

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 118**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2008 E 08762818 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2144926**

54 Título: **Métodos para incrementar el crecimiento vegetal**

30 Prioridad:

12.04.2007 GB 0707089

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

05.05.2015

73 Titular/es:

**SWETREE TECHNOLOGIES AB (100.0%)
P.O. Box 4095
904 03 Umea, SE**

72 Inventor/es:

**JONES, BRIAN;
WANG, JIEHUA y
SANDBERG, GORAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 535 118 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para incrementar el crecimiento vegetal

5 La invención se refiere a métodos para aumentar el crecimiento de plantas.

La seguridad energética a largo plazo es tanto un reto como una oportunidad. De entre el amplio abanico de opciones disponible actualmente, las fuentes de biomasa renovables ofrecen una alternativa muy real a los combustibles fósiles. La producción de biomasa proporciona un medio renovable de carbono neutro para proporcionar bioenergía y recursos biomateriales. La producción de biomasa en plantas de biomasa de rotación corta de Suecia actualmente supone 8 t secas ha⁻¹ año⁻¹ y en los Estados Unidos entre 10 y 22 t secas ha⁻¹ año⁻¹ (para cultivos leñosos de rotación corta) (Ragauskas et al. 2006. Science. Vol. 113, 484 - 489).

15 Las plantas, como los animales, requieren un suministro de células nuevas para crecer y desarrollarse. La acumulación de biomasa en especies vegetales leñosas comienza con divisiones celulares en los meristemos primarios y secundarios. Los meristemos son los nichos de las células madre vegetales. Los meristemos apicales primarios proporcionan células para el crecimiento apical radicular y de los vástagos. Un meristemo secundario perimetral, denominado cámbium vascular (VC), está ubicado hacia el exterior de los árboles y de otras especies leñosas. La madera deriva de la proliferación celular en el VC. Sorprendentemente, dada su importancia en el comercio y el medio ambiente, aunque ha existido una larga tradición de análisis anatómicos y fisiológicos del VC, no se sabe prácticamente nada sobre las bases moleculares de su creación y función. Incluso los componentes celulares que comprenden el nicho de células madre del VC permanecen sin identificar.

25 Se ha demostrado que el gen de Arabidopsis *SHORT-ROOT* (*AtSHR*) juega unos papeles críticos en la creación y el mantenimiento del meristemo apical radicular. En la raíz de Arabidopsis, la proteína *SHORT-ROOT* (*AtSHR*), junto con las proteínas *SCARECROW* (*AtSCR*) y *PLETHORA* (*AtPLT1* y *AtPLT2*), es esencial para la especificación y el mantenimiento del QC y las poblaciones de células madre adyacentes (Levesque et al. PLoS Biol. 2006 4(5): e143). Los mutantes con una pérdida de la función del *shr* muestran una progresiva desorganización del QC, una pérdida de la actividad de las células madre y el cese del crecimiento apical radicular (Levesque et al., PLoS Biol., mayo de 2006; 4 (5): e143.). El *AtSHR* es transcrito en las capas internas de la estela, y la proteína se mueve hacia el núcleo de las células en los pedúnculos adyacentes que expresan el *AtSCR*, el QC, la endodermis / córtex, y en las células hijas (Nakajima et al., Nature. 20 de septiembre de 2001; 413 (6853): 307 - 11). Una proteína codificada por el gen *SCARECROW* (*SCR*) bloquea el movimiento de la *SHR* secuestrándola en el núcleo (Cui et al. Science, Vol. 316, pág. 421, 2007).

35 En combinación con el papel en el QC y en la determinación del destino de las células madre, el *AtSHR* es un regulador clave de la división asimétrica en el ápice radicular de Arabidopsis. Junto con el *AtSCR*, el *AtSHR* es esencial para la división periclinal asimétrica de la hija de la célula madre del córtex / endodermo (Helariutta et al., Cell. 26 de mayo de 2000; 101 (5): 555 - 67). La separación del destino de la célula de cortical / endodérmica de las células hija de esta división depende de la degradación de la *AtSHR* y de la *AtSCR* en la célula externa y del mantenimiento de la *AtSHR* en la célula endodérmica interna (Helariutta et al., Cell. 26 de mayo de 2000; 101 (5): 555 - 67). Finalmente, al envejecer la raíz se produce una segunda capa cortical a través de la división asimétrica de la endodermis. La *AtSHR* es crítica para esta división, y en este caso opera a través de un mecanismo independiente de la *AtSCR* (Paquette y Benfey Plant Physiol. Junio de 2005; 138 (2): 636 - 40).

45 Una pérdida completa de la función de la *AtSHR* es claramente perjudicial para el crecimiento en Arabidopsis, ya que tanto las raíces como los vástagos de mutantes *shr* sufren un enanismo grave en comparación con el tipo silvestre (Benfey et al., Development. Septiembre de 1993; 119 (1): 57 - 70).

50 También se ha informado de que la expresión ectópica del *AtSHR* en plantas transgénicas de Arabidopsis, guiada por los promotores *CaMV35S*, *AtSCR* o *WEREWOLF* (*AtWER*), puede dar como resultado una modificación del patrón radial apical de las raíces de Arabidopsis (Benfey et al., Cell, Vol. 101, 2000; Nakajima et al., 2001 Nature; Sena et al., 2004, Development). Este defecto en el patronizado radial se produce a través de una multiplicación de las capas de células que se originan en el meristemo radicular (Benfey et al., Cell, Vol. 101, 555 - 567, 2000). Sena et al. (2004) sugirieron que las capas supernumerarias en plantas transgénicas *AtWER*:*promotor:AtSHR* se originaban a partir de la expresión ectópica de la *AtSHR* que se produce en los pedúnculos de la cofia radicular epidérmica / lateral (células madre) más que en la progenie de estas células.

60 Aunque la *AtSHR* es esencial para el desarrollo radicular, los mecanismos implicados en el movimiento entre células de la proteína y sus modos de acción precisos autónomos celulares y no autónomos celulares todavía están por determinar.

65 Los presentes inventores han descubierto que, mientras que una pérdida completa de la función de la *AtSHR* da lugar a una degeneración del meristemo apical radicular y a un enanismo de los vástagos de Arabidopsis, una supresión parcial de los niveles del ARNm en estado estacionario del *AtSHR* o del *SHORT-ROOT1* (*PtSHR1*) de álamo dio como resultado un aumento drástico y sostenido en las actividades de los meristemos de los vástagos

primarios (crecimiento apical) y secundarios (crecimiento perimetral). La manipulación de la expresión del *SHORT-ROOT* puede ser por lo tanto útil para acelerar el crecimiento y aumentar la producción de biomasa en plantas transgénicas.

5 Un aspecto de la invención proporciona un método para aumentar el crecimiento y/o la biomasa de una planta dicotiledónea que comprende;
reducir sin alterar la expresión de un polipéptido *SHORT-ROOT* (SHR) en las células de dicha planta según se establece en la reivindicación 1.

10 La expresión del polipéptido *SHORT-ROOT* (SHR) puede ser alterada con respecto a las plantas de control, por ejemplo, plantas silvestres.

La reducción sin la anulación de la expresión del *SHORT-ROOT* (SHR) puede aumentar la velocidad del desarrollo post-germinativo de las plantas. Por ejemplo, la reducción sin la anulación del polipéptido *SHORT-ROOT* (SHR) en las células de la planta puede aumentar la velocidad del crecimiento primario (en altura) y del crecimiento secundario (perimetral) y/o la velocidad de acumulación de biomasa en la planta.

15 El aumento en el crecimiento o en la biomasa puede producirse en la parte aérea de una planta, por ejemplo, en los tallos y en otras estructuras aéreas de la planta, con respecto a las plantas de control. La parte aérea de la planta puede tener por lo tanto un aumento en el crecimiento primario (en altura) y en el crecimiento secundario (perimetral) y/o un aumento en la biomasa con respecto a las plantas de control. En una planta leñosa, puede aumentarse la densidad de la madera.

20 La reducción sin la anulación de la expresión del polipéptido *SHORT-ROOT* (SHR) en las células de la planta también puede aumentar la velocidad de germinación de la planta.

El crecimiento puede aumentarse mediante un incremento global en el número de células, por ejemplo, la médula, la vasculatura y el córtex pueden ser proporcionalmente mayores en las plantas tratadas según se describe en este documento que en las plantas de control.

30 Los polipéptidos *SHORT-ROOT* (SHR) son miembros de la superfamilia GRAS de factores de transcripción. Los factores de transcripción de la superfamilia GRAS comparten un amino terminal variable y un carboxilo terminal altamente conservado que contiene diversos motivos reconocibles (Bolle C., Planta. Marzo de 2004; 218(5): 683 - 92). Los polipéptidos SHR, tales como AtSHR, PtSHR1, PtSHR2A y PtSHR2B, comparten diversas secuencias conservadas entre ellos que no son compartidas por otras clases funcionales de GRAS (véase la Figura 3 para las secuencias conservadas, y Bolle C., Planta. Marzo de 2004; 218 (5): 683 - 92) para los dominios GRAS).

40 Un polipéptido *SHORT-ROOT* (SHR) puede estar en el clado SHR, según se muestra en la Figura 1 para AtSHR, PtSHR1, PtSHR2A y PtSHR2B, en un cladograma de otras secuencias de proteínas GRAS, en particular secuencias de proteínas de tipo Scarecrow (SCL) tales como PtSCL35b, PtSCL53b, PtSCL62, PtSCL69b, PtSCL92b, PtSCL97b, AtSCL29 y AtSCL32. Puede producirse un cladograma mediante el uso de técnicas convencionales. Por ejemplo, puede calcularse un cladograma mediante el uso de ClustalW para alinear las secuencias de proteínas, en formato Phylip para el árbol de resultados, con 1000 copias *bootstrap* y TreeViewX (versión 0.5.0) para la visualización.

45 Un polipéptido *SHORT-ROOT* (SHR) adecuado puede tener la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las ID. SEC. N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16, o puede ser un fragmento o una variante de esta secuencia que conserve la actividad SHR.

50 En algunas formas de realización preferidas, un polipéptido *SHORT-ROOT* (SHR) puede tener la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. N°: 2 (PU04350_eugene3.01860017), de la ID. SEC. N°: 4 (eugene3.00070144) o de la ID. SEC. N°: 6 (eugene3.00640143) o puede ser un fragmento o una variante de esta secuencia que conserve la actividad SHR.

55 Un polipéptido *SHORT-ROOT* (SHR) que es una variante de la secuencia de referencia del SHR establecida en este documento, tal como la ID. SEC. N°: 2, puede comprender una secuencia de aminoácidos que comparta más del 30 % de la identidad de la secuencia con la secuencia de aminoácidos del SHR de referencia, preferiblemente más del 40 %, más del 50 %, más del 60 %, más del 65 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 % o más del 95 %.

60 Las variantes de la secuencia de aminoácidos en particular pueden diferir de una secuencia conocida de un polipéptido SHR según se describe en este documento mediante una inserción, una adición, una sustitución o una delección de 1 aminoácido, de 2, de 3, de 4, de 5 - 10, de 10 - 20, de 20 - 30, de 30 - 50, o de más de 50 aminoácidos.

65 La similitud y la identidad de secuencia se definen habitualmente con referencia al algoritmo GAP (Wisconsin Package, Accelrys, San Diego, EE.UU.). El GAP usa el algoritmo de Needleman y Wunsch para alinear dos

secuencias completas que maximizar el número de coincidencias y minimizar el número de gaps (huecos). Generalmente se usan los parámetros por defecto, con una penalización por creación de gaps (huecos) = 12 y una penalización por extensión de gap (hueco) = 4.

5 Puede preferirse el uso de GAP, pero pueden usarse otros algoritmos, por ejemplo, el BLAST (que usa el método de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405 - 410), el FASTA (que usa el método de Pearson y Lipman (1988) PNAS EE.UU.85: 2444 - 2448), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195 - 197), o el programa TBLASTN, de Altschul et al. (1990) *supra*, empleando generalmente los parámetros por defecto. En particular, puede usarse el algoritmo psi-Blast (Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389 - 3402).

10 La comparación de la secuencia puede realizarse sobre la secuencia completa de la secuencia pertinente descrita en este documento, o puede ser sobre una secuencia contigua (es decir, una 'ventana') de al menos 50, 75, 100, 150 o más tripletes de aminoácidos o de nucleótidos, en comparación con la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos pertinente.

15 Ciertos dominios de un polipéptido SHORT-ROOT (SHR) pueden mostrar un aumento en el nivel de identidad con los dominios de una secuencia SHR de referencia, tal como las ID. SEC. Nº: 2, 4 o 6, con respecto a la secuencia del polipéptido SHORT-ROOT (SHR) como un todo. Por ejemplo, un polipéptido SHORT-ROOT (SHR) puede comprender uno o más dominios o motivos que tengan una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 98 % de identidad o similitud de secuencia, con una secuencia de aminoácidos elegida de entre el grupo que consiste en la ID. SEC. Nº: 17, la ID. SEC. Nº: 18, la ID. SEC. Nº: 19, la ID. SEC. Nº: 20 y la ID. SEC. Nº: 21. En algunas formas de realización preferidas, un polipéptido SHORT-ROOT (SHR) puede comprender uno o más dominios o motivos que tengan una secuencia de aminoácidos que se elige de entre el grupo que consiste en la ID. SEC. Nº: 17, la ID. SEC. Nº: 18, la ID. SEC. Nº: 19, la ID. SEC. Nº: 20 y la ID. SEC. Nº: 21.

20 La expresión del polipéptido SHORT-ROOT (SHR) se reduce en las células de dicha planta. La reducción en este contexto excluye la completa anulación de la expresión. Por ejemplo, la expresión del polipéptido SHORT-ROOT (SHR) puede reducirse en las células de dicha planta en hasta el 90 %, en hasta el 80 %, en hasta el 70 %, en hasta el 60 %, en hasta el 50 % en hasta el 40 % o en hasta el 30 %. En otras palabras, la expresión del polipéptido SHORT-ROOT (SHR) en la planta puede ser de 0,1 veces, de 0,2 veces, de 0,3 veces, de 0,4 veces, de 0,5 veces, de 0,6 veces o de 0,7 veces de la expresión en las células de las plantas de control.

30 La reducción de la expresión del polipéptido SHORT-ROOT (SHR) según se describe en este documento puede dar lugar a un aumento en el crecimiento de la planta o en la biomasa. En algunas formas de realización, puede aumentarse el crecimiento o la biomasa de la parte aérea de la planta.

35 La expresión del polipéptido SHORT-ROOT (SHR) puede reducirse en las células de dicha planta mediante la expresión de un ácido nucleico heterólogo que codifica, o transcribe, un ácido nucleico supresor, por ejemplo, una molécula de ARN supresor, en las células de dicha planta.

40 Los ácidos nucleicos según se describen en este documento puede ser total o parcialmente sintéticos. En particular, pueden ser recombinantes porque las secuencias de ácidos nucleicos que no se encuentran conjuntamente en la naturaleza (no aparecen contiguas), han sido ligadas o, de otro modo, combinadas artificialmente. Alternativamente, pueden haber sido sintetizadas directamente, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador automatizado.

45 El ácido nucleico puede ser, por supuesto, bi o monocatenario, ADNc o ADN genómico, o ARN. El ácido nucleico puede ser total o parcialmente sintético, dependiendo del diseño. Naturalmente, la persona experta comprenderá que cuando el ácido nucleico incluye ARN, la referencia a la secuencia mostrada debería ser interpretada como referencia al equivalente de ARN, con el U sustituido por la T.

50 "Heterólogo" indica que el gen / la secuencia de nucleótidos en cuestión, o una secuencia que regula el gen / la secuencia en cuestión, ha sido introducido en dichas células de la planta o de un progenitor de la misma, mediante el uso de ingeniería genética o medios recombinantes, es decir, mediante la intervención humana. Las secuencias de nucleótidos que son heterólogas de una célula vegetal pueden no aparecer de forma natural en las células de ese tipo, de esa variedad o de esa especie (es decir, exógena o foránea), o pueden ser secuencias que no aparecen de forma natural en ese entorno subcelular o genómico de las células, o pueden ser secuencias que no están reguladas de forma natural en las células, es decir, están unidas operativamente a un elemento regulador no natural.

55 La supresión de la expresión de los polipéptidos objetivo en células vegetales es bien conocida en la técnica. Un ácido nucleico supresor adecuado puede ser una copia de todo o de parte del gen SHR objetivo insertado en orientación antisentido o sentido, o ambas, con respecto al gen SHR, para conseguir una reducción en la expresión del gen SHR. Véase, por ejemplo, van der Krol et al., (1990) The Plant Cell 2, 291 - 299; Napoli et al., (1990) The Plant Cell 2, 279 - 289; Zhang et al., (1992) The Plant Cell 4, 1575 - 1588, y el documento US-A-5.231.020. Algunas mejoras adicionales de esta metodología pueden encontrarse en el documento WO95/34668 (Biosource); en Angell & Baulcombe (1997) The EMBO Journal 16, 12: 3675 - 3684; y en Voinnet & Baulcombe (1997) Nature 389: pág.

553.

En algunas formas de realización, el ácido nucleico supresor puede ser un supresor sentido de la expresión del polipéptido SHORT- ROOT (SHR).

5 Un ácido nucleico supresor sentido adecuado puede ser un ARN bicatenario (Fire A. et al Nature, Vol. 391, (1998)). El silenciamiento mediado por un ARNbc es específico del gen y a menudo se denomina interferencia de ARN (ARNi). La ARNi es un proceso en dos etapas. En primer lugar se escinde el ARNbc en la célula para producir ARN interferentes pequeños (ARNip) de aproximadamente 21 - 23 nt de longitud, con el fosfato terminal en 5' y pequeños salientes en 3' (~ 2 nt). Los ARNip están dirigidos a la correspondiente secuencia de ARNm específicamente para su destrucción (Zamore P.D. Nature Structural Biology, 8, 9, 746 - 750, (2001)

15 Los ARNip (denominados a veces microARN) regulan por disminución la expresión génica uniéndose a los ARN complementarios y, bien desencadenando la eliminación del ARNm (ARNi), o bien deteniendo la traducción del ARNm en la proteína. Los ARNip pueden derivarse mediante el procesamiento de ARN bicatenarios largos, y cuando se encuentran en la naturaleza son normalmente de origen exógeno. Los ARN microinterferentes (miARN) son pequeños ARN no codificantes codificados endógenamente, derivados mediante el procesamiento de horquillas pequeñas. Tanto el ARNip como el miARN pueden inhibir la traducción de los ARNm que porten secuencias objetivo parcialmente complementarias sin la escisión del ARN y degradan los ARNm que portan secuencias totalmente complementarias.

20 Consecuentemente, la presente invención proporciona el uso de secuencias de ARNi basadas en la secuencia de ácidos nucleicos del SHORT-ROOT (SHR) para la supresión de la expresión del polipéptido SHORT-ROOT (SHR). Por ejemplo, una secuencia de ARNi puede corresponderse con un fragmento de la ID. SEC. N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 25 15 o una variante de la misma.

30 Las moléculas ARNip son normalmente bicatenarias y, con objeto de optimizar la eficacia de la regulación por disminución mediada por el ARN de la función de un gen objetivo, se prefiere que la longitud y la secuencia de la molécula del ARNip se elija para asegurar un correcto reconocimiento del ARNip por parte del complejo RISC que media en el reconocimiento por parte del ARNip del ARNm objetivo, y de forma que el ARNip sea lo suficientemente corto como para reducir la respuesta en un hospedador.

35 Los ligandos del miARN son normalmente monocatenarios y tienen regiones que son parcialmente complementarias que permiten que los ligandos formen una horquilla. Los miARN son secuencias de ARN que son transcritas a partir del ADN, pero que no son traducidas en una proteína. Una secuencia de ADN que codifica un miARN es más larga que el miARN. Esta secuencia de ADN incluye la secuencia del miARN y un complemento inverso aproximado. Cuando esta secuencia de ADN es transcrita en una molécula de ARN monocatenario, la secuencia del miARN y su base complementaria inversa se aparean para formar un segmento de ARN parcialmente bicatenario. El diseño de secuencias de microARN se analiza en John et al, PLoS Biology, 11(2), 1862 - 1879, 2004.

40 Normalmente, las moléculas de ARN destinadas a mimetizar los efectos del ARNip o del miARN tienen entre 10 y 40 ribonucleótidos (o análogos sintéticos de los mismos), más preferiblemente entre 17 y 30 ribonucleótidos, más preferiblemente entre 19 y 25 ribonucleótidos y lo más preferiblemente entre 21 y 23 ribonucleótidos. En algunas formas de realización de la invención que emplean un ARNip bicatenario, la molécula puede tener salientes simétricos en 3', por ejemplo, de uno o dos (ribo)nucleótidos, normalmente un saliente UU de dTdT en 3'. Tomando como base la divulgación proporcionada en este documento, la persona experta puede diseñar fácilmente secuencias adecuadas de ARNip y miARN, por ejemplo, mediante el uso de recursos tales como el buscador de ARNip de Ambion, véase http://www.ambion.com/techlib/misc/ARNip_finder.ht ml. Las secuencias de ARNip y de miARN pueden ser producidas sintéticamente y añadirse de forma exógena para provocar la regulación génica por 50 disminución, o producidas mediante el uso de sistemas de expresión (por ejemplo, vectores). En una forma de realización preferida, el ARNip es sintetizado sintéticamente.

En la célula pueden procesarse ARN bicatenarios más largos para producir ARNip (véase, por ejemplo, Myers (2003) Nature Biotechnology 21: 324 - 328). La molécula de ARNbc más larga puede tener unos salientes simétricos en 3' o en 5', por ejemplo, de uno o dos (ribo)nucleótidos, o puede tener extremos romos. Las moléculas de ARNbc más largas pueden ser de 25 nucleótidos o más. Preferiblemente, las moléculas de ARNbc más largas tienen entre 25 y 30 nucleótidos. Más preferiblemente, las moléculas de ARNbc más largas tienen entre 25 y 27 nucleótidos. Más preferiblemente, las moléculas de ARNbc más largas tienen 27 nucleótidos de longitud. Los ARNbc de 30 nucleótidos o más de longitud puede ser expresados mediante el uso del vector pDECAP (Shinagawa et al., Genes y Dev., 17, 1340 - 5, 2003).

65 Otra alternativa es la expresión de una molécula de ARN pequeño en horquilla (ARNph) en la célula. Los ARNph son más estables que los ARNip sintéticos. Un ARNph consiste en repeticiones cortas invertidas separadas por una pequeña secuencia de bucle. Una repetición invertida es complementaria del gen objetivo. En la célula, el ARNph es procesado por la DICER en un ARNip que degrada el ARNm del gen objetivo y suprime su expresión. En una forma de realización preferida, el ARNph es producido endógenamente (dentro de una célula) mediante su transcripción a

- partir de un vector. Los ARNph pueden producirse dentro de una célula transfectando la célula con un vector que codifica la secuencia del ARNph bajo el control de un promotor de la polimerasa III de ARN, tal como el promotor humano H1 o 7SK o un promotor de la polimerasa II de ARN. Alternativamente, el ARNph puede ser sintetizado exógenamente (*in vitro*) mediante su transcripción desde un vector. Después, el ARNph puede ser introducido
- 5 directamente en la célula. Preferiblemente, la molécula de ARNph comprende una secuencia parcial del SHR. Por ejemplo, la secuencia del ARNph tiene entre 40 y 100 bases de longitud, más preferiblemente entre 40 y 70 bases de longitud. El tallo de la horquilla tiene preferiblemente entre 19 y 30 pares de bases de longitud. El tallo puede contener parejas de G-U que estabilizan la estructura de la horquilla.
- 10 Las moléculas de ARNip, las moléculas de ARNbc más largas o las moléculas de miARN pueden crearse recombinantemente mediante la transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos, preferiblemente contenida en un vector. Preferiblemente, la molécula de ARNip, la molécula de ARNbc más largo o la molécula de miARN comprende una secuencia parcial de las ID. SEC. N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 o una variante de la misma.
- 15 En otras formas de realización, el ácido nucleico supresor puede ser un supresor antisentido de la expresión del polipéptido SHORT-ROOT (SHR). Mediante el uso de secuencias antisentido para regular por disminución la expresión génica, una secuencia de nucleótidos se coloca bajo el control de un promotor en una "orientación inversa", de forma que la transcripción produce un ARN que es complementario del ARNm normal transcrito a partir de la hebra "sentido" del gen objetivo. Véase, por ejemplo, Rothstein et al, 1987; Smith et al, (1988) Nature 334, 724
- 20 - 726; Zhang et al, (1992) The Plant Cell 4, 1575 - 1588, English et al., (1996) The Plant Cell 8, 179 - 188. La tecnología antisentido también se revisa en Bourque, (1995), Plant Science 105, 125 - 149, y Flavell (1994) PNAS EE.UU. 91,3490 - 3496.
- Un supresor de ácidos nucleicos antisentido puede comprender una secuencia antisentido de al menos 10
- 25 nucleótidos a partir de una secuencia de nucleótidos que es un fragmento de la ID. SEC. N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 o una variante de la misma.
- Puede ser preferible que haya una identidad de secuencia completa entre la secuencia usada para la regulación por
- 30 disminución de la expresión de una secuencia objetivo y la secuencia objetivo, aunque la complementariedad o similitud total de la secuencia no es esencial. Puede haber una diferencia de uno o más nucleótidos en la secuencia usada con respecto a gen objetivo. Por lo tanto, una secuencia empleada en una regulación por disminución de la expresión génica de acuerdo con la presente invención puede ser una secuencia natural (por ejemplo, un gen) elegida de entre las que haya disponibles, o una variante de dicha secuencia.
- 35 No es necesario que la secuencia incluya un marco abierto de lectura o especifique para un ARN que podría ser traducible. Es más preferido que tenga la homología suficiente como para hibridar con las respectivas moléculas de ARN antisentido y sentido. Puede haber una regulación por disminución de la expresión génica incluso cuando existe un mal apareamiento de aproximadamente el 5 %, el 10 %, el 15 % el 20 % o más entre la secuencia usada y el gen objetivo. Efectivamente, la homología debería ser suficiente para que tenga lugar la regulación por
- 40 disminución de la expresión del gen.
- En otras formas de realización, la expresión del polipéptido SHORT-ROOT (SHR) puede reducirse en una planta mediante métodos de cultivo selectivo de la planta que emplean la secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos SHORT-ROOT (SHR) como marcador molecular, con objeto de producir una planta con un crecimiento aéreo y/o
- 45 una biomasa aumentados.
- Un método para la producción de una planta con un crecimiento y/o una biomasa aumentados puede comprender:
- 50 proporcionar una población de plantas,
determinar la cantidad de expresión de un polipéptido SHR en una o más plantas de la población, e
identificar una o más plantas de la población con una expresión reducida del polipéptido SHR con respecto a los demás miembros de dicha población.
- Las plantas identificadas pueden ser adicionalmente propagadas o cruzadas, por ejemplo, con otras plantas con una
- 55 expresión reducida del SHR, o autocruzarse para producir líneas endogámicas. Puede determinarse la expresión de un polipéptido SHR en poblaciones de plantas progenitoras e identificarse una o más plantas progenitoras con una expresión reducida del polipéptido SHR.
- La expresión de un polipéptido SHR en una planta puede determinarse mediante cualquier método conveniente. En
- 60 algunas formas de realización, puede determinarse a nivel proteico la cantidad de expresión del polipéptido SHR. Un método para la producción de una planta con un crecimiento y/o una biomasa aumentados puede comprender:
- 65 proporcionar una población de plantas,
determinar la cantidad de polipéptido SHR en una o más plantas de la población, e
identificar una o más plantas de la población con una cantidad reducida de un polipéptido SHR con respecto a los demás miembros de dicha población.

Puede determinarse la cantidad de polipéptido SHR en una o más células de la planta, preferiblemente en células de la planta de la parte o tejido aéreo, tales como la vasculatura y los meristemos primarios y secundarios de los vástagos, en particular, la zona cambial. La cantidad de polipéptido SHR puede determinarse mediante el uso de cualquier técnica adecuada. Convenientemente pueden emplearse técnicas inmunológicas tales como la inmunotransferencia Western, mediante el uso de anticuerpos que se unen al polipéptido SHR y muestran poca o ninguna unión a otros antígenos de la planta. Por ejemplo, la cantidad de un polipéptido SHR en una célula vegetal puede determinarse poniendo en contacto una muestra que comprende la célula vegetal con un anticuerpo u otro miembro de unión específica dirigido contra el polipéptido SHR, y determinar la unión del polipéptido SHR a la muestra. La cantidad de unión del miembro de unión específica es indicativa de la cantidad de polipéptido SHR que es expresado en la célula.

En otras formas de realización, la expresión del polipéptido SHR puede determinarse a nivel de ácido nucleico. Por ejemplo, puede determinarse la cantidad de ácido nucleico que codifica un polipéptido SHR. Un método para la producción de una planta con un crecimiento y/o una biomasa aumentados puede comprender:

proporcionar una población de plantas,
determinar el nivel o la cantidad de ácido nucleico, por ejemplo, de ARNm, que codifica el polipéptido SHR en una célula de una o más plantas de la población, e
identificar una o más plantas de la población con una cantidad reducida de un SHR que codifica el ácido nucleico con respecto a los demás miembros de dicha población.

El nivel o la cantidad del ácido nucleico codificante en una célula vegetal pueden ser determinados, por ejemplo, mediante la detección de la cantidad de ácido nucleico codificante transcrito en la célula. Esto puede llevarse a cabo mediante el uso de técnicas convencionales tales como una inmunotransferencia o una RT-PCR.

Una célula adecuada puede proceder de la parte o del tejido aéreo de la planta, tal como la vasculatura y los meristemos primarios y secundarios de los vástagos, en particular, la zona cambial.

Alternativamente, puede determinarse la presencia de variaciones en la secuencia que afecten a la expresión o a la actividad de un polipéptido SHR. Otro método para la producción de una planta con un crecimiento y/o una biomasa aumentados puede comprender:

proporcionar una población de plantas,
determinar la presencia de una o más variaciones en la secuencia, por ejemplo, polimorfismos, mutaciones o regiones de hipermetilación, en un ácido nucleico que codifica un polipéptido SHR en una célula en una o más plantas de la población, en el que dicha una o más variaciones en la secuencia reducen pero no anulan la expresión o la actividad del polipéptido SHR codificado, e
identificar una o más plantas de la población con una o más variaciones en la secuencia que reducen la expresión o la actividad de un polipéptido SHR con respecto a los demás miembros de dicha población.

Los polipéptidos SHR y los ácidos nucleicos codificantes se describen con más detalle más arriba.

Las variaciones en la secuencia, tales como las mutaciones y los polimorfismos, que reducen o anulan la expresión o la actividad, pueden incluir una delección, una inserción o una sustitución de uno o más nucleótidos, con respecto a la secuencia de nucleótidos natural, una amplificación génica o un aumento o una disminución en la metilación, por ejemplo, una hipermetilación. La una o más variaciones en la secuencia puede ser en una región codificante o no codificante de la secuencia de ácidos nucleicos. Las mutaciones en la región codificante del gen que codifica el componente puede impedir la traducción de la proteína activa completa, es decir, mutaciones de truncamiento, o permitir la traducción de la proteína completa pero con una función inactiva o deteriorada, es decir, mutaciones sin sentido. Las mutaciones o los cambios epigenéticos, tales como la metilación, en regiones no codificantes del gen que codifica el componente, por ejemplo, en un elemento regulador, pueden impedir la transcripción del gen. Un ácido nucleico que comprende una o más variaciones en la secuencia puede codificar una variante del polipéptido que tiene una actividad reducida o anulada, o puede codificar un polipéptido natural que tenga poca o ninguna expresión en la célula, por ejemplo, a través de la expresión alterada de un elemento regulador. Un ácido nucleico que comprende una o más variaciones en la secuencia puede tener una, dos, tres, cuatro o más mutaciones o polimorfismos con respecto a las secuencias de control.

La presencia de una o más variaciones en la secuencia en un ácido nucleico puede determinarse mediante la detección de la presencia de la variante de la secuencia del ácido nucleico en una o más células vegetales, o mediante la detección de la presencia de la variante del polipéptido que está codificado por la secuencia de ácidos nucleicos. Las técnicas preferidas de detección de variaciones en secuencias de ácidos nucleicos incluyen la amplificación específica de alelos ARMS™, OLA, ALEX™, COPS, Taqman, Molecular Beacons, RFLP y técnicas de PCR y FRET basadas en sitios de restricción.

En la materia hay disponibles numerosos métodos adecuados para la determinación de la cantidad de un ácido nucleico que codifica un polipéptido SHR, o de la presencia o la ausencia de una variación en la secuencia de un

ácido nucleico que codifica un polipéptido SHR, en una célula vegetal (véase, por ejemplo, (véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3ª edición, Sambrook & Russell (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press NY; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. eds. John Wiley & Sons (1992); DNA Cloning, The Practical Approach Series (1995), series eds. D. Rickwood y B. D. Hames, IRL Press, Oxford, Reino Unido, y PCR Protocols: A Guide to Methods y Applications (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, Calif.)). Muchos de los métodos actuales para la detección de una variación en la secuencia están revisados por Nollau et al., Clin. Chem. 43, 1114 - 1120, 1997; y en los libros de texto habituales, por ejemplo, como "Laboratory Protocols for Mutation Detection", Ed. by U. Landegren, Oxford University Press, 1996, y en "PCR", 2ª Edición, de Newton & Graham, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997.

Las técnicas preferidas de variación de la secuencia de polipéptidos incluyen inmunoensayos, que son bien conocidos en la materia, por ejemplo, A Practical Guide to ELISA, de D M Kemeny, Pergamon Press 1991; Principles and Practice of Immunoassay, 2ª edición, C P Price & D J Newman, 1997, publicado por Stockton Press en Estados Unidos & Canadá, y por Macmillan Reference en el Reino Unido.

En algunas formas de realización, puede secuenciarse el ácido nucleico o una región amplificada del mismo para identificar o determinar la presencia de un polimorfismo o una mutación en el mismo. Un polimorfismo o una mutación pueden ser identificados mediante la comparación de la secuencia obtenida con la secuencia conocida del SHR, por ejemplo, según se establece en las bases de datos de secuencias. Alternativamente, puede compararse con la secuencia del correspondiente ácido nucleico de células de control. En particular, puede determinarse la presencia de uno o más polimorfismos o mutaciones que provoquen la reducción pero no la anulación total de la función. La secuenciación puede llevarse a cabo mediante el uso de una cualquiera de un abanico de técnicas convencionales. La secuenciación de un producto amplificado puede implicar, por ejemplo, una precipitación con isopropanol, la resuspensión y la secuenciación mediante el uso de un kit de secuenciación TaqFS+ Dye terminator (por ejemplo, de GE Healthcare UK Ltd, Reino Unido). Los productos de la extensión pueden someterse a electroforesis en un secuenciador de ADN ABI 377 y analizarse los datos mediante el uso del programa informático Sequence Navigator.

Puede ensayarse una planta progenitora identificada como portadora de una expresión reducida del SHR para comprobar el aumento en la biomasa, el crecimiento y la velocidad de crecimiento con respecto a los controles.

Un método para la producción de una planta con un crecimiento y/o una biomasa aumentados puede comprender:

cruzar una primera y una segunda planta para producir una población de plantas progenitoras;
determinar la expresión de un polipéptido Short Root (SHR) en las plantas progenitoras en la población, e
identificar una planta progenitora en la población en la que la expresión del polipéptido SHR está reducida con respecto a los controles, pero no anulada.

Una planta progenitora en la que la expresión del polipéptido SHR está reducida, pero no anulada (es decir, la expresión no se elimina completamente) con respecto a los controles (por ejemplo, otros miembros de la población) puede mostrar un crecimiento primario y/o secundario aumentados con respecto a los controles, o una acumulación de biomasa aumentada. Una planta leñosa puede mostrar un aumento en la densidad de la madera.

La planta progenitora identificada puede ser adicionalmente propagada o cruzada, por ejemplo, con la primera o con la segunda planta (es decir, retrocruzamiento), o autocruzarse para producir líneas endogámicas.

La planta progenitora identificada puede ensayarse para comprobar el aumento en la biomasa, el crecimiento y la velocidad de crecimiento con respecto a los controles.

Un polipéptido SHORT-ROOT (SHR) o un ácido nucleico codificante según se describe en este documento pueden usarse como un marcador para el cultivo selectivo de una planta que tiene un aumento en la biomasa o en el crecimiento en su parte aérea, con respecto a las plantas de control. Un método de cultivo selectivo de una planta que tiene un aumento en la biomasa o en el crecimiento en su parte aérea, con respecto a las plantas de control, puede emplear el aminoácido SHORT-ROOT (SHR) o una secuencia codificante de ácidos nucleicos.

Las plantas que tienen reducida la expresión del polipéptido SHORT-ROOT (SHR) pueden producirse mediante una mutagénesis aleatoria, seguido de exploración de los mutantes para seleccionar los de expresión reducida del SHR. Las técnicas adecuadas son bien conocidas en la materia e incluyen Lesiones Locales Dirigidas Inducidas en el Genoma (*Targeting Induced Local Lesions IN Genomes* (TILLING)). El TILLING es una técnica de exploración de alto rendimiento que da como resultado la identificación sistemática de mutaciones no derivadas de GMO en genes objetivo específicos (Comai y Henikoff, The Plant Journal (2006) 45, 684 - 694).

Un método para la producción de una planta con un crecimiento y/o una biomasa aumentados puede comprender:

exponer una población de plantas a un mutágeno,
determinar la expresión de un polipéptido SHR o de un ácido nucleico en una o más plantas de dicha población,

e

identificar una planta con una expresión reducida del polipéptido SHR con respecto a los demás miembros de dicha población.

5 Algunos mutágenos adecuados incluyen metil sulfonato de etano (EMS).

Algunos métodos para la determinación de la expresión del polipéptido o del ácido nucleico SHR en plantas se describen con más detalle más arriba.

10 La planta identificada puede ensayarse adicionalmente para comprobar el aumento en la biomasa, el crecimiento y/o la velocidad de crecimiento de la parte aérea con respecto a los controles.

15 Una planta identificada por tener una expresión reducida del polipéptido SHR con respecto a los controles (por ejemplo, otros miembros de la población) puede mostrar un aumento en el crecimiento primario y/o secundario en su parte aérea con respecto a los controles, o un aumento en la acumulación de biomasa. Una planta leñosa puede mostrar un aumento en la densidad de la madera.

20 Una planta producida o identificada como se ha descrito anteriormente puede ser propagada sexualmente o asexualmente o cultivada para producir hijos o descendientes. Los hijos o descendientes de la planta generados a partir de una o más células pueden propagarse o cultivarse sexualmente o asexualmente. La planta o sus hijos o descendientes pueden cruzarse con otras plantas o con ellos mismos.

25 Otro aspecto de la invención proporciona una planta dicotiledónea que es producida mediante un método descrito en este documento según se establece en la reivindicación 5, en el que dicha planta muestra un aumento en el crecimiento y/o en la biomasa con respecto a las plantas de control.

También se proporciona cualquier parte o propágulo de dicha planta, por ejemplo, semillas, progenie y descendientes endogámicos o híbridos.

30 Una planta dicotiledónea de acuerdo con la presente invención puede ser aquella que no se reproduce de forma idéntica en una o más propiedades. Pueden excluirse las variedades de plantas, particularmente las variedades de plantas registrables de acuerdo con los Derechos de Obtentor.

35 Además de una planta dicotiledónea producida mediante un método descrito en este documento, la invención engloba cualquier clon, semilla, progenie y descendientes endogámicos o híbridos de dicha planta, y cualquier parte o propágulo de cualquiera de estos, tales como esquejes y semillas, que puedan usarse en la reproducción o en la propagación, sexual o asexual. También está englobada por la invención una planta que es un hijo, un clon o un descendiente de dicha planta propagado sexualmente o asexualmente, o cualquier parte o propágulo, hijo, clon o descendiente de dicha planta.

40 Los polipéptidos SHORT-ROOT (SHR) se describen con más detalle más arriba. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido SHR puede comprender o consistir en la secuencia de nucleótidos de las ID. SEC. N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 o puede ser una variante o un fragmento de una cualquiera de estas secuencias que conserve la actividad SHR.

45 Una variante de la secuencia puede ser un mutante, un homólogo o un alelo de las ID. SEC. N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 puede diferir de una de estas secuencias en una o más de una adición, una inserción, una elección o una sustitución de uno o más nucleótidos en el ácido nucleico, dando lugar a la adición, la inserción, la delección o la sustitución de uno o más aminoácidos en el polipéptido codificado. Por supuesto, están incluidos los cambios en el ácido nucleico que no crean ninguna diferencia con la secuencia de aminoácidos codificada. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido SHR, que tiene una secuencia de nucleótidos que es una variante de la secuencia de las ID. SEC. N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 puede comprender una secuencia que tiene al menos un 30 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácidos nucleicos de las ID. SEC. N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15, por ejemplo, preferiblemente mayor del 40 %, mayor del 50 %, mayor del 60 %, mayor del 65 %, mayor del 70 %, mayor del 80 %
55 %, mayor del 90 % o mayor del 95 %. La identidad de secuencia se describe más arriba.

60 Un fragmento o variante puede comprender una secuencia que codifica un polipéptido SHR funcional, es decir, un polipéptido que conserva una o más características funcionales del polipéptido codificado por el gen SHR natural, por ejemplo, la capacidad de estimular el crecimiento en una planta.

En otras formas de realización, un ácido nucleico que codifica un polipéptido SHR, que tiene una secuencia de nucleótidos que es una variante de la secuencia de las ID. SEC. N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 puede hibridar selectivamente en condiciones rigurosas con esta secuencia de ácidos nucleicos o con el complemento de la misma.

65 Las condiciones rigurosas incluyen, por ejemplo, para la hibridación de secuencias que son idénticas en aproximadamente el 80 - 90 %, una hibridación durante una noche a 42 °C en Na₂HPO₄ 0,25 M, a pH 7,2, un 6,5 %

de SDS, un 10 % de sulfato de dextrano y un lavado final a 55 °C en 0,1X de SSC, un 0,1 % de SDS. Para la detección de las secuencias que son idénticas en más de aproximadamente el 90 %, las condiciones adecuadas incluyen una hibridación durante una noche a 65 °C en Na₂HPO₄ 0,25 M, a pH 7,2, un 6,5 % de SDS, un 10 % de sulfato de dextrano y un lavado final a 60 °C en 0,1X de SSC, un 0,1 % de SDS.

5 Una alternativa que puede ser particularmente apropiada con preparaciones de ácidos nucleicos vegetales es una solución de 5x de SSPE (final, NaCl 0,9 M, fosfato de sodio 0,05 M, EDTA 0,005 M, pH 7,7), 5X de solución de Denhardt, un 0,5 % de SDS, a 50 °C o a 65 °C durante una noche. Los lavados pueden realizarse con 0,2x de SSC / un 0,1 % de SDS a 65 °C o a 50 - 60 °C en 1x de SSC / un 0,1 % de SDS, según se requiera.

10 Un ácido nucleico que codifica un polipéptido o un ácido nucleico Short Root (SHR) que suprime la expresión de un polipéptido Short Root (SHR) (es decir, una molécula de ARN supresora) puede estar unido operativamente a una secuencia reguladora, tal como un promotor, por ejemplo, un promotor constitutivo, inducible, específico tisular o específico de desarrollo.

15 Una secuencia reguladora unida operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos SHR es preferiblemente heteróloga o foránea de la secuencia de ácidos nucleicos SHR (por ejemplo, de una especie, clase o tipo de organismo diferente). Preferiblemente, la secuencia reguladora es una secuencia reguladora específica vegetal para proporcionar una expresión deficiente en una célula vegetal. Una secuencia o un elemento regulador específico vegetal dirige preferentemente la expresión (es decir, la transcripción) de un ácido nucleico en una célula vegetal con respecto a otros tipos celulares. Por ejemplo, la expresión de dicha secuencia puede reducirse o anularse en células no vegetales, tales como en células bacterianas o de mamífero.

25 Se conocen muchas secuencias reguladoras adecuadas en la materia, y pueden usarse de acuerdo con la invención. Algunos ejemplos de secuencias reguladoras adecuadas pueden derivar de un virus vegetal, por ejemplo, el promotor del gen del virus del mosaico de la coliflor 35S (CaMV 35S) que es expresado a un nivel alto en prácticamente todos los tejidos vegetales (Benfey et al, (1990) EMBO J 9: 1677 - 1684). También pueden usarse promotores específicos de las hojas (véase, por ejemplo, Lagrange et al Plant Cell. 1997 9 (8): 1469 - 1479). Otros elementos reguladores constitutivos adecuados incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor 19S; el promotor del virus del mosaico Figwort; y el promotor del gen de la sintasa de nopalina (nos) (Singer et al., Plant Mol. Biol. 14: 433 (1990); An, Plant Physiol. 81: 86 (1986)).

35 En algunas formas de realización puede emplearse un promotor inducible tal como el sistema de expresión inducible por alcohol del gen alc (Roslan et al., Plant Journal; octubre de 2001; 28 (2): 225 - 35).

El ácido nucleico heterólogo puede estar contenido en una construcción o en un vector de ácido nucleico. La construcción o vector es preferiblemente adecuado para su transformación y/o su expresión en una célula vegetal.

40 Un vector es, entre otros, cualquier plásmido, cósmido, fago o vector binario de *Agrobacterium* de forma lineal o circular bi o monocatenario, que puede ser o no autotransmisible o movilizable, y que puede transformar el hospedador procarionota o eucariota, en particular un hospedador vegetal, tanto mediante integración en el genoma celular como mediante una existencia extracromosómica (por ejemplo, un plásmido de replicación autónoma con un origen de replicación).

45 Específicamente están incluidos los vectores lanzadera, por los que se entiende un vehículo de ADN capaz, de forma natural o diseñada, de replicarse en dos organismos diferentes, que pueden elegirse de entre *actinomyces* y especies relacionadas, células bacterianas y eucariotas (por ejemplo, de vegetales superiores, de mamífero, de levadura o fúngica).

50 Un construcción o un vector que comprende un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente no necesita incluir un promotor ni ninguna otra secuencia reguladora, particularmente si el vector se va a usar para introducir el ácido nucleico en las células para su recombinación en el genoma.

55 Los construcciones y los vectores pueden comprender adicionalmente marcadores genéticos seleccionables que consisten en genes que confieren unos fenotipos seleccionables tales como resistencia a antibióticos tales como kanamicina, higromicina, fosfotricina, clorsulfuron, metotrexato, gentamicina, espectinomina, imidazolinonas, glifosato y d-aminoácidos.

60 Los expertos en la materia son bien capaces de construir vectores y de diseñar protocolos para la expresión génica recombinante, en particular en una célula vegetal. Los vectores adecuados pueden elegirse o construirse para que contengan las secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3ª edición, Sambrook & Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

65

Los expertos en la materia pueden construir vectores y diseñar protocolos para una expresión génica recombinante, por ejemplo, en una célula microbiana o vegetal. Los vectores adecuados pueden elegirse o construirse para que contengan las secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 3ª edición, Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, y *Protocols in Molecular Biology*, Segunda Edición, Ausubel et al. eds. John Wiley & Sons, 1992. Algunos procedimientos y vectores específicos usados previamente con un gran éxito en plantas se describen en Bevan, *Nucl. Acids Res.* (1984) 12, 8711 - 8721), y en Guerinneau y Mullineaux, (1993) *Plant transformation and expression vectors*. En: *Plant Molecular Biology Labfax* (Croy RRD ed) Oxford, BIOS Scientific Publishers, págs. 121 - 148.

Cuando se introduce una construcción génica elegido en una célula deben tenerse en cuenta ciertas consideraciones, bien conocidas por los expertos en la materia. El ácido nucleico que se va a insertar debería estar ensamblado dentro de una construcción que contenga elementos reguladores eficaces que dirigirán la transcripción. Debe haber disponible un método para transportar la construcción a la célula. Una vez que el construcción está dentro de la membrana celular se producirá o no la integración en el material cromosómico endógeno. Finalmente, el tipo de célula objetivo es preferiblemente tal que las células puedan ser regeneradas en plantas completas.

Pueden usarse técnicas bien conocidas por los expertos en la materia para introducir construcciones y vectores de ácidos nucleicos en células vegetales para producir plantas transgénicas con las propiedades descritas en este documento.

La transformación en *Agrobacterium* es un método usado ampliamente por los expertos en la materia para transformar especies de plantas leñosas, en particular especies de madera noble tales como el álamo. La producción de plantas transgénicas fértiles y estables es ahora rutinaria en la materia: (Toriyama, et al. (1988) *Bio/Technology* 6, 1072 - 1074; Zhang, et al. (1988) *Plant Cell Rep.* 7, 379 - 384; Zhang, et al. (1988) *Theor Appl Genet* 76, 835 - 840; Shimamoto, et al. (1989) *Nature* 338, 274 - 276; Datta, et al. (1990) *Bio/Technology* 8, 736 - 740; Christou, et al. (1991) *Bio/Technology* 9, 957 - 962; Peng, et al. (1991) International Rice Research Institute, Manila, Philippines 563 - 574; Cao, et al. (1992) *Plant Cell Rep.* 11, 585 - 591; Li, et al. (1993) *Plant Cell Rep.* 12, 250 - 255; Rathore, et al. (1993) *Plant Molecular Biology* 21, 871 - 884; Fromm, et al. (1990) *Bio/Technology* 8, 833 - 839; Gordon-Kamm, et al. (1990) *Plant Cell* 2, 603 - 618; D'Halluin, et al. (1992) *Plant Cell* 4, 1495 - 1505; Walters, et al. (1992) *Plant Molecular Biology* 18, 189 - 200; Koziel, et al. (1993) *Biotechnology* 11, 194 - 200; Vasil, I. K. (1994) *Plant Molecular Biology* 25, 925 - 937; Weeks, et al. (1993) *Plant Physiology* 102, 1077 - 1084; Somers, et al. (1992) *Bio/Technology* 10, 1589 - 1594; documento WO92/14828; Nilsson, O. et al (1992) *Transgenic Research* 1, 209 - 220).

Pueden preferirse otros métodos, tales como el bombardeo con microproyectiles o con partículas (documento US 5100792, documento EP-A-444882, documento EP-A-434616), la electroporación (documento EP 290395, documento WO 8706614), la microinyección (documento WO 92/09696, documento WO 94/00583, documento EP 331083, documento EP 175966, Green et al. (1987) *Plant Tissue and Cell Culture*, Academic Press), la captación directa de ADN (documento DE 4005152, documento WO 9012096, documento US 4684611), la captación de ADN mediada por liposomas (por ejemplo, Freeman et al. *Plant Cell Physiol.* 29: 1353 (1984)), o el método de agitación vorticial (por ejemplo, Kindle, *PNAS EE.UU.* 87: 1228 (1990d)) cuando la transformación en *Agrobacterium* es ineficaz o inefectiva, por ejemplo, en algunas especies de gimnospermas.

Los métodos físicos para la transformación de células vegetales están revisados en Oard, 1991, *Biotech. Adv.* 9: 1 - 11.

Alternativamente, puede emplearse una combinación de diferentes técnicas para mejorar la eficacia del proceso de transformación, por ejemplo, el bombardeo con micropartículas recubiertas con *Agrobacterium* (documento EP-A-486234) o bombardeo con microproyectiles para inducir lesiones seguido del cultivo conjunto con *Agrobacterium* (documento EP-A-486233).

Después de la transformación, una planta puede ser regenerada, por ejemplo, a partir de células individuales, de tejido calloso o de discos foliáceos, como es habitual en la materia. Prácticamente cualquier planta puede ser regenerada completamente a partir de células, tejidos y órganos de la planta. Las técnicas disponibles están revisadas en Vasil et al., *Cell Culture y Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol I, II y III *Laboratory Procedures y Their Applications*, Academic Press, 1984, y en Weissbach y Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989.

La elección en particular de la tecnología de transformación estará determinada por su eficacia para transformar ciertas especies vegetales, así como por la experiencia y la preferencia de la persona que lleva a cabo la invención con una metodología de elección en particular. El experto apreciará que la elección en particular de un sistema de transformación para introducir un ácido nucleico en células vegetales no es esencial para, ni una limitación de, la invención, ni tampoco la elección de la técnica de regeneración de la planta.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para la producción de una planta dicotiledónea con un aumento en el crecimiento y/o en la biomasa que comprende:

5 incorporar un ácido nucleico heterólogo que reduce pero no anula la expresión de un polipéptido SHORT-ROOT (SHR) en una célula vegetal mediante una transformación, y;
regenerar la planta a partir de una o más células transformadas, según se establece en la reivindicación 3.

10 El ácido nucleico heterólogo reduce pero no anula la expresión de un polipéptido SHORT-ROOT (SHR). El ácido nucleico heterólogo puede codificar o transcribir un ácido nucleico que suprime la expresión del polipéptido SHORT-ROOT (SHR), por ejemplo, una molécula de ARNi.

15 Una planta dicotiledónea producida mediante dichos métodos puede mostrar un aumento en el crecimiento y/o en la biomasa con respecto a las plantas de control. Por ejemplo, las porciones aéreas de la planta pueden mostrar un aumento en el crecimiento y/o en la biomasa con respecto a los controles.

Preferiblemente, el ácido nucleico se recombina con el ácido nucleico genómico celular, de forma que es incorporado de forma estable en el mismo.

20 El polipéptido SHR, el ácido nucleico codificante y/o el vector que comprende el ácido nucleico se describen con más detalle más arriba, y pueden ser heterólogos (por ejemplo, exógenos o foráneos) de la célula transformada con los mismos.

25 La planta regenerada muestra un aumento en el crecimiento y/o en la biomasa con respecto a los controles. Por ejemplo, las porciones aéreas de la planta pueden mostrar un aumento en el crecimiento y/o en la biomasa. Una planta leñosa regenerada puede mostrar un aumento en la densidad de la madera. Una planta regenerada a partir de una célula vegetal puede propagarse sexualmente o asexualmente, o crecer para producir hijos o descendientes. Los hijos o los descendientes de la planta regenerada a partir de una o más células pueden propagarse o crecer sexualmente o asexualmente.

30 Otro aspecto de la invención proporciona una planta dicotiledónea que es producida mediante un método descrito en este documento según se establece en la reivindicación 5, en el que dicha planta muestra un aumento en el crecimiento y/o en la biomasa, por ejemplo, un aumento en el crecimiento aéreo y/o en la biomasa, con respecto a las plantas de control.

35 La planta dicotiledónea comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un supresor de la expresión del polipéptido SHORT-ROOT (SHR) en una o más de su células.

También se proporciona cualquier parte o propágulo de dicha planta, por ejemplo, semillas, progenie y descendientes endogámicos o híbridos.

40 Una planta puede ser aquella que no se reproduzca de forma idéntica en una o más propiedades. Pueden excluirse las variedades de plantas, particularmente las variedades de plantas registrables de acuerdo con los Derechos de Obtentor. Se aprecia que una planta no tiene por qué ser considerada una "variedad de planta" simplemente porque contiene de forma estable en su genoma un transgen, introducido en una célula de la planta o en un progenitor de la misma.

50 Además de una planta dicotiledónea, cualquier clon, semilla, progenie y descendientes endogámicos o híbridos de dicha planta, y cualquier parte o propágulo de cualquiera de estos, tales como esquejes y semillas, puede ser útiles en la reproducción o en la propagación, sexual o asexual. Una planta dicotiledónea que es un hijo, un clon o un descendiente propagado sexualmente o asexualmente de dicha planta, o cualquier parte o propágulo, hijo, clon o descendiente de dicha planta, también puede ser útil.

55 Una planta puede tener una expresión disminuida del polipéptido SHR, con respecto a la planta silvestre (es decir, "sin modificar"). La expresión del SHR puede reducirse mediante la expresión de un ácido nucleico que provoca una regulación por disminución antisentido, sentido o mediante un ARNi del SHR en las células de la planta, como se ha descrito anteriormente.

60 Pueden llevarse a cabo experimentos de control según sea apropiado en los métodos descritos en este documento. La realización de los controles adecuados está en la competencia y la capacidad de una persona experta en la materia.

65 Algunos ejemplos de plantas adecuadas para su uso de acuerdo con cualquier aspecto de la invención descrita en este documento incluyen las dicotiledóneas. De particular interés son las plantas superiores transgénicas, especialmente las cosechas agrícolas, por ejemplo, cereales, y plantas, que han sido modificadas genéticamente para portar un ácido nucleico heterólogo como se ha descrito anteriormente, incluyendo tabaco, cucurbitáceas, zanahorias, brasicáceas vegetales, melones, pimientos, vides, lechuga, fresas, brasicáceas oleaginosas, remolacha

azucarera, trigo, cebada, maíz, arroz, soja, guisantes, sorgo, girasol, tomate, patata, pimienta, crisantemo, clavel, linaza, cáñamo y centeno. En este documento se establecen algunos ejemplos de secuencias de proteínas SHR de *Arabidopsis*, álamo, arroz, cebada y *Medicago*.

5 En algunas formas de realización preferidas, la planta es una planta perenne, por ejemplo, una planta perenne leñosa. Una planta leñosa es una planta que tiene un ciclo de vida que dura más de 2 años que implica un largo periodo juvenil en el que sólo se produce crecimiento vegetativo. Esto contrasta con una planta anual o herbácea tal como *Arabidopsis thaliana* o *Lycopersicon esculentum* (tomate), que tienen un ciclo de vida que se completa en un año.

10 Una planta perenne leñosa tiene tejidos duros y lignificados y forma un arbusto o un árbol. Las plantas perennes preferidas son árboles (es decir, plantas de especies formadoras de árboles). Una planta perenne leñosa puede ser una angiosperma (planta con flor). Las angiospermas se dividen en dos amplias clases, y una planta perenne puede ser una angiosperma dicotiledónea.

15 Algunos ejemplos de plantas perennes leñosas incluyen las coníferas tales como cipreses, pino de Oregón, abeto, secuoya, abeto canadiense, cedro, junípero, alerce, pino, secuoya roja, píceas y tejo; árboles de madera noble tales como acacia, eucalipto, hojarazo, haya, caoba, nogal, roble, fresno, sauce, nogal americano, abedul, castaño, chopo, aliso, arce y sicomoro; árboles frutales tales como manzano, ciruelo, peral, banano, naranjo, kiwi, limonero, cerezo, vid e higuera; y otras plantas comercialmente significativas, tales como algodón, bambú y caucho.

El promotor SHR puede usarse para explorar compuestos que alteran (es decir, que aumentan o reducen) la expresión del polipéptido SHR en una planta.

25 Un método de exploración de un compuesto que aumenta el crecimiento aéreo y/o la biomasa de una planta puede comprender;

30 proporcionar un construcción de un ácido nucleico que comprende un promotor SHR unido operativamente a un gen indicador, en un sistema de expresión en el que el indicador es expresado, poner en contacto el construcción con un compuesto de ensayo y determinar la expresión del indicador, en el que un aumento o una disminución en la expresión del indicador en presencia con respecto a la ausencia del compuesto de ensayo, es indicativo de que el compuesto aumenta el crecimiento aéreo y/o la biomasa de una planta.

35 Un promotor SHR puede tener la secuencia de las ID. SEC. Nº: 22 o 23, o puede ser una variante o un fragmento de la misma. Las variantes y los fragmentos de las secuencias SHR de referencia, tales como las ID. SEC. Nº: 22 y 23, se describen más arriba.

40 Los genes indicadores adecuados son bien conocidos en la materia e incluyen genes que codifican para proteínas fluorescentes tales como la GFP.

El promotor SHR también puede ser útil para dirigir la expresión de un gen heterólogo en tejidos formadores de madera de una planta perenne leñosa. Los tejidos formadores de madera incluyen la vasculatura y los meristemos primario y secundario de los vástagos, incluyendo la zona cambial.

45 Un método para producir una planta puede comprender:

50 incorporar un construcción de un ácido nucleico o un vector que comprende un promotor SHORT-ROOT (SHR) unido operativamente a un gen heterólogo en una célula vegetal mediante una transformación, y; regenerar la planta a partir de una o más células transformadas.

Preferiblemente, la planta es una planta perenne leñosa y el promotor SHORT-ROOT (SHR) dirige la expresión del gen heterólogo en el tejido formador de madera de la planta perenne leñosa.

55 Algunas secuencias heterólogas adecuadas pueden incluir secuencias que codifican para polipéptidos que alteran el crecimiento o la composición de la célula, los tejidos y/o los órganos de la planta transformada, en particular los genes promotores del crecimiento y los genes que mejoran la calidad de la madera.

La planta regenerada puede ser cruzada o propagada como se ha descrito anteriormente.

60 Una construcción o un vector de un ácido nucleico pueden comprender un promotor SHORT-ROOT (SHR) unido operativamente a un gen heterólogo. Dicho construcción o vector de un ácido nucleico puede usarse para expresar específicamente el gen heterólogo en los tejidos formadores de madera de una planta perenne leñosa. Un método para expresar un gen heterólogo en los tejidos formadores de madera de una planta perenne leñosa puede comprender la introducción de dicho construcción o vector en la planta perenne leñosa.

65

Los diversos aspectos y formas de realización adicionales de la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia en vista de la presente divulgación

5 Cuando en este documento se usa "y/o" debe interpretarse como la divulgación específica de cada una de los dos componentes especificados, con o sin el otro. Por ejemplo "A y/o B" debe interpretarse como la divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se estableciera individualmente en este documento.

10 Salvo que el contexto lo indique de otro modo, las descripciones y las definiciones de las características establecidas anteriormente no están limitadas en ningún aspecto o forma de realización particular de la invención, y se aplican igualmente en todos los aspectos y las formas de realización que se describen.

Ahora se ilustran ciertos aspectos y formas de realización de la invención a modo de ejemplo y con referencia a las figuras descritas a continuación.

15 La Figura 1 muestra un cladograma no ramificado de las secuencias de álamo y Arabidopsis con o similitudes con la AtSHR. El análisis filogenético se realizó con las secuencias de aminoácidos predichas completas de miembros de álamo y de Arabidopsis de la rama SHR de la familia GRAS. Se usó ClustalW para alinear las secuencias de las proteínas. Se usó el formato de Phylip para el árbol de resultados, mediante el uso de 1000 copias *bootstrap*. El cladograma se visualizó mediante el uso de TreeViewX (versión 0.5.0).

La Figura 2 muestra una alineación de las secuencias de nucleótidos entre las secuencias codificantes predichas de la AtSHR y las tres proteínas de álamo similares a SHR, PtSHR1, PtSHR2A y PtSHR2B.

25 La Figura 3 muestra una comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de PtSHR1, PtSHR2A, PtSHR2B y AtSHR. Los aminoácidos idénticos, similares y conservados se muestran en fondos negro y gris, respectivamente. También se muestran los motivos de aminoácidos conservados a través de los miembros de la familia GRAS.

30 La Figura 4 muestra el crecimiento diferencial de árboles silvestres T89 y PtSHR1 con la línea de ARNi 2B. Árboles después de un periodo de crecimiento de 52 días en el invernadero y dos de los mismos árboles como plántulas iniciales en cultivo tisular (inserto).

35 La Figura 5 muestra las mediciones perimetrales de tallos de álamo después de 52 días de crecimiento en el invernadero. Los eventos de transformación independientes de las líneas de álamo PtSHR1 con ARNi (2A, 2B y 4A) en comparación con el T89 silvestre. Los resultados se presentan como las medias más y menos 1 DT. Las medias son el ancho promedio de 10 entrenudos de 9 árboles para cada una de las líneas con ARNi y T89 silvestre, comenzando en el entrenudo que está 200 mm por encima del suelo.

40 La Figura 6 muestra secciones transversales de T89 silvestre y la línea 2B de PtSHR1 con ARNi. Las secciones se tomaron del centro de los entrenudos 500 mm por encima del suelo y se tiñeron con azul de toluidina. Las flechas de cabeza doble indican el xilema (células leñosas).

45 La Figura 7 muestra la biomasa acumulada en tallos de álamo después de 52 días de crecimiento en el invernadero. Los eventos de transformación independientes de las líneas de álamo PtSHR1 con ARNi (2A, 2B y 4A) en comparación con T89 silvestre. Los resultados se presentan como las medias más y menos 1 DT. Las medias, n = 9, son la masa fresca total media en gramos de los tallos y las hojas a partir de 200 mm por encima del suelo.

50 La Figura 8 muestra la longitud media entre nudos de tallos de álamo después de 52 días de crecimiento en el invernadero. Los eventos de transformación independientes de las líneas de álamo PtSHR1 con ARNi (2A, 2B y 4A) en comparación con T89 silvestre. Los resultados se presentan como las medias más y menos 1 DT. Las medias, n = 9, son las longitudes medias de 15 entrenudos completamente expandidos comenzando 200 mm por encima del suelo.

55 La Figura 9 muestra el número medio de hojas (nodos) en tallos de álamo después de 52 días de crecimiento en el invernadero. La línea de álamo PtSHR1 2B con ARNi en comparación con T89 silvestre. Los resultados se presentan como las medias más y menos 1 DT. Las medias, n = 9, son el número medio de bajas producido a partir de 200 mm por encima del suelo hasta la hoja más joven de al menos 40 mm de longitud.

60 La Figura 10 muestra una comparación de las longitudes y las anchuras de las traqueidas del centro de los entrenudos completamente expandidos de eventos de transformación independientes de las líneas de álamo PtSHR1 con ARNi (2A y 2B) en comparación con T89 silvestre. Los resultados se presentan como las medias más y menos 1 DT. Medias, n = 30, son las longitudes y las anchuras medias (unidades arbitrarias) de las traqueidas. A & C y B & D representan las mediciones de las secciones tomadas de entrenudos individuales de aproximadamente la misma longitud.

65

La Figura 11 muestra el área foliar media y el peso fresco de hojas completamente expandidas de tallos de álamo después de 52 días de crecimiento en el invernadero. Las líneas de álamo PtSHR1 con ARNi (2A, 2B y 4A) en comparación con T89 silvestre. Los resultados se presentan como las medias más y menos 1 DT. Las medias son el área y el peso promediados de 15 hojas completamente expandidas a partir de 200 mm por encima del suelo de 9 árboles individuales para cada una de las líneas 2A, 2B, 4A y silvestre T89.

La Figura 12 muestra una comparación de los niveles del transcrito PtSHR1 en varios órganos de plantas de álamo. Los datos se presentan como la expresión relativa a escala log2, indicando las barras de error 1 DT. Los datos representan los niveles de los transcritos PtSHR1 con respecto a una muestra agrupada de todos los tejidos (por ejemplo, ápice frente al grupo, hoja frente al grupo). Ápice = ápice del vástago; PrimRoot = raíz primaria (crecida en cultivo tisular); SecRoot = raíz secundaria (lateral) (crecida en cultivo tisular).

La Figura 13 muestra la germinación y el crecimiento temprano de Arabidopsis con el AtSHR suprimido con ARNi y de plantas de control silvestres. A. Germinación de las semillas de las líneas transgénicas 4, 6 y 11 y de semillas silvestres. B. Semillas silvestres y de la línea 11 después de 18 horas a 23 °C. C. Semillas silvestres y de la línea 11 después de 40 horas a 23 °C. D. Plántulas silvestres y de la línea 11 después de 5,5 días a 23 °C. E. Semillas silvestres y de la línea 11 etioladas después de 5,5 días a 23 °C. F. Tamaño medio del cotiledón de plántulas silvestres y de la línea 11 cultivadas con luz después de 5,5 días a 23 °C. G. Longitud media del hipocótilo de plántulas etioladas después de 5,5 días a 23 °C. H. Longitud media de la raíz de plántulas silvestres, *shr* y transgénicas después de 5,5 días a 23 °C. Las placas para las plantas cultivadas a la luz (A, B, C, D, F y H) contenían un 1 % de sacarosa. Las plántulas etioladas se cultivaron en placas sin sacarosa. Los resultados de A se presentan como el porcentaje de germinación de las muestras de 140 semillas con el tiempo. Todos los experimentos se llevaron a cabo tres veces con resultados similares. Los resultados presentados son representativos de los tres experimentos. Las semillas silvestres y con ARNi para los experimentos se cultivaron en las mismas condiciones y al mismo tiempo. Después de recoger estas semillas se dejaron madurar completamente durante al menos 2 meses antes de llevar a cabo los experimentos de germinación y crecimiento. Los resultados de la F, G y H están presentados como las medias más y menos 1 DT.

La Figura 14 muestra la comparación del crecimiento en plantas Arabidopsis transgénicas con ARNi y silvestres de control. A. Plantas de la línea 11 en la fase 1.06 (Boyes et al., The Plant Cell, Vol. 13, 1499 - 1510, 2001) a los 15 días después de la germinación. B. Plantas silvestres en la misma fase de desarrollo (a los 18 días después de la germinación). C. Área de las hojas verdaderas completamente expandidas 1 y 2. D. Plantas de la línea 11 a los 18 días después de la germinación (compárense B y D). E. Área foliar total a los 18 días después de la germinación en las líneas con ARNi y en los controles silvestres. F. Secciones longitudinales radiales a lo largo de los ápices de las plantas silvestres de control y transgénicas de la línea 11 en el día 18. Los círculos de A y B destacan la 5ª hoja verdadera. Las líneas discontinuas de F representan el diámetro del domo apical silvestre.

La Figura 15 muestra una alineación de aminoácidos múltiples de genes PtSHR, AtSHR y Rice y las secuencias predichas de *Medicago*.

La Figura 16 muestra los niveles de transcrito de tres líneas independientes de supresión de *SHR* con ARNi de Aspen (2A-P con dos duplicados, 2B-P con dos duplicados y 4A-P) y cinco líneas silvestres T89, determinados mediante una RT-PCR.

45 Experimentos

Transformación en álamo

Se transformó el construcción de ADN con la repetición invertida CaMV 35S para *PtSHR1* en el vector binario pK7GWIWG2(I) (Karimi et al., Trends Plant Sci. Mayo de 2002; 7(5): 193 - 195) y se transfirió posteriormente a *Agrobacterium tumefaciens* y se usó para transformar segmentos de tallos de álamo híbrido (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*, clon T89) según se ha descrito previamente (Nilsson et al., 1992 Transgenic Research 1: 209 - 220). Los transformantes resistentes a la kanamicina se regeneraron según se ha descrito previamente (Nilsson et al., *supra*). Los cebadores usados para la clonación de la secuencia *PtSHR1* usada para el construcción de repetición invertida fueron 5'-AGAAAGCTGGGTAACCACCACCATCATCACTATC-3' (contiene un sitio ATTB2) y 5'-AAAAGCAGGCTGCTTTACCTTCAAATGCTTCC-3' (contiene un sitio ATTB1). El molde usado para la amplificación mediante PCR de la secuencia era el clon EST UB21CPG06. La clonación en el vector binario se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo recomendado por los fabricantes (Gateway, Invitrogen, EE.UU.). Las secuencias del cebador usado en el análisis mediante RT-PCR de los niveles de transcrito remanentes en las líneas transgénicas fueron: 5'-CATCACCTGACCTTCACTCC-3' y 5'-GTTTCG- GATTGTTGTTGGAGAC-3'. Los cebadores usados para la determinación de los niveles de transcrito de homólogos cercanos de *PtSNRI* (*PtSHR2A* y *PtSNR2B*) en líneas *PtSHR1* suprimidas con ARNi fueron 5'-AGCAACAACAACAACAATCAG-3' y 5'-GCACACTCACTAA-GAAGCC-3'. El análisis no mostró ninguna regulación por disminución de los niveles de transcrito de estos dos genes.

Se generaron veinticuatro líneas independientes. Dicho grupo de árboles transgénicos producidos mediante el uso de la construcción short root se denomina en lo sucesivo "grupo de construcción". Cada línea transgénica del grupo de construcción era un evento de transformación diferente y por lo tanto, lo más probablemente tendría el ADN recombinante insertado en diferentes ubicaciones dentro del genoma de la planta. Esto puede crear diferentes líneas dentro de un grupo de construcción parcialmente diferentes. Por ejemplo, se sabe que los eventos de transformación diferentes producirán plantas con diferentes niveles de regulación por disminución génica cuando se usan construcciones de ARNi del tipo usado en el presente documento.

Crecimiento de plantas de álamo

Después del inicio y el establecimiento del enraizado en el cultivo tisular, las líneas de álamo transgénico se cultivaron junto con sus árboles de control silvestre (T89), en un invernadero con un periodo de luz de 18 h y a una temperatura de 22 °C / 15 °C (día / noche). La humedad era del 70 % de HR. Las plantas se fertilizaban semanalmente mediante el uso del fertilizante "Weibulls Rika S NPK 7-1-5" diluido 1 a 100 (concentraciones finales de NO₃, 55 g/l; de NH₄, 29 g/l; de P, 12 g/l; de K, 56 g/l; de Mg 7,2 g/l; de S, 7,2 g/l; de B, 0,18 g/l; de Cu, 0,02 g/l; de Fe, 0,84 g/l; de Mn, 0,42 g/l; de Mo, 0,03 g/l; de Zn, 0,13 g/l). Las plantas se cultivaron durante 7 - 9 semanas antes de recogerlas. Durante este tiempo se alteraron sus posiciones en el invernadero cada 2 - 3 días y se midieron sus alturas y sus diámetros según se describe en los resultados. Se cultivaron varios árboles silvestres (normalmente 8 - 25 árboles) y varios árboles transgénicos que comprenden el grupo de construcción en paralelo en el invernadero en las mismas condiciones anteriores. Todas las comparaciones entre los árboles silvestres y el grupo de construcción se llevan a cabo dentro de cada grupo de cultivo.

Mediciones del crecimiento de álamo

En las condiciones de crecimiento definidas más arriba, las plantas de álamo mostraron un patrón de crecimiento exponencial (altura de la planta) hasta una altura aproximada de 80 cm o un máximo hasta el día 40 en el invernadero. Las mediciones de altura se realizaron en los momentos estipulados en los resultados. En las condiciones de crecimiento definidas más arriba, el ancho de los tallos mostraba un aumento comparativamente lineal con el tiempo.

Se definió una medición de la velocidad de crecimiento en altura (denominada en el presente documento "Velocidad de crecimiento en altura máxima") como la pendiente de una función y se ajustó sobre cuatro puntos de datos consecutivos de altura. Se calculó un valor de la velocidad de crecimiento en altura para los puntos de datos 1 - 4, para los puntos de datos 2 - 5 etc. de una forma gradual, véase la Figura 4 para un ejemplo. Se definió una velocidad de crecimiento máxima definida como el valor máximo, producido a partir del análisis de regresión lineal gradual, para cada planta. Se comprobaron los datos primarios para los valores altos de la *Velocidad de crecimiento en altura máxima* de los transformantes individuales de un grupo de construcción para confirmar que no estuvieran basados en unos valores incorrectos.

Inmunocitoquímica y microscopía de barrido con láser confocal

Los tejidos se prepararon en forma de un material seccionado semifino incluido en resina de metilmetacrilato de butilo. El material incluido en resina se fijó previamente con éster de N-hidroxisuccinimida de m-male-imidobenzóilo 100 µM (Sigma) en tampón Pipes 25 mM (Sigma), a pH 6,9. Después se fijó en formaldehído al 3,7 % con un 0,2 % (v/v) de glutaraldehído en tampón Pipes 25 mM, a pH 6,9, se incluyó en una mezcla de resina de metilmetacrilato de butilo, se polimerizó bajo luz UV y se seccionó a 7 µm. Después de eliminar la resina con acetona, las secciones se incubaron en una solución de bloqueo que contenía un 5 % de leche desnatada en polvo en PBS que contenía NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 2 mM, KH₂PO₄ 2 mM, a un pH de entre 7,2 y 7,4, y Tween 20 al 1 % durante ~ 45 min, antes de la aplicación del anticuerpo primario. Las secciones se incubaron en la solución de anticuerpo primario durante 2 h a la temperatura ambiente, o durante una noche a 4 °C, antes de lavar con Tween 20 al 0,1 % en PBS y de la aplicación del anticuerpo secundario conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Después, las secciones se incubaron durante 1 h a la temperatura ambiente, se lavaron concienzudamente como se ha descrito anteriormente, y se tiñeron con azul de toluidina O al 0,01 % durante 1 min para minimizar la autofluorescencia del tejido. Las secciones se montaron en Vectashield (Vector Laboratories) y se examinaron mediante microscopía de barrido con láser confocal mediante el uso del instrumento Zeiss LSM 510, con láseres de 488 y 568 nm de argón - criptón, generando la señal del FITC (detectada a entre 505 y 550 nm) y la señal de autofluorescencia (detectada a > 585 nm). Estas señales se detectaron en canales diferentes.

En el segundo método de preparación tisular se seccionó material reciente con una cuchilla de afeitar y se fijó en paraformaldehído al 4 % en tampón Pipes 50 mM, a pH 7, que contenía MgSO₄ 5 mM y EGTA 5 mM durante 30 min. Después de la fijación, el material se trató básicamente como el material incluido en metacrilato de metilo, excepto porque no era necesaria la inactivación de la autofluorescencia. Debido a que a la autofluorescencia de las paredes era baja, la señal del FITC era proyectada sobre una imagen de luz transmitida para mostrar el detalle anatómico.

Anticuerpos

Se usaron anticuerpos monoclonales creados contra la proteína recombinante PtSHR1 en conejo para localizar el PtSHR1. Los anticuerpos secundarios eran unos conjugados de FITC anti-conejo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) usados a una dilución de 1:100. Las preparaciones de control y las experimentales se procesaron en paralelo y se observaron con la misma configuración de microscopía de barrido con láser confocal. Para ensayar la autofluorescencia del tejido, el material fue procesado sin los anticuerpos secundarios. Los anticuerpos primarios también se saturaron con el antígeno a 10 nmol/ml para determinar si la señal de las secciones experimentales era atribuible a los anticuerpos que reaccionan con el antígeno objetivo o a algunos otros anticuerpos. Estos controles dieron unas señales de fondo mínimas que fueron consideradas no específicas.

Microscopía de barrido con láser confocal

Se realizó una CLSM con un sistema de barrido Leica TCS SP2 AOBS montado en un microscopio invertido Leica DM IRE2 que emplea el programa informático Leica TCS. Se usaron un objetivo corregido con aceite 63x NA = 1,4 (HCX PL APO lbd.BL 63,0 x 1,40 Ol, Leica) y un objetivo corregido con agua 63x NA = 1,2 (HCX PL APO 63,0 x 1,20WBD UV, Leica). Las longitudes de onda de excitación eran de 488 nm (láser de argón) para la GFP y el FITC, y de 340 - 380 nm para la tinción de contraste, blanco de calcoflúor. La emisión se detectó a entre 505 y 520 nm para la GFP, a entre 520 y 550 nm para el FITC y a entre 420 y 440 nm para el blanco de calcoflúor. Las imágenes se solaparon con Adobe Photoshop 7.0.

Transformación y crecimiento de Arabidopsis

Se usó el vector binario pK7GWIWG2D(II) (Karimi et al., Trends Plant Sci. Mayo de 2002; 7 (5): 193 - 195) para transferir un construcción de ADN de repetición invertida para *AtSHR* en plantas silvestres de *Arabidopsis Columbia* (Col0) mediante el uso del método de inmersión floral según se ha descrito previamente (Clough y Bent, 1998, Plant J 16: 735 - 43). Además, se usaron las siguientes reservas de semillas: *shr2* (reserva homocigótica) en fondo de Col0, tpd::GUS línea A1, homocigótica, en fondo de Columbia (Col) (obsequio de Malcolm Bennett). Las semillas germinaron en placas con la superficie esterilizada con etanol al 70 % durante 5 min, se incubaron en Bayroclor (Bayrol, Planegg, Alemania; un comprimido por 400 ml de H₂O) durante 30 min, y se lavaron tres veces con agua destilada estéril (dH₂O). Las semillas esterilizadas se colocaron en placas de agar que contenían 1 X de medio MS (Duchefa Biochemie, Haarlem, Países Bajos), un 1 % de agar vegetal (Duchefa), un 1 % de sacarosa (o un 0 % de sacarosa para el crecimiento etiolado), tamponadas a pH 5,7 con ácido morfolinoetansulfónico 1 M (Sigma, Steinheim, Alemania). Las semillas en placas esterilizadas se vernalizaron a 4 °C en la oscuridad durante un mínimo de tres días y posteriormente se cultivaron con luz continua o con 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad a una densidad de flujo de fotones de 1.780 μE m⁻² s⁻¹, con un 70 % de humedad relativa y a una temperatura constante de 23 °C.

Para detectar la actividad de glucuronidasa (GUS), se incubaron secciones de tejido reciente durante 16 - 18 h a 37 °C con una agitación suave en una solución de sustrato que consiste en: 5-bromo-4-cloro-3-indoíl-beta-D-glucurónido 1 mM, sal de ciclohexilamonio (BioVectra, PEI, Canadá), tampón de fosfato de sodio 50 mM, a pH = 7,2, Triton X-100 al 0,1 %, K₃[Fe(CN)₆] 1 mM y K₄[Fe(CN)₆] 1 mM. Después las secciones se fijaron durante 10 min en una solución fijadora (5 % de formaldehído, 5 % de ácido acético y 50 % de etanol), se lavaron unos pocos minutos en etanol al 50 % y al 100 %, y se aclararon mediante una incubación en HCl 0,24 M en metanol al 20 % a 57 C durante 15 min, seguido de 15 min en NaOH al 7 % en EtOH al 60 % a la temperatura ambiente. Entonces las secciones se rehidrataron con una serie de etanol graduado (EtOH al 40, al 20 y al 10 %), agua y se montaron en glicerol al 50 %. Las secciones se examinaron mediante el uso de un microscopio Axioplan 2 y las imágenes se registraron con una cámara AxioVision (ambos de Zeiss).

RT-PCR

La cuantificación de la expresión del ARNm en las líneas transgénicas híbridas de Aspen se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de los fabricantes (Biorad). La RT-PCR en tiempo real se realizó con una máquina de PCR MyiQ (Bio-Rad) mediante el uso del kit SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Las secuencias de los cebadores para el análisis mediante RT-PCR de los niveles de transcrito *PtSHR* en las líneas silvestres y con ARNi fueron 5'-CCATCACCTGACCTTCACTCC-3' y 5'-TGTTCCGGATTGTTGTTGGAGAC-3'.

Resultados*Tres genes de álamo codifican para proteínas similares al SHR*

La familia de proteínas GRAS, que incluye la SHR, puede dividirse en diversos subgrupos distintos tomando como base la secuencia y la función ((Bolle C., Planta. Marzo de 2004; 218 (5): 683 - 92)). Un análisis filogenético de los homólogos más estrechamente relacionados de álamo y *Arabidopsis* con la bien caracterizada proteína *AtSHR* (*Populus tremula*: PtSHR1 (eugene3.01860017), PtSH R2 A (eugene3.00070144), PtSHR2B (eugene3.00640143), PtSCL35b (eugene3.00050544), PtSCL53b (eugene3.00640007), PtSCL62 (fgenes4_pm.C_LG_III000210),

PtSCL69b (eugene3.00070272), PtSCL92b (eugene3.00030248), PtSCL97b (eugene3.00011016); *Arabidopsis thaliana*: AtSHR (At4 g37650), AtSCL29 (At3 g13840), AtSCL32 (At3 g49950) (Fig. 1) indicó que hay tres genes similares al SHR en álamo y que, de los tres, el PtSHR1 es el más estrechamente relacionado con la AtSHR.

- 5 El genoma completo del álamo está disponible públicamente en internet en el sitio web del Joint Genome Institute (actualmente en http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html) y se describe en Tuscan et al. (2006) Science 313 (5793), 1596.

10 Unas alineaciones de secuencias múltiples indicaron unas importantes similitudes en la secuencia entre los nucleótidos de álamo (Fig. 2) y las secuencias de aminoácidos (Fig. 3) y las correspondientes secuencias de la AtSHR. El *PtSHR1* comparte una similitud de nucleótidos del 67 % con la *AtSHR*, y la secuencia predicha de 540 aminoácidos de *PtSHR1* comparte una similitud del 73,52 % con la secuencia de *Arabidopsis*. La diferencia más obvia entre las proteínas es los aproximadamente 110 residuos de aminoácidos N-terminales que están presentes en *PtSHR1* y *AtSHR*, pero que están ausentes en *PtSHR2A* y *PtSHR2B* (Fig. 3). Las secuencias predichas de 411 aminoácidos de *PtSHR2A* y *PtSHR2B* comparten una identidad de aminoácidos del 93 % a lo largo de la longitud de las secuencias, y una similitud de aminoácidos del 71,14 % y del 68,78 % con la *AtSHR*, respectivamente. Las tres secuencias de álamo similares al SHR contienen variaciones en el característico motivo VHID específico de la familia GRAS y sus necesarias regiones ricas en leucina circundantes (Fig. 3). Todas ellas también contienen el motivo SAW C-terminal conservado de GRAS, pero sólo *PtSHR2A* y *PtSHR2B* contienen variaciones en el motivo RVER presente en muchos miembros de la familia de proteínas GRAS. Las secuencias genómicas de los tres genes son similares, con ninguna secuencia codificante de intrón presente.

15 *La supresión parcial de PtSHR1 da lugar a una aceleración del crecimiento* Las funciones *in planta* de los genes similares al SHR de álamo fueron investigadas mediante la supresión de la expresión de *PtSHR1*. Al contrario que nuestras expectativas, de las 24 líneas de transformación independiente generadas, ninguna mostró un crecimiento reducido, sino que muchas mostraron un notable aumento tanto en el crecimiento primario (altura) (Fig. 4, Tabla 1) como en el secundario (perímetro) (Figs. 5 y 6). El efecto combinado era un aumento sustancial en la acumulación de biomasa aérea total después de 52 días de crecimiento en el invernadero (Fig. 7). Se averiguó que las líneas que mostraban un aumento en el crecimiento tenían una supresión parcial de los transcritos *PtSHR1*. Tres líneas, que representaban acontecimientos de transformación independientes, la línea 2A, la línea 2B y la línea 4A, tenían un 50 - 80 % de los niveles de los transcritos *PtSHR1* que se encuentran en los árboles silvestres. El crecimiento se midió en los árboles que comenzaron como esquejes uniformes de tres hojas de álamo (inserto de la Fig. 4). Después de 4 semanas en cultivo tisular, los árboles se trasplantaron en tierra y se trasladaron al invernadero. Desde la primera medición (16 días después del trasplante, DAT), las líneas transgénicas eran significativamente más altas que las plantas de control, T89 (Tabla 1). En el DAT 52, las plantas con el ARNi de la línea 2B eran de media un 27 % más altas que las plantas silvestres T89. Esto era así a pesar de que la distancia media entre nudos de las plantas transgénicas era significativamente menor que la de las plantas silvestres (Fig. 8). El aumento en la altura dio como resultado un índice de producción de nudos (hoja) acelerado en las líneas transgénicas (Fig. 9).

20 El aumento perimetral era el resultado de un aumento proporcional en la anchura de los diversos componentes del tallo (Fig. 6). No había ninguna diferencia coherentemente significativa en la longitud y el ancho de las traqueidas entre las plantas transgénicas y las silvestres (Fig. 10), lo que indicaba que el aumento en el crecimiento era predominantemente el resultado de un aumento en el número de células. Tampoco había diferencias significativas en la forma de la hoja o en el área promedio superficial foliar completamente expandida y en el peso fresco entre las líneas transgénicas y los árboles silvestres (Figs. 11A y 11B). Los esquejes de álamo se establecieron a través de la producción de raíces adventicias. Fuimos incapaces de observar diferencia alguna en el establecimiento de la raíz o en el crecimiento radicular temprano entre las plantas con el ARNi y las silvestres T89.

25 La expresión del ARNm se cuantificó en las líneas híbridas transgénicas de álamo (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*, clon T89) mediante el uso de una RT-PCR. La supresión parcial del 20 - 80 % de los niveles silvestres de los niveles de transcrito *PtSHR1* en estado estacionario observadas en la figura 16 y en la Tabla 6 dio como resultado una drástica aceleración tanto del crecimiento primario como del secundario en comparación con los árboles silvestres T89 (Figuras 4, 5 y 6).

30 *Los vástagos mutantes de shr de Arabidopsis presentan alteraciones en el desarrollo vascular secundario*

35 En marcado contraste con el fenotipo de las líneas de álamo con silenciamiento génico, los vástagos de las líneas de *Arabidopsis* con silenciamiento de *shr* son claramente enanos. A pesar de esto, examinamos los hipocótilos de *shr* y los tallos florales con objeto de revelar discrepancias o similitudes que pudieran arrojar luz sobre el fenotipo de álamo. El crecimiento secundario estaba claramente reducido en el mutante. Las secciones transversales a través del hipocótilo de las plantas florecidas revelaron una reducción en el espesor de los hipocótilos de *shr* en comparación con las silvestres. Los haces vasculares de los hipocótilos mutantes eran pequeños e irregulares, y carecían de la típica alineación radial de los vasos del silvestre. Los hipocótilos de las plantas florecidas silvestres tenían una considerable cantidad de xilema secundario producido por la actividad del cámbium vascular y un grueso peridermo producido por la actividad del cámbium de la corteza. Por el contrario, los hipocótilos de las plantas de *shr* florecidas mostraron muy poca actividad del cámbium vascular, produciendo 3 - 9 capas de xilema secundario.

Tampoco había ningún cámbium de corteza apreciable.

Unos patrones de expresión similares para AtSHR y PtSHR1 proporcionan evidencias adicionales de que son funcionalmente equivalentes

5 Los datos de expresión de la base de datos de micromatriz BASE de álamo mostraron que los transcritos *PtSHR1* estaban presentes en una gran diversidad de órganos (Fig. 12). Se usan construcciones nativas promotor:indicador y una inmunohistocalización para determinar de forma más precisa los patrones de expresión de *PtSHR1* y *AtSHR*.
 10 La expresión de la GFP guiada por el promotor *PtSHR1* era similar al perfil radicular publicado para la expresión de *AtSHR* (Nakajima et al., Nature. 20 de septiembre de 2001; 413 (6853): 307 - 11). En las raíces, una secuencia de 2,5 kpb secuencia arriba de la secuencia codificante de *PtSHR1* guiaba la expresión de la GFP en la estela y durante el inicio y el desarrollo temprano de las raíces laterales. En los vástagos, la GFP se observaba en la vasculatura de las hojas, las ramas y el tallo principal. En secciones longitudinales transversales y radiales de los entrenudos completamente expandidos en el tallo de un álamo de dos meses de vida en crecimiento activo, se observó la GFP en toda la zona cambial (CZ). La CZ es la zona de división celular en la que las células madre y las células amplificadoras en tránsito (madre) experimentan divisiones formando nuevas células para la formación continuada de xilema (madera) y de floema y el consiguiente aumento en el perímetro. La GFP también se observó en el parénquima del floema y en el parénquima y en los pedúnculos radiales. La GFP se observó en las filas radiales a través del cámbium hasta de floema y profundamente en el xilema en maduración (albura). El marcaje de inmunofluorescencia con un antisuero anti-PtSHR1 también indicó la presencia de epítomos PtSHR1 en estas células. El marcaje de inmunofluorescencia fue inhibido completamente por un polipéptido PtSHR1 competidor.

En el ápice del vástago, la GFP se observó en un grupo de células del corpus, inmediatamente por debajo de la túnica del domo apical. También había una importante expresión de la GFP en los tejidos procambiales y en los primordios foliares. El marcaje de inmunofluorescencia de secciones longitudinales radiales a través del ápice del vástago mostró la aparición de epítomos PtSHR1 a lo largo del domo apical y de los tejidos flanqueantes, proporcionando una indicación de que la proteína actúa, al menos en parte, de forma no autónoma de la célula en el ápice del vástago. Las secciones transversales inmediatamente por debajo del ápice mostraron una expresión de la GFP aislada en el procámbium fascicular, sin embargo, en el entrenudo 4 la expresión se había extendido al procámbium fascicular y pudo observarse en cualquier sitio en el que había vasculatura en desarrollo, por ejemplo, en las hojas vestigiales del tallo.

En Arabidopsis, la actividad de la GUS guiada por un promotor indicaba que, de forma similar al *PtSHR1* en álamo, el *AtSHR* es expresado a lo largo de la vasculatura de las raíces y los vástagos. La actividad de la GUS se observó en la vasculatura de las plántulas recién emergidas y en los cotiledones completamente desarrollados y en las hojas en roseta. También se observó en la vasculatura de las diversas partes de la flor. Cuando había presente actividad cambial interfascicular en los tallos de las inflorescencias, se encontró GUS en ambas zonas cambiales fascicular e interfascicular. En el hipocótilo que mostraba crecimiento secundario, la actividad estaba asociada a la zona cambial y en el lado del floema de esta zona, de forma similar a la expresión de la GFP en las líneas promPtSHR1:GFP. Además, había algo de marcaje de GUS dispersado en el xilema secundario tanto de los tallos como de los hipocótilos, donde estaba asociado al parénquima paratraqueal.

El PtSHR1 complementa el fenotipo mutante shr

45 Con objeto de ensayar si las proteínas de álamo similares a la PtSHR eran capaces de funcionar de forma similar a la AtSHR, al menos en Arabidopsis, expresamos individualmente las secuencias codificantes de PtSHR1, de PtSHR2A y de PtSHR2B, guiadas por una secuencia de 2,5 kpb en 5' secuencia arriba del promotor At SHR nativo, en el mutante *shr2* (Col0) con pérdida de función. La verificación mediante una reacción en cadena de la polimerasa demostró que había expresión de las construcciones en las respectivas líneas complementadas. Los conjuntos de cebadores para PtSHR2A y PtSHR2b amplificaron las secuencias en ambas líneas complementadas PtSHR2 debido a las secuencias de nucleótidos prácticamente idénticas de los dos genes. Los tres genes *PtSHR* eran capaces de complementar parcialmente el fenotipo mutante *shr2*. El fenotipo de crecimiento enano de raíz y vástago era totalmente complementado, pero los tallos florales de las líneas complementadas permanecían agravitrópicos. Interesantemente, el complemento del mutante *shr* con una proteína de fusión AtSHR:GFP guiada por una secuencia promotora AtSHR similar tampoco consiguió complementar el fenotipo de vástago agravitrópico. También, la expresión ectópica guiada por promotor CaMV 35S del AtSHR en plantas de Arabidopsis silvestres (Col0) dio como resultado la pérdida del gravitropismo del vástago floral. En conjunto, estos resultados proporcionan una indicación de que es necesario un preciso control espaciotemporal de la expresión de la AtSHR para este aspecto de la función de la AtSHR.

60 *La supresión parcial de la AtSHR en Arabidopsis da lugar a un fenotipo similar al observado en las líneas de álamo PtSHR1 con ARNi.*

Otra posibilidad para la discrepancia entre la pérdida del fenotipo de función en el mutante *shr* y el fenotipo silenciado en las líneas de álamo es que puede haber diferencias fundamentales entre una reducción y una ausencia total de la proteína. Como todos los alelos mutantes de *shr* son nulos, usamos una estrategia con ARNi en

Arabidopsis similar a la usada con los transgénicos de álamo con objeto de obtener líneas que conservaran una expresión residual de *AtSHR*. Generamos 26 líneas de supresión individuales con ARNi de *AtSHR*. Se eligieron tres líneas, las líneas 4, 6 y 11, que tenían entre un 40 y un 75 % de los niveles normales de transcritos de *AtSHR* que se encuentran en las plantas silvestres. Todas estas líneas mostraron una aceleración sustancial de varios aspectos del desarrollo vegetativo. Después de 3 días de estratificación a 4 °C, las poblaciones de semillas silvestres (Col0) tardaron entre 18 y 27 horas en germinar completamente (surgimiento radical) a la luz a 23 °C en placas de agar que contenían 1 x de MS y un 1 % de sacarosa (Fig. 13A). Las muestras de semillas de las tres líneas suprimidas con ARNi comenzaron la germinación varias horas antes que las semillas silvestres y habían germinado completamente tres horas antes de que la población silvestre alcanzara el mismo nivel de germinación (Figs.13A y 13B). Cuarenta horas después de poner las semillas a 23 °C, a diferencia de las plántulas silvestres, la mayoría de las plántulas transgénicas habían emergido completamente de la cáscara de la semilla y se estaban alargando rápidamente (Fig. 13C). A los 5,5 días, los cotiledones (Figs. 13D y 13F) y las raíces (Fig. 13H) de las plántulas con ARNi cultivadas a la luz eran sustancialmente mayores que los de las silvestres cultivadas en las mismas placas. Por el contrario, a los 5,5 días no había diferencias significativas entre las longitudes de los hipocótilos y los tamaños de los cotiledones de las líneas silvestres y con ARNi de las plántulas etioladas cultivadas en placas con un 0 % de sacarosa (Figs.13E y 13G).

Boyes et al. (Boyes et al., The Plant Cell, Vol. 13, 1499 - 1510, 2001) publicaron un modelo de las etapas de crecimiento de plantas de Arabidopsis. En las líneas transgénicas, la fase de crecimiento 1.06 (seis hojas en roseta > de 1 mm de longitud) se alcanzaba 15 días después de la siembra (Fig. 14A). Las plántulas silvestres no alcanzaron esta fase hasta el día 18 (Fig. 14B). En el día 18, las hojas inmaduras 1 y 2 estaban completamente expandidas tanto en las líneas silvestres como en las transgénicas. En esta etapa no había diferencias significativas entre las áreas foliares silvestres y con ARNi (Fig. 14C). Por el contrario, el área combinada de todas las hojas emergidas de cada planta era significativamente mayor en las líneas con ARNi (Fig. 14E y compárense las Figs. 14B & 14D) que en las líneas silvestres. Esto era debido tanto el mayor tamaño de las hojas en expansión como a la aparición de las hojas en las líneas con ARNi. En otras palabras, las plantas con ARNi tenían un desarrollo más avanzado que las silvestres. A los 18 días, las secciones longitudinales radiales indicaban que los domos apicales de las plantas de la línea 11 eran sustancialmente más largos que los de las silvestres (Fig. 14F).

30 *Velocidad de crecimiento en altura de los álamo*

La Figura 4 y la Tabla 1 muestran un ejemplo de las comparaciones de la altura de plantas de álamo con ARNi y silvestres T89. A partir de la Tabla 1 puede observarse que la ventaja de crecimiento en altura es mayor durante la fase temprana de crecimiento. Debido a que las fases de crecimiento tienen una cronología diferente en plantas diferentes, y que hay algún ruido añadido, el método descrito anteriormente es útil para calcular la velocidad de crecimiento máximo en estas condiciones para los diferentes árboles individuales. Estos resultados (usando menos duplicados biológicos para cada acontecimiento de transformación independiente) pueden observarse en las Tablas 4 y 5.

40 *Velocidad de crecimiento perimetral*

En las condiciones de crecimiento definidas anteriormente, el ancho del tallo mostró un aumento comparativamente lineal con el tiempo. Se usó una regresión lineal de los datos de los diámetros para estimar el crecimiento perimetral.

$$d(t) = c * t + d_0$$

en la que d_0 es el ancho inicial y c es la velocidad de crecimiento perimetral (pendiente).

Estas mediciones de crecimiento en alto y en ancho se compararon entre las plantas silvestres T89 y las transgénicas con ARNi. Para estos resultados, las plantas silvestres T89 se denominaban conjuntamente población silvestre, y los árboles transgénicos se denominaban conjuntamente grupo de construcción.

La Tabla 4 muestra los datos de crecimiento para el grupo de construcción KR462 (PtSHR1 con ARNi) y el correspondiente grupo silvestre. Las filas de la Tabla contienen las mediciones de altura y de diámetro de los individuos del grupo KR462 (PtSHR1 con ARNi) y del grupo de control silvestre. Estos datos se resumen en la Tabla 5. Se averiguó que la construcción KR462 (PtSHR1 con ARNi) aumentaba la velocidad de crecimiento en altura en aproximadamente un 12 % y la velocidad de crecimiento perimetral en aproximadamente un 18 %.

60 *La supresión parcial del SHR acelera la morfogénesis en especies determinadas e indeterminadas.*

En Arabidopsis, la total ausencia de la proteína AtSHR da lugar al colapso del meristemo radical, al enanismo de los vástagos y a una reducción en el crecimiento secundario. Por el contrario, hemos observado que tanto en álamo como en Arabidopsis, el efecto de la supresión parcial de *PtSHR1* y *AtSHR*, respectivamente, da lugar a una aceleración de la velocidad de crecimiento de los vástagos. El aumento en la velocidad de crecimiento parece ser debido a un aumento en la velocidad de las divisiones mitóticas en el VC y en el meristemo apical de los vástagos (SAM).

Muchas plantas han evolucionado desarrollando mecanismos para evitar la sombra de las plantas vecinas aumentando la altura a través de un aumento en el alargamiento de las células internodales. En las líneas transgénicas de álamo, los entrenudos eran más cortos que en las líneas silvestres T89 y no había diferencias significativas en las longitudes de los elementos traqueales entre las plantas silvestres T89 y las plantas transgénicas. Un aumento en la altura, sin un aumento proporcional en la longitud entrenudos o celular indica que, de forma similar al aumento perimetral, el crecimiento en altura acelerado era el resultado de divisiones celulares adicionales. La combinación de plantas más altas, entrenudos más cortos y ninguna reducción en la longitud de la célula indica que el plastocrono, el intervalo de tiempo entre la producción de nuevos órganos en el SAM, está disminuido en las líneas transgénicas. Se han identificado varios mutantes en el que está afectado el plastocrono. Por ejemplo, el maíz *terminal earl, tel* (Velt et al., 1998. Nature 393, 166 - 168) y *Arabidopsis altered meristem program 1, ampl* (Chaudhury et al., 1993. Plant Journal 4, 907 - 916; Helliwell et al., 2001. Plant Cell 13, 2115 - 2125). Además de un plastocrono alterado, estos dos mutantes tienen una filotaxia alterada (la fracción de la circunferencia que separa dos hojas sucesivas en un tallo). La filotaxia no difiere entre las plantas de álamo silvestres T89 y las transgénicas con ARNi, ni entre las líneas de *Arabidopsis* silvestres y con ARNi. Recientemente se ha identificado un mutante del arroz que tiene un plastocrono reducido (Miyoshi et al., PNAS Vol. 101 N° 3 2004, 875 - 880). El gen *PLASTOCHRON 1* codifica un citocromo P450 que es expresado en los primordios foliares. De forma análoga a las líneas *PtSHR1* y *AtSHR* con ARNi, el mutante *plastochron 1* tiene afectada la cronología de producción de hojas nuevas, pero no está afectada la separación (filotaxia) de la nueva aparición de hojas (Miyoshi et al., PNAS Vol. 101 N° 3 2004, 875 - 880).

Varias líneas de evidencias proporcionan indicaciones adicionales de la función conservada entre PtSHR1 y AtSHR

Dado que la desregulación de ambos *PtSHR1* y *AtSHR* afectaba a la actividad del VC, consideramos que podría haber patrones conservados de acumulación de transcritos en las dos especies. Los datos de la micromatriz de transcrito global BASE indicaban que el *PtSHR1* era expresado en diversos órganos de toda la raíz y de todo el vástago (Fig. 12). La expresión de la GFP guiada por el promotor nativo *PtSHR1* también indicaba que el gen es expresado en todo el vástago, y que esta expresión está asociada en su mayor parte con el desarrollo vascular. En el ápice del vástago, se observó la GFP en un grupo de células del corpus, inmediatamente por debajo de la tónica del domo apical. La combinación de una ausencia de señal de la GFP y la presencia de marcaje inmunofluorescente en zonas flanqueantes de la zona central del SAM sugiere que la *PtSHR1* tiene la capacidad de moverse de una célula a otra. En *Arabidopsis*, el movimiento entre células de la *AtSHR* es crítico para la función de la proteína y el adecuado desarrollo de la raíz (Nakajima et al. Nature. 20 de septiembre de 2001; 413 (6853): 307 - 11; Benfey et al., Benfey et al., Development. Septiembre de 1993; 119 (1): 57 - 70). El crecimiento de la punta del vástago finalmente deriva de una población de células del tallo en el centro del SAM (Fletcher JC., 2002 Annual Review of Plant Biology, 53, 45 - 66). Otro mecanismo por el cual los epítomos *PtSHR1* podrían estar presentes en las células en las que no se expresa el gen es que el gen podría ser expresado en las células del tallo y después podría ser retenido en estas células y en las células hijas al moverse fuera del ápice durante la división celular y el desarrollo apical. La tinción con GUS en las líneas *promAtSHR:GUS* de *Arabidopsis* indicó que el *AtSHR* es expresado en zonas similares por toda la planta de *Arabidopsis*, proporcionando evidencias adicionales de que las dos proteínas llevan a cabo las mismas funciones.

Una evidencia adicional que apoya esta hipótesis es que las tres proteínas de álamo similares a *PtSHR* eran capaces de complementar individualmente el fenotipo mutante *shr2* con pérdida de función cuando eran dirigidas por una secuencia de 2,5 kpb en 5' secuencia arriba del promotor *AtSHR* nativo (y por el promotor CaMV 35S constitutivo).

La supresión parcial de AtSHR en Arabidopsis da lugar a un fenotipo similar al observado en las líneas de álamo PtSHR1 con ARNi.

El fenotipo de las líneas *AtSHR* silenciadas proporcionó una fuerte evidencia adicional que apoya la hipótesis de que *PtSHR1* y *AtSHR* tienen unas funciones similares. El desarrollo vegetativo está acelerado en las líneas *PtSHR1* con ARNi. En *Arabidopsis*, ya en la germinación, las líneas *AtSHR* con ARNi tenían un desarrollo aproximadamente 3 horas más avanzado en las plántulas silvestres. Boyes et al. (Beyes et al., The Plant Cell, Vol. 13, 1499 - 1510, 2001) publicaron análisis de *Arabidopsis* que definían una serie de etapas de crecimiento para su uso en el análisis de las líneas transgénicas y mutantes. Su fase de crecimiento 1.06 se habían alcanzado 15 días después de la siembra en la línea transgénica (línea 11) (Fig. 14). Esta fase no se alcanzó en las plántulas silvestres hasta el día 18. Combinado con los datos que muestran que no había ninguna diferencia significativa en el tamaño final expandido de las hojas 1 y 2, esto indica que, de forma similar a las líneas *PtSHR1* con ARNi, el efecto de la supresión de la expresión de *AtSHR* es aumentar la velocidad de aparición de nuevos órganos, pero no el tamaño final de sus órganos. Estos datos sugieren fuertemente que existe una diferencia fundamental entre una expresión reducida y una ausencia total de la proteína *AtSHR*.

Los vástagos mutantes shr tienen una morfología alterada, pero el plastocrono permanece sin modificar.

La suma total de nuestros datos proporciona una fuerte evidencia de que *AtSHR* y *PtSHR1* son funcionalmente equivalentes. En ambas líneas transgénicas de álamo y de *Arabidopsis*, una disminución en los niveles de los

transcritos SHR dio lugar a un aumento en la velocidad de crecimiento. Esto sugiere que la proteína actúa como regulador negativo de la división celular y del crecimiento. En los mutantes *shr*, en los que hay una ausencia total de la proteína, los meristemos apicales radiculares colapsan, los vástagos son enanos y el desarrollo vascular secundario se ha reducido en gran medida. Claramente es esencial un cierto nivel de AtSHR para la división celular normal tanto en la raíces como en los vástagos. Sin embargo, la velocidad de desarrollo vegetativo y la cronología de la transición de vegetativo a floral no están retardadas en los mutantes *shr*. En la floración tienen, como media, el mismo número de hojas que las plantas silvestres. Esto proporciona una indicación de que, mientras que SHR regula la división celular y el desarrollo vegetativo en los vástagos, la disminución en el plastocrono en ambas líneas de Arabidopsis y álamo con ARNi es un efecto secundario de la supresión de la expresión génica de SHR. El efecto primario es una estimulación de la división celular en el SAM.

Tabla 1

Líneas				
Días después de la plantación	Línea 2A con ARNi	Línea 2B con ARNi	Línea 4A con ARNi	silvestre T89
16 días	216 ^{**1} (17)	239 ^{***} (25)	205 [*] (33)	175 (23)
28 días	429 ^{***} (42)	508 ^{***} (50)	412 ^{***} (35)	336 (42)
40 días	933 ^{***} (84)	1053 ^{***} (64)	913 ^{***} (80)	778 (65)
52 días	1364 ^{***} (95)	1497 ^{***} (57)	1316 ^{**} (105)	1173 (75)

Medias (n = 9) de las alturas de los árboles (DT entre paréntesis) para la comparación del crecimiento en invernadero de las líneas PtSHR1 con ARNi 2A, 2B y 4A con los árboles de control T89
 Los asteriscos indican el valor de significación de la diferencia media entre cada línea y el tipo silvestre T89 (ensayado con una prueba de Dunett post hoc para comparar todas las muestras con un control) * $p < ,05$, ** $p < ,01$, *** $p < ,001$

Tabla 2

Especie	ID. SEC. Nº:	Base de datos de referencia
álamo SHR1	2	JGI ID: Poptr1:586010 eugene3.01860017
álamo SHR2A	4	eugene3.00070144
álamo SHR2B	6	eugene3.00640143
Arabidopsis SHR	8	NP_195480.1 GI:15235646
Arroz SHR	10	AAS07303.1 GI:41469537
Arroz SHR	12	BAD30442.1 GI:50509213
Cebada SHR	14	HvGI TC147542
Cebada SHR	16	AAL66734.1 GI:18254373

15

Tabla 3

AFH	Altura media final de la población silvestre y de la población del grupo de construcción
AFD	Diámetro medio final de la población silvestre y de la población del grupo de construcción
AMHGR	Velocidad de crecimiento en altura máxima media de la población silvestre y de la población del grupo de construcción
ADGR	Coefficiente de diámetro medio de la población silvestre y de la población del grupo de construcción
MFH	Altura final máxima de la población silvestre y de la población del grupo de construcción
MFD	Diámetro final máximo de la población silvestre y de la población del grupo de construcción
MMHGR	Máximo de la Velocidad de crecimiento en altura máxima de la población silvestre y de la población del grupo de construcción
MDC	Coefficiente de diámetro máximo de la población silvestre y de la población del grupo de construcción

Tabla 4

Días en el invernadero	Altura (cm)							Diámetro (mm)					
	18	26	33	39	47	53	65	33	39	47	53	59	65
KR462 (PtSHR1)-2A-A	28	44	62	100	120	143	193	4,9	6,6	7,7	9,1	8,5	9,3
KR462 (PiSHR1)-2A-B	26	42	63	99	116	137	181	4,6	5,8	5,8	6,5	6,9	7,5
KR462 (PtSHR1)-2B-A	18	28	38	65	80	99	140	3,5	5,3	6,1	6,9	7,8	7,9
KR462 (PiSHR1)-4A-A	20	40	57	95	112	133	168	4,6	6,4	7,4	8,5	8,7	9,9

ES 2 535 118 T3

KR462 (PtSHR1)-5A	17	27	39	67	83	100	140	3,7	5,1	6,2	7,1	7,5	8,3
T89-133	23	37	51	84	103	121	156	4,7	6,7	7,7	8,4	9,1	9,7
T89-134	25	38	50	80	95	112	149	4,4	6,2	7,1	7,6	7,6	8,4
T89-135	17	29	43	71	86	104	140	4,8	6,6	7,7	8,6	9,1	9,1
T89-136	19	31	45	72	85	103	138	4,6	5,3	6,0	6,4	7,3	7,8
T89-137	22	37	52	82	96	112	151	5,0	6,5	7,3	7,8	N/A	10,9
T89-138	21	33	47	78	94	109	140	4,9	6,0	7,0	7,8	8,4	9,0
T89-139	24	39	56	92	108	124	159	4,8	5,7	6,3	7,0	7,6	8,4
T89-140	25	41	56	88	101	115	148	4,9	6,0	6,0	6,8	7,0	7,8
T89-141	17	30	45	77	87	104	132	5,0	5,3	6,2	6,4	6,9	7,2
T89-142	24	38	54	85	99	116	146	5,3	5,9	6,3	6,6	7,6	8,3
T89-143	24	40	56	89	107	122	155	4,7	5,7	6,3	6,8	7,3	8,4
T89-144	23	37	52	76	89	107	139	4,5	5,9	6,5	6,9	7,1	7,9
T89-146	27	43	58	84	99	116	153	4,6	6,0	6,7	7,4	7,8	8,5
T89-147	26	44	62	95	111	130	167	5,4	6,5	6,9	7,4	8,0	8,7
T89-148	21	32	47	77	91	109	146	4,2	5,4	6,1	6,6	6,9	7,8

Tabla 5

Grupo de construcción	Altura final media AFH (KR medio / silvestre medio)	Diámetro final medio AFD (KR medio / silvestre medio)	Velocidad de crecimiento en altura media AMHGR (KR medio / silvestre medio)	Coefficiente de diámetro medio ADGR (KR medio / silvestre medio)	Altura final máximo MFH (KR máx / silvestre máx)	Diámetro fin al máximo MFD (KR máx / silvestre máx)	Máximo de la Velocidad de crecimiento en altura máxima MMHGR (KR máx / silvestre máx)	Coefficiente de diámetro máximo MDC (KR máx: silvestre máx)
KR462	1,11	1,01	1,12	1,18	1,16	0,99	1,10	1,05

Tabla 6

Planta	2A-P1	2A-P2	2B-P1	2B-P2	4A-P1	T89-1	T89-2	T89-3	T89-4	T89-5
Expresión de PtSHR1 normalizada a la media de T89	0,32	0,61	0,16	0,25	0,79	0,98	0,91	1,14	1,05	0,90

Secuencias

5 PtSHR1 eugene3.01860017 (ID. SEC. Nº: 1)

GGGAGAAGACTGGGCTAGCTAGCTAGATAAAAAGAATATCCCAAACCCACCCAATTTGATTTCACATCGAC
TACAGAAAAAGAAAAGCACATTTAAACATGTATGTATGTATATATATGTATATATATAAATATCCAACCTT
CAAGATCCTCTCTTTTATCATTCTCTACCCCAATATTTCCACAGTTAAAAACACAAACACCCATCCCCTT
ACCTTCACTCCAAGCCATCCCCAACAACTCCATCCGAATTCATTGATGTGGGTCTCTGGATTTTGTT
AAATGGATACCTTGTTTAGGCTAGTTAGTCTCCAACAACAATCTGAACAATCTTCAACTCTACTAGCAG
AACCTCTAGTAGCTCTAGATCATCAAGACAAAACAACAACCACCACCATCATCACTATCAACAAGAAGAC
GAAGAATGCTTCAACTTTTTTCATGGATGAGGAAGACTTCTCTTCATCTTCTTCTAAGCACTACTATCCTC
CTTATCACCACAACCAACAACAACAACATCAACACCAAAACCACCACCACCCTCCTACCCTACTACCAC
CAACACTAGCACCCCTTCTACTCACCATGTCTTGATTCCGCTGACTTCTCTTTCTCCCCTTCTCATGAC
CTAAACTTTGAATTTTCCGGCAAGTGGGTCACCGATATCCTCCTTGAATCTGCACATGCCATCGCGGATA
AAAACAGCGCTCGTCTCCAGCAATTGATGTGGATGCTTAATGAGCTTGTTTACCTTATGGTGACACAGA
GCAAAAACCTTGCTTCTTATTTTCTCCAAGCTTTGTTTAGCCGATGAACGACTCCGGCGAGAGATGCTAC
CGTACTTTAGCTTACAGCATCAGAGAAAACCTGCTCTTTTGATTCCACAAGGAAAATGGTATTAAGTTTC
AAGAGGTGAGTCTTGGACTACTTTTGGTCACGTATCTTGAATGGCGCAATTATGGAAGCATTGGAAGG
TGAAAAGCAAATTGCATATTATTGATATTAGTAACACATATTGTACCCAATGGCCTACTTTGCTCGAAGCC
CTAGCAACTCGCACTGATGAGACACCACACTTGAAGTTAACCACCGTAGTGGCTAGCAAAAAGTAGTGGTA
ATAATATTGGTTTAACTAGTACAGGAGGTTAGCTTCAAGGTAATGAAAGAAAATGGCAACAG
AATGGAATAATTTGCCAGGCTTATGGGAGTCCCATTTAAGTTTAAATGTTATCCACCATGCTGGTGATTTA
TGTGACCTAACTTAGCTGAATTGGATGTTAAAGATGATGAGGCTCTTGCTATCAACTGTGTTGGTGCTT
TACACTCAATCACTCCAGCTTCTCGTCGCCGAGATTATGTTATATCTAGTTTTAGAACATTGCAACCAAG
AATCATTACTGTTGTTGAAGAAGAAGCTGATCTTGATGGTCTGGATTTTGTCAAGGGTTTTCAAGAATGT
TTAAGATGGTTTAGGGTTTACTTTGAATCATTGGATGAGAGCTTTCCAAGAACCAGTAACGAACAGTTGA
TGCTTGAAAAGAGCAGCAGGCCGCGCTATCGTTGACTTAGTGGCATGTCCTCCATCTGATTCGATCGAAAG
GCGGGAAACAGCCACGCGCTGGTCTGGACGCCCTCATTATGTGGTTTTAGCCCATAATTTTCAGTGAT
GAGGTTTGTGATGATGTACGCGCCTTATTGAGGAGGTATAAGGAGGGTTGGTCAATGACACAGTGCAGGG
ATGCCGGAATATCTTGTGCTGGAAGGAACAGCCGGTGGTGTGGGCTAGTGCATGGAGGCCCTGATTGAG
ATTTGTTGATGGTTTTCACTTTTCACTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT
TTTTTTTTTTTCAAAGTTAGTTTGAATGATTTGGCAGTTTGAATGTTTATTTGGGCACGTGCATGGA
TTAAGGATTGGAATAGTAAATGAAGTTAATCAATTTTCATTGATCTTTGTTTAAATATCATTTGCGGTTA
TTTCTTATTTTATGAAAAATAGCTTTCTTAATCATCATATCAAAGAAACGTTTTTAATTCAATGATGTA
AACAAATTAGTTGAGCAAGATTTATCTTTGGGGTAAATAAATGATTTAATTTAGGAAAGTTATTTCGATAA
TTA

PtSHR1 eugene3.01860017 (ID. SEC. Nº: 2)

MDTLFRLVSLQQQSEQSFNSTSRSSSSSRSSRQNNHHHHHYQQEDEECFNFFMDEEDFSSSSSKHYPPYHHNQ
QQQHQQHTTTTTPTTTTTNTSTPSTHHVLDSDAFSFPSPSHDLNFEFSGKWVTDILLESAAHAIADKNSARLQQLMW
MLNELGSPYGDTEQLKASYFLQALFSRMNDSGERCYRTLASASEKTCFSFDSTRKMLVKFQEVSPWTTFGHVSCNG
AIMEAFEGESKLHIIDISNTYCTQWPTLLEALATRTDETPHLKLTVVASKSSGNIGLSTGGGLASVHKVMKEI
GNRMEKFARLMGVFPKFNVIHHAGDLDLNLAEALDVKDEALAINCVGALHSITPASRRRDYVISSFRFLQPRII
TVVEEADLDGLDFVKGFOECLRWFRVYFESLDESFPRTSNEQLMLERAAGRAIVDLVACPPSDSIERRETATRW
SGRLHSCGFSPIIFSDEVCDDVRALLRRYKEGWSMTQCGDAGIFLCWKEQPVVWASAWRP

PtSHR2A eugene3.00070144 (ID. SEC. Nº: 3)

AAGTCCTCGCCACTTATATGTGTTTATTGAGAAAAAATATATATTATACATGTAGTACGTACGTATGA
 TATGCAATATCGAACAAGTATATACTAGCTAGGGCTTTGAGGTTATTGCAATTATGGTTGCCAAATCCAA
 CCACTACACTAGCAATTAGGTATTTTTCATCTCGAGATCACAATATCATTAAATTTGAAGCTAATAATACA
 CATAAAAATAGAAATTCATATTAAGAAAAAATATATATATATAGCATGACTATGACCCCAAAACCCAAA
 ATATAATACTACGGATTTCTATATCATAGCTTTGFACTTGGCCAATTTTTTTGAATTAGCAGAGGTACTG
 CCTCCAGAGTCAAAGGGGGCCTTCCCTAGCTATCACCCACGGACATAACCATCTTCGGTCCAAAAGACAG
 ACTCACACACTTATTTTCCCTTCCCACCAACAAAGCAATGATCAAATAGAAGCTAGCTATAGACATGCAAAG
 CAATAGCAGCAACAACAACAACAATCAGCCTCAGACTAGTCATACATCAACAAGCCGTTCTTCGGACTCC
 GGTGAGGCTTGTGGGGCAGGAAACAATGGGCATCAAGGCTTCTTAGTGAGTGTGCAAGAGCAATCTCAG
 AGAAGGACTCTAGCAAGATCCATAACCTTCTATGGATGTTAAATGAGCTTGCCTCTCCTTATGGAGATTG
 TGAACAGAAATTGGCATCTCATTCTTGTCAAGCTCTCTTTTGTAAAGGCTACCGACTCCGGCCAACGGTGC

TTCAAACCCCTAACAAACAGTAGCTGAAAAGAGCCACTCCTTTGATTGAGCTAGGAAATTGATACTAAAAT
 TCCAAGAGGTAAGCCCATGGACTACTTTTGGTCATGTGGCTTCAAACGGTGCAATTTTGGAGGCCTTAGA
 TGGGGCGAGCAAACCTTACATAATTGATATAAGCCATACCCTTTGCACACAATGGCCTACTTTGCTAGAA
 GCTTTAGCTACAAGAAATGATGAGACGCCGATTTAAAGCTCACCGTTGTGGTAACTGCTAGCATTGTAA
 GATCGGTCATGAAAGAAATTTGGCCAAAGAATGGAGAAGTTTGTAGGTTAATGGGAGTGCCCTTTGAGCT
 TAATGTAATTAGTGGGCTAAACCATTTAGGAGAGCTCACAAAGGACAGGCTAGGAGTTCAAGAAGATGAA
 GCTGTTCGGGATTAATTGCAATGGGGCATTGAGAAGAGTTGGAGTAGAGGAAAAGAAATCTGTGATCCAGA
 TGTTTCAATCACTTAACCTTCGAGTTGTGACAATTGTTGAAGAAGAAGCTGATTTTACTAGCTCAAGATA
 TGACTTTGTCAAGTGCTTTGAAGAGTGCCTTAGGTATTATACACTATATTTTGTAGATGCTAGAGGAGAGC
 TTTGTCCCAACTAGTAATGAGAGATTGATGTTGGAGAGGGAATGTTCAAGGAACATAGTTAGAGTTTGG
 CTTGTGATGAAGGAAATGATGGAGGAGAGTGTGAAAGAAGGGAGAGGGGAAGCCAATGGTTTGAAGGCT
 AAGGGAGGCATTTTCCCCTGTGGGTTTCAGTGATGATGTTGTCGATGATGTCAAGGCATTGCTTAAGAGA
 TACCGAGCTGGGTGGGCACTAGTGCTACCTCAAGGAGATCATGACTCAGGAATTTACTTAACATGGAAAG
 AAGAACCCTGTGGTATGGGCTTCTGCATGGAAACCCCTAGAGGAGAATTATAGCTAGAACCACCATGATCTCC
 ACACTCAAAGTCAAGGCTTAGCATGGCAATTTATTACAAATTTGGGAAGCACTGCCATGAACACAACATA
 TTGATTCCTGTCAATCATGAAGTACTACTACTTTTCACTTTTCAATTTCTTCTTCTCATTTCATGCATATTTG
 TGTCTTCTGTACTCCAACCTTTTCTTTTCTTATGCT

PtSHR2A eugene3.00070144 (ID. SEC. Nº: 4)

MQSNSSNNNNNQPQTSHTSTSRSSDSGEACGAGNKWASRLLESECARAISEKDSSKIHNLLWMLNELASPYGDCEQ
 KLAHFLQALFCKATDSGQRCFKLTTVAEKSHSFDSARKLILKFQEVSPWTTFGHVASNGAILEALDGASKLHI
 IDISHTLCTQWPTLLEALATRNDTPHLKLTVVVTASIVRSVMKEIGQRMK FARLMGVPFELNVI SGLNHLGEL
 TKDRLGVQEDEAVA INCNGALRRVGVVEERNSVIQMFQSLNPRVVITVEEADFTSSRYDFVKCFEECLRYTYLF
 EMLEESFVPTSNERLMLEREC SRNIVRVLACDEGNDGGECERRERGSQWFERLREAFSPVGFSDDVDDVKALLK
 RYRAGWALVLPQGDHDSGIYLTWKEEPVWASAWKP

5

PtSHR2B eugene3.00640143 (ID. SEC. Nº: 5)

ACATATAAGAATATTTCAAATATAATACACAAGAAATTATTCACATTAACAAAATAGGATGACTATGACC
CCCCACCCCAAGATATAATTATACTATGGATATCTATATCAATATAGCTTTGTACTTGGCCATGTCTGAA
CTCAAATGAAATTTGAGTTTGGCAAAGGTTCTGCCTCTAGAGTCAAAGGGGGCCTCGCCGATCACCAATG
GACATAACTCTCTCAGTCCAAAAGACACACTGACACACTTCTTTCTTCCCACCAGCAAAGCAATGATC
AAGTAGCAGCTATAGACATGCAAAGCAATAGCAGCAACAACAATAATCAGCCTCAAACCAGCCATAC
ATCAACAAGCCGGTCTTCGGACTCCGGTGAGGCCCTGTGGAGGAGGAAACAAGTGGGCATCAAAGCTTCTT
AGTGAGTGTGCAAGAGCAATCTCAGAGAAGGACTCTAGCAAGATCCACCACCTTCTATGGATGTTAAATG
AGCTTGCCTCTCCTTATGGAGATTGTGATCAGAAATTGGCATCTTATTTCTTGCAAGCTCTATTCTGTAA
GGCTACCGAGTCTGGTCAACGGTGTTCAAAACCCTAACAACAGTAGCTGAAAAGAGCCACTCCTTTGAT
TCAGTAGGAAATTTGATACTAAAATTTCCAAGAGGTAAGCCCGTGGACTACTTTCCGGTCATGTAGCTTCAA
ATGGTGCAATTTTGGAGGCCCTTAGATGGGGAAAAGCAAACCTTACATAATTGATATCAGCAATACCCTTTG
CACACAGTGGCCTACTTTGCTAGAAGCTTTAGCCACAAGAAATGATGAGACGCCGCGATTAAAGCTCACC
GTTGTGGTAACTGCTAGCATTGTAAGATCAGTCATGAAAGAAATTTGGCCAAAGAATGGAGAAGTTTGCTA
GGTTAATGGGAGTGGCCCTTTGAGTTTAAAGTAATTAGTGTGCTAAATCATATAGGAGAGCTCACAAAGGA
AGGACTGGGTGTTCAAGAAGATGAAGCAGTCCGATTAATTGCATTGGGGCATTGAGAAGAGTTGAAGTA
GATGAAAGAAGTTCTGTAATCCAGTTGTTCCGATCACTTAACCCTCGAGTTGTGACAATTGTAGAGGAAG
AAGCTGATTTTACTAGCTCAAGATATGACTTCGTCAAGTGCTTTGAAGAGTGCCTGAGGTATTATACACT
ATATTTTGAGATGCTAGAGGAGAGCTTTGTCCCACTAGTAATGAGAGATTGATGTTGGAGAGGGAATGT
TCAAGGAACATAGTTAGGTTTTTGGCTTGTGATGAAGAACTGGTGGAGGAGAGTGTGAAAGAAGAGAGC
GGGGTGTCCAATGGTCTGAAAGGCTAAGGGAGGCATTTTCCCCTGTTGGATTTCAGTGATGATGTTGTCTGA
TGATGTCAAGGCATTGCTTAAGAGATACAAAGCTGGGTGGGCACCTGTGCTACCTCAAGGAGATCATGAG
TCAGGAATTTACCTAACATGGAAAGAGGAACCTGTAGTATGGGCTTCTGCATGGAAACCCTAAAAGGTTG
TGGCCAGAACCACATCTCTATGCTCAAATTCAGGCTCAGCATGGCAATTTATTCACAAGATGGGAACAG
CGCGCCATGAACACATATTGATAATTAATTATAGAGTACTACTACTTTCACTTTTCACTTTCTTCTTCTTA
TTCATGCATATTTGTATCTTATGCACTCCAACCTTTCTTTTCTTATGTTATAT

PtSHR2B eugene3.00640143 (ID. SEC. Nº: 6)

MQSNSSNNNNNQPQTSHTSTSRSSDSGEACGGGNKWKLLSECARAISEKDSSKIHHLLWMLNELASPYGDCDQ
KLASYFLQALFCKATESGQRCKLTLTTVAEKSHSFDKARKLILKFQEVSPWTTFGHVASNGAILEALDGESKLHI
IDISNTLCTQWPTLLEALATRNDETPLRLKLTVVVVTASIVRSVMKEIGORMEKFARLMGVPFEFKVISVLNHIGEL
TKEGLGVQEDEAVAINCIGALRRVEVDERSSSIQLFRSLNPRVVTIVEEEADFTSSRYDFVKCFEECLRYTYLYF
EMLEESFVPTSNERLMLERECSRNIVRVLACDEETGGGECERRERGVQWSERLREAFSPVGFSDVVDDVKALLK
RYKAGWALVLPQGDHESGIYLTWKEEPVWASAWKP

5

AtSHR At4 g37650 (ID. SEC. Nº: 7)

ATGGATACTC TCTTTAGACT AGTCAGTCTC CAACAACAAC AACAATCCGA TAGTATCATT
 ACAAATCAAT CTTCGTTAAG CAGAACTTCC ACCACCACTA CTGGCTCTCC ACAAACCTGCT
 TATCACTACA ACTTTCCACA AAACGACGTC GTCGAAGAAT GCTTCAACTT TTTCATGGAT
 GAAGAAGACC TTTCCTCTTC TTCTTCTCAC CACAACCATC ACAACCACAA CAATCCTAAT
 ACTTACTACT CTCCTTTTAC TACTCCCACC CAATACCATC CCGCCACATC ATCAACCCCT
 TCCTCCACCG CCGCAGCCGC AGCTTTAGCC TCGCCTTACT CCTCCTCCGG CCACCATAAT
 GACCCTTCCG CGTTCTCCAT ACCTCAAACCT CCTCCGTCCT TCGACTTCTC AGCCAATGCC
 AAGTGGGCAG ACTCGGTCTT TCTTGAAGCG GCACGTGCCT TCTCCGACAA AGACACTGCA
 CGTGCACAAC AAATCCTATG GACGCTCAAC GAGCTCTCTT CTCCGTACGG AGACACCGAG
 CAAAAACTGG CTTCCTTACTT CCTCCAAGCT CTCCTTCAACC GCATGACCGG TTCAGGCGAA
 CGATGCTACC GAACCATGGT AACAGCTGCA GCCACAGAGA AGACTTGCTC CTTTCGAGTCA
 ACGCGAAAAA CTGTACTAAA GTTCCAAGAA GTTAGCCCTT GGGCCACGTT TGGACACGTG
 GCGGCAAAAC GAGCAATCTT GGAAGCAGTA GACGGAGAGG CAAAGATCCA CATCGTTGAC
 ATAAGCTCCA CGTTTTGCAC TCAATGGCCG ACTCTTCTAG AAGCTTTAGC CACAAGATCA
 GACGACACGC CTCACCTAAG GCTAACCAAC GTTGTGCTGG CCAACAAGTT TGTCAACGAT
 CAAACGGCGT CGCATCGGAT GATGAAAGAG ATCGGAAACC GAATGGAGAA ATTCGCTAGG
 CTTATGGGAG TTCCTTTCAA ATTTAACATT ATTCATCACG TTGGAGATTT ATCTGAGTTT
 GATCTCAACG AACTCGACGT TAAACCAGAC GAAGTCTTGG CCATTAAGTGG CGTAGGCGCG
 ATGCATGGGA TCGCTTACAG TGAAGGCCCT AGAGACGCTG TGATATCGAG TTTCCGACGG
 TTAAGACCGA GGATTGTGAC GGTTCGTAGAA GAAGAAGCTG ATCTTGTCGG AGAAGAAGAA
 GGTGGCTTTG ATGATGAGTT CTTGAGAGGG TTTGGAGAAT GTTTACGATG GTTTAGGGTT
 TGCTTCGAGT CATGGGAAGA GAGTTTCCA AGGACGAGCA ACGAGAGGTT GATGCTAGAG
 CGTGCAGCGG GACGTGCGAT CGTTGATCTT GTGGCTTGTG AGCCGTCGGA TTCCACGGAG
 AGGCGAGAGA CAGCGAGGAA GTGGTCGAGG AGGATGAGGA ATAGTGGGTT TGGAGCGGTG
 GGGTATAGTG ATGAGGTGGC GGATGATGTC AGAGCTTTGT TGAGGAGATA TAAAGAAGGT
 GTTTGGTFCG TGGTACAGTG TCCTGATGCC GCCGGAATAT TCCTTTGTTG GAGAGATCAG
 CCGGTGTTT GGGCTAGTGC GTGGCGGCCA ACGTAA

AtSHR At4 g37650 (ID. SEC. Nº: 8)

MDTLFRLVSLQQQQSDS IITNQSSLSRSTSTTTTGS PQTAYHYNFPONDVVEECFNFFMDEEDLSSSSSHHNNHN
 HNNPNTYYS PFTTPTQYHPATSSTPSSTAAAAALASPYSSSGHHNDPSAFSIPQTPPSFDFSANAKWADSVLLEA
 ARAFSDKDTARAQQILWTLNELSSPYGDTEQKLASYFLQALFNRMTGSGERCYRTMVTAATEKTCSFESTRKT
 LKPFQEVSPWATFGHVAANGAILEAVDGEAKIHIVDISSTFCTQWPLLEALATRSDDTPHLRLTTVVVANKFVNDQ
 TASHRMMKEIGNRMEK FARLMGVPPKFNIIHHVGDLEFDLNELDVKPDEVLA INCVGAMHGIASRGS PRDAVIS
 SFRRLRPRIVTVVEEADLVGEEEGGFDFEFLRGPGECLRWFRCFESWEESFPRTSNERLMLERAAGRAIVDLV
 ACEPSDSTERRETARKWSRRMRNSGFGAVGYSDEVADDVRALLRRYKEGVWSMVQCPDAAGIFLCWRDQPVVWAS
 5 AWRP

Secuencia de nucleótidos de SHR del arroz (ID. SEC. Nº: 9)

TGCAGGATTCGGCAGGAGGCACAACACTAGCTAGTTTAGATCCCCTTTGCATCCATCGATGATCAGTTGTTGCATCGATGAT
 CAGTTGTTGCAGGACAGTGTAGTGAGGTGAGAAAGATTGTTGTAGTAGCTGCTGTGCTGTATGGTGGTAGCCAGTGAGTA
 GCTACTACACTGCAGTTCAGTTTGCACCCCGGCATATGTTGGCTACTACTGTCAGGTGCTTAGGTCTAGATGGATA
 CCTCTTCAGGTTGGTTAGCCTCCACCACCATCACCACCACAGCAGCGGGCCTCACCCTCGCCCGGACCAGCCGCAC
 AAGTCGTACCCCTCCTCGGAGGGAGCACCAGCTCCCCCTCCTCCACCACACCACACACCTACTACCACCCTC
 CCACTCCCACTACAACAATAATAGCAACACCAACTACTATTACCAGGGTGGTGGAGGCGGCGGAGGGTACTACTACG
 CGGAGGAGCAGCAGCCGGCGGCGTACCTAGAAGAA TGCGGCAACGGCCACCAGTTTACATGGATGAAGACTTCTCCTCC
 TCGTCTTCTCCCGCAGTTCACCTCGGGAACGGGCGCGCGTCTGTCGGCGCGGTCCTCCTCCTCGGCGGACGAC

SHR HvGI TC147542 de la cebada (ID. SEC. Nº: 14)

MADTPTSRMI HPFSNMQRQN PKQFQFQYPD NPQHPCHPYQ PSPDTHVVPQ HHYSLKSHSS
DASYENHVAQ MKHTLVDSSA AAGCMRHDSF SSSSFTPSI RSGSGSPSSH DDSHSDSTDG
SPVSASCVTV TTEDPNDLKQ KLDLEAEML GPDAAEIVNS LESSVAKQLS LEPEKWAQMM
DFPRGNLDEL LLACARAVEE KNMYAVDMV PELRKMVSVS GTPLERLGAY MVEGLVARLA
SSGHSIYKAL RCKEPKSSDL LSYMFLYEA CPYFKFGYMS ANGAIAEAVK GEDRIHIIDF
HIAQGAQWIS LLQALAAPRG GPPTVRITGI DDSVSAYARG GGLDLVGRRL SHIAGLCKVP
FEFRSVAMAG EEVEEGHLGV VPGEALAVNF TLELHHIPDE TVSTANHRDR ILRLVKGLRP
KVLTLVEQES NNTAPFPQR FAETLDYYTA IFESIDLTLF RDDRERVNME QHCLAREVVN
LIACEGAERV ERHEVFGKWK ARLTMAGFRP SPLSSLVNAT ISKLLQSYSD NYKLAERDGA
LYLGWKKRPL VVSSAWH

Secuencia de nucleótidos de SHR de la cebada (ID. SEC. Nº: 15)

ATGAAGCGGAGTACCAGGACGGCGGGGAGCGGGTGGGGGTGATGAGATGGGGTTCGTCGAGGGACAAGATGATGGT
GTCGTCGTCGGAGGCGGGGAGGGGAGGAGGTGGACGAGCTGCTGGCGGCGCTCGGTACAAGGTGCGGGCGTCCGACA
TGGCGGACGTGGCGCAGAAGCTGGAGCAGCTCCAGATGGCCATGGGGATGGGCGGCCCGCCCGACGACGGCTTCGCG
ACCCACCTCGCCACGGACACCGTCCACTACAACCCACCGACCTCTCCTCGGTGAGAGCATGCTGTCCGAGCAA
CGCGCCGCGCGCCCTCCCGCGGCCCGCCGCGAGTCAACGCTCCACCTCTCCACCGTCACGGGCGGGCGGAT
ACTTCGATCTCCCGCCCTCTGTGACTCCTCCAGCAGCACCTACGCCCTGCGCCCGATCATCTCGCGCCCGTTCGCGCC
GCCGACCTCTCGCTGACTCCGTCCGGGACCCCAAGCGGATGCGCACTGGCGGCAGCAGCACGTCGCTCTTCGCTCCTC
GTCGTCCTCGCTCGGCGGTGGTGGCGCCAGGAGCTCTGTGGTGGAGGCTGCTCCGCGGTGGCGGCTGCGGCTGCTGCGC
CCGCGCTGCGGTCGTCGTTGGTGCACACGCGAGGAGGCGGGATTTCGGTGGTGACGCGCTGCTGGCGTTCGCGGAGGCC
GTGCAGCAGGAGAACCCTCTCGGCCGCGAGGCGCTGGTGAAGCAGATACCCTTGCTGGCAGCGTCGCAAGGCGGCGGAT
GCGCAAGGTGCGCCCTACTTCGGCGAGGCCCTCGCCCGCGCTCTTCGCTTCGCGCCGCGAGCCGACAGCTCCCTCC
TCGACGCGCCTTCGCGCAGCTCCTCCAGCGCACTTCTACGAGTCTGCCCCCTACCTCAAGTTCGCCCATTTCCAGGCC
AACGAGGCCATCCTGGAGGCGTTCGCGCGCTGCCCGCGTCCACGTCGTCGACTTCGGCATCAAGCAGGGGATGCAGTG
GCCGGCCCTTCTCCAGGCCCTCGCACTCCGTCCCGCGGGGCCCTTCGTTCCGCTCACCAGGCGTTGGCCCCCGCAGC
CGGACGAGACCGACGCCCTGCAGCAGGTGGGCTGGAAGCTCGCCAGTTCGCGCACACCATCCGCGTCGACTTCCAGTAT
CGCGGCTCGTCGCGCCACGCTCGCGGACCTGGAGCGGTTCATGCTGCAGCCGAGGCGGAGGAGGACCCCTAACGAGGA
CGCCGAGGTAATCGCGTGAAGTCACTTCGAGATGCACCGGCTCCTCGCGCAGCCCGCGCCCTCGAGAAGGTCCCTGG
GCACGGTGCGCGCCCTGCGGCCGAGGATCGTCACCGTGGTTCGAGCAGGAGGCGAACCACAACTCCGGCTCATTCCTGGAC
CGCTTCACCGAGTCCCTGCACTACTACTCCACCATGTTGATTCTCTCGAGGGCGGCAGCTCCGGCGGCCCGTCCGAGGT
CTCATCGGGGGTTCGCGCTCCTGCGCGCGCGCGCGCACCGACAGGTCATGTCGAGGTGTACCTCGGCCGCGAGATCT
GCAACGTGGTGGCCTCGGAGGCGACGGAGCGCACAGAGCGGCACGAGACACTGGGGCAGTGGCGGAACCGGCTGGGCAAC
GCCGGTTCGAGACCGTGCACCTGGGCTCCAAFGCTACAAGCAGGCGAGCACGCTGCTGGCCCTCTTCGCGCGCGCGCA
CGGTACAAGGTGGAGAGAAGGAAGGAGGCTGACTCTCGGGTGGCACAGCGCCCGCTGATCGCCACTTCCGATGGC
GCCTCGCGCGCGCGTGCAGGATTTTGAACGCTGTAAGTAGACATCGTGAGAGCATGGAGCGCTACGACACAACCCCG
GCCGCCCGCCCGCCCGCTCTCCGGCGCACGACACGCACTTGAAGAAGAAGAAGATGAAGAAGAAGCTAAATGTGAGT
GATACGCTGAATTGCAGCGACCGGCTAGGATCGATCGGGTTACCACTCTACGGTTTGGTTCGCGTCCGGCGTGAAGACA
TGGACACGACCAACTCCGACCAGACCGCGGATGTAATGTAATCCCTCCTTCGTTCCAGTTCACCATCACCCGTAATA
CTCCTTATTAAGCCCTATTACTATTATTATTATGTTAAATGTCTATTACTATGCTATGTGTAATTCCTCCAATCGCTC
5 ATATTGAAATAAGCACGGGCGGACTTTTGNAGCAAGCTGCTTCATTTGAGAATTTTGTACCGCAAGGGCACATCT

Cebada SHR AAL66734. | GI: 18254373 (ID. SEC. Nº: 16)

MKREYQDGGG SGGGGDEMGS SRDKMMVSS EAGEGEEVDE LLAALGYKVR ASDMADVAQK
LEQLEMAMGM GGPAPDDGFA THLATDTVHY NPTDLSSWVE SMLSELNAPP PPLPPAPPQL
NASTSSTVTG GGGYFDLPPS VDSSTSYAL RPIISPPVAP ADLSADSVRD PKRMRTGGSS
TSSSSSSSSS LGGGAARSSV VEAAPPVAAA AAPALPVVV VDTQEAGIRL VHALLACAEA
VQENLSAAE ALVKQIPLLA ASQGGAMRKV APYFGEALAR RVFRFRPQPD SLLDAAFAD
LLHAHFYESC PYLKFAHFTA NQAILFAFAG CRRVHVDFG IKQGMQWPAL LQALALRPGG
PPSFRLTGVG PPQDETDL QQVGWKLQF AHTIRVDFQY RGLVAATLAD LEFFMLQPEG
EEDPNEPEV IAVNSVFEMH RLLAQFGALE KVLGTVRAVR PRIVTVVEQE ANHNSGSFLD
RFTESLHYYS TMFDSLEGGG SGGPSEVSSG GAAPAAAAGT DQVMSEVYLG RQICNVVACE
GTERTERHET LGQWRNRLGN AGFETVHLGS NAYKQASTLL ALFAGGDGYK VEEKEGCLTL
GWHTRPLIAT SAWRLAAP

10 Residuos 1 hasta 120 del PtSHR1 de la cebada (ID. SEC. Nº: 17)

MDTLFRLVLSLQQQSEQSFNSTSRSSSRSSRQNNHHHHHYQQEDECNFNFMDDEDFSSSSSKHYPPYHHNQ
QQQHQQHTTTTTPTTTTTNTSTPSTHHVLDSDAFSFSPSHDLNFE

ID. SEC. Nº: 18 VMKEIG(N/Q)RMEKFARLMGVVPF(K/E)(F/L)(N/K)VI

ID. SEC. Nº: 19 LNEL(G/A)SPYGD(T/C)(E/D)QKLAS(Y/H)FLQALF

15 ID. SEC. Nº: 20 LKFQEVSPW(T/A)TFGHV

ID. SEC. Nº: 21 CTQWPTLLEALATR

Promotor AtSHR (ID. SEC. Nº: 22)

agatttcgagaaaattacataagaaaactgaattgcaacactcgatagggttcgaagaaagggacaaaagaagcagag
cgtgggggttcttctaataattgtagaagaaaactgatcatgagaacatttgatctaccagagatggatgactc
ataagatgtaaatatctactgcattatgtctagcctaggctataatgtagatttgatcactttcttcattaatta
gtttggaatttttagcatgatatagcatatatactaaatatgtccgaaaactttcctacatactagaaaaataggaga
gttatgtaatgtaggtttgcttgttaatatatacaaaaataacatcatcatttagttttttagattttttattttattt
ttataatgggtgctacgtacgtggcgatcaaatattcccaattttgagacttcgggattttaaacgaaattaaac
aatgggcatgagctcggggggatagacaagattaatgctttgtatcgagacaaaacgagaaaaatcatgatgagcct
atgcattaaagtgcggttggttaattagaggttcgcatatacataaaaccagtagacatatggataaatatgaacac
acacaccaaaaaagtgggaaatctaaataagtgtagagaataataagtccctcaggtgggagattcaaagagagga
caatgaagggtatataagactctaaacaaaaatggcatgacttagtggagaggggttttaaatgaaacaagtagga
ttgaagaacaagaaaaacaagaagcatgccctagatttctgagataataattacacattgctgtttatataaggt
aagagaatatgacacattgggttggtttcttacgggtaaatgtgaagaaaaaaaaaatagtaatatgtgagaaatc
taaaatagtaagaggtatataatggagaagaagagagaaaaagggaaaaaatagtgagcagagaatggagagaggtta
ggaggcaaaggcaaatgtggagctttgatgatgtgatgcacgcgcgctcagctttcttcacgcctgctcccactc
actcacacctatgaacattctctctctattttataattatattcacatgctctctatgttactatgtaaatgggtga
ccacttaagtatttatataatcatgtatataatcttataggtatcatacaaaaatgggtcatgaaacttttgcaatttc
aatctacttggtcattgtagatgctagcttttcacatggttttgaaaaattagtctggatctgaaattctttaatta
gcattgtttgttggtcaacgtttaatttcttgattatgtatgtcaaaaaatcagagcgttcagaactcttacac
taatttcttaaaaaataatcgattaagagaaaaatagagttttcatgcaccagtggtgatagtaacgtagtcgcgga
atgcttaaaacgattatgagtttgggtgttttgattgggtagaattgggtattagtaggacattctaactttttgt
tagtctgttgatttaggatgcgtaagagtccttttattttacaccagttgagacttgggatcgatagtacttga
aacacttgggttggtttcatgtatttggcctatataatacaaacatcgtaatatatacggatttttttcggaat
tttacgccatctctgtaagtataataacatgcattgctgttttcaaaatcatatgatgaacgatccacgtaagt
ctactactcctacaatatgcatgagagagatatgtatttataaaattttattttgaagaagaaataagaggggaag
gttacttgggtggatcgatgtgaaaacaaaagaagaaaaagcgaaccactaagccattacatgatatcgacct
tcttatcttttctctcttatttttatttttctcaggacttttttctacttaatgaaacctccaaactatctaact
aatacactcccatgtagaataaagaaaaattatataagatatgttgatattttgtaactagaaaaatataattgct
ctgtaatttttcgtaagttaaatcaacatttttcagtagaaacaaaatattactgcaaaaagtaggatcattattt
ttgtccaaaatctcagttagctatagggttgtagtaaaaaacaaaacacattcttgatttgccccaaaaataaag

agagagaagaatatgttcaaaagtgggtctctctctctcttaattatgttttcaactaaacccaattagattcaaa
cagctacaaaagtcctaaaagataaacatgggacaacaattcgatgcaaaaaatcctcttttcatgctctttttt
attctctagctcttttaaaattactaataaaaaactcacaatccaccaaaccoattctctacaactcacctcatct
agatttaccactcccaccgagaaacacaagaaaaaaaatatacatatataaatatacaagacaacacatgatgc
tgatgcaatatacacaacaaagtattaaatcttagatattgtgggtctccctttcttctattcattttcttatte
attaaaaaaaaaaaa

Promotor PtSHR (ID. SEC. Nº: 23)

AAATCAATAAAAAACAAAATAAATAACAATCAAAAAGAATGACCAAATTAGATATAAAAAGAACAAATAAA
 ATGAAACATTTATATTTTGGCAAGGAGAAAAGGAGAAAAATAGGGAGGAGAAGAAATAAATATTCAATCG
 GAGCAAATCATTACACTGTCATGTACACGCGTCAGACTATTGAATAGAGGATGGCAGGATGCTTCCATCT
 TTGCCATGAAAACCGGTGTTTGGAGGGTAGATAATGCCTTAAACATTGCCTAAAAGGCAGGGGTATCGTC
 CAACGCCCGCACCAACCACTTTTTATTTTTAACTAATATCTAAATTTATCAAAATACCAAATCGCTTCCA
 AGTCAACTTGATAATTACTAAAAACATATTATGAAATGACCAAAAAGCACTTGAATAATAGTTTGAAAAT
 TTTTGCTTTTAAAGGTAATTTAGTCTTTATATTATATTTTTGAAATGTAAAAAGATCAAATTACCCTTGA
 TCAATATTTTTAGAAAATTTGTTTTTAAAGGGTAATAAAGTTTTTAAAATATGCATTTAAAAGGTTAAAAG
 ACCAAATTATCCATAAGAAAAAACCGTTTTACTTCCAATAGCAAGTAAATGATTTTTTTTGTGGGAAG
 GGGAAAATATAATTACACTATTATAGTGAACATGGCTTTCATTTATTTTTTAAAGGGTCTTTGT
 CTCAATTCTGATAAAAAAGTTAGTATTTCTACTTTTAAAAATATTATAAGTTTTTTTCAATTATGA
 ATGTTATAATAATTAAAAAATATATATATGATAGGTGTAATGCTATTATAGAAAAAATAAAAAATAAT
 ACCTACCTTTTATCTTCTACTCACAAAAAAAATTAAAAATAGTTTTTTTTTAAATAGATTTTATGCTTGT
 CTATTTTTTTTAAATAGATGTACTTATGTGAGAGTAAGCGGCAATAAATTTGAAACAAAATTAGTGAGATC
 ACCTTTATTCAAATAATAAGACCGGGTCACCGGGTCATATATATATATATATATATATATATATATAT
 ATATATATATATATATATATATATATGCTTGCAGTCAACAATAATGATTTCCAATTTTTTAAACCGAATG
 ATCTACACGAGACAGAAATCCAGACGTGATAGTTTTCTAATGATTGATGGAGAAAACCAAGGACGAGCAG
 TGATTAGGAACAAGGAAAATTTCAACAGACAAAAGAACTCATATATATATATATATAGACACACACTCTCA
 CCTCTTGCGTATGAAAATGTAGAATAGCAATAGAGCATAATGTTGCTGACTATAAAAGCAAAGAGTAGAC
 CAACCGTGACATACATTAATCCAAATATTTGATCTGCGTTGAGGTTTAGCAAGCTGACACAGAAAGAA
 ATAAATGTTTGTGCTAGCTATATGTAGGCCAACCAATATAGATATAGTTTCTAGAGAGAATTAAGGTT
 CAGCTTGAGGACAACAAGGTTAAGACAATAAAAGGCGAAGTAGTACGTGGTTGTGGTGAATCATAATGA
 ACCGGCTTGGCTATGAATTTTACTAAAAAAGAGCAAGTCACTAGCGGGAGTAAGATTTGAGGTTGTGA
 CATGGAAGGAGAGCCTAGCTATATATGGTTGGGCCATCTTGAGAAATGGCCTAGCTAGCTAGTTTGGTGC
 ATATATGGTGTATGGAATGAATGGATTTATAATAAGTGTGCTATATATATATATATATATATATATAT
 ATATATATATATATATAAACTAAACTATCATGTGGAAGTGGGGAAAAAAGTGAAAGAGCACGCCCTAG
 ATTTTTATATTACAAAAGAGCATTGGTTATAATTAATGGAAGTTGATTTATGTTACACAGTGTAGAAAA
 GGCAAAGCGGGGTGGAATTTTGGCAGAGATTGAAGAGGGATTAGGAGGCAAGGAATGTGAATAGGATGG
 GTTGGAGGGATGATAGTGGGTTTGATAATGATGATGCACGCCGCGCAGCTTTACTCATTATCTTCCCAA
 ATCCAATTGGCAGCCTGCCCCACTAAAACCTATAACAATATTCTCTTCTCTCTTTCAATCTTCTCAT
 AGACAATGAAAAGCTAATCCACTAACCATTGTTGATCTAGCTAGACCTGTTATCTTTCTCTTTTTTA
 ATCTTTTTGTGAGATAACATTTCTATTTCTCAACACCAGTAGCTCTTTCATGCCAATTCCCACGTTCTT
 CCAGGGAAAACGTATATTAGTCATATCTCTCATGAGTTGATTAATAAAGAAAGGAAAAAAGGGAGAAGAC
 TGGGCTAGCTAGCTAGATAAAAGAATATCCCAAACCCACCCAATTTGATTCACATCGACTACAGAAAA
 GAAAAGCACATTTAAACATGTATGTATGTATATATATATATATAAATATCCAATTTCAAGATCCTC
 TCTTTTATCATTCTCTACCCCAATATCCCACAGTTAAAAACACAAACACCCATCCCCTTACCTTCACTC
 CAAGCCATCCCCAACAACTCCATCCGAA

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar el crecimiento y/o la biomasa de una planta dicotiledónea, que comprende;
- 5 reducir pero no anular la expresión del polipéptido SHORT-ROOT (SHR) en las células de dicha planta con respecto a las plantas de control, en donde la expresión se reduce expresando un ácido nucleico heterólogo que codifica una molécula de ARN supresora en las células de dicha planta.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el polipéptido SHORT-ROOT (SHR) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de similitud en la secuencia con una cualquiera de las ID. SEC. N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16.
- 15 3. Un método para producir una planta dicotiledónea con un crecimiento o una biomasa aumentados, que comprende:
- incorporar un ácido nucleico heterólogo que reduce pero no anula la expresión de un polipéptido SHORT-ROOT (SHR) en una célula vegetal mediante una transformación, y;
- 20 regenerar la planta a partir de una o más células transformadas, en donde el ácido nucleico heterólogo codifica una molécula de ARN supresora que reduce la expresión del polipéptido SHORT-ROOT (SHR).
- 25 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3 en el que el polipéptido SHORT-ROOT (SHR) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de similitud en la secuencia con una cualquiera de las ID. SEC. N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16.
- 30 5. Una planta dicotiledónea producida mediante un método de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4 que muestra un crecimiento o una biomasa aumentados con respecto a los controles o una parte de los mismos, en donde la planta dicotiledónea o una parte de la misma comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica una molécula de ARN supresora que reduce pero no anula la expresión de un polipéptido SHORT-ROOT (SHR).
- 35 6. Una planta dicotiledónea de acuerdo con la reivindicación 5 en donde la parte aérea de dicha planta muestra un crecimiento o una biomasa aumentados con respecto a los controles o una parte de los mismos.
- 40 7. Una planta dicotiledónea o una parte de la misma que comprende un ácido nucleico heterólogo que reduce pero no anula la expresión de un polipéptido SHORT-ROOT (SHR), en donde el ácido nucleico heterólogo codifica una molécula de ARN supresora que reduce la expresión del polipéptido SHORT-ROOT (SHR), en donde dicha planta es un hijo, un clon o un descendiente de una planta de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6.

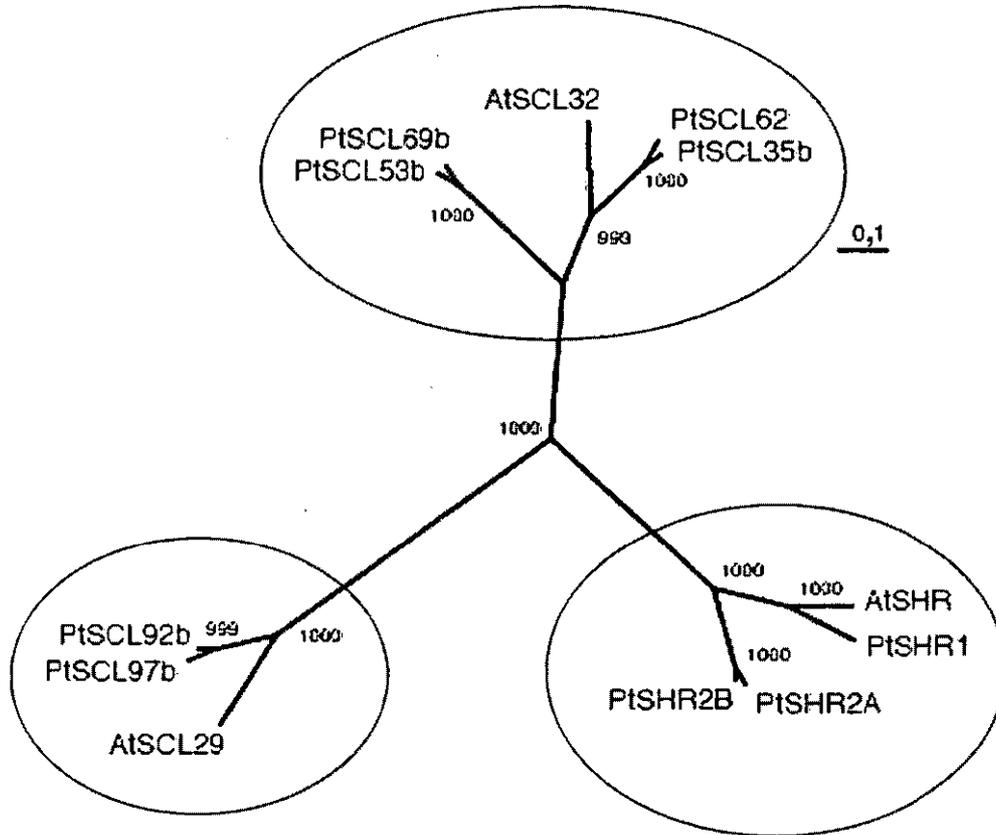


Figura 1

ES 2 535 118 T3

```

. . . 10 . . . 20 . . . 30 . . . 40 . . . 50 . . . 60 . . . 70 . . . 80 . . . 90 . . . 100
AtSHE 1:MDTLFRLVSLQQQQSDSIIITNQSLSGKPTTTCSPTIAYHYNPPONDVYVGGVNFYFDDEDLSSSSSHDHNHNMPNTYSPPTTPTQYHPATSSIP:100
PtSHE1 1:MDTLFRLVSLQQQSEQ.....SPNSTGKSSSSRSRGNMNHBBHYQQEDGGVNFYFDDEDLSSSSSKHYPPYHBNQQOGRHQXTTTTTPTTTTNT:95
PtSHE2A 1:.....MDSGSENNNNNQPTSTSTSSSSGAGC.....:31
PtSHE2B 1:.....MDSGSENNNNNQPTSTSTSSSSGAGC.....:31

. . . 110 . . . 120 . . . 130 . . . 140 . . . 150 . . . 160 . . . 170 . . . 180 . . . 190 . . . 200
AtSHE 101:SSSTAAALASPYSSSGHHNDPSAPSIPOTPPSDFPSNAKWDSDVLEAANAFEDKDAACQILWTLNELSPYGDTEOKLASVFLQALDNRITGSC:200
PtSHE1 96:S.....TPSTHVLDSADPSPSHDLNPFSGKVVLDHLSAALINDKNSARLQYAHMLNELGSPYGDTEOKLASVFLQALDNRITGSC:203
PtSHE2A 31:.....LGNKWAQRNLSGCAFAIENDESKHBNALMLNELASPYGDTEOKLASVFLQALDNRITGSC:94
PtSHE2B 31:.....GKNKWAQRNLSGCAFAIENDESKHBNALMLNELASPYGDTEOKLASVFLQALDNRITGSC:94

. . . 210 . . . 220 . . . 230 . . . 240 . . . 250 . . . 260 . . . 270 . . . 280 . . . 290 . . . 300
PtSHE2A 95:KCKK...LTVVAEKCSFDDARRLLKPKQEVSPWTFCHVASNGALDEALDCKSKHIIIDISNLTCTOWPTLLEALATRDSTPHLRLTVVAEKSSGNN:187
PtSHE2B 95:KCKK...LTVVAEKCSFDDARRLLKPKQEVSPWTFCHVASNGALDEALDCKSKHIIIDISNLTCTOWPTLLEALATRDSTPHLRLTVVAEKSSGNN:187
AtSHE 201:KCVFMTVTAAGKTCSPESRKKVLRKFOEVSFWTFCHVASNGALDEALDCKSKHIIIDISNLTCTOWPTLLEALATRDSTPHLRLTVVAEKSSGNN:299
PtSHE1 184:KCVF...TVAASKTCSPESRKKVLRKFOEVSFWTFCHVASNGALDEALDCKSKHIIIDISNLTCTOWPTLLEALATRDSTPHLRLTVVAEKSSGNN:281
                                     VBIIID

. . . 310 . . . 320 . . . 330 . . . 340 . . . 350 . . . 360 . . . 370 . . . 380 . . . 390 . . . 400
AtSHE 299:.....DQTASDPMKEIGNRMENFARLMGVFPRFVIBHAGDGLSDFDLNEDVYKPDVVAIHCYGAHKCDSRGSFDDAVSSSRDRPRLTVVAEKSSGNN:392
PtSHE1 282:IGLTSTGGLASVRYMKEIGNRMENFARLMGVFPRFVIBHAGDGLSDFDLNEDVYKPDVVAIHCYGAHKCDSRGSFDDAVSSSRDRPRLTVVAEKSSGNN:381
PtSHE2A 187:.....IVRSYMKRIGRMENFARLMGVFPRFVIBHAGDGLSDFDLNEDVYKPDVVAIHCYGAHKCDSRGSFDDAVSSSRDRPRLTVVAEKSSGNN:275
PtSHE2B 187:.....IVRSYMKRIGRMENFARLMGVFPRFVIBHAGDGLSDFDLNEDVYKPDVVAIHCYGAHKCDSRGSFDDAVSSSRDRPRLTVVAEKSSGNN:275

. . . 410 . . . 420 . . . 430 . . . 440 . . . 450 . . . 460 . . . 470 . . . 480 . . . 490 . . . 500
AtSHE 393:ADLVGREGGDFDIFLQCECLRRVYVQESWDESPFNSNEQMLERAAAGRAVAVACEPSSDS...IERRRTRSRVYNSDFCAVQYSDEVAAD:489
PtSHE1 382:ADLDG.....LDVYVQCECLRRVYVQESWDESPFNSNEQMLERAAAGRAVAVACEPSSDS...IERRRTRSRVYNSDFCAVQYSDEVAAD:471
PtSHE2A 276:ADPTSSR.....YDLYKCPSCRLRYVYVQESWDESPFNSNEQMLERAAAGRAVAVACEPSSDS...IERRRTRSRVYNSDFCAVQYSDEVAAD:369
PtSHE2B 276:ADPTSSR.....YDLYKCPSCRLRYVYVQESWDESPFNSNEQMLERAAAGRAVAVACEPSSDS...IERRRTRSRVYNSDFCAVQYSDEVAAD:369

. . . 510 . . . 520 . . . 530 . . . 540 .
AtSHE 490:VRLLRVYKCVNSVQCCPAG...FPCWDECPVVASAWRF:531
PtSHE1 472:VRLLRVYKCVNSVQCCPAG...FPCWDECPVVASAWRF:510
PtSHE2A 370:VRLLRVYKCVNSVQCCPAG...FPCWDECPVVASAWRF:411
PtSHE2B 370:VRLLRVYKCVNSVQCCPAG...FPCWDECPVVASAWRF:411
                                     SAW
    
```

Figura 3



Figura 4

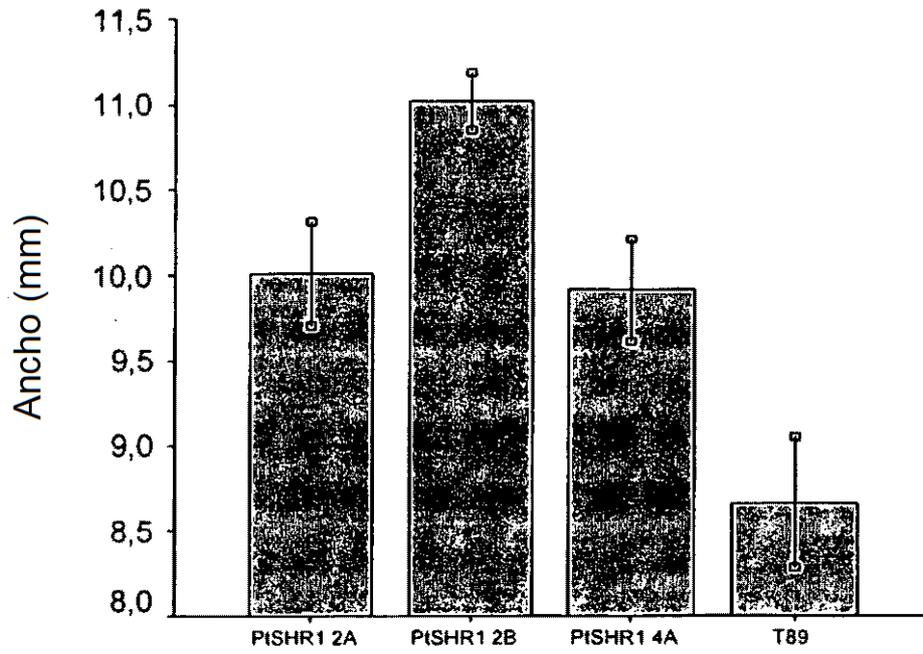


Figura 5

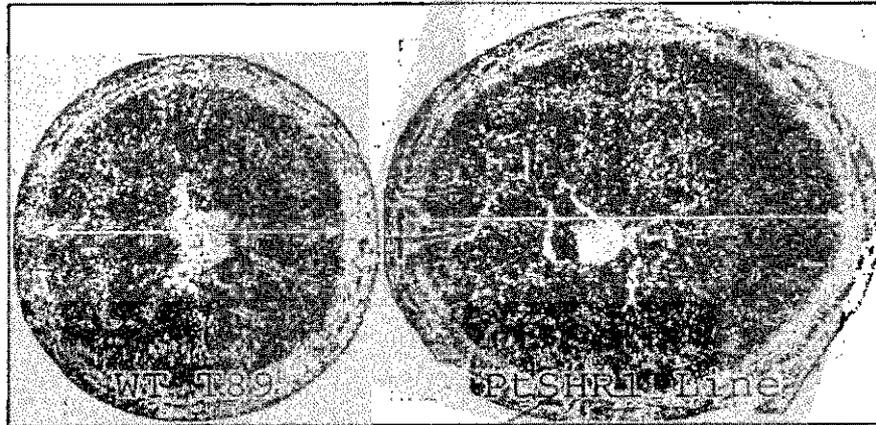


Figura 6

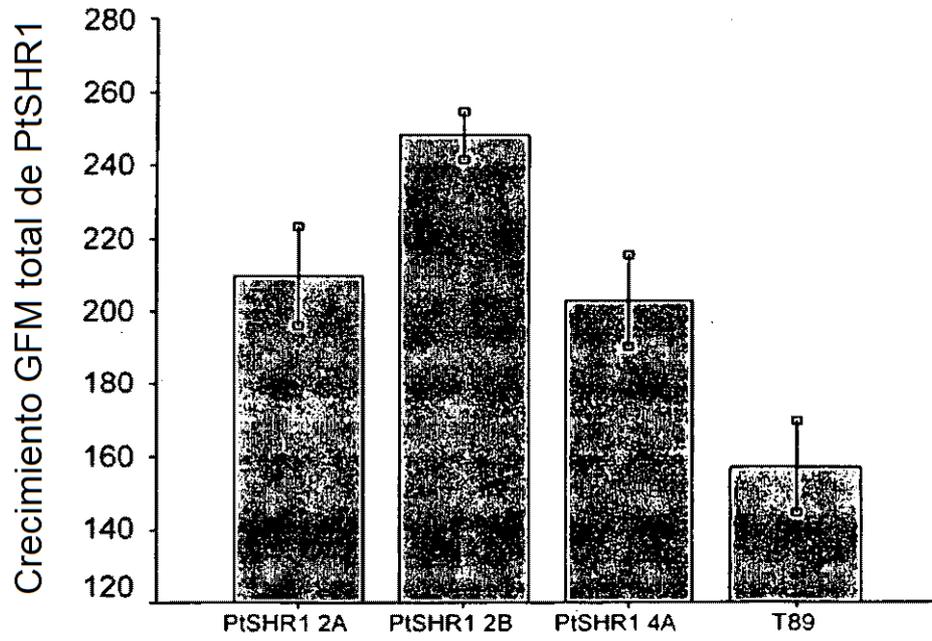


Figura 7

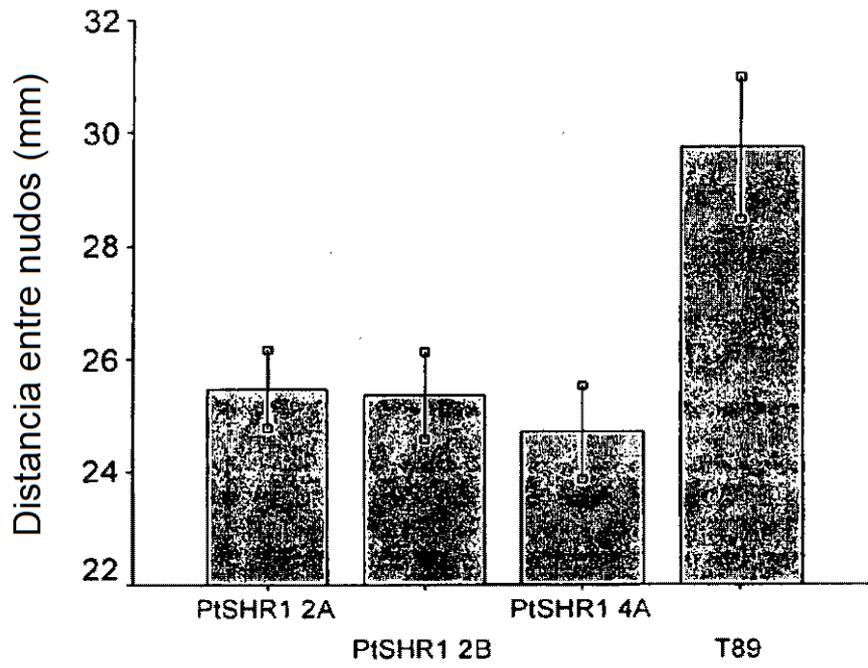


Figura 8

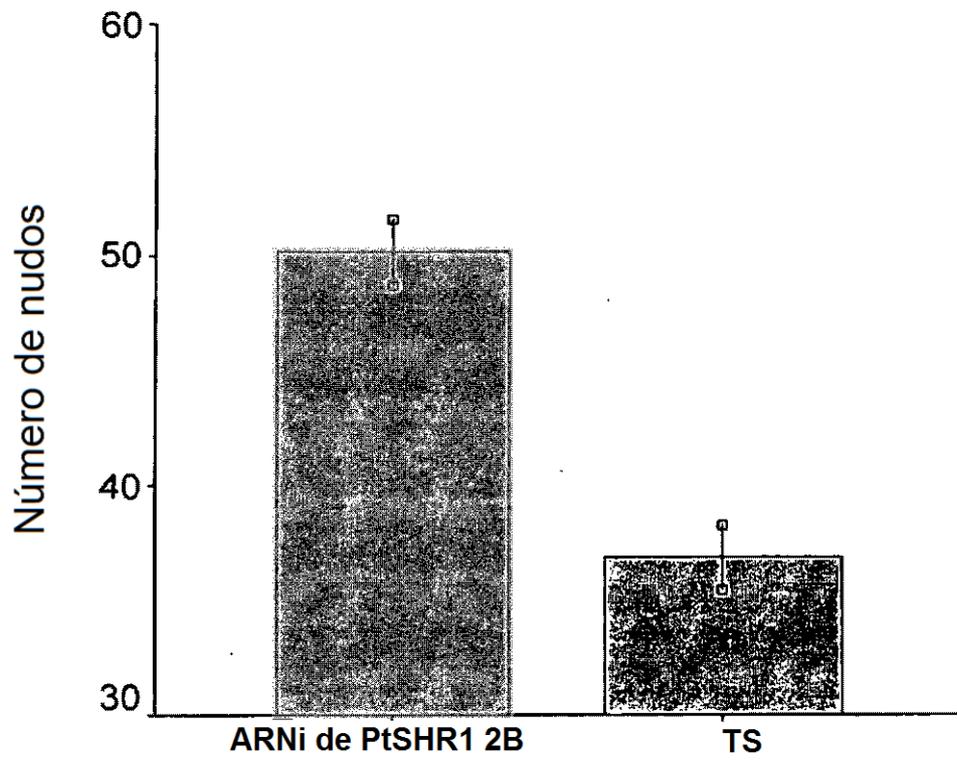


Figura 9

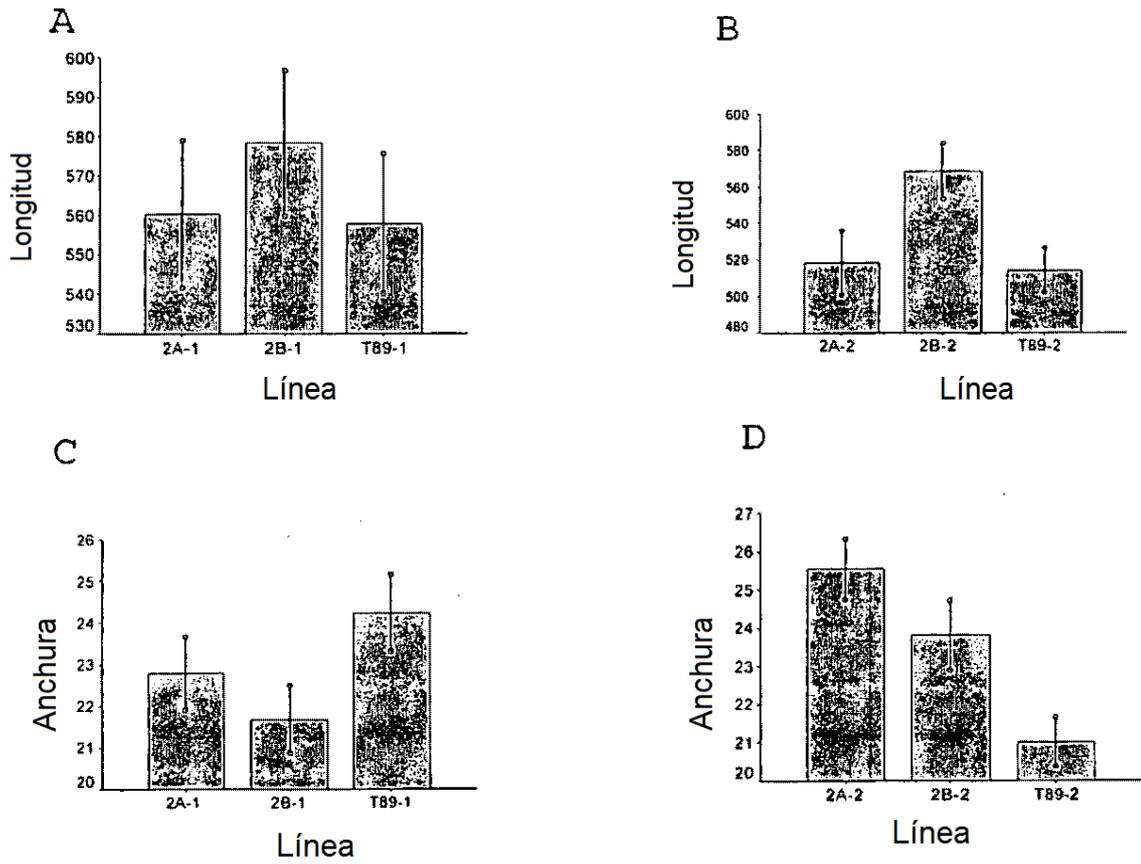


Figura 10

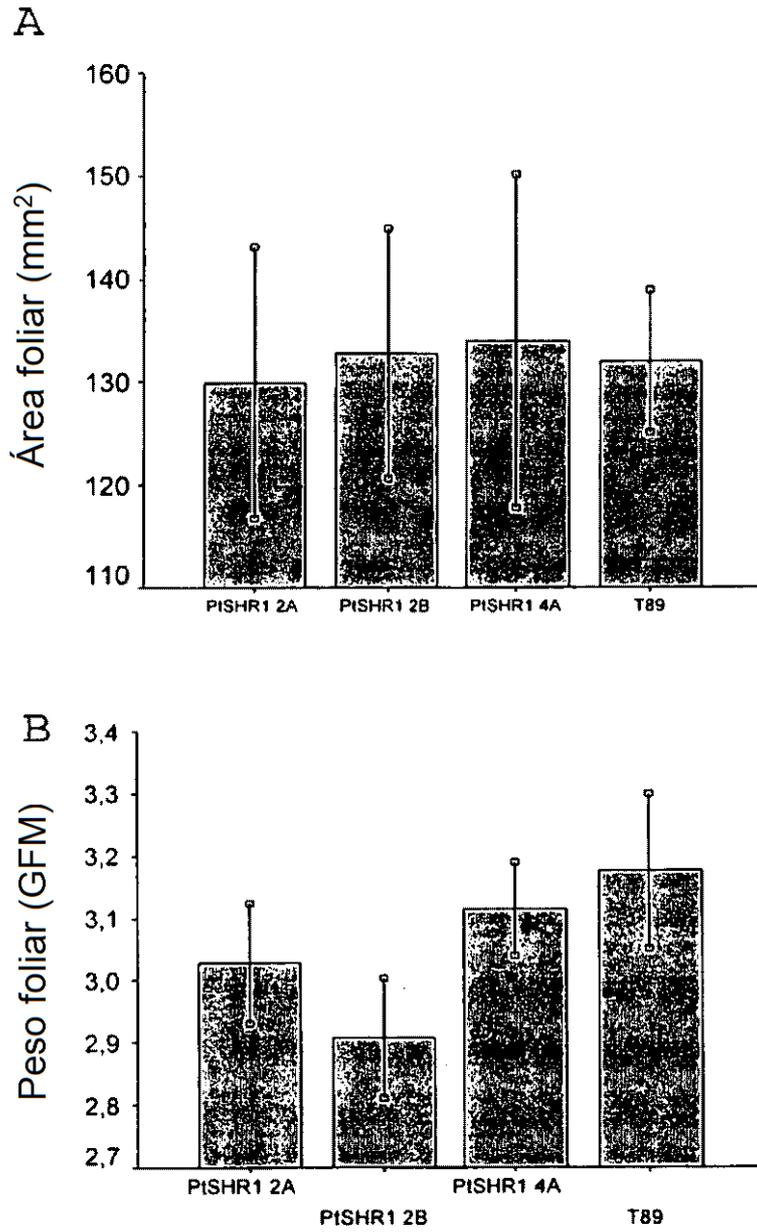


Figura 11

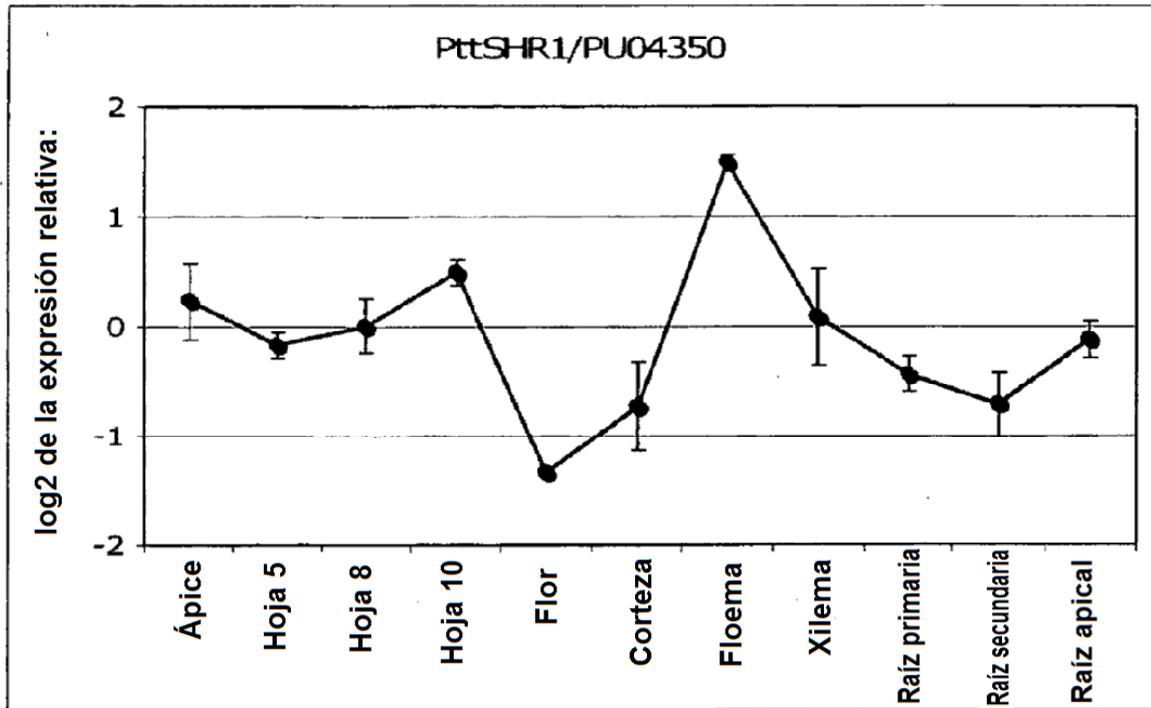


Figura 12

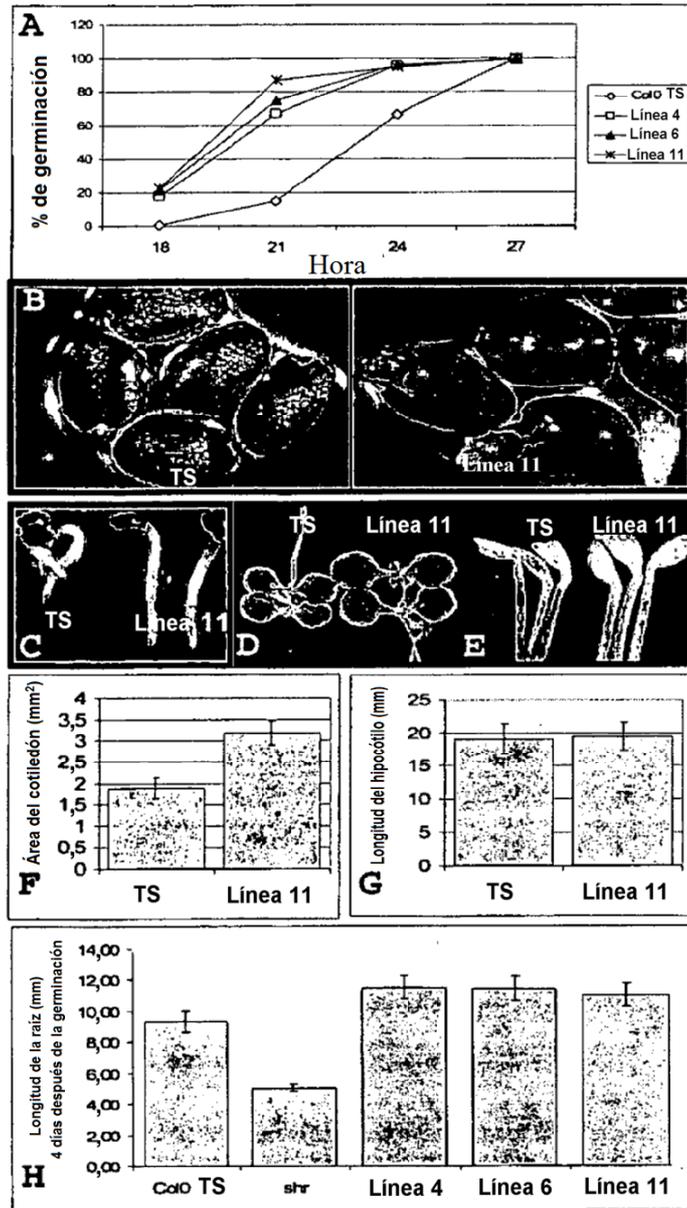


Figura 13

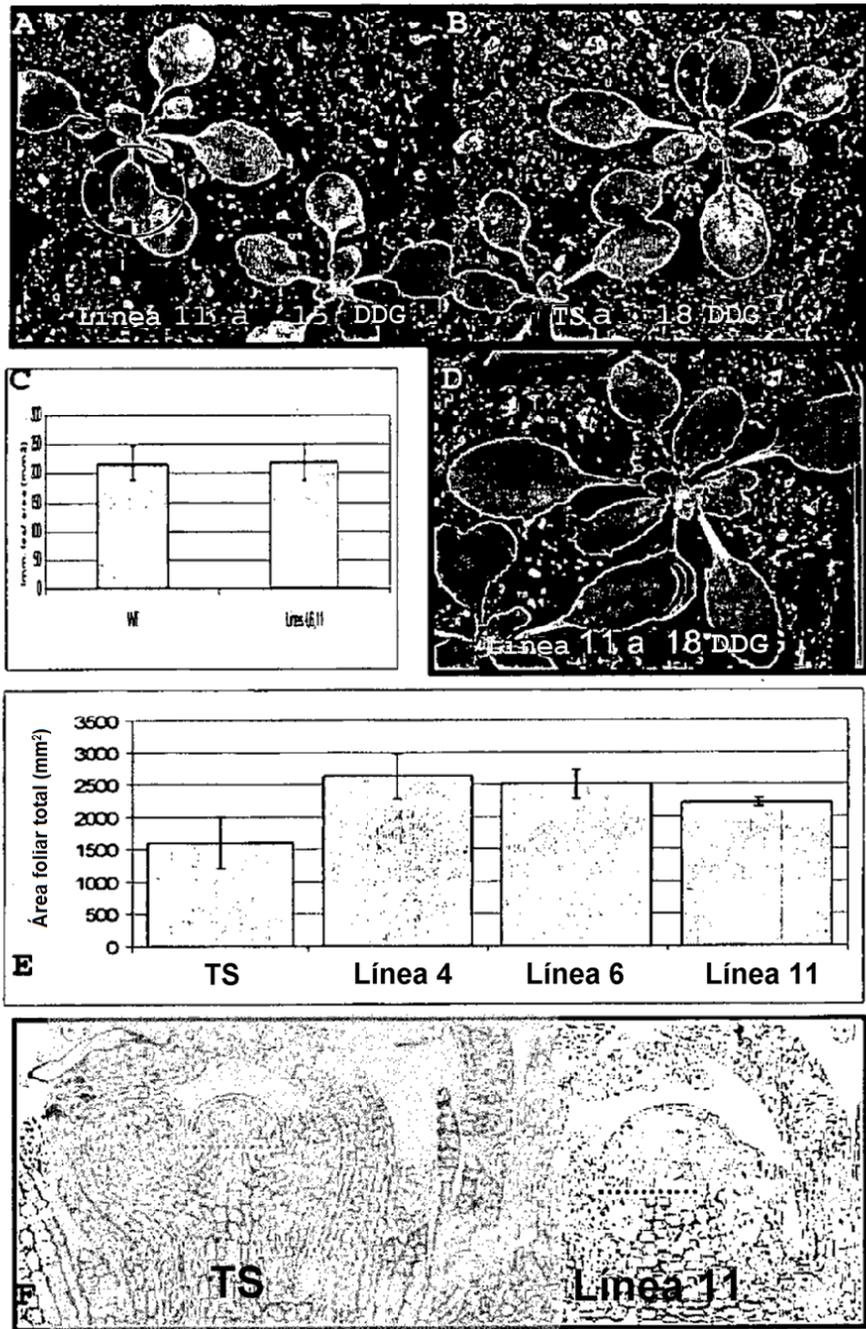


Figura 14

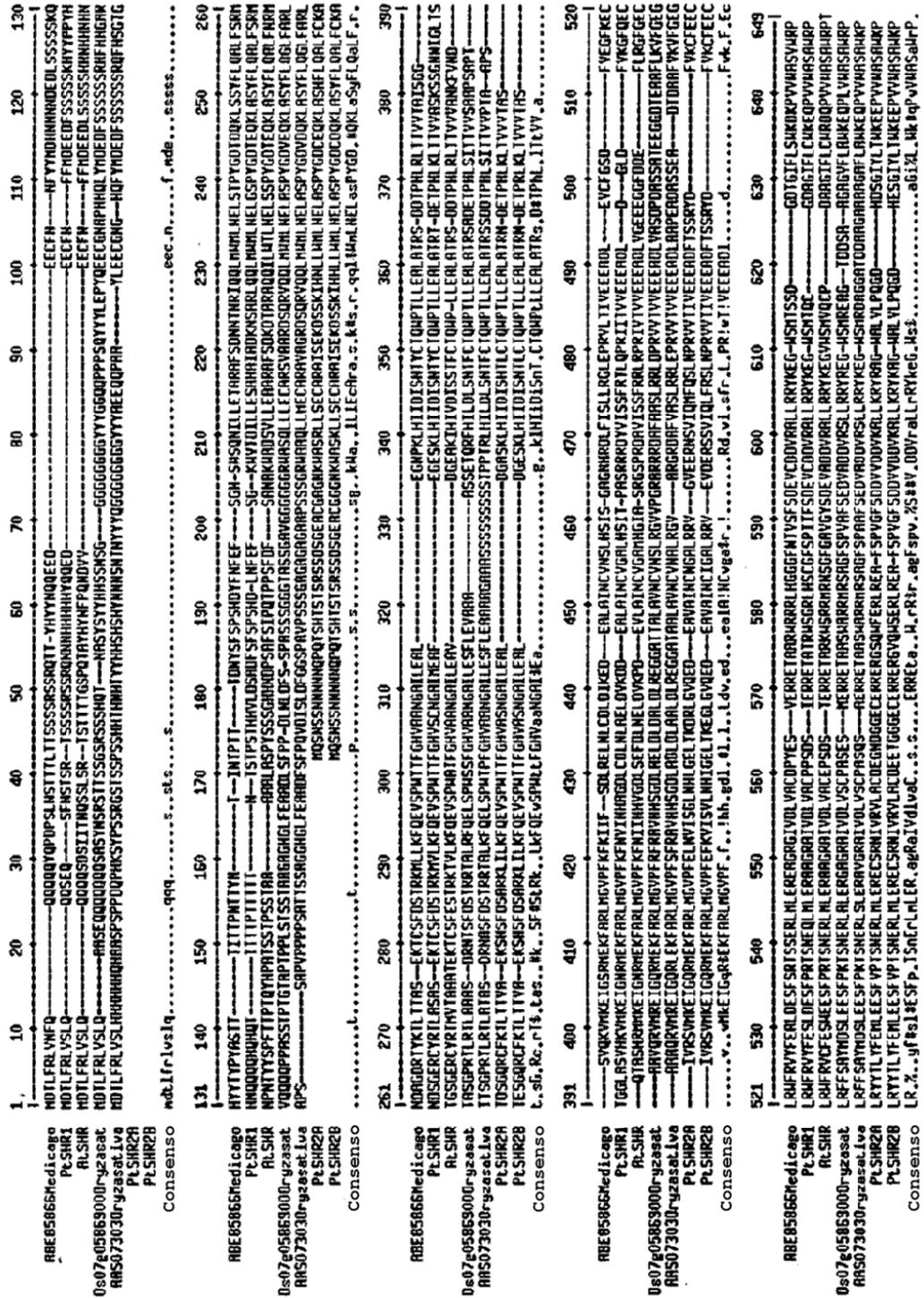


Figura 15

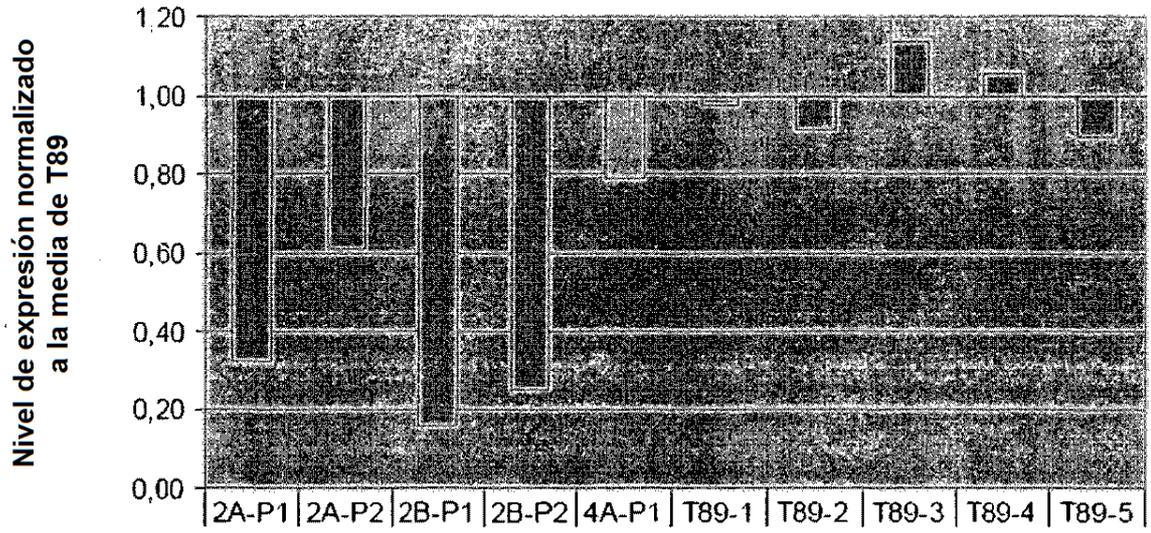


Figura 16