificarse taxonómicamente como pertenecientes a la especie *Solanum lycopersicum*.

Otro aspecto se refiere a una célula vegetal, de ahora en adelante célula vegetal de la invención, cuyo material genético integra los polinucleótidos aislados de la invención o las construcciones genéticas de la invención. Preferiblemente, las células vegetales de la invención puede clasificarse taxonómicamente como pertenecientes a la especie *Solanum tuberosum* L. En otra realización preferida, puede clasificarse taxonómicamente como perteneciente a la especie *Solanum lycopersicum*.

Otro aspecto se refiere a un cultivo de células vegetales, de ahora en adelante cultivo de células vegetales de la invención, cuyo material genético integra los polinucleótidos aislados de la invención o las construcciones genéticas de la invención. Preferiblemente, las células vegetales del cultivo de la invención pueden clasificarse taxonómicamente como pertenecientes a la especie *Solanum tuberosum* L. En otra realización preferida, pueden clasificarse taxonómicamente como pertenecientes a la especie *Solanum lycopersicum*.

El término “cultivo de células” en esta memoria, hace referencia a un cultivo de células aisladas del mismo o diferente tipo de tejido, o una colección de tales células organizadas en partes de una planta o en tejidos (cultivos tisulares). Tipos de cultivos de este tipo son, por ejemplo, cultivos de protoplastos, callos (grupos de células vegetales indiferenciadas capaces de regenerar una planta completa) y células vegetales que están aisladas de plantas o partes de las plantas, tales como embriones, protoplastos, células meristemáticas, polen, hojas o anteras.

Otro aspecto de la invención se refiere a un grupo de células, que pueden clasificarse taxonómicamente como pertenecientes a la especie *Solanum tuberosum* L cuyo material genético integra los polinucleótidos aislados de la invención o las construcciones genéticas de la invención, y que forman los tubérculos, los minitubérculos o los microtubérculos.

Se conocen como “minitubérculos”, ó “papa semilla” a pequeños tubérculos de no más de 3 cm de diámetro utilizados para realizar las grandes plantaciones comerciales del cultivo de papa. En su defecto se usan tubérculos medianos o trozos de ellos que lleven al menos un ojo (esto es, una yema).

Otro aspecto se refiere a una planta, de ahora en adelante planta de la invención, que comprende las células o el cultivo de células vegetales de la invención, y/o que se ha obtenido tras el crecimiento de la semilla de la invención. Dicha planta integraría en su material genético los polinucleótidos de la invención, y/o las construcciones genéticas de la invención. Preferiblemente, las células vegetales del cultivo de la invención pueden clasificarse taxonómicamente como pertenecientes a la especie *Solanum tuberosum* L. En otra realización preferida, pueden clasificarse taxonómicamente como pertenecientes a la especie *Solanum lycopersicum*.

Modificaciones en los genes *SIBRC1L1*, *SIBRC1L2*, *StBRC1L1* y *StBRC1L2*, permitiría, por tanto, modificar la arquitectura vegetal de una planta. Puesto que en esta invención se recoge la secuencia de estos genes, así como las respectivas proteínas a las que se traducen, la obtención de plantas cuya arquitectura vegetal se encuentre modificada, se podría hacer por varios métodos.

Por selección de mutantes espontáneos: se debe tener en cuenta que en cada división celular hay una pequeña probabilidad de que ocurra un cambio genético, por lo cual no es sorprendente que en una gran masa celular la población sea heterogénea. Esta distribución puede presentar problemas de rendimiento debido a que en general las variantes tienen menores niveles de producción que la población parental. Estos cambios definitivos (mutaciones) se deben distinguir de las variaciones fenotípicas que dependen de las condiciones ambientales y que tienen lugar en todas las células de la población que expresan la misma modificación fisiológica, dentro de las variaciones permitidas por su genotipo. En las mutaciones espontáneas, si el elemento responsable de la mutación no es conocido, es muy difícil diferenciar estas variaciones fenotípicas de aquellas que presentan modificaciones en los genes responsables de la arquitectura vegetal y que son estables y hereditarias. La presente invención proporciona las herramientas necesarias para llevar a cabo una selección de aquellos mutantes no solo mediante la observación de las características morfológicas de interés, sino también mediante la detección de mutaciones en los genes responsables de dichas mutaciones (*SIBRC1L1*, *SIBRC1L2*, *StBRC1L1* y *StBRC1L2*), diseñando un procedimiento simple de cribado selectivo para un tipo particular de mutantes. Por ejemplo, se podrían seleccionar morfológicamente aquellas plantas, preferiblemente la tomatara o la patata, que presenten una arquitectura vegetal ventajosa, y comprobar posteriormente si los genes *SIBRC1L1*, *SIBRC1L2*, *StBRC1L1* y *StBRC1L2* presentan mutaciones respecto a un genotipo silvestre control.

Por tanto otro aspecto de la invención se refiere a una planta de tomate, un fruto, semilla, células, grupo de células o partes de la planta, que presentan una arquitectura vegetal modificada con respecto a las plantas tipo control de tomate, donde la modificación de la arquitectura vegetal se debe a mutaciones no transgénicas en los genes *SIBRC1L1* y *SIBRC1L2* de tomate.

Otro aspecto de la invención se refiere a una planta de patata, un fruto, semilla, células, grupo de células o partes de la planta, que presentan una arquitectura vegetal modificada con respecto a las plantas tipo control de patata, donde la modificación de la arquitectura vegetal se debe a mutaciones no transgénicas en los genes *StBRC1L1* y *StBRC1L2* de patata.

El término “genotipo”, tal como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la constitución hereditaria o genética de un individuo; todo el material genético contenido en una célula, al que, por lo general, se denomina material nuclear.

El término “fenotipo”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la suma total de las propiedades estructurales y funcionales observables de un organismo producto de la interacción entre el genotipo y el medio ambiente.

El término “tipo” hace referencia a la planta designada como el tipo de un género, subgénero, especie, variedad u otra categoría taxonómica, siendo el “tipo” bajo el punto de vista taxonómico, el elemento simple de un taxón al cual se le asigna permanentemente el nombre y sobre el que están basadas las características descriptivas que satisfacen las condiciones de disponibilidad o de publicación válidas. En esta memoria también describe una planta control de tomatara o patata con la que se comparan otras plantas de la misma categoría taxonómica para observar si presenta su arquitectura vegetal modificada, para posteriormente analizar si los genes *SIBRC1L1* y *SIBRC1L2* (en la tomatara) y *StBRC1L1* y *StBRC1L2* (en la patata) presentan mutaciones respecto a los genes de la planta control. De esta manera, se pueden distinguir las modificaciones en la arquitectura vegetal que se deben a factores fisiológicos, ambientales, o de otro tipo, frente a las provocadas por mutaciones en los genes *SIBRC1L1* y *SIBRC1L2* (en la tomatara) y *StBRC1L1* y *StBRC1L2*.

El procedimiento de mutación inducida implica dos etapas, el tratamiento de la población con el mutágeno elegido y luego el aislamiento de los mutantes para su posterior ensayo y selección. Inducir mutaciones en una planta es una herramienta muy valiosa para el mejoramiento de plantas, especialmente cuando se desea mejorar uno o dos caracteres fácilmente identificables en una especie o variedad bien adaptada. Además, tiene a ventaja de que la variabilidad causada por las mutaciones inducidas no es esencialmente diferente de la causada por las mutaciones espontáneas durante la evolución. La elección de un agente mutagénico depende en general de consideraciones prácticas. En algunos de los casos es más conveniente el empleo de más de uno en lugar del uso masivo de uno solo. Hasta donde sea posible el aislamiento del mutante debería utilizar la característica mejorada del mismo (la arquitectura vegetal de interés) como factor de selección. Los agentes mutagénicos pueden ser agrupados en físicos (luz ultravioleta, rayos X, radiación gamma, radiación beta, neutrones rápidos, haces de iones pesados, ...) y químicos. La mayoría de los mutágenos químicos pertenecen al grupo de los agentes alquilantes (metanosulfonato de etilo (EMS), sulfato de dietilo (DES), ...) pero existen otros grupos, como los análogos de bases (como el 5-bromuracilo y la 2-aminopurina) y mutágenos estructurales (como la proflavina o naranja acridina).

## ES 2 371 316 A1

Los mutágenos crean, principalmente, mutaciones puntuales y pequeñas deleciones, inserciones, transversiones y/o transiciones (de alrededor de 1 a 5 nucleótidos). Por ejemplo, pero sin limitarnos a, podrían ser mutágenos como el metilmetano sulfonato (MMS), Nitrosoguanidina (NTG), N-etil-N-nitrosourea (ENU), trietilmelamina (TEM), N-metil-N-nitrosourea (MNU), procarbazona, clorambucil, ciclofosfamida, dietil sulfato, monómero de acrilamida, mel-falan, vincristina, dimetilnitrosamina, N-metil-N'-nitro-Nitrosoguanidina (MNNG), nitrosoguanidina, 2-aminopurina, 7,12 dimetil-benz(a)antraceno (DMBA), óxido de etileno, hexametilfosforamida, bisulfan, diepoxialcanos (diepoxioc-tano (DEO), diepoxibutano(BEB), 2-metoxi-6-cloro-9[3-(etil-2-cloro-etil)aminopropilamino] acridina dihidroclorida (ICR-170), formaldehído, etc.

Así, por ejemplo, las semillas son sometidas a la acción de mutágenos químicos, que da lugar a una serie de mutaciones en el genoma de dichas semillas. Se crecen dichas semillas dando lugar a plantas adultas (M1), que se autopolinizan, dando lugar a una generación M2. El DNA de las plantas M2 se somete a un cribado para ver si presenta mutaciones en el gen de interés. Una vez se identifica la mutación en el gen de interés, las semillas de las plantas M2 portando dicha mutación se crecen, dando lugar a plantas M3, que se someten a un cribado para ver si manifiestan las características fenotípicas asociadas con el gen de interés.

Un experto en la materia entiende que una variedad de material vegetal puede ser sometido al proceso de mutagé-nesis, incluyendo, pero sin limitarnos, semillas, polen, células o tejidos de la planta. El tipo de material vegetal que se somete a mutagénesis modifica la etapa en la el DNA de las plantas es sometido al cribado para encontrar la mutación. Así, por ejemplo, cuando se somete a mutagénesis el polen antes de la polinización de una planta no mutagénica, las semillas resultantes dan lugar a plantas M1. Cada célula de dichas plantas M1 puede contener las mutaciones inducidas en el polen, por lo que no hay que esperar a la generación M2 para realizar el cribado, Este procedimiento es conocido en el estado de la técnica como *tilling*.

Así, otro aspecto de la invención se refiere a un método para obtener plantas de tomatera con arquitectura vegetal modificada, en comparación con la planta silvestre control, que comprende:

- a) obtener material vegetal de una planta (parental) de tomatera,
- b) someter a un proceso de mutagénesis el material vegetal del paso (a),
- c) cultivar el material vegetal mutado hasta regenerar una planta completa, y su descendencia,
- d) analizar la descendencia de las plantas del paso (c) para detectar al menos una mutación en al menos una copia los genes ortólogos de BRC1 (genes *SIBRC1L1* y *SIBRC1L2*),
- e) seleccionar los descendientes con al menos una mutación en al menos una copia de los genes *SIBRC1L1* y *SIBRC1L2* que presenten su arquitectura vegetal modificada en comparación con una planta tipo control,
- f) opcionalmente, cultivar la planta seleccionada para obtener descendencia que presente dicha modificación de la arquitectura vegetal.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la mutación se produce en al menos una copia del gen *SIBRC1L2*. En otra realización preferida, la inducción de la mutación del paso (b) se realiza mediante mutágenos químicos.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para obtener plantas de patata con arquitectura vegetal modifi-cada, en comparación con la planta silvestre control, que comprende:

- a) obtener material vegetal de una planta (parental) de patata,
- b) someter a un proceso de mutagénesis el material vegetal del paso (a),
- c) cultivar el material vegetal mutado hasta regenerar una planta completa, y su descendencia,
- d) analizar la descendencia de las plantas del paso (c) para detectar al menos una mutación en al menos una copia los genes ortólogos de BRC1 (genes *StBRC1L1* y *StBRC1L2*),
- e) seleccionar los descendientes con al menos una mutación en al menos una copia de los genes *StBRC1L1* y *StBRC1L2* que presenten su arquitectura vegetal modificada en comparación con una planta tipo control,
- f) opcionalmente, cultivar la planta seleccionada para obtener descendencia que presente dicha modificación de la arquitectura vegetal.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la inducción de la mutación del paso (b) se realiza mediante mutágenos químicos.

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. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Descripción de las figuras

Fig. 1. Fenotipo de líneas transgénicas de tomate con actividad reducida de los genes *SIBRC1L1* y *SIBRC1L2*. Aspecto general de planta control variedad Moneymaker (A) y línea 35SCaMV::SIBRC1L1 RNAi (B). Detalle de yema axilar de planta control (C) y de planta 35SCaMV::SIBRC1L2 RNAi (D). E. Aspecto general de plantas de líneas 35SCaMV::SIBRC1L2 RNAi.

Fig. 2. Cuantificación del fenotipo de ramificación de plantas de tomatara control, líneas 35SCaMV::SIBRC1L1 RNAi (A) y 35SCaMV::SIBRC1L2 RNAi (B).

Fig. 3. Expresión diferencial de los genes *StBR1L1* y *StBR1L2* en yemas aéreas y estolones, cuantificada mediante RT-PCR semicuantitativa.

Fig. 4. Fenotipo de líneas transgénicas de patata con actividad reducida de *StBRC1L1*. A. Aspecto general de planta control variedad Desiree (izquierda) y planta 35SCaMV::StBRC1L1 RNAi (derecha). B. Fenotipo de ramificación aérea de plantas control y líneas 35SCaMV:: StBRC1L1 RNAi. En abscisas se representa el número de ramas. C. Fenotipo de ramificación subterránea (estolones) de plantas control y líneas 35SCaMV::StBRC1L1 RNAi. En abscisas se representa el número de estolones.

Fig. 5. Fenotipo de estolones de líneas 35SCaMV::RNAi StBRC1L1. A. Las plantas transgénicas (RNAi) producen un mayor número de estolones que las plantas control (wt). B. Las plantas transgénicas producen estolones ramificados a diferencia de las plantas control.

Fig. 6. Rendimiento de las líneas transgénicas con actividad reducida de *StBRC1L1*. A. Producción total de tubérculos de individuos control (arriba) e individuos de líneas independientes 35SCaMV::StBRC1L1 RNAi (abajo, paneles numerados). B. Cuantificación de la producción de tubérculos. C. Cuantificación del peso total de tubérculos.

Fig. 7. Mapas de los plásmidos binarios utilizados para la generación de las líneas 35SCaMV::SIBRC1L1 RNAi y 35SCaMV::SIBRC1L2 RNAi (izquierda) y 35SCaMV::StBRC1L1 RNAi y 35SCaMV:: StBRC1L2 RNAi (derecha). En ella se indican los fragmentos de secuencia sentido (caja A) y antisentido (caja B) que se clonan separadas por el intrón de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDKintrón), constituyendo la estructura de RNAi. Delante del fragmento sentido A se encuentra el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35Spromoter) y como terminador de la transcripción se utiliza el terminador de la octopina sintetasa (OCster). También se indican los extremos del T-DNA, LB (extremo izquierdo) y RB (extremo derecho) y la posición del gen de de la neomicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a kanamicina (NPTII KanR).

### Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad de las modificaciones en la expresión de los genes *SIBRC1L1*, *SIBRC1L2*, *StBRC1L1* y *StBRC1L2* en la alteración de la arquitectura de las plantas de la tomatara y de la patata.

#### Ejemplo 1

##### Clonaje de las secuencias genómicas, promotoras y codificantes de los genes *SIBRC1L1* y *SIBRC1L2*

Para clonar los ortólogos a *BRC1* de tomatara se realizó una búsqueda de genes TCP tipo *BRC1* en diferentes bases de datos de solanáceas: TIGR Solanaceae Genomics Resource BLAST page, TIGR Plant Transcript Assemblies Database y SOL Genomics Network. Para llevar a cabo la comparación se utilizó la secuencia de aminoácidos de la caja TCP de la proteína BRC1 de Arabidopsis, y se encontró una EST (*Expressed Sequence Tags*) y un cDNA cuya traducción daban lugar a proteínas con alta homología con BRC1 de arabidopsis. El EST EST522935 tenía 447 bp y el cDNA parcial AY168167, 415 bp. Las secuencias nucleotídicas de los genes *SIBRC1L1* y *SIBRC1L2* se recogen en la SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, respectivamente.

Para amplificar los cDNAs completos (SEQ ID NO: 15 para *SIBRC1L1* y SEQ ID NO: 16 para *SIBRC1L2*) de ambos genes, se siguieron dos estrategias diferentes. En el caso del *SIBRC1L1*, se diseñaron dos cebadores anidados (Le1, SEQ ID NO:17 y Le2, SEQ ID NO:18) en la región 5' del gen, y se amplificó por PCR el cDNA completo con oligo dT a partir de cDNA de yemas axilares de tomatara. En el caso del gen *SIBRC1L2*, la secuencia disponible no incluía ni el extremo 5' ni el 3', por lo que se procedió al clonaje de ambos extremos mediante el kit SMART™

## ES 2 371 316 A1

RACE cDNA Amplification Kit (Clontech). Mediante el uso de este kit, se incorporaron adaptadores sintéticos en los extremos 5' y 3' durante la síntesis del cDNA realizada a partir de RNA total de yemas axilares de tomatara. Para la amplificación de ambos extremos utilizando la secuencia de los adaptadores sintéticos, se diseñaron dos pares de cebadores anidados en la secuencia disponible del gen *SIBRC1L2*: LeTCP2-F1 (SEQ ID NO: 19) y LeTCP2-F1 nested (SEQ ID NO: 20) para el extremo 3' y LeTCP2-R1 (SEQ ID NO: 21) y LeTCP2-R1 nested (SEQ ID NO: 22) para el extremo 5'. Una vez obtenida la secuencia de ambos fragmentos solapantes 5' y 3' se diseñaron cebadores (LeTCP2 cDNA-F, SEQ ID NO: 23) y LeTCP2 cDNA-R, SEQ ID NO: 24) para amplificar el gen completo.

En el caso del gen *SIBRC1L1*, se amplificaron dos tipos de cDNA, uno con una fase abierta de lectura larga (1041 pb) y uno con una fase abierta de lectura corta (978 pb) por un procesamiento de intrones diferente, mientras que en el caso de *SIBRC1L2* sólo se amplificó un tipo de cDNA con una fase de lectura abierta de 1014 pb. Los fragmentos de PCR correspondientes a los tres cDNAs se clonaron en el vector pGEMT-easy™ (Promega).

Una vez conocida la secuencia completa de ambos genes, se amplificaron los fragmentos correspondientes a su secuencia genómica (SEQ ID NO: 7 para *SIBRC1L1* y SEQ ID NO: 8 para *SIBRC1L2*), utilizando cebadores que incluyeran las zonas 5' y 3' correspondientes a cada gen: Le1 (SEQ ID NO: 17) y Le3 (SEQ ID NO: 25) para amplificar la secuencia genómica de *SIBRC1L1*, y *SIBRC1L2* cDNA-F (SEQ ID NO: 23) y LeTCP2 cDNA-R (SEQ ID NO: 24) para amplificar la de *SIBRC1L2*. En el caso de *SIBRC1L1*, al comparar la secuencia genómica con la correspondiente a la zona codificante, se observó la existencia de dos intrones, que se eliminaban en el cDNA corto, pero uno de los cuales se mantiene en el cDNA largo. En el caso del gen *SIBRC1L2*, la comparación de la secuencia genómica con la codificante mostró la existencia de un intrón.

El aislamiento de las zonas promotoras de ambos genes (SEQ ID NO: 5 para *SIBRC1L1* y SEQ ID NO: 6 para *SIBRC1L2*) se realizó utilizando una librería Genome Walker™ (Clontech) de tomate. Mediante esta estrategia, se crearon, a partir de DNA genómico, distintas librerías Genome Walker™ mediante digestión con diferentes enzimas que produzcan extremos romos (DraI, EcoRV, PvuII y SspI) y posterior ligación de adaptadores sintéticos en los extremos producidos por la digestión. A partir de cebadores anidados diseñados a unos 100bp del atg de ambos genes (GSP1-TCP1, GSP2-TCP1 - SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27 respectivamente - para *SIBRC1L1* y GSP1-TCP2, GSP2-TCP2 - SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 respectivamente - para *SIBRC1L2*) y de los disponibles para los adaptadores, se amplificaron por PCR dos fragmentos de 1,7 kb y 0,7 kb de tamaño, correspondientes a las zonas promotoras de los genes *SIBRC1L1* y *SIBRC1L2* respectivamente. Ambos fragmentos fueron clonados en el vector pGEMT-easy™.

### Ejemplo 2

#### *Generación de plantas transgénicas de tomate (Solanum Lycopersicum variedad MoneyMaker) con pérdida de función de los genes SIBRC1L1 y SIBRC1L2 silenciados por la técnica de RNAi*

Los fragmentos de DNA elegidos para realizar la interferencia de RNA están situados entre la caja TCP y la caja R, zonas altamente conservadas y características de los genes TCP. Dicho fragmento anilla exclusivamente con la parte de secuencia elegida lo que asegura que el silenciamiento sea específico cada gen por separado, *SIBRC1L1* y *SIBRC1L2*.

El fragmento utilizado para silenciar el gen *SIBRC1L1* tiene 225 pares de bases, y la secuencia se recoge en la SEQ ID NO: 11., y constituye el séptimo polinucleótido de la invención.

El fragmento utilizado para silenciar el gen *SIBRC1L2* tiene 415 pares de bases, y la secuencia se recoge en la SEQ ID NO: 12, y constituye el octavo polinucleótido de la invención.

#### *Estrategia utilizada para la generación de las construcciones RNAi para los genes SIBRC1L1 y SIBRC1L2*

Para la obtención de la estructura en horquilla característica del RNAi, se clonó el fragmento seleccionado en el plásmido pHannibal (CSIRO), que porta la resistencia a ampicilina. Dicho clonaje es dirigido, de forma que el fragmento entra en dirección 5'-3' clonándolo con las dianas *BamHI* y *ClaI*, y en 3'-5' al otro lado del intrón PDK (742 pb), utilizando las dianas *XhoI* y *KpnI*. Para ello, los fragmentos seleccionados se amplificaron usando cebadores que contenían en el extremo 5' las secuencias diana para las distintas enzimas de restricción a utilizar (el cebador para el extremo 5' de *SIBRC1L1* se recoge en la secuencia SEQ ID NO: 30, para el extremo 3' de *SIBRC1L1* en la secuencia SEQ ID NO: 31, para el extremo 5' de *SIBRC1L2* en la secuencia SEQ ID NO: 32 y para el extremo 3' de *SIBRC1L2* en la secuencia SEQ ID NO: 33).

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes con la estructura en horquilla del RNAi, y comprobados por secuenciación, se extrajo el *cassette* con el transgén (3330 pb) del pHannibal cortando con *NotI* y se clonó en el sitio para la misma enzima de restricción del plásmido pBluescriptII SK+. De esta forma se consiguió dejar a un lado de la secuencia un sitio *SacI* y al otro lado un sitio *SmaI*, de manera que mediante una digestión con ambos enzimas de los fragmentos y del plásmido binario pBIN19 (Fig. 7), se subclonaron ambos fragmentos dando lugar a las construcciones que se han introducido en la planta de tomate (Figura 7). Se optó por la utilización de este plásmido binario ya que ha sido bien establecido que el plásmido pBIN19 transforma tomate eficazmente, confiriendo resistencia a kanamicina en



## ES 2 371 316 A1

bacteria y en planta. La expresión del transgén está dirigida por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) (1346 pb) promoviendo su expresión constitutiva, mientras que en el extremo 3' del gen se encuentra la octopina sintasa (terminador OCS) (766 pb) de *Agrobacterium* que actúa como terminador de la transcripción. Una vez obtenidas las construcciones en *Escherichia coli*, se realizó una preparación de los plásmidos que se utilizaron para transformar *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. De las colonias portadoras de nuestros plásmidos, se seleccionó una única colonia que se utilizó para la transformación de las plantas de tomatara.

### *Transformación de plantas de tomatara*

Para transformar de forma estable plantas de tomatara, se empleó el protocolo de Ellul *et al.* (2003) *Theor Appl Genet.* 106(2): 231-8.). Siguiendo este protocolo, se transformaron cotiledones de tomate procedentes de plantas crecidas en condiciones *in vitro* en medio Murashige y Skoog con vitaminas (*Physiol. Plant.* 15:473-497,1962) suplementado con un 2% de sacarosa. Una vez desarrolladas las primeras hojas verdaderas, los cotiledones fueron cortados transversalmente en una o dos porciones (explantos), dependiendo del tamaño, y se colocaron durante dos días en oscuridad con el envés en contacto con el medio de precultivo (MPC), que incluye las hormonas AIA y kinetina, a una concentración final de 4 mg/l. Pasadas 48 horas, se infectaron los explantos sumergiéndolos durante 8 minutos en el cultivo de *Agrobacterium*. Después de eliminar el exceso de *Agrobacterium*, los explantes se colocaron en el medio de cocultivo (MCC), que lleva la misma composición de hormonas que el anterior, añadiendo acetosiringona. Los explantes se incubaron con la bacteria durante 48 horas en oscuridad.

Concluido el periodo de cocultivo, los explantes se limpiaron en medio de lavado (ML) más el antibiótico claforán (500 mg/l) para eliminar el *Agrobacterium*, y se secaron sobre papel de filtro estéril para pasarlos a medio de recuperación (MR) sin presión selectiva (AIA/Kinetina/Claforán). En este medio se cultivaron a la luz durante dos días, después de lo cual se transfirieron al primer medio selectivo (MS) al que se le añadió otra hormona más, la zeatina (1 mg/l) y el antibiótico de selección del transgén kanamicina (50 mg/l). Los explantes se cultivaron en este medio selectivo hasta el primer cambio a medio fresco (con la misma composición) a las tres semanas. A partir de estos explantes se desarrollaron callos que pasaron por cuatro subcultivos de tres semanas antes de empezar a desarrollar los primeros ápices.

Una vez bien desarrollados los ápices, se cortaron de los callos y se transfirieron a medio de enraizamiento (ME), que incluye AIA en baja concentración (0,1 mg/l) para favorecer el desarrollo de raíces. Una vez que estuvieron bien desarrolladas, se transfirieron las plantas de tomate a una mezcla de turba y vermiculita 3:1, manteniendo las plantas en condiciones de alta humedad durante al menos una semana para evitar su marchitamiento.

### *Medio de precultivo (MPC)*

MS basal salt mixture con 0,8% agar

Sacarosa 30 g/l

Myo-inositol 100 mg/l

Vitaminas SH 10 ml/l

IAA 4 mg/l

Kinetina 4 mg/l

### *Medio de cocultivo (MCC)*

MS basal salt mixture con 0,8% agar

Sacarosa 30 g/l

Myo-inositol 100 mg/l

Vitaminas SH 10 ml/l

IAA 4 mg/l

Kinetina 4 mg/l

Acetosiringona (39,2 g/l)

## ES 2 371 316 A1

### *Medio de lavado (ML)*

MS basal salt mixture

5 Sacarosa 20 g/l

Myo-inositol 100 mg/l

10 Claforán 500 mg/l

### *Medio de recuperación (MR)*

15 MS basal salt mixture con 0,8% agar

Sacarosa 30 g/l

Myo-inositol 100 mg/l

20 Vitaminas SH 10 ml/l

IAA 4 mg/l

25 Kinetina 4 mg/l

Claforán 300 mg/l

### *Medio de selección (MS)*

30 MS basal salt mixture con 0,8% agar

Sacarosa 30 g/l

35 Myo-inositol 100 mg/l

Vitaminas SH 10 ml/l

40 IAA 4 mg/l

Kinetina 4 mg/l

Zeatina 1 mg/l

45 Kanamicina 50 mg/l

Claforán 300 mg/l

### *Medio de enrizamiento (ME)*

50 MS basal salt mixture con 0,8% agar

Sacarosa 30 g/l

55 Myo-inositol 100 mg/l

Tiamina HCl 1 mg/l

60 IAA 0,1 mg/l

### *Caracterización de las líneas RNAi 35S::SIBRC1L1 y 35S::SiBRC2L2*

65 Se generaron 10 líneas transgénicas independientes de tomatera de la variedad Moneymaker portadoras de la construcción 35S::SIBRC1L1 RNAi y otras 10 portadoras de la construcción 35S::SIBRC1L2 RNAi que fueron analizadas fenotípicamente. Los individuos de T1 indicaron que, mientras que los individuos 35S::SIBRC1L1 RNAi tenían una fuerte dominancia apical (no tenían ramas), bajo las mismas condiciones, los individuos 35S::SIBRC1L2 RNAi tenían

## ES 2 371 316 A1

un claro exceso de ramas laterales en comparación con las plantas silvestres (Figuras 1 y 2). Estos resultados muestran que el gen *SIBRC1L2* tiene una mayor importancia que *SIBRC1L1* en el control del crecimiento de las ramas laterales en la tomatera.

### 5 Ejemplo 3

#### *Clonaje de las secuencias genómicas, promotoras y codificantes de los genes StBRC1L1 y StBRC1L2*

10 Para clonar los ortólogos a *BRC1* de patata se realizó una búsqueda de genes TCP tipo *BRC1* en diferentes bases de datos de solanáceas: TIGR Solanaceae Genomics Resource BLAST page, TIGR Plant Transcript Assemblies Database y SOL Genomics Network. Para llevar a cabo la comparación se utilizó la secuencia de aminoácidos de la caja TCP del gen *BRC1* de Arabidopsis. Se encontraron dos unigenes: TC168465 y TC129597 que se denominaron *StBRC1L1* y *StBRC1L2*, respectivamente. Además, conociendo la alta homología existente entre tomate y patata, y teniendo clonado el gen *SIBRC1L1* de tomate, se probaron los mismos cebadores con ADN genómico de patata, para el extremo 5' Le1 (SEQ ID NO:17) y Le2 (SEQ ID NO:18), siendo este último un cebador anidado del anterior, y Le3 (SEQ ID NO:25) para el extremo 3'. En base a esta secuencia se diseñó un cebador específico (rcest1-5', SEQ ID NO: 34) para localizar el extremo 5' del gen usando la técnica PCR-RACE con cDNA de yemas axilares y estolones de patata. En base a la secuencia obtenida se diseñó un cebador en el extremo 5': StTCP1-ORF1 (SEQ ID NO: 35). Para amplificar la secuencia de cDNA se usó cDNA sintetizado a partir del mismo ARN que para el extremo 5', pero utilizando el cebador B26 (SEQ ID NO: 36) que incluye en su secuencia una cola de poliT a continuación de la secuencia del cebador B25 (SEQ ID NO: 37), lo que permite usarlo como cebador del extremo 3'.

25 El gen StBRC1L1 se amplificó de ADN usando los cebadores genómico-StTCP1A (SEQ ID NO: 38) y genómico-StTCP1B (SEQ ID NO: 39).

30 StBRC1L2 fue amplificado primero parcialmente a partir de mismo cDNA utilizado para el gen StBRC1L1. Se usó el cebador B25 para el extremo 3', y, para el extremo 5' se usaron los cebadores StTCP2A (SEQ ID NO: 40) y StTCP2B (SEQ ID NO: 41) (anidado del anterior) que habían sido diseñados en función de la secuencia del EST TC129597. A partir de la secuencia obtenida se localizó el extremo 5' usando PCR-RACE y los cebadores específicos St2-Seq 1 (SEQ ID NO: 42) y el anidado de éste St2-Seq 2 (SEQ ID NO: 43).

35 Para la amplificación del cDNA completo se usaron los cebadores StTCP2-5' (SEQ ID NO: 44) y B25. La secuencia del cDNA mostró una serie de polimorfismos que consideramos como dos alelos dando lugar al alelo 1 y al alelo 2, así como a sus respectivas proteínas. Para la secuencia genómica se usaron los cebadores StTCP2-5' y StTCP2-3' (SEQ ID NO: 45).

Todos los fragmentos de PCR amplificados correspondientes tanto a partes como a la totalidad de las secuencias de los genes se clonaron en el vector pGEMT-easy™ (Promega).

### 40 Ejemplo 4

#### *Generación de plantas transgénicas de patata (*Solanum tuberosum* variedad Desiree) con pérdida de función de los genes *StBRC1L1* y *StBRC1L2* silenciados por la técnica de RNAi*

45 El fragmento elegido para la interferencia de *StBRC1L1* está situado entre la caja TCP y la caja R, zonas altamente conservadas y características de los genes TCP. Dicho fragmento no anilla más que con esa parte de secuencia elegida lo que asegura un silenciamiento específico del gen *StBRC1L1*. El fragmento tiene 185 pares de bases, y la secuencia se recoge en la SEQ ID NO: 13, y constituye el noveno polinucleótido de la invención.

50 El fragmento elegido para la interferencia de *StBRC1L2* también está situado entre la caja TCP y la caja R. Dicho fragmento sólo hibrida con la parte de secuencia elegida, lo que asegura el silenciamiento específico del gen *StBRC1L2*. El fragmento tiene 168 pares de bases, se recoge en la SEQ ID NO: 14., y constituye el décimo polinucleótido de la invención.

#### *Estrategia utilizada para la generación de las construcciones RNAi para los genes StBRC1L1 y StBRC1L2*

60 Para la obtención de la estructura en horquilla característica del RNAi, se clonó el fragmento seleccionado en el plásmido pHannibal (CSIRO), que porta la resistencia a ampicilina. Dicho clonaje es dirigido, de forma que el fragmento entra en dirección 5'-3' clonándolo con las dianas *BamHI* y *ClaI*, y en 3'-5' al otro lado del intrón PDK (742 pb), utilizando las dianas *XhoI* y *KpnI*. Para ello, los fragmentos seleccionados se amplificaron usando cebadores que contenían en el extremo 5' las secuencias diana para las distintas enzimas de restricción a utilizar.

65 Para *StBRC1L1*

Cebador del extremo 5': (SEQ ID NO: 46)

Cebador del extremo 3': (SEQ ID NO:47).

## ES 2 371 316 A1

Para *StBRC1L2*

Cebador del extremo 5': (SEQ ID NO: 48)

5 Cebador del extremo 3': (SEQ ID NO: 49).

Una vez obtenido el plásmido recombinante con la estructura en horquilla del RNAi, y comprobada por secuenciación, se extrajo el transgen (3330 pb) del pHannibal cortando con NotI y se clonó en el sitio para la misma enzima de restricción del plásmido binario pART27 (Gleave, 1992 *Plant Mol Biol.* 1992 Dec; 20(6):1203-7) (Figura 7), que confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina en bacteria y a kanamicina en planta. El sitio NotI del pART27 se localiza entre los bordes derecho e izquierdo del plásmido, lo que garantiza su transferencia a la célula vegetal al transformarla. El transgen está flanqueado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) (1346 pb) para una expresión constitutiva y el extremo 3' del gen de la octopina sintasa (terminador OCS) (766 pb) de *Agrobacterium* que actúa como terminador de la transcripción.

Una vez obtenida la construcción en *Escherichia coli*, se hizo una preparación del plásmido que se utilizó para transformar *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. De las colonias que portaban nuestro plásmido, fue seleccionada una que se utilizó para la transformación de las plantas de patata.

20

### *Transformación de plantas de patata*

Se transformaron hojas de patata de plantas crecidas en condiciones *in vitro* en medio Murashige y Skoog con vitaminas (*Physiol. Plant.* 15:473-497,1962) suplementado con un 2% de sacarosa (MS2). Las plantas deben tener entre 3 y 4 semanas contadas desde el momento en que el ápice de la planta se repica en medio fresco.

Las hojas son retiradas de la planta y con un bisturí se elimina la parte del pecíolo y se les hace uno o dos cortes en la vena central, sin que lleguen a los bordes de la hoja. Diez de estas hojas se colocan con el haz hacia abajo, en una placa de 9 cm de diámetro que contiene 10 ml de medio MS2.

La placa es inoculada con 80  $\mu$ l del cultivo de *Agrobacterium*. Dicho cultivo se inicia a una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0.2 en medio YEB con los antibióticos adecuados. Cuando llega a una DO<sub>600 nm</sub> de 0.8 se lava por centrifugación y se resuspende en el mismo volumen de medio YEB sin antibióticos, que es el que se utiliza para la inoculación.

Las placas se incuban durante 2 días en oscuridad, pero en las mismas condiciones de temperatura y humedad en la que van a crecer posteriormente. Después se pasan a medio de inducción de callos (MIC) manteniendo la posición de las hojas con el envés hacia abajo. Después de 7-8 días se pasan al medio de inducción de ramas (MIR). En este medio permanecerán hasta la aparición de callos y su desarrollo en hojas. El medio se refresca cada 8-10 días.

Cuando las ramas tienen entre 0,5 y 1 cm se transfieren al medio de enraizamiento que consiste en medio MS con 1,6% de glucosa, sin ninguna hormona, pero con kanamicina 50 mg/L y claforán 250 mg/L para evitar el crecimiento de *Agrobacterium*.

Después de enraizar y cuando las plantas han crecido, se corta el ápice y se transfiere a medio MS2 con kanamicina y claforán en las mismas concentraciones indicadas más arriba.

Para crecer las plantas en invernadero, plantas que llevan en medio MS2 entre 1 ó 2 semanas son transferidas a recipientes con una capacidad de 50 ml de sustrato. Las raíces se tapan con el sustrato, y la planta al completo se cubre con plástico para mantener alta la humedad, condición característica de crecimiento *in vitro*. Después de 3-4 días dicha cubierta se retira.

### 55 *Medio de inducción de callos (MIC)*

MS con 1.6% glucosa

60	NAA	5 mg/L
	BAP	0.1 mg/L
	Claforán	250 mg/L
65	Kanamicina	50 mg/L
	Plant Agar Duchefa	5.5 g/L

## ES 2 371 316 A1

### *Medio de inducción de ramas (MIR)*

MS con 1.6% glucosa

5	Zeatinriboside	2 mg/l
	NAA	0.02 mg/l
	GA <sub>3</sub>	0.02 mg/l
10	Claforán	250 mg/l
	Kanamicina	50 mg/l
15	Plant Agar Duchefa	5.5 g/l

### *Caracterización de las líneas RNAi 35S::StBRC1L1 y 35S::StBRC2L2*

20 En patata existen varios tipos de yemas axilares: las yemas aéreas que dan lugar a las ramas, y las yemas subterráneas que dan lugar a estolones, tallos subterráneos que tuberizan dando lugar a los tubérculos. Las yemas axilares de los estolones que quedan incluidas en tubérculos son los ojos de los tubérculos.

25 Los resultados muestran que, en patata, *StBRC1L1* se expresa a niveles más altos en las yemas de los estolones que en las yemas aéreas, mientras que *StBRC1L2* muestra un patrón de expresión inverso (Fig. 3). Esto podría revelar la especialización de cada ortólogo de *BRC1* en el control de diferentes tipos de yemas.

30 El fenotipo de la falta de función de *StBRC1L1* apoya su papel en la supresión de la elongación y ramificación de los estolones. Se generaron siete líneas transgénicas de 35S::RNAiStBRC1L1 de patata variedad Desiree, y se analizaron durante dos generaciones.

StBRC1L1 afecta tanto al desarrollo de las ramas aéreas, como al de los estolones ya que las líneas silenciadas tienen un mayor número de ramas laterales, estolones aéreos y estolones subterráneos (Fig. 4 y 5).

35 Los estolones subterráneos (que dan lugar a los tubérculos) están ramificados, a diferencia de los estolones silvestres que muestran una fuerte dominancia apical (Fig. 5). El tiempo de tuberización no se ve afectado en estas líneas. Dado que cada extremo del estolón normalmente da lugar a un tubérculo, el elevado número de estolones ramificados, hace que cada planta genere un mayor número de tubérculos que las plantas silvestres (Fig. 6A y 6B, 64-276,9% más que los controles). En las condiciones experimentales en las que se crecieron las plantas (tiestos de 20 cm de diámetro) se produce un incremento moderado del rendimiento (17-19%) del peso total de los tubérculos (Figura 6C). Es muy probable que en condiciones óptimas el rendimiento sea mayor respecto de las plantas silvestres. Además las líneas son bastante vigorosas y tienen la senescencia retrasada.

45

50

55

60

65

# ES 2 371 316 A1

## REIVINDICACIONES

5 1. Polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 95% con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.

2. Polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 99% con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.

10 3. Polinucleótido de ARN o ADN aislado según la reivindicación anterior, capaz de traducirse a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.

4. Construcción genética de ADN o ARN, que comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:

15 a. secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*, o

20 b. secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.

25 5. Construcción genética según la reivindicación 4, donde el promotor es un polinucleótido de ARN o ADN aislado, capaz de dirigir la expresión de un gen de interés en los meristemos axilares de una planta que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 5 seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

a. al menos un 95%, o

30 b. al menos un 99%.

35 6. Construcción genética según la reivindicación 4, donde el promotor es un polinucleótido de ARN o ADN aislado, capaz de dirigir la expresión de un gen de interés en los meristemos axilares de una planta que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 6 seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

a. al menos un 95%, o

40 b. al menos un 99%.

7. Construcción genética según la reivindicación 4, donde el promotor es un polinucleótido de ARN o ADN aislado, capaz de dirigir la expresión de un gen de interés en los meristemos axilares de una planta, que se selecciona de la lista que comprende:

45 a. SEQ ID NO: 5, 6

b. SEQ ID NO: 6.

50 8. Uso de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o de una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, para modificar la arquitectura de una planta.

9. Método para modificar la arquitectura vegetal de una planta que comprende:

55 a. transfectar un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en una célula o cultivo de células vegetales hospedantes,

60 b. crecer la célula o el cultivo de células vegetales hospedantes en un medio adecuado, hasta regenerar una planta completa.

10. Método para expresar un gen de interés en los meristemos axilares de una planta que comprende:

65 a. transfectar un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en una célula o cultivo de células vegetales hospedantes,

## ES 2 371 316 A1

- b. crecer la célula o el cultivo de células vegetales hospedantes en un medio adecuado, hasta regenerar una planta completa.

5 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, donde la célula transfectada puede clasificarse taxonómicamente como perteneciente a la especie *Solanum tuberosum*.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, donde la célula transfectada puede clasificarse taxonómicamente como perteneciente a la especie *Solanum lycopersicum*.

10 13. Agente modulador de la expresión de los genes *StBRCIL1* o de los polinucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que se selecciona de la lista que comprende:

15 a. un oligonucleótido antisentido,

b. un RNA interferente, ó

c. un anticuerpo, (o fragmento del mismo).

20 14. Agente modulador según la reivindicación 13, que consiste en un polinucleótido de ADN o ARN aislado que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 13.

25 15. Construcción genética que comprende un polinucleótido aislado según la reivindicación 14.

16. Composición que comprende un agente modulador según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, o una construcción genética según la reivindicación 15.

30 17. Uso de un agente modulador según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, una construcción genética según la reivindicación 15, o de una composición según la reivindicación 16, para modificar la arquitectura de una planta.

18. Semilla cuyo material genético integra el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 ó 14, o la construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 4-7 ó 15.

35 19. Célula vegetal cuyo material genético integra el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 ó 14, o la construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 4-7 ó 15.

20. Cultivo de células vegetales según la reivindicación 19.

40 21. Planta que comprende células según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20 y/o obtenida tras el crecimiento de la semilla según la reivindicación 18.

22. Grano de polen cuyo material genético es un derivado del material genético de una célula según cualquiera de las reivindicaciones 19-20.

45 23. Semilla según la reivindicación 18, célula vegetal según la reivindicación 19, cultivo de células vegetales según la reivindicación 20, planta según la reivindicación 21, o grano de polen según la reivindicación 22, que puede clasificarse taxonómicamente como perteneciente a la familia *Solanaceae*.

50 24. Semilla según la reivindicación 18, célula vegetal según la reivindicación 19, cultivo de células vegetales según la reivindicación 20, planta según la reivindicación 21, o grano de polen según la reivindicación 22, que puede clasificarse taxonómicamente como perteneciente a la especie *Solanum tuberosum*.

55 25. Semilla según la reivindicación 18, célula vegetal según la reivindicación 19, cultivo de células vegetales según la reivindicación 20, planta según la reivindicación 21, o grano de polen según la reivindicación 22, que puede clasificarse taxonómicamente como perteneciente a la especie *Solanum lycopersicum*.

26. Grupo de células según la reivindicación 19, que forman los tubérculos ó minitubérculos.

60 27. Planta, fruto, semilla, célula, grupo de células o partes de la planta de patata, que presentan una arquitectura vegetal modificada con respecto a una planta tipo control, donde la modificación de la arquitectura vegetal se debe a mutaciones no transgénicas en los genes *StBRCIL1* de patata.

65 28. Método para obtener plantas de patata con arquitectura vegetal modificada, en comparación con una planta silvestre control, que comprende:

a. obtener material vegetal de una planta (parental) de patata,

## ES 2 371 316 A1

- b. someter a un proceso de mutagénesis el material vegetal del paso (a),
- c. cultivar el material vegetal mutado hasta regenerar una planta completa, y su descendencia,
- 5 d. analizar la descendencia de las plantas del paso (c) para detectar al menos una mutación en al menos una copia los genes *StBRCIL1* y *StBRCIL2*,
- e. seleccionar los descendientes con al menos una mutación en al menos una copia de los genes *StBRCIL1* y *StBRCIL2* que presenten su arquitectura vegetal modificada en comparación con una planta tipo control,
- 10 f. opcionalmente, cultivar la planta seleccionada para obtener descendencia que presente dicha modificación de la arquitectura vegetal.

15 29. Método según de la reivindicación 28, donde el proceso de mutagénesis del paso (b) se realiza con mutágenos químicos.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



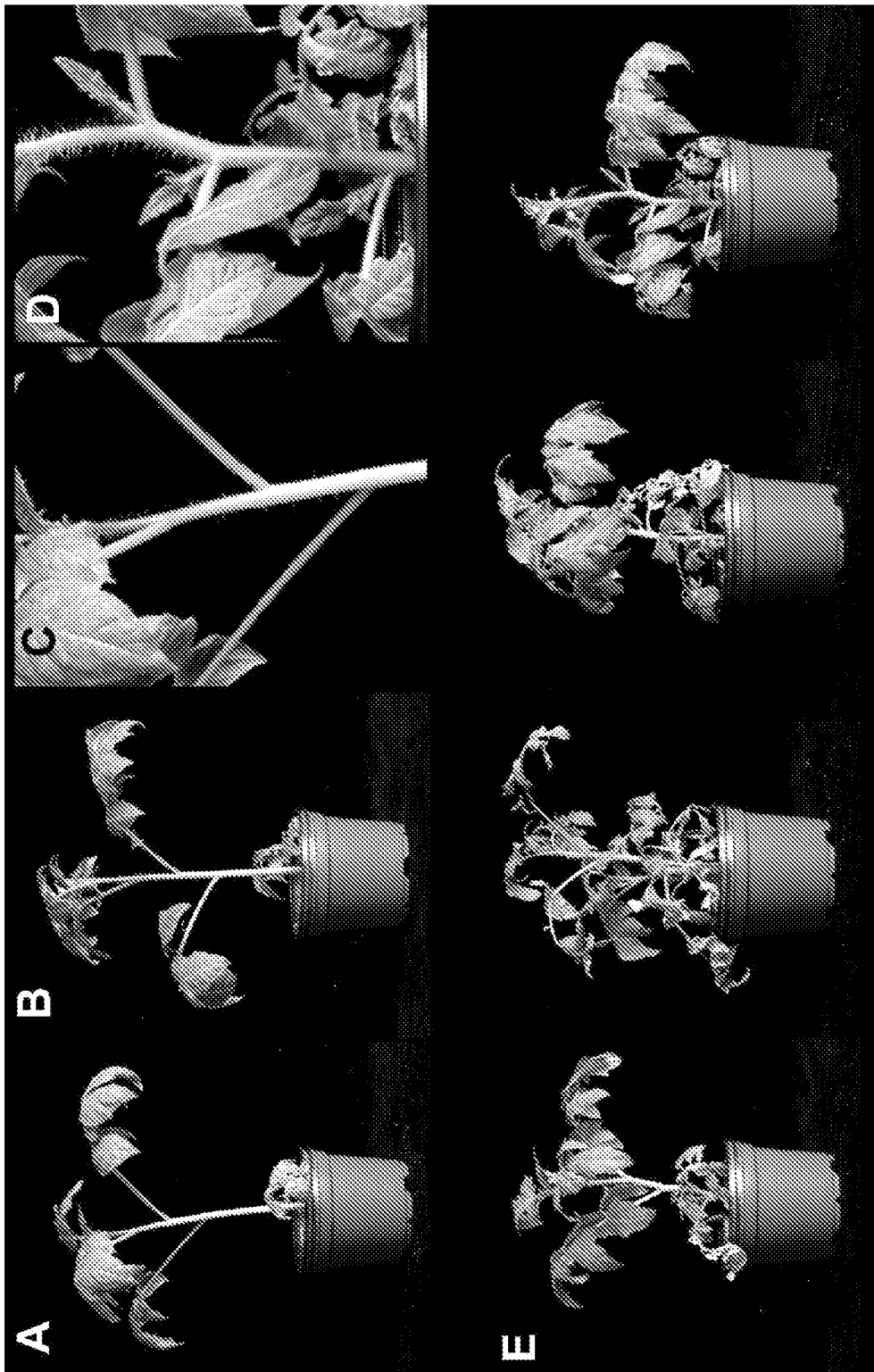
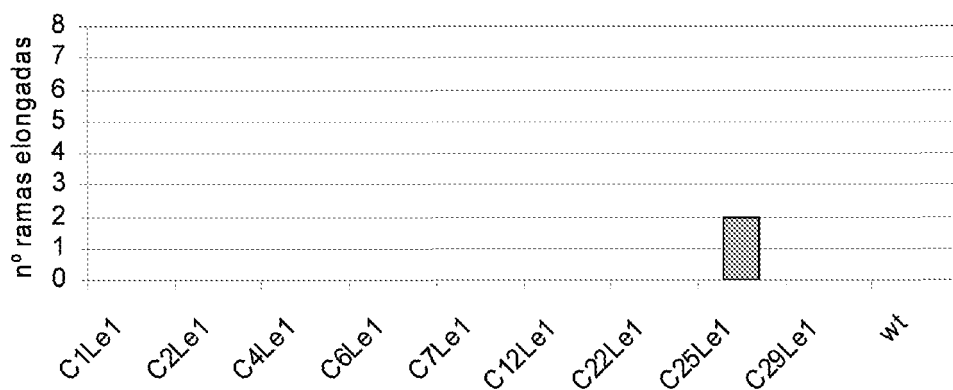
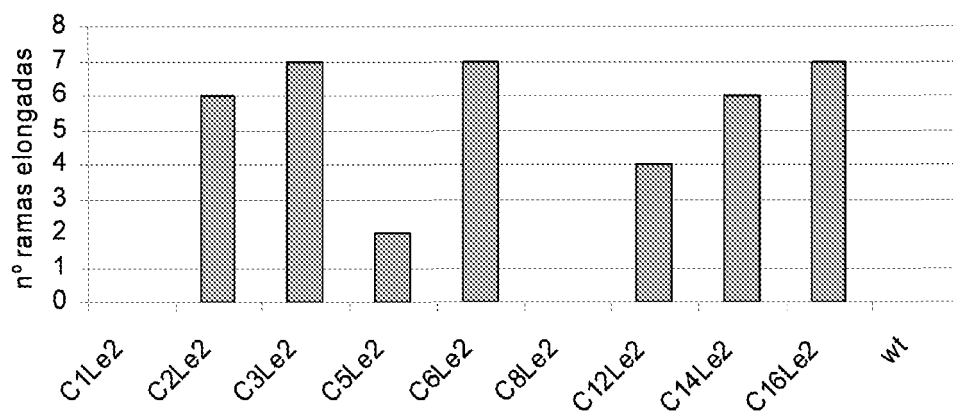


FIG.1

**A**



**B**



**FIG.2**

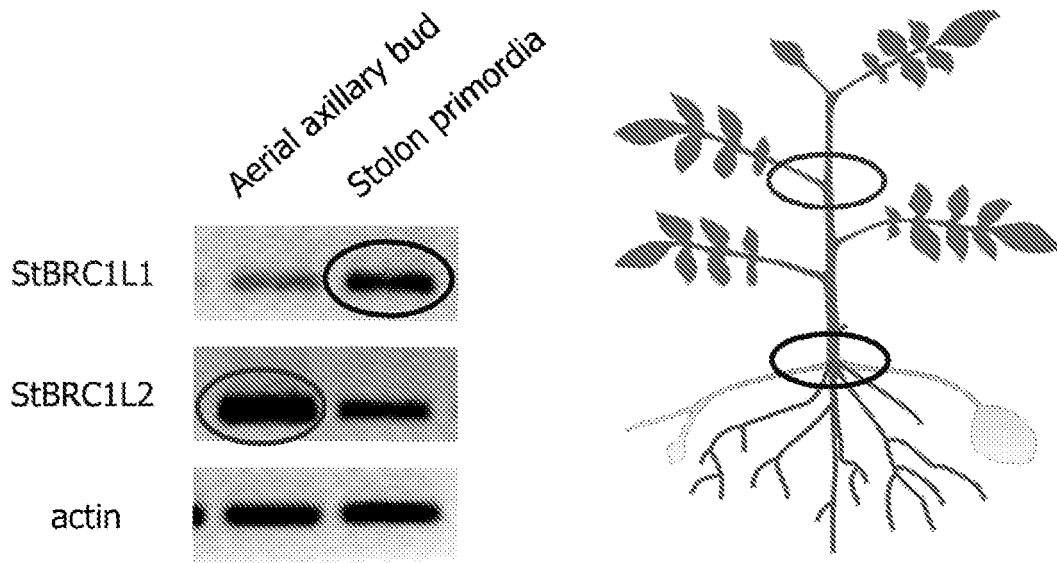


FIG.3

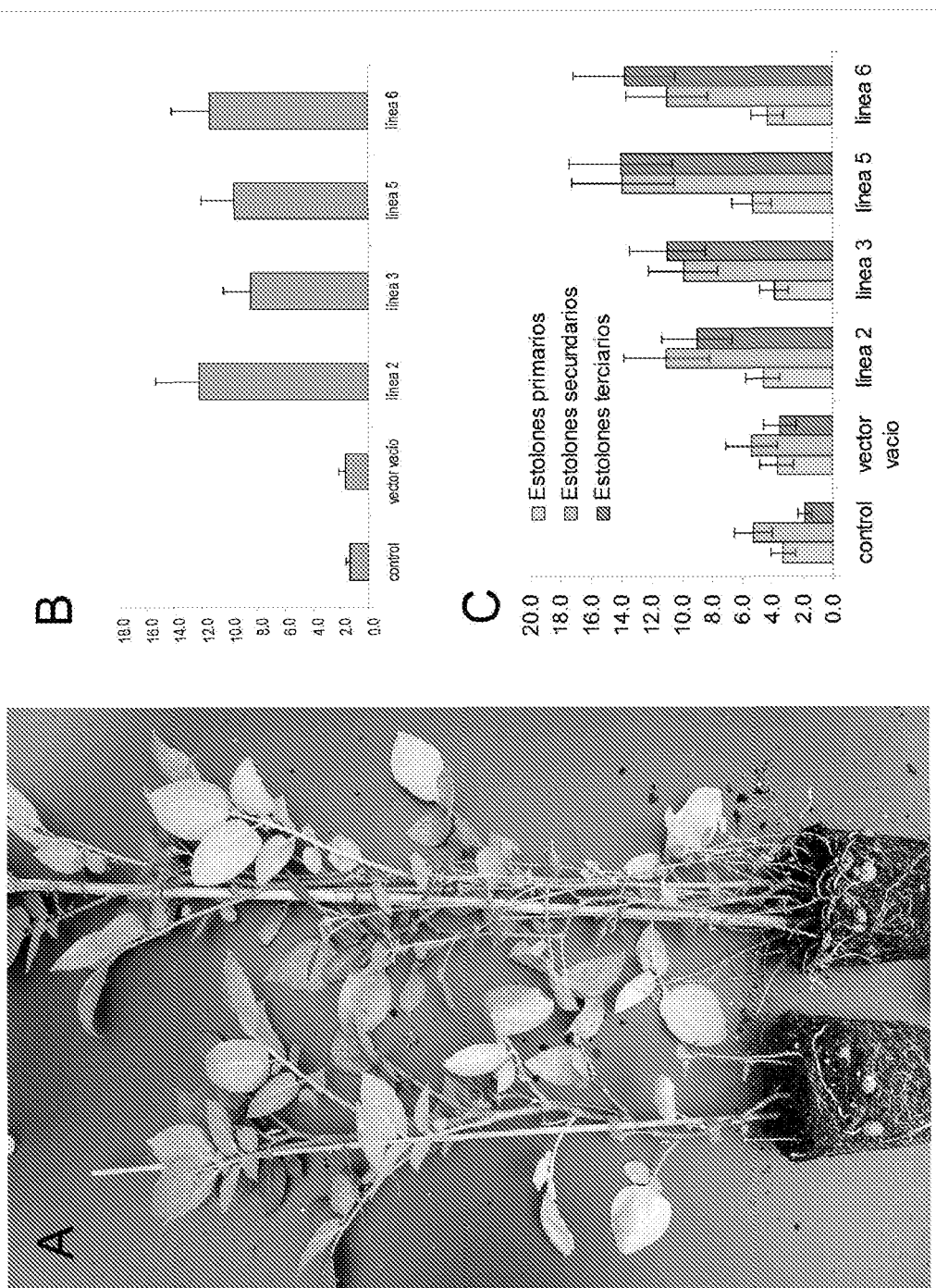


FIG.4

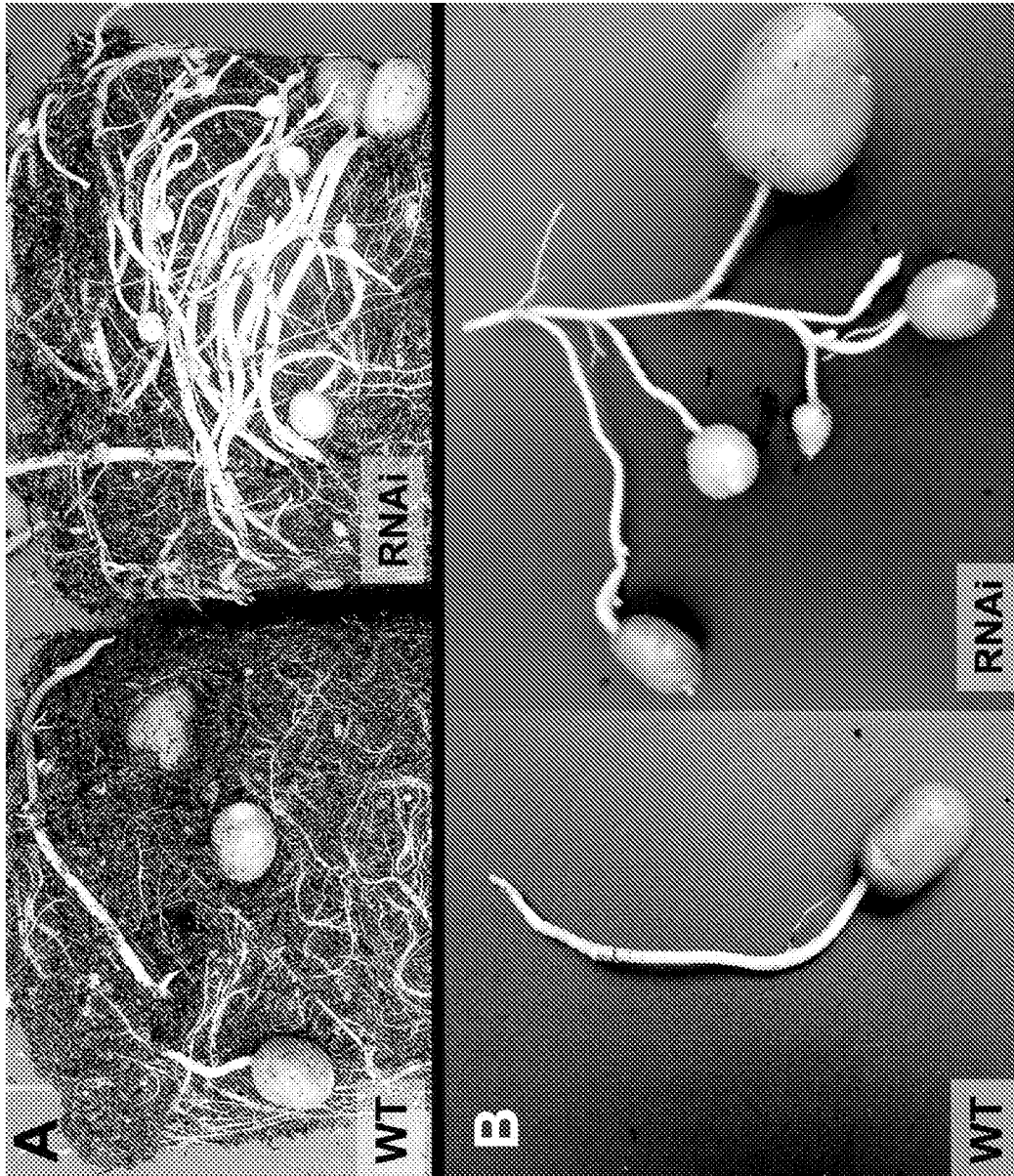


FIG.5

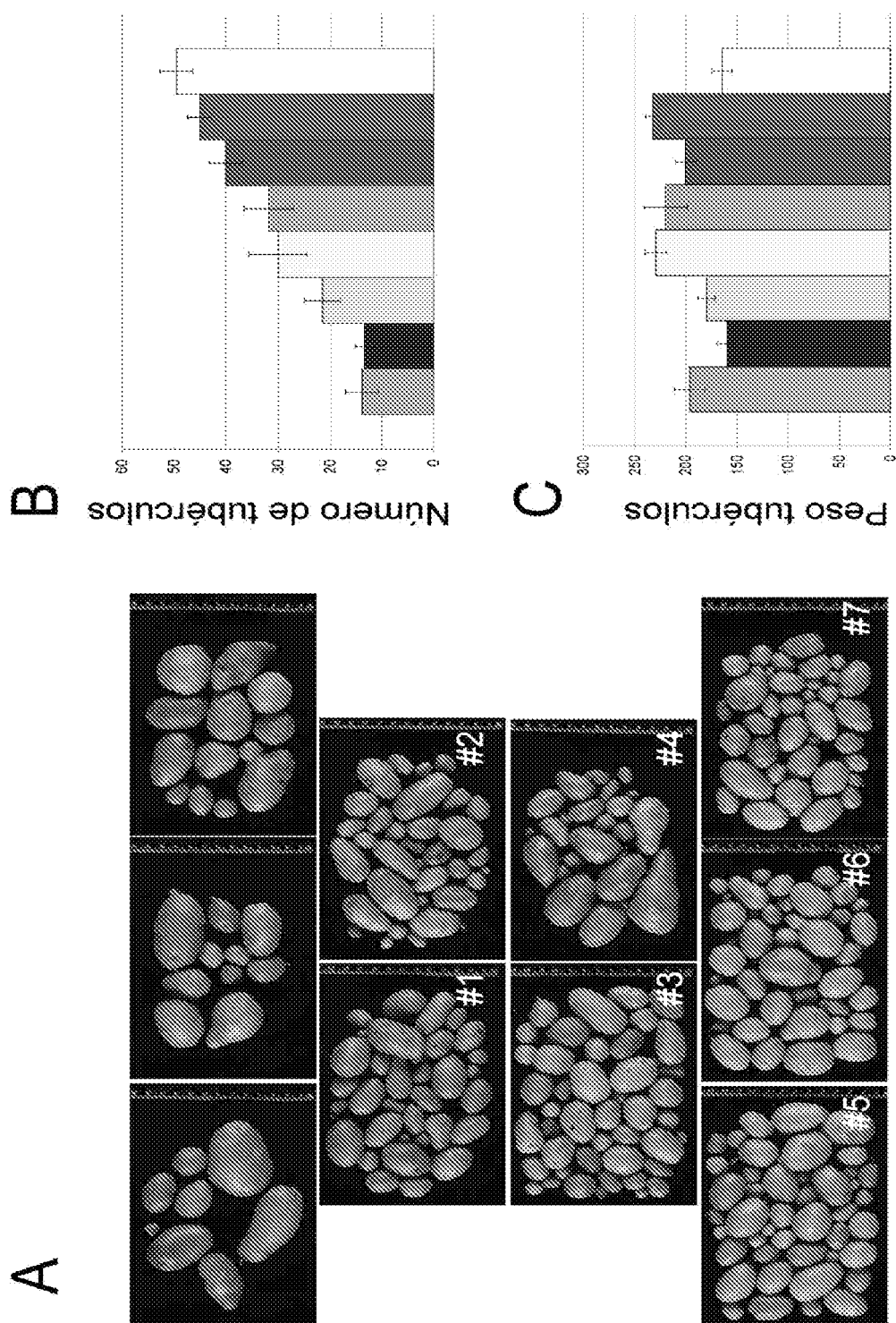


FIG.6

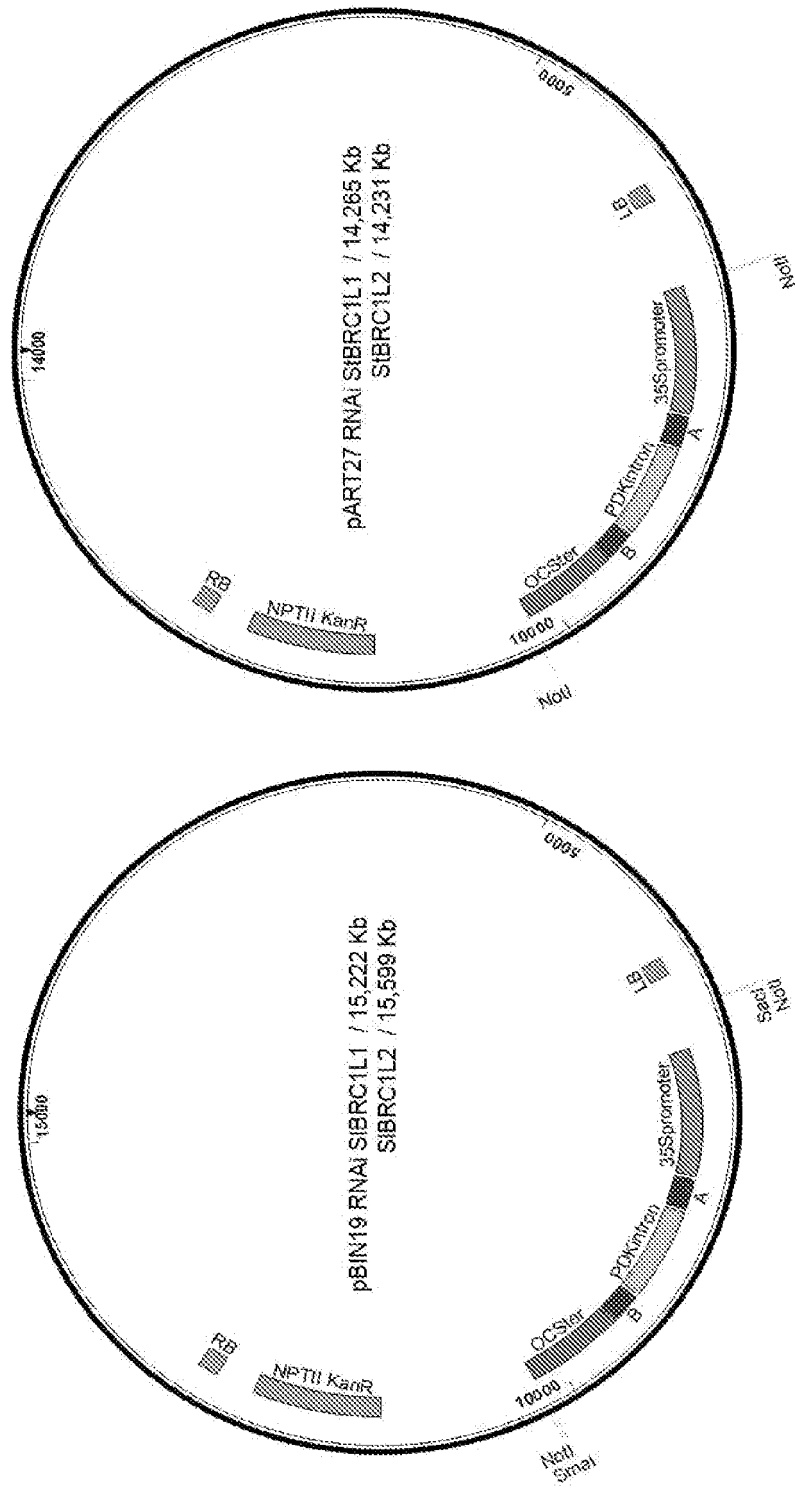


FIG.7

# ES 2 371 316 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de investigaciones Científicas (CSIC)

5 <120> Gen regulador de la ramificación de plantas, promotores, construcciones genéticas que lo contienen y usos

<130> ES1641.344 Bis

10 <160> 52

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 346

<212> PRT

20 <213> *Solanum lycopersicum*

<400> 1

25 Met Tyr Pro Ser Ser Asn Tyr Ser Pro Asn Ile Ser Ser Ser Ser Ser  
1 5 10 15

Phe Phe His Ile Asn Ile Pro Ser Pro Ser Met Gln Tyr Glu Pro Glu  
20 25 30

Phe Ile Gln Tyr Phe His Asp Phe Gln Phe Ile Gln Pro Ser Tyr Asp  
35 40 45

Gln Asn Thr Asn Ile Pro Ala Glu Glu Ala Ala Asp Ser Asp Lys Leu  
50 55 60

Asp Lys Ile Glu Glu Asp Gln Ser Ile Ile Lys Ser Cys Asn Asn Asn  
65 70 75 80

Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ile Arg Arg Lys  
85 90 95

Asn Asn Lys Arg Thr Thr Ser Gly Ser Ala Gly Val Gly Pro Ser Lys  
100 105 110

Lys Asp Arg His Ser Lys Ile Asn Thr Ala His Gly Pro Arg Asp Arg  
115 120 125

Arg Met Arg Leu Ser Leu Glu Ile Ala Arg Lys Phe Phe Asn Leu Gln  
130 135 140

Asp Leu Leu Gly Phe Asp Lys Ala Ser Lys Thr Val Glu Trp Leu Leu  
145 150 155 160

Thr Lys Ser Lys Ser Ala Val Asn Asp Leu Val Gln Lys Ile Asn Lys  
165 170 175

65 Asp Lys Cys Ser Gly Ser Glu Asn Pro Asn Ile Ala Thr Val Ser Ser  
180 185 190





# ES 2 371 316 A1

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

Gly

65 <210> 3  
<211> 353

# ES 2 371 316 A1

<212> PRT

<213> *Solanum tuberosum*

5 <400> 3

5	Met	Tyr	Pro	Ser	Ser	Pro	Asn	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Phe	Phe	His
	1				5					10					15	
10	Ile	Asn	Ile	Pro	Ser	Pro	Ser	Met	Gln	Tyr	Glu	Pro	Glu	Phe	Ile	Gln
				20					25					30		
15	Tyr	Phe	His	Asp	Phe	Gln	Phe	Ile	Gln	Pro	Ala	Ala	Tyr	Asp	Gln	Asn
			35					40					45			
20	Asn	Leu	Asp	Thr	Asn	Ile	Thr	Ala	Glu	Glu	Ala	Asp	His	Lys	Met	Glu
		50					55					60				
25	Glu	Asp	Glu	Leu	Ile	Met	Lys	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Lys	Asp	Glu	Ser
	65				70						75					80
30	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Ile	Arg	Arg	Lys	Asn	Asn	Lys	Arg	Thr	Thr
					85					90					95	
35	Ser	Gly	Thr	Gly	Val	Gly	Pro	Ser	Lys	Lys	Asp	Arg	His	Ser	Lys	Ile
				100					105					110		
40	Asn	Thr	Ala	His	Gly	Pro	Arg	Asp	Arg	Arg	Met	Arg	Leu	Ser	Leu	Glu
			115					120					125			
45	Ile	Ala	Arg	Lys	Phe	Phe	Asn	Leu	Gln	Asp	Leu	Leu	Gly	Phe	Asp	Lys
		130					135					140				
50	Ala	Ser	Lys	Thr	Val	Glu	Trp	Leu	Leu	Thr	Lys	Ser	Lys	Ser	Ala	Val
	145					150					155					160
55	Asn	Asp	Leu	Val	Gln	Lys	Ile	Asn	Lys	Gly	Lys	Cys	Ser	Ala	Ser	Thr
				165						170					175	
60	Asn	Pro	Asn	Ile	Gly	Val	Val	Ser	Ser	Pro	Ser	Glu	Ser	Cys	Glu	Val
				180					185					190		
65	Ile	Ser	Gly	Val	Ile	Asp	Glu	Ser	Ala	Ala	Thr	Asn	Asn	Thr	His	Lys
			195					200					205			
70	Gln	Gln	Lys	Lys	Lys	Lys	Ser	Ile	Arg	Arg	Ala	Ile	Phe	His	Pro	Val
		210					215					220				
75	Val	Ala	Lys	Glu	Ser	Arg	Lys	Glu	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Arg	Glu	Arg
	225					230					235					240
80	Thr	Lys	Ile	Lys	Lys	Ser	Leu	Asn	Asn	Asn	Asn	Gly	Asp	Gln	Ser	Met
				245						250					255	



# ES 2 371 316 A1

	100	105	110
5	Lys Asn Asn 115	Lys Arg Ser Ser 120	Asp Arg His Ser 125
10	Thr Ala 130	Arg Gly Pro Arg 135	Arg Arg Met Arg 140
15	Ala Arg Lys Phe Phe 145	Arg Leu Gln Asp 150	Leu Leu Gly Phe Asp 155
20	Ser Lys Thr Val 165	Glu Trp Leu Leu 170	Thr Gln Ser Asp 175
25	Glu Leu Val 180	Ala Val Lys Gly 185	Asn Asp Ala Gln 190
30	Ser Cys Asn 195	Thr Pro Thr Thr 200	Thr Gly Ile Gly 205
35	Ser Asn Ser 210	Ile Ser Glu Ser 215	Cys Glu Val Ile 220
40	Thr Ser Ser 225	Asn Asp Lys Asn 230	Lys Glu Thr Thr 235
45	Glu Lys Lys Lys 245	Pro Val Asn Thr 250	Ala Arg Arg Pro 255
50	Pro Leu Thr 260	Lys Glu Ser Arg 265	Asn Gln Ala Arg 270
55	Arg Thr Lys 275	Thr Lys Lys Met 280	Ser Gln Val Gly 285
60	Ala His Asp 290	Leu Asn Pro Ser 295	Gly Ser Arg Arg 300
65	Cys Glu Glu Pro 305	Gly Thr His Glu 310	Gln His Thr Phe 315
70	Asp Ser Ser Phe 325	Val Val Asn Gly 330	Asn Trp Asn Pro 335
75	Thr Ser His 340	Glu Gln Tyr Ala 345	Gly Ile Ser Asn 350
80	Thr Asp Leu 355	Gln Phe Tyr Gly 360	Lys Leu Trp Glu 365

<210> 5

<211> 1723

## ES 2 371 316 A1

<212> DNA

<213> *Solanum lycopersicum*

5 <400> 5

	agtctgaacc cttttcacct caactgtggg aagcaggaag aattcaccaa aactttaata	60
10	acatattcag taaaaatfff tataatgcgt ctaagaaaag taaaatgtac gtagaattta	120
	tcctgcctcg taaaaataaa gattgtatct aaaaaaaacc tcgactcaaa taatacatat	180
	taacaaaatt acaaattaac tatcactcaa cccaatatt tacttcaagt tgtagggat	240
15	cacttaaggg cttttctfff tctcctfff tttttttfff ttggagaaga tgaaggtgaa	300
	agagatggg gatgatggag ctaggaaaga ggagattgaa gggatffff tttgtcaaag	360
	tatgtgtcag ttgctatcac gtgaacttga aactaagggg caccattaga gaagacttta	420
20	gctataatat acattcattt ctataaaaaa aaatcacmac ataaacatgc ctttttttaa	480
	cttagcttta atatatcttt taaatttgat tatgcagaaa tagatattta aatttatata	540
	aaatttaaaa agtctatcta acaatgttgt gtcctacata tattatatct ggtatgatat	600
25	atatgtgtta cttgtttaat tttatataaa tttaaatatt ttttatgca aattcaaaat	660
	taagagatat aaatatcaag ctaaatcgaa gttcaatgaa atatatatat ataattatgc	720
30	caatataaaa tcagtgtaac tatacaacaa gtactatagt gtcccctcca ctcttttttt	780
	ctcaaattcc ctttcatact ttaaaactccc acatgagcta gctagagaag tctttttttt	840
	ttttaagat tcgkggtggt tacatcaatt taaacatatt ttgactaatt tcatagaata	900
35	tttatcatct cttattaata acatgtgtca tattcataaa tgaatagaaa ttactaaata	960
	cagtagtact ycttttaatt tttttctaata aaaatttaaa cgtgaaacct catgattcct	1020
40	aattatccac ttcagtaacc atcgactcac accaaccctt tggtgcaagc gaagccttct	1080
	ttatctttat agcagatagg ggtcctttga aaagatggaa gtacaattac acctctcttt	1140
	gtccccttgc aggtaataac ataacatgac ttttctttat cttcatcttt ctttctttgt	1200
45	caacaagaac atacaccacc atgaatgtct ctcccattag ctaatatatt ccagctaact	1260
	agcttaaata tatagtgcta atacytgac gaacacaaaa atagccacta atatacacct	1320
50	atacctagct attattatta ttatcataat taagcacwca ccaagcaaca tacatgtaaa	1380
	gccacatatt tttaatcacc tgtctttctc aacaaaaaag ctatattatc atcattatat	1440
	tgaaaaaaaa attaaaaata accacatatc ctttcccact ttctctatgt gctatctttg	1500
55	tattcaaaat ttatatatcc aagagaatta tgaagagtct ctctcaaaaa aagttttaat	1560
	taatttataa cttttctfff tttcctactt tttgttgatg cagctaggta gctagattat	1620
	taaaagtgtc aaactgaaga agctgatggt tgtggttatt tcaacttcaa tacaagtgtg	1680
60	ctaggttgtc cttatcaacc agtttctfff ttttttttta aag	1723

<210> 6

<211> 665

65 <212> DNA

<213> *Solanum lycopersicum*

## ES 2 371 316 A1

<400> 6

	tcacatgaag	gggcacgata	acaagttggt	cgtatccatc	cattcacttc	caacaatacc	60
5	gctacgtacc	actacctgct	tccttcctat	ccccagtctt	tgtcaaactt	cctttccctt	120
	tccaattact	ttttctttaa	tagagatggt	tgtttccttt	tcccttcccc	ccatattctt	180
	cccttttttt	tttatctctc	tttcacaata	gtagcaccat	gcctgtagct	ttgatgctta	240
10	gacgggcgca	cgcgcacgcy	cactcacaca	actagaatag	aatcactctc	tctatatatt	300
	catagttatc	aaaactactt	atcatatacc	aaaaaaaaacc	actgtcattc	tcaagcaaat	360
15	aatatTTTTT	ttaaaaaaga	agaactacat	atatatatat	agtactacta	ctatTTTcat	420
	catcactttg	gtcaatccat	acagttctaa	gtagtcattg	cttcctctgt	caaattactg	480
	tatacagtac	attgaactag	ctaggggaaa	attaatctac	taactctaata	ttgtttgTTT	540
20	aattctcttc	ttattgcagc	tagatTTTgcc	taattagcag	aaaaaccaa	agctgtgTTC	600
	atactgtctt	tctcaagatc	tagaccacc	atatagaccy	cctcaactac	agctactcca	660
	caaga						665

25 <210> 7

<211> 1133

<212> DNA

30 <213> *Solanum lycopersicum*

<400> 7

	atgtaccctt	cgagcaatta	cagccccaat	atTTccagct	cttcatcttt	ctttcacatt	60
35	aatattccat	ctccttctat	gcaatatgaa	cccgaattca	tccaatattt	ccatgatttt	120
	caattcatcc	aacctagtta	cgatcagaat	accaatattc	ctgcagaaga	agctgctgat	180
40	tCGgacaaac	tagataaaat	agaagaagat	caatcaatca	taaaaagctg	caataataac	240
	aagaaggatg	agaagagtag	tagcagtact	agtactattc	gtagaaaaaa	caacaagaga	300
	actacgagtg	gtagtgctgg	tgtaggacct	tCGaagaaag	atagacacag	caaaatcaac	360
45	acggcacatg	gccaagaga	ccgaagaatg	agactatcac	ttgaaattgc	tCGcaaattc	420
	ttcaatttgc	aagacttgct	tgggttcgat	aaagccagca	aaactgtaga	atggctactc	480
50	acaaagtcaa	aatcagcggT	gaacgatctg	gttcagaaaa	ttaacaaaga	caaatgcagc	540
	ggtagtgaaa	atcctaatat	tgctactgta	tcatctcctt	ccgccgaatc	atgtgaagtt	600
	atcgacgaat	cagctgcaac	taatacagca	gaaactcaga	agcaacagaa	gaaaaaagtt	660
55	aagtcgattc	gtagggcaat	aattcatcca	gttgTTgcaa	aggaatcaag	gaaagaagca	720
	agagcaaggg	caagggaaag	aacaataata	aagaaaagcc	taaatgataa	cacgaataat	780
60	aataataatg	gtgatcaatc	tatggctgat	gaggatttaa	caagatcatt	aagatcttgg	840
	aatactacat	ttgaagatca	tcaatcaggt	attcaaggct	ataataataa	taataatag	900
	aatgttTgtg	ataactTTaa	tttggtggat	actagcaatt	ggagccatt	tatgttcaac	960
65	tatcacaaa	tcaatactga	aatttctcaa	gaggTatgta	ctaattTaat	taataaatta	1020
	TTTTTctat	tattattatt	aaccgatcg	ccaagtattt	atTTtatattt	ttgtgttgca	1080

## ES 2 371 316 A1

gcatcaatth gcgaacttcc agtattctgg gaagttatgg gaagcttaat tag

1133

<210> 8

5 <211> 1124

<212> DNA

<213> *Solanum lycopersicum*

10 <400> 8

	atgcaatatg	aacacgaact	atactttcaa	agctttaatc	atgataacca	atattattht	60
	caacaacagc	aactagttcc	ctcgatagat	gatttgagtc	ctcacatctt	agctgacagc	120
15	tgcaccgaga	ttattactaa	gccttcgaat	tgcaaccacg	aactacaagg	aatggaagaa	180
	ggccgaggcg	aaaagaaagg	agatgatgat	gttatgagta	gcagaattag	tggacggatc	240
	tcaaaaaata	ataagagatc	ttccaataaa	gatcgacaca	gcaagatcaa	caccgctcgt	300
20	ggtccaagag	atcgaaggat	gagactttca	cttgatgctg	ctcgcaagtt	tttccgthtg	360
	caggacttat	tgggattcga	taaggccagc	aaaactgthg	aatggthgct	tactcaatcg	420
25	gattctgcaa	ttgaagagct	tgttgccgct	aaaggcaatg	atgcacaggt	tgctcagcaa	480
	actagctgca	ataccccac	tactactact	ggaattgthg	caattthgth	atctaattct	540
	atthctgagth	cgthgthgagth	tatahcagga	actgathgaaa	ctthctctaa	tgacaaaaac	600
30	aaggaaaccg	ctcaagatga	ggagaagaag	aaaaggaa	aggtgthtaa	cacagctcgt	660
	agagctgthgth	tagaacctct	tacgaaggaa	tcgaggaatc	aagcaagagc	cagggctaga	720
	gagagaacaa	aatcaagaa	aatgagccaa	actggaaaat	ccaaatccct	agctaatgat	780
35	ttgaaccctt	caggatctcg	gaggccgthgct	aataaaactth	gthgagaacc	tggaacacat	840
	gaagaactca	actthcatca	agagaagaac	actgthcgatg	actgthaatth	tatgthtaaat	900
40	ggaaattgga	atccatthac	aatctthtagc	tatcatgagc	aatacgctgg	aatthccaac	960
	gagthgaggg	thtcagactth	tgtthththtag	ggctthcaata	atthgaacca	catatthctth	1020
	thcatthctthg	atthattatth	thththtaaaa	aaaaaatthct	tgtthctctthg	cagcatcaat	1080
45	tggthtacaga	ctthgcaatth	tgtggaaagc	tatgggaagg	ctag		1124

<210> 9

50 <211> 1059

<212> DNA

<213> *Solanum tuberosum*

55 <400> 9

	atgtaccctth	cgagcccaaa	tattthccagc	tctthcatctth	tctthcacat	taatattcca	60
	tctctthctaa	tgcaatatga	accggaatth	atccaatatt	tccatgactth	tcaatthcatc	120
60	caacctgctg	cttacgatca	gaataatthg	gataccaata	ttacggcaga	agaagctgat	180
	cataagatgg	aagaagatga	atthgatcatg	aaaagctgca	agaacaagaa	ggatgagagth	240
	actagthacca	ctactactat	tcgthaggaaa	aacaacaaga	gaactacgag	tggthactgthg	300
65	gthaggacctth	cgaagaaaga	thgacacagc	aaaataaaca	cggcacatgg	cccaagagac	360
	cgaagaatga	gactthctact	tgaatthgct	agaaaatthct	tcaatthgca	agactthgctth	420



## ES 2 371 316 A1

	gggttcgata aggctagcaa aactgtagaa tggctactca caaagtcaaa atcagctgta	480
	aacgatctcg ttcagaaaat taacaaagga aaatgcagcg ctagtacaaa tcctaataatt	540
5	ggtgttgtat catctccctc cgagtcatgt gaagtcatat ctggagtaat cgacgaatca	600
	gcagcaacta ataatactca caagcaacag aagaaaaaaaa agtcgattcg tagggcaata	660
10	tttcatccag ttgttgcaaa ggaatcaagg aaagaagcaa gggcaagggc aagggaaaga	720
	acaaaaataa agaaaagcct aaataataat aatggtgatc aatccatggc gcctgatgag	780
	gatttaacaa gatcattagg atcttgagat actacatttg aagatcatca atcaggtatt	840
15	caagcctata ataatactaa caatattatg aatgctgttg ataactttaa tttggtggat	900
	actagcaatt ggagcccatt tatgttcaac taccaccaa tcaatactga aatttctcag	960
20	gaggtatgta ttaacttaat tagattatta ttattattat tattaatccg atcgccaata	1020
	tatttatttt tatttttatt cttctgttgc agcatcaat	1059
	<p>&lt;210&gt; 10            &lt;211&gt; 1092            &lt;212&gt; DNA            &lt;213&gt; <i>Solanum tuberosum</i></p>	
30	<400> 10	
	atgtatcctc caagcaacaa taactgcaac tacagcccaa ttttgtcttc tttcatatgc	60
35	caaaatattc catcttctcc ttgtatgcaa tatgaacacg aactatactt tcaaaacttc	120
	aatcatgatg accaatatta ttttcaacta cagcaacaag ttcccttgat agatgacttg	180
40	agtcctcacg tcttagctga cagctgcact gagactgtta ctaagccttc aaattgcaat	240
	cacgtactag aaggaatgga agaaggccga ggcggaaaca aaggagatga tgttggtatg	300
	agtagcagaa ttagtattat tagtggacgg atctcgaaaa acaataagag atcttccaat	360
45	aaggatcgac acagcaagat caacacggct cgtggtccaa gagatcgaag gatgagactt	420
	tcacttgatg ctgctcgcaa gtttttccgt ttgcaggact tgttgggatt tgataaggcc	480
	agcaaaactg tagaatgggt gcttactcaa tcrgattccg caattgaaga gctcgtcgcc	540
50	gttaaaggca atgatgctca ggttcctcag caaactagct gcaatacccc cactactact	600
	actggaattg gtgcaatttg tgcattctaat tctatttctg agtcatgtga agttatatca	660
	ggaactgatg aaacttcctc taatgacaaa aacaaggaaa ctactgctaa agatgagaag	720
55	gagaaaaaga agaagccggt taacacagct cgtagacctg cgtttgaacc tcttacaag	780
	gaatcaagga atcaagcaag agccagggct agagagagaa caaaaacaaa gaaatgagc	840
60	caagttgga aatccaaatc cccagctcat gatttgaacc cttcaggatc tcggaggccg	900
	gctaatagaa cttgtgaaga acctggaaca catgaacaac acaccttcca tcatgttgat	960
	gacagtagtt ttgtggttaa tggaaattgg aatccattta caatcttcac ttctcatgaa	1020
65	caatatgctg gaatttccaa tgagcatcaa ttagttacag acttgcaatt ttatggaaag	1080
	ctgtgggaaa gc	1092

## ES 2 371 316 A1

<210> 11  
 <211> 225  
 <212> DNA  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> RNAi para el gen SIBRC1L1  
 10  
 <400> 11  
  
 tggctactca caaagtcaaa atcagcgggtg aacgatctgg ttcagaaaat taacaaagac 60  
 15 aaatgcagcg gtagtgaaaa tcctaataatt gctactgtat catctccttc cgccgaatca 120  
 tgtgaagtta tcgacgaatc agctgcaact aatacagcag aaactcagaa gcaacagaag 180  
 20 aaaaaagtta agtcgattcg tagggcaata attcatccag ttggt 225  
  
 <210> 12  
 <211> 415  
 25 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 30 <223> RNAi para el gen SIBRC1L2  
  
 <400> 12  
  
 35 caacaccgct cgtggtccaa gagatcgaag gatgagactt tcacttgatg ctgctcgcga 60  
 gtttttccgt ttgaggact tattgggatt cgataaggcc agcaaaactg ttgaatgggt 120  
 gcttactcaa tcggattctg caattgaaga gcttggtgcc gctaaaggca atgatgcaca 180  
 40 ggttgctcag caaactagct gcaatacccc cactactact actggaattg gtgcaatttg 240  
 tgcatctaatt tctatttctg agtcgtgtga agttatatca ggaactgatg aaacttcctc 300  
 taatgacaaa aacaaggaaa ccgctcaaga tgaggagaag aagaaaagga agaaggtggt 360  
 45 taacacagct cgtagagctg tgttagaacc tcttacaag gaatcgagga atcaa 415  
  
 <210> 13  
 <211> 185  
 50 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 55 <223> RNAi para el gen StBRC1L1  
  
 <400> 13  
  
 60 agaaaattag caaaggaaaa tgcagcgcta gtacaaatcc taatattggt gttgtatcat 60  
 ctccctccga gtcattgtgaa gtcatatctg gagtaatcga cgaatcagca gcaactaata 120  
 65 atactcacia gcaacagaag aaaaaaagt cgattcgtag ggcaatattt catccagttg 180  
 ttgca 185

## ES 2 371 316 A1

<210> 14  
 <211> 168  
 <212> DNA  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> RNAi para el gen StBRC1L2  
 10  
 <400> 14  
  
 15     gccgttaaag gcaatgatgc tcaggttcct cagcaaacta gctgcaatac cccactact     60  
        actactggaa ttgggtgcaat ttgtgcatct aattctatct ctgagtcatg tgaagttata     120  
        tcaggaactg atgaaacttc ctctaatac aaaaacaagg aaactgct     168  
  
 20 <210> 15  
     <211> 1041  
     <212> DNA  
 25 <213> *Solanum lycopersicum*  
  
     <400> 15  
  
 30     atgtaccctt cgagcaatta cagccccaat atttccagct cttcatcttt ctttcacatt     60  
        aatattccat ctcttctat gcaatatgaa cccgaattca tccaatattt ccatgatttt     120  
        caattcatcc aacctagtta cgatcagaat accaatattc ctgcagaaga agctgctgat     180  
 35     tcggacaaac tagataaaat agaagaagat caatcaatca taaaagctg caataataac     240  
        aagaaggatg agaagagtag tagcagtact agtactattc gtagaaaaaa caacaagaga     300  
        actacgagtg gtagtgctgg tgtaggacct tcgaagaaag atagacacag caaaatcaac     360  
 40     acggcacatg gcccaagaga ccgaagaatg agactatcac ttgaaattgc tcgcaaattc     420  
        ttcaatttgc aagacttgct tgggttcgat aaagccagca aaactgtaga atggctactc     480  
        acaaagtcaa aatcagcggg gaacgatctg gttcagaaaa ttaacaaaga caaatgcagc     540  
 45     ggtagtghaa atcctaatat tgctactgta tcatctcctt ccgccgaatc atgtgaagtt     600  
        atcgacgaat cagctgcaac taatacagca gaaactcaga agcaacagaa gaaaaagtt     660  
 50     aagtcgattc gtagggcaat aattcatcca gttgttgcaa aggaatcaag gaaagaagca     720  
        agagcaaggg caagggaaag aacaataata aagaaaagcc taaatgataa cacgaataat     780  
        aataataatg gtgatcaatc tatggctgat gaggatttaa caagatcatt aagatcttgg     840  
 55     aatactacat ttgaagatca tcaatcaggt attcaaggct ataataataa taataatatg     900  
        aatgttgttg ataactttaa tttggtggat actagcaatt ggagcccatt tatgttcaac     960  
        tatacaciaa tcaatactga aatttctcaa gagcatcaat ttgcgaactt ccagtattct     1020  
 60     gggaagttat gggaagctta a     1041  
  
 <210> 16  
 65 <211> 1014  
     <212> DNA  
     <213> *Solanum lycopersicum*

## ES 2 371 316 A1

<400> 16

	atgcaatatg aacacgaact atactttcaa agctttaatc atgataacca atattatfff	60
5	caacaacagc aactagttcc ctcgatagat gatttgagtc ctcacatctt agctgacagc	120
	tgcaccgaga ttattactaa gccttcgaat tgcaaccacg aactacaagg aatggaagaa	180
10	ggccgaggcg aaaagaaagg agatgatgat gttatgagta gcagaattag tggacggatc	240
	tcaaaaaata ataagagatc ttccaataaa gatcgacaca gcaagatcaa caccgctcgt	300
	ggtccaagag atcgaaggat gagactttca cttgatgctg ctcgcaagtt tttccgtttg	360
15	caggacttat tgggattcga taaggccagc aaaactgttg aatggttgct tactcaatcg	420
	gattctgcaa ttgaagagct tgttgccgct aaaggcaatg atgcacaggt tgctcagcaa	480
20	actagctgca atacccccac tactactact ggaattggtg caatttgtgc atctaattct	540
	atftctgagt cgtgtgaagt tatatcagga actgatgaaa cttcctctaa tgacaaaaac	600
	aaggaaaccg ctcaagatga ggagaagaag aaaaggaaga aggtgggtaa cacagctcgt	660
25	agagctgtgt tagaacctct tacgaaggaa tcgaggaatc aagcaagagc cagggctaga	720
	gagagaacaa aatcaaagaa aatgagccaa actggaaaat ccaaatccct agctaattgat	780
	ttgaaccctt caggatctcg gaggccggct aataaaactt gtgaagaacc tggaacacat	840
30	gaagaactca acttccatca agagaagaac actgtcgatg actgtaatft tatggtaaat	900
	ggaaattgga atccatttac aatctttagc tatcatgagc aatacgctgg aatttccaac	960
35	gagcatcaat tggttacaga cttgcaatft tgtggaaagc tatgggaagg cttag	1014

<210> 17  
 40 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> cebador Le1

<400> 17

	atgtaccctt cgagcaatta cagccccaat	30
--	----------------------------------	----

<210> 18  
 55 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> cebador Le2

<400> 18

	tatttccagc tcttcatctt tctttcacat t	31
--	------------------------------------	----

## ES 2 371 316 A1

<210> 19  
<211> 22  
<212> DNA  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador LeTCP2-F1  
10  
<400> 19  
  
caacaccgct cgtggtccaa ga 22  
15

<210> 20  
<211> 28  
20 <212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
25 <223> cebador LeTCP2-F1 nested  
  
<400> 20  
30 ccaagagatc gaaggatgag actttcac 28

<210> 21  
35 <211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
40 <223> cebador LeTCP2-R1  
  
<400> 21  
45 ttgattcctc gattcctttg taa 23

<210> 22  
50 <211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial  
55  
<220>  
<223> cebador LeTCP2-R1 nested  
60 <400> 22  
  
gaggttctaa cacagctcta cgagc 25  
65

<210> 23  
<211> 22



## ES 2 371 316 A1

<220>

<223> cebador GSP2-TCP1

5 <400> 27

ttggggctgt aattgctcga aggggt

25

10

<210> 28

<211> 27

<212> DNA

15 <213> Artificial

<220>

<223> cebador GSP1-TCP2

20

<400> 28

tcagctaaga tgtgaggact caaatca

27

25

<210> 29

<211> 28

30 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

35 <223> cebador GSP2-TCP2

<400> 29

40

atctatcgag ggaactagtt gctgttgt

28

<210> 30

45 <211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

50 <220>

<223> cebador para el extremo 5' de SIBRC1L1

<400> 30

55

ggggctcgag ggatccagaa aattagcaaa ggaa

34

60 <210> 31

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

65

<220>

<223> cebador para el extremo 3' de SIBRC1L1

## ES 2 371 316 A1

<400> 31

5                    ggggggtacc atcgattgca acaactggat gaaa                    34

<210> 32  
<211> 40  
10 <212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
15 <223> cebador para el extremo 5' de SIBRC1L2

<400> 32

20                    ggggctcgag ggatccgccg ttaaaggcaa tgatgctcag                    40

<210> 33  
25 <211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
30 <223> cebador para el extremo 3' de SIBRC1L2

<400> 33

35                    ggggggtacc atcgatagca gtttccttgt ttttgcatt a                    41

<210> 34  
40 <211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> cebador racest1-5'

50 <400> 34

                      tgggctccaa ttgctagtat ccacca                    26

55 <210> 35  
<211> 26  
<212> DNA  
60 <213> Artificial

<220>  
65 <223> cebador StTCP1-ORF1



## ES 2 371 316 A1

<400> 35

atgtaccctt cgagcccaaa tatttc

26

5

<210> 36

<211> 34

10 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> cebador B26

<400> 36

20

gactcgagtc gacatcgttt tttttttttt tttt

34

<210> 37

25 <211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

30 <220>

<223> cebador B25

<400> 37

35

gactcgagtc gacatcg

17

40 <210> 38

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

45

<220>

<223> cebador genómico-StTCP1A

50 <400> 38

tgaatagaag tgtagtaggt tgtcctt

27

55

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

60 <213> Artificial

<220>

65 <223> cebador genómico-StTCP1B

## ES 2 371 316 A1

<400> 39	
5	tgaaagataa agatgagctt attta 25
<210> 40	
<211> 29	
10 <212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
15 <223> cebador StTCP2-A	
<400> 40	
20	agagatcttc caataaggat cgacacagc 29
<210> 41	
25 <211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
30 <223> cebador StTCP2-B	
<400> 41	
35	atcaacacgg tcgtgggtcc aagagatcg 29
<210> 42	
40 <211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
45 <220>	
<223> cebador St2-Seq 1	
50 <400> 42	
	tcatctcctt tgtttccgcc tcggccttct 30
55 <210> 43	
<211> 27	
<212> DNA	
60 <213> Artificial	
<220>	
<223> cebador St2-Seq 2	
65	

## ES 2 371 316 A1

<400> 43

cttcattcc ttctagtagc tgattgc

27

5

<210> 44

<211> 26

<212> DNA

10

<213> Artificial

<220>

15

<223> cebador StTCP2-5'

<400> 44

atgtatcctc caagcaaca taactg

26

20

<210> 45

<211> 28

25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

30

<223> cebador StTCP2-3'

<400> 45

gctttccac agctttccat aaaattgc

28

35

<210> 46

40

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

45

<223> cebador del extremo 5' de StBRC1L1

<400> 46

50

ggggctcgag ggatccagaa aattagcaaa ggaa

34

55

<210> 47

<211> 34

<212> DNA

60

<213> Artificial

<220>

<223> cebador del extremo 3' de StBRC1L1

65

## ES 2 371 316 A1

<400> 47

                  gggggtacc atcgattgca acaactggat gaaa                  34

5

<210> 48

<211> 40

<212> DNA

10 <213> Artificial

<220>

15 <223> cebador del extremo 5' del gen StBRC1L2

<400> 48

20                  ggggctcgag ggatccgccg ttaaaggcaa tgatgctcag                  40

<210> 49

<211> 41

25 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

30 <223> cebador del extremo 3' del gen StBRC1L2

<400> 49

35                  gggggtacc atcgatagca gtttccttgt tttgtcatt a                  41

<210> 50

40 <211> 325

<212> PRT

<213> *Solanum lycopersicum*

45

50

55

60

65

# ES 2 371 316 A1

<400> 50

5	Met 1	Tyr	Pro	Ser	Ser 5	Asn	Tyr	Ser	Pro	Asn 10	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser 15	Ser
	Phe	Phe	His	Ile 20	Asn	Ile	Pro	Ser	Pro 25	Ser	Met	Gln	Tyr	Glu 30	Pro	Glu
10	Phe	Ile	Gln 35	Tyr	Phe	His	Asp	Phe 40	Gln	Phe	Ile	Gln	Pro 45	Ser	Tyr	Asp
15	Gln	Asn 50	Thr	Asn	Ile	Pro	Ala 55	Glu	Glu	Ala	Ala	Asp 60	Ser	Asp	Lys	Leu
20	Asp 65	Lys	Ile	Glu	Glu	Asp 70	Gln	Ser	Ile	Ile	Lys 75	Ser	Cys	Asn	Asn	Asn 80
25	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys 85	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr 90	Ser	Thr	Ile	Arg	Arg 95	Lys
30	Asn	Asn	Lys	Arg 100	Thr	Thr	Ser	Gly	Ser 105	Ala	Gly	Val	Gly	Pro 110	Ser	Lys
35	Lys	Asp	Arg 115	His	Ser	Lys	Ile	Asn 120	Thr	Ala	His	Gly	Pro 125	Arg	Asp	Arg
40	Arg	Met 130	Arg	Leu	Ser	Leu	Glu 135	Ile	Ala	Arg	Lys	Phe 140	Phe	Asn	Leu	Gln
45	Asp 145	Leu	Leu	Gly	Phe	Asp 150	Lys	Ala	Ser	Lys	Thr 155	Val	Glu	Trp	Leu	Leu 160
50	Thr	Lys	Ser	Lys	Ser 165	Ala	Val	Asn	Asp	Leu 170	Val	Gln	Lys	Ile	Asn 175	Lys
55	Asp	Lys	Cys	Ser 180	Gly	Ser	Glu	Asn	Pro 185	Asn	Ile	Ala	Thr	Val 190	Ser	Ser
60																
65																



## ES 2 371 316 A1

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







OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030915

②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.06.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/82** (2006.01)  
**A01H5/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TAKEDA et al., "The OsTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice." Plant J. 2003 Feb; 33(3):513-20, todo el documento.	1-29
X	AGUILAR-MARTINEZ et al., "Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds" The Plant Cell (2007), vol. 19, pág. 458-472, todo el documento.	1-29
X	ES 2249982 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 01.04.2006, todo el documento.	1-29
A	US 20060130178 A1 (KEETMAN et al.) 15.06.2006, todo el documento.	1-29
A	FINLAYSON S. "Arabidopsis TEOSINTE BRANCHED-LIKE 1 regulates axillary bud outgrowth and is homologous to monocot TEOSINTE BRANCHED1" Plant Cell Physiology (2007), 48(5), pág. 667-677, todo el documento.	1-29
A	POZA-CARRION C. et al., "Role of TCP gene BRANCHED1 in control of shoot branching in Arabidopsis", Plant Cell (2007), 19:458-472, todo el documento.	1-29
A	CUBAS P. et al., "The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development" The Plant Journal (1999), 18(2), pág. 215-222, todo el documento.	1-29
A	DOEBLEY J, et al., "The evolution of apical dominance in maize." Nature. 1997 Abr 3; 386(6624):485-8, todo el documento.	1-29

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  
28.06.2011

Examinador  
M. Hernández Cuellar

Página  
1/4

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, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EBI SEQUENCES DATABASES

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.06.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-29	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-29	<b>NO</b>

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 se publica.

**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	TAKEDA et al., "The OsTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice." Plant J. 2003 Feb; 33(3):513-20, todo el documento.	
D02	AGUILAR-MARTINEZ et al., "Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds" The Plant Cell (2007), vol. 19, pág. 458-472, todo el documento.	
D03	ES 2249982 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 01.04.2006, 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 invención de la presente solicitud describe la identificación de genes que codifican para factores de transcripción de la familia TCP y que tienen un papel biológico en el desarrollo de las yemas axilares y crecimiento de las ramas. En particular, la invención de la presente solicitud se refiere a la identificación del gen StBRC1L1 de tomate. El gen StBRC1L1 se considera ortólogo funcional de los genes Teosinte branched 1 de maíz y BRANCHED1 de Arabidopsis. La invención proporciona polinucleótidos correspondientes a StBRC1L1 y su promotor, así como construcciones genéticas obtenidas con dichos polinucleótidos. La invención también se refiere al uso de los polinucleótidos y construcciones para modificar la arquitectura vegetal de las plantas y obtención de células vegetales, semillas, plantas y granos de polen. Por último la invención también describe agentes moduladores de la expresión del gen StBRC1L1, en particular del tipo RNAi, y sus usos.

**1.- NOVEDAD**

Las reivindicaciones 1-34 cumplen el requisito de novedad establecido en el Art. 6.1 LP 11/1986

**2.- ACTIVIDAD INVENTIVA**

El documento D01 describe la estructura genómica y la secuencia del gen OsTB1. También se describe la construcción de un plásmido que consiste en un fragmento de 4'5 kb de la región 5' no codificante, en el que está comprendido el promotor potencial del gen, unido al gen delator GUS. La introducción de este plásmido en una cepa salvaje de arroz permite comprobar que el gen OsTB1 se expresa en las yemas axilares completas, pero solo en una área relativamente limitada del meristemo apical (SAM). El gen OsTB1 se ha identificado en base a la homología de su secuencia con la del gen TB1 de Zea mays ssp. mays del cual se considera ortólogo funcional.

El documento D02 describe el análisis de la familia completa de los genes TCP de Arabidopsis con el objetivo de encontrar los genes más relacionados con el gen teosinte branched 1 (tb1) de maíz. En función de la similitud de la secuencia proteica con tb1, sus patrones de expresión y fenotipos mutantes, los autores han renombrados los genes TCP12 y TCP18 de Arabidopsis como BCR1 y BCR2. El documento aporta las secuencias de cDNA de ambos genes (Nº Acceso Genbank: AM408560 y AM408561 respectivamente). Los autores también describen el desarrollo de líneas de RNAi utilizadas para investigar la función de BRC1 y BRC2 sobre las yemas axilares.

El documento D03 describe la identificación del promotor del gen BRANCHED1 de Arabidopsis thaliana y su uso en construcciones genéticas con el objetivo de modificar la arquitectura vegetal de una planta. Entre las plantas transgénicas obtenidas se encuentran la planta de patata y de tomate.

A la luz de la información aportada por los documentos D01, D02 y D03, un experto en la materia obtendría y desarrollaría de forma rutinaria los diversos objetos de la invención (identificación del gen StBRC1L1, su promotor, las construcciones genéticas correspondientes, el RNAi y los respectivos usos) mediante la aplicación de las técnicas de biología molecular habituales. En este sentido, esta Oficina considera que las reivindicaciones 1-34, no cumplen el requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP 11/1986.