

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 560**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01G 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2015 PCT/IB2015/055974**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16020874**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2015 E 15767295 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 3055415**

54 Título: **Método para modular procesos vegetales**

30 Prioridad:

06.08.2014 IT MI20141447
06.08.2014 US 201462033757 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.07.2017

73 Titular/es:

VALAGRO S.P.A. (100.0%)
Via Cagliari 1 Zona Industriale
66041 Atesa (Chieti), IT

72 Inventor/es:

PERATA, PIERDOMENICO;
LORETI, ELENA;
PAPARELLI, ELEONORA;
SANTANIELLO, ANTONIETTA;
NOVI, GIACOMO y
PIAGGESI, ALBERTO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 626 560 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

Método para modular procesos vegetales

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para modular procesos vegetales estando dicho método caracterizado por que se suministra a una planta una composición bioestimulante ecológica que comprende miARN vegetales y exógenos. En particular, el método de la invención se puede usar para modular procesos vegetales fisiológicos o patológicos, tales como crecimiento vegetal, productividad vegetal, calidad del fruto, calidad del producto, rendimiento de la planta, respuesta de la planta a estrés abiótico y resistencia de la planta a enfermedades o a infecciones.

15 Antecedentes de la técnica

Promover el crecimiento y la productividad de la planta es importante en la agricultura. Hoy en día, estos procesos principalmente se gestionan usando fertilizantes, sustancias de crecimiento vegetal tales como hormonas, modificaciones físicas del suelo, etc.

20 Sin embargo, el uso de estos compuestos agroquímicos ha dado como resultado muchas consecuencias medioambientales a largo plazo tales como el agotamiento de recursos, daños medioambientales y efectos en la salud.

25 Para limitar el uso de aportes de compuestos químicos medioambientalmente peligrosos, para incrementar el rendimiento del cultivo, y promover el crecimiento de la planta y la absorción de nutrientes, se han puesto muchos esfuerzos hacia el desarrollo y la puesta en práctica de enfoques respetuosos con el medio ambiente, basados en productos naturales. Actualmente, en particular, los bioestimulantes están atrayendo el interés de las comunidades de actividad y de investigación en la agricultura.

30 Los bioestimulantes son materiales, distintos de los fertilizantes, que promueven el crecimiento vegetal cuando se aplican en pequeñas cantidades (Khan, y col. 2009, *J. Plant. Growth Regul.* 28:386-399). Según una definición más reciente, los bioestimulantes vegetales son sustancias y materiales, con la excepción de nutrientes y pesticidas, que cuando se aplican a plantas, semillas o sustratos de cultivo en formulaciones específicas, tienen la capacidad de modificar procesos fisiológicos de las plantas de una manera que proporciona beneficios potenciales al crecimiento, desarrollo y/o respuesta al estrés (Du Jardin P 2012, *The Science of Plant Biostimulants*).

35 Los documentos WO2014/113423 y US2014/215656 enseñan que se puede producir plantas resistentes a hongo y/o nematodo aplicando elementos de silenciamiento de PMR5 o del inhibidor de BAX 1 sobre superficies de la planta, tales como raíces u hojas. El pepino resistente a nematodo se produce salpicando ARNbc (bicatenario) sobre cotiledones. El documento WO2013/016201 describe un método de disminución de la resistencia a microbios en plantas tales como maíz y remolacha azucarera para mejorar la nodulación. El documento US2011/296556 describe un método para volver las plantas susceptibles a herbicidas aplicando tópicamente oligómeros de polinucleótido a plantas tales como maíz, remolacha azucarera, alfalfa y caña de azúcar.

45 Marina Brumin y col. 2008 describen plantas transgénicas con silenciamiento.

Nao Gao y col., 2009 enseña que la sobreexpresión transgénica de miARN399d de *A. thaliana* en tomate mejora su capacidad de recuperar o adquirir P en suelo.

50 El documento EP2468902 se refiere a un caso de maíz transformado (*Zea mays*), denominado MIR162 que comprende un novedoso genotipo transgénico que comprende una secuencia codificante vip3Aa20 (proteína insecticida), que es única en el caso MIR162.

55 El documento CN102899352 enseña un método para modular miARN (y no un gen) *in vivo*. El método implica una etapa de remojo de raíces de *Arabidopsis* en una solución acuosa que comprende un oligonucleótido antisentido dirigido a un miARN.

60 Rodríguez-Medina Caren y col. 2001 describen exudados de floema de altramuz que comprenden miARN. H. Restrepo-Díaz y col., 2009 enseña que aplicaciones foliares de K incrementan eficazmente el contenido de K en olivos deficientes en K. R Xia y col., 2013 enseña que la ruta de microARN (miARN)-gen de ARN pequeño de interferencia que actúa trans (TAS)-gen que contiene la repetición de pentatricopéptido (PPR)-ARN pequeño de interferencia es muy dinámica y es un rasgo extendido de eudicotas.

65 En este contexto, es un objeto principal de la presente invención proporcionar un método ecológico para modular procesos vegetales fisiológicos o patológicos, en particular, para mejorar el crecimiento vegetal, la productividad

vegetal, la calidad del fruto, la calidad del producto, el rendimiento de la planta, la respuesta de la planta a estrés abiótico y la resistencia de la planta a enfermedades o a infecciones.

Descripción de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para mejorar la absorción de nutrientes, la tolerancia a estrés abiótico, el crecimiento y el desarrollo en plantas que comprende: extraer miARN156 y/o miARN399d de una planta; o

10 recoger el exudado de raíz que comprende miARN156 y/o miARN399d; y suministrar a una planta en desarrollo o una semilla el extracto o el exudado.

15 En particular, el extracto es de hojas de la planta y preferentemente el extracto se obtiene congelando rápidamente en líquido las hojas y, a continuación, machacando las hojas congeladas con mortero y la mano del mortero usando tampón citrato 100 mM, pH 6.

20 Según una realización preferida de la invención, la planta es una planta dicotiledónea o monocotiledónea, preferentemente la planta se selecciona entre el grupo que consiste en: Remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), Maíz (*Zea mays*) y Alfalfa (*Medicago sativa*).

25 Según una realización preferida adicional de la invención el método comprende adicionalmente una etapa de adición de micronutrientes, preferentemente presentes en una concentración que oscila desde 0,1 a 20 % p/p, preferentemente desde 1 a 10 % p/p, más preferentemente desde 2 a 6 % p/p.

30 Según una realización preferida adicional de la invención el método comprende adicionalmente una etapa de adición de macronutrientes preferentemente presentes en una concentración que oscila desde 0,5 a 50 % p/p, preferentemente desde 10 a 30 % p/p, más preferentemente desde 12 a 25 % p/p.

35 Preferentemente, los micronutrientes se seleccionan entre: KCl, H₃BO₃, MnSO₄, CuSO₄, ZnSO₄, y Fe-EDTA; y los macronutrientes se seleccionan entre: KNO₃, Ca(NO₃)₂, MgSO₄ and KH₂PO₄.

40 Según una realización preferida adicional de la invención el método comprende adicionalmente una etapa de adición de sustancias capaces de modificar la tensión superficial, tensioactivos, adyuvantes, adhesivos, compuestos humectantes y sustancias capaces de facilitar el transporte de la composición dentro de la planta hacia el sitio diana.

45 Según una realización preferida adicional de la invención el extracto o el exudado se formula como polvo, polvo soluble en agua, gránulo, gel, comprimido o emulsión, concentrado emulsionable o como solución líquida o como suspensión líquida.

50 Según una realización preferida adicional de la invención, el extracto o exudado se aplica por suministro a las raíces y/o rociado de las hojas.

55 Según una realización preferida adicional de la invención el extracto o exudado se aplica a la planta en combinación con la administración de bioestimulantes, hormonas PGR, PGPR, preferentemente para reducir las tasas o dosis de aplicación por temporada de dichos bioestimulantes, hormonas, PGR, PGPR.

60 Por lo tanto, es un objeto de la presente invención un método para modular procesos vegetales fisiológicos y/o patológicos que comprende al menos una etapa de suministrar a una planta, también planta en desarrollo o una semilla, una composición bioestimulante que comprende miARN156 y/o miARN399d naturalmente derivados de plantas o partes de la planta. En particular, la composición de la invención se puede usar para mejorar el crecimiento vegetal, la productividad vegetal, la calidad del fruto, la calidad del producto, el rendimiento de la planta, la respuesta de la planta a estrés abiótico y la resistencia de la planta a enfermedades o a infecciones.

De hecho, el solicitante ha encontrado inesperadamente que:

- 65
- 1) los miARN, son extremadamente estables en extractos vegetales/exudados vegetales;
 - 2) suministrando a las plantas a tratar las composiciones de la invención, los miARN derivados de planta exógenos de plantas externas y no producidos por la propia planta tratada) son capaces de alcanzar las células de las plantas tratadas, y modular varios procesos biológicos de interés agrícola a través de mutagénesis dirigida (*gene-targeting*) mediado por un mecanismo de ARN de interferencia ambiental; y

65 Por lo tanto, al enriquecer las composiciones con los miARN derivados de planta exógenos específicos, es posible marcar (y, por lo tanto, modular) varias funciones génicas específicas en plantas, tales como el crecimiento y la productividad de las plantas, la fase de transición desde la fase juvenil a la planta, y la respuesta de las plantas a estrés abiótico. Además, de esta manera, es posible aprovechar este uso, por ejemplo, para incrementar el rendimiento de la planta y la calidad del fruto y/o flor, para mejorar la absorción de nutrientes, o la resistencia de la

planta a enfermedad específica causada, por ejemplo, por hongos, bacterias, virus o infestación de insectos o nematodos.

Ventajosamente, el método de la presente invención es respetuoso con el medio ambiente y, por lo tanto, más seguro en comparación con los productos agroquímicos, tales como reguladores del crecimiento vegetal o pesticidas, usados en la actualidad con el mismo fin.

Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 muestra la distribución de la longitud de secuencia de ARN pequeño en *Ascophyllum nodosum*.
- La Figura 2 muestra las familias de miARN identificadas comparando el ARNm identificado en *Ascophyllum nodosum* y los miARN conocidos.
- La Figura 3 muestra ejemplos de miARN identificados en *Ascophyllum nodosum* y su papel en plantas superiores.
- La Figura 4 muestra la clasificación de *Gene Ontology* (GO) de las dianas putativas de los miARN identificados en *Ascophyllum nodosum*.
- La Figura 5 muestra el análisis de RT-PCR acoplado con detección por PCR cuantitativa de miR399d, pre-miR399d, y las secuencias de ARNm de ARNr 40S y GAPDH realizado sobre el medio de cultivo externo de plantas de *Arabidopsis* cultivadas usando un medio hidropónico.
- La Figura 6 muestra la estabilidad (a temperatura ambiente y a 4 °C) de miR399d después de la extracción de miARN en tampón de citrato de los brotes (A) y de las raíces (B) de *Arabidopsis* que sobreexpresa miR399d.
- La Figura 7 muestra el sistema de cultivo usado para verificar el efecto de miARN extraídos de plantas OE-miR399d (plantas que sobreexpresan miR399d) cuando se suministran de manera exógena a plantas de tipo natural. 7A cultivo de plantas de tipo natural, 7B cultivo de plantas OE-miR399d y 7C cultivo conjunto de plantas de tipo natural y OE-miR399d.
- La Figura 8 muestra la expresión de PHO2 en plantas de tipo natural (Col-O Cntr), en plantas OE-miR399d (35S::miR399d Cntr), en plantas de tipo natural cultivadas conjuntamente con plantas OE-miR399d (Col-O Co-Colt.) y en plantas OE-miR399d cultivadas conjuntamente con plantas de tipo natural (35S::miR399d Co-Colt.).
- La Figura 9 muestra la expresión de PHO2 en plantas de tipo natural (Cntr), en plantas OE-miR399d (miR399), en plantas de tipo natural cultivadas conjuntamente con plantas OE-miR399d (CNTR-cc), y en plantas OE-miR399d cultivadas conjuntamente con plantas de tipo natural (miR399-CC) cuando las plantas se han cultivado con una concentración de Pi de 3 mM (gráfica derecha) y 1,5 mM (gráfica izquierda).
- La Figura 10 muestra la expresión de PHO2 en plantas de tipo natural tratadas con el medio en el que se cultivaron el tipo natural (gris claro) y OE-miR399d (gris oscuro).
- La Figura 11 muestra el nivel de expresión de miR156 (A), SPL9 (B) y miR172 (C) en plantones de *Arabidopsis*. En particular, las plantas de tipo natural cultivadas durante 48 h en un medio en el que se cultivaron plantas de tipo natural durante cinco días (columna A); plantas 35S::miR156 cultivadas durante 48 h en un medio en el que se cultivaron plantas 35S::miR156 durante cinco días (columna B); plantas de tipo natural cultivadas durante 48 h en un medio en el que se cultivaron plantas 35S::miR156 durante cinco días (columna C); y plantas 35S::miR156 cultivadas durante 48 h en un medio en el que se cultivaron plantas de tipo natural durante cinco días (columna D).

Descripción detallada de la invención

Para un entendimiento adicional del objeto, construcción, características y funciones de la invención, a continuación, se da una descripción detallada con referencia a las realizaciones. En el concepto general, la presente invención, por lo tanto, revela un método para modular procesos vegetales fisiológicos y/o patológicos que comprende una etapa de suministrar a una planta una composición bioestimulante ecológica que comprende al menos miARN naturalmente derivados de (producidos de manera natural por) al menos una planta o una parte de plantas tal como raíces, hojas, tallo o cualquier otra parte de las plantas. Según una realización preferida de la invención, la composición bioestimulante comprende al menos un miARN exógeno naturalmente derivado de al menos una planta o parte de la planta o exudado de la planta.

En una realización preferida de la invención, las plantas se recogen de fuentes naturales o se cultivan artificialmente. Según una realización preferida de la invención, al menos un miARN exógeno derivado de al menos un extracto o al menos un exudado o cualquier otra muestra de al menos una planta o una parte de una planta, tal como raíces, hojas, tallo o cualquier otra parte de las plantas.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "modular procesos vegetales fisiológicos y/o patológicos" se refiere a un proceso de modificación de la expresión de uno o más genes responsables o implicados en el proceso vegetal de interés, regulando a la baja y/o regulando a lo alto la expresión de los genes a través de un mecanismo que implica la interferencia de las moléculas de miARN (contenidas en la composición reivindicada y administradas a la planta suministrándola) y el(los) gen(es) de interés (ARN de interferencia ambiental, véase más adelante).

La composición de la invención se puede usar también para alimentar una planta en desarrollo o una semilla.

Tal como se usa en el presente documento, los procesos vegetales fisiológicos y/o patológicos de interés se refieren, por ejemplo, a absorción de nutrientes, tolerancia al estrés abiótico, procesos de crecimiento y desarrollo tales como floración y producción del fruto, productividad de la planta en términos de cantidad y calidad, resistencia de la planta a enfermedad específica causada, por ejemplo, por hongos, bacterias, virus o infestación por insectos o nematodos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “bioestimulante/bioestimulación” se refiere a materiales que promueve el crecimiento vegetal, distintos a los fertilizantes, normalmente usados en pequeñas cantidades. En otras palabras, los bioestimulantes vegetales son sustancias/materiales, con la excepción de nutrientes y pesticidas, que cuando se aplican a plantas, semillas o sustrato de cultivo en formulaciones específicas, tienen la capacidad de modificar procesos fisiológicos de plantas de una manera que proporciona beneficios potenciales al crecimiento, desarrollo y/o respuesta al estrés. Por tanto, la aplicación de bioestimulantes tiene un impacto positivo sobre la nutrición de la planta y el crecimiento de la planta, mientras que a la vez proporciona efectos anti-estrés. En vista de la definición anteriormente revelada, la composición usada en el método de la invención se puede considerar una “composición bioestimulante”. De hecho, cuando se suministra a plantas, por ejemplo, es capaz de modificar los procesos vegetales de una manera que proporciona múltiples beneficios a las plantas; por ejemplo, mejora el crecimiento de la planta, el desarrollo de la planta y/o la respuesta de la planta al estrés.

El miARN preferentemente se obtiene de una fuente natural, preferentemente una planta, más preferentemente una planta natural o una planta transgénica (planta genéticamente modificada).

Según una realización preferida el miARN se selecciona entre: miR156, miR399d, miR166, miR398, miR168, miR396, miR159, miR6027, miR6024, miR162, miR157, miR9471, miR390, miR169, miR1919, miR397, miR414, miR4376, miR482, miR5168, miR5300, miR827, miR9470, miR9476, más preferentemente es miR156 y/o miR399d. Según una realización preferida adicional, dicho miARN comprende una secuencia seleccionada entre: SEQ ID NO: 1 a 44.

Tal como se usa en el presente documento, “ARN de interferencia (ARNi)” se refiere a un mecanismo regulador genético post-transcripcional endógeno generalmente mediado por moléculas de ARN no codificantes (ARNip/miARN). En particular, este mecanismo se puede utilizar para el silenciamiento del gen dirigido mediante la introducción de herramientas basadas en ácido nucleico que están especialmente diseñadas para desencadenar el mecanismo de ARNi. Después del descubrimiento de ARNi, se han propuesto diversas aplicaciones potenciales. En el área de planta/cultivo, por ejemplo, el uso de ARNi como una herramienta para modular la fisiología de la planta es hoy en día una técnica comúnmente usada. En particular, este método es un enfoque transgénico por el cual una planta sobreexpresa un miARN u otra secuencia de ARN pequeña para silenciar la expresión del(los) gen(es) diana. Sin embargo, la presente invención se basa en el concepto de transferencia horizontal de material genético, específicamente miARN u otros ARN pequeños capaces de desencadenar ARNi. Este proceso también se denomina “ARN de interferencia ambiental”, significando que, además de controlar la expresión génica por mecanismos múltiples dentro de una célula que los produce o sistémicamente en la planta que los produce, las moléculas de ARN se pueden exportar, a través de un mecanismo desconocido, fuera de la planta así como dentro de otras plantas en las que modulan procesos fisiológicos y/o patológicos interfiriendo con la expresión génica.

Por tanto, según la presente invención, es posible suministrar a una planta (o un plantón o una semilla o incluso un tejido vegetal primordial) una composición que comprende al menos un miARN, en la que esta molécula exógena está naturalmente derivada de plantas o partes de planta y en la que esta molécula exógena es capaz de modular la expresión de uno o más genes vegetales implicados en un proceso vegetal, a través de un mecanismo de ARN de interferencia ambiental. Esto significa que los miARN usados en el método de la invención son moléculas presentes de manera natural en plantas y derivadas de un extracto de plantas/partes de planta o de un exudado de plantas/partes de planta y se usan para modular procesos fisiológicos y/o patológicos de otras plantas que no los producen.

Más preferentemente, al menos una molécula de ARN pequeño exógeno está implicada en la modulación del proceso vegetal específico de interés. En otras palabras, la composición de la invención contiene preferentemente miARN (derivados de plantas y/o partes de planta y/o de algas y/o de microalgas) capaces de modular (suprimir o sobreexpresar) la expresión del gen de interés a través de un mecanismo de ARN de interferencia ambiental y, por lo tanto, modular (mejorar o perjudicar) el proceso vegetal de interés.

Alternativamente, la composición comprende un extracto, un exudado, cualquier muestra derivada de plantas o parte de plantas, tales como raíces u hojas, en la que dicho extracto, exudado o muestra comprende miARN exógenos (derivados de planta).

Según una realización preferida el miARN se selecciona entre: miR156, miR399d, miR166, miR398, miR168, miR396, miR159, miR6027, miR6024, miR162, miR157, miR9471, miR390, miR169, miR1919, miR397, miR414, miR4376, miR482, miR5168, miR5300, miR827, miR9470, miR9476 o combinación de los mismos, más preferentemente es miR156 y/o miR399d.

Según una realización adicional preferida, el miARN comprende una secuencia seleccionada entre: SEQ ID NO: 1 a 44.

Según una realización preferida de la invención, las moléculas de miARN, derivadas de una planta seleccionada entre el grupo que consiste en: Remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), Maíz (*Zea mays*) y Alfalfa (*Medicago sativa*).

Sin embargo, cualquier planta, dicotiledónea o monocotiledónea, o parte o mezclas de las mismas se puede usar para el alcance de la presente invención.

La planta, de la cual se derivan los miARN, puede ser una planta de tipo natural o una genéticamente modificada, tal como una planta genéticamente modificada para expresar los miARN de interés.

Otra realización preferida de la composición de esta invención comprende componentes tales como sustancias capaces de modificar la tensión superficial, tensioactivos, adyuvantes, adhesivos o agentes humectantes y sustancias capaces de facilitar el transporte de la composición dentro de la planta hacia los sitios diana.

Según una realización adicional, la composición de la invención comprende adicionalmente micronutrientes y/o macronutrientes.

Ejemplos de micronutrientes útiles son: KCl, H₃BO₃, MnSO₄, CuSO₄, ZnSO₄, o Fe-EDTA.

Ejemplos de macronutrientes útiles son: KNO₃, Ca(NO₃)₂, MgSO₄, KH₂PO₄.

5 Preferentemente, los micronutrientes están presentes en una concentración que oscila desde 0,1 a 20 % p/p, preferentemente desde 1 a 10 % p/p, más preferentemente desde 2 a 6 % p/p.

Preferentemente, los micronutrientes están presentes en una concentración que oscila desde 0,01 a 100 mg/kg para la aplicación sencilla (cuando se aplica).

10 Preferentemente, los macronutrientes están presentes en una concentración que oscila desde 0,5 a 50 % p/p, preferentemente desde 10 a 30 % p/p, más preferentemente desde 12 a 25 % p/p.

Preferentemente, los macronutrientes están presentes en una concentración que oscila desde 1 a 50 gramos/kg para la aplicación sencilla (cuando se aplica).

15 En una realización preferida adicional de la invención, la composición bioestimulante se puede administrar como polvo, preferentemente polvo soluble en agua, gránulos, gel, comprimidos, emulsión, concentrado emulsionable, o como una solución líquida (un medio) o una suspensión líquida. Más preferentemente, la composición se puede diluir o no diluir antes de ser administrada.

En una realización adicional de la invención, la composición se puede aplicar a plantas de cualquier manera.

20 Preferentemente, se puede alimentar a las plantas la composición revelada a través de la raíz como un producto aplicado al suelo o las hojas como un tratamiento foliar.

La composición preferentemente se formula como un rociador cuando se administra a través de las hojas.

25 Las realizaciones preferidas de la invención no excluyen aplicar el método revelado en el presente documento en combinación con composiciones que comprenden compuestos químicos, tales como fertilizantes, otros bioestimulantes, hormonas, reguladores del crecimiento vegetal (PGR), Rhizobacterias que promueven el crecimiento vegetal (PGPR), pesticidas o cualquier otra sustancia conocida para ser usada sobre las plantas para el mismo fin. Estas combinaciones son particularmente útiles para reducir las tasas o dosis de aplicación por temporada de dichos fertilizantes, bioestimulantes, hormonas, PGR, PGPR, pesticidas o cualquier compuesto que actúe con sinergia o inhiba la actividad de estos compuestos, reduciendo así los efectos adversos sobre el medio ambiente.

30 El uso de las composiciones de la presente invención (el método de la invención) es una alternativa ecológica a los compuestos químicos actuales disponibles en el mercado con el fin de modular procesos vegetales, tales como mejorar la productividad de la planta o el crecimiento de la planta. De hecho, el uso de la composición revelada en el presente documento podría reducir el impacto ecológico de tratar plantas con compuestos químicos perjudiciales tales como herbicidas y pesticidas. Por lo tanto, el uso de las composiciones de la presente invención es medioambientalmente y biológicamente seguro.

A continuación, la presente invención se ejemplifica para ilustrar mejor y no limitar la invención.

Ejemplo I

40 Extracción y caracterización de los miARN de *Ascophyllum nodosum*

Se extrajo ARN pequeño de *Ascophyllum nodosum* por 100 mg de muestras de algas (previamente almacenadas a -80 °C) con el kit de aislamiento de microARN mirPremier (Sigma-Aldrich).

45 Se analizaron las muestras de ARN pequeño purificadas por electroforesis en gel de agarosa al 4 % y se controló la calidad por un BioAnalizador.

50 Puesto que la mayoría de los miARN maduros tienen un grupo 3'-hidroxilo como resultado de la escisión enzimática por Dicer u otras enzimas de procesamiento de ARN, se usó el Kit de Preparación de Muestra de ARN pequeño (Illumina) para preparar una genoteca de miARN. Esta tecnología usa un adaptador 3' específicamente modificado para marcar microARN y otros ARN pequeños que tienen un grupo 3' hidroxilo. A continuación, se secuenciaron los miARN aislados usando la plataforma HiSeq 2000 (IGA Technology Service, Udine).

55 A continuación, las secuencias obtenidas se limpiaron separando las secuencias adaptador/acceptor. Se obtuvo un total de 27.152.631 lecturas que produjeron 2.117.202 miARN únicos. Se recontó el hecho de la longitud del número total de las lecturas de secuencia, considerando solamente el intervalo desde 9 a 48 nucleótidos, mostrando que la mayoría del ARN pequeño de la genoteca de *Ascophyllum* era 21 de tamaño (Figura 1), que es consecuente con el tamaño de miARN típico producido por Dicer.

60 Las secuencias putativas de miARN identificadas se compararon con miARN conocidos usando la base de datos miRBase.

65 Con este análisis, se identificaron 316 familias de miARN conocidas, compuestas así por ortólogos de miARN de otras especies vegetales. Entre ellas, 17 familias de miARN tienen relativamente más recuentos de secuencia (10<n<106), indicando que probablemente están muy expresadas (Figura 2).

Algunas de ellas están implicadas en la regulación de procesos en relación al desarrollo de la planta y la respuesta al estrés (Figura 3).

5 Las secuencias de miARN que comprenden 20 a 22 nucleótidos y repetidas al menos 100 veces (5.059 secuencias) se sometieron a Blast frente la base de datos GenBank de NCBI de *Arabidopsis* para encontrar dianas posibles. Los resultados informaron del posible emparejamiento de secuencia de miARN de *Ascophyllum* con 2.303 genes de *Arabidopsis* anotados. Este grupo posiblemente comprende también miARN novedoso no representado en familia de miARN previamente conocida. Los genes de *Arabidopsis* emparejados se agruparon en 50 clases implicadas en Procesos Biológicos (52 %), Funciones Moleculares (44 %) y Componentes Celulares (4 %) (clasificación GO –
10 Figura 4).

15 Las dianas relacionadas con el Proceso Biológico GO:0007166 ($p=6,08 \times 10^{-5}$) comprenden genes relacionados con la activación del mecanismo de defensa, respuesta a frío, respuesta a etileno, ABA y estímulos de azúcar, hormonas y metabolismos de carbohidrato, crecimiento y desarrollo (Fig. 4). Este grupo de genes de *Arabidopsis* es probablemente una diana interesante para la acción de los miARN producidos por *Ascophyllum nodosum*.

El miARN de *Ascophyllum nodosum* está muy conservado en plantas

20 Para identificar el miARN conservado en *Ascophyllum nodosum*, los inventores compararon los conjuntos de datos con los miARN vegetales y animales conocidos usando la base de datos miRBase (versión 21, publicada en junio de 2014, <http://www.mirbase.org>).

25 No permitiendo errores de emparejamiento entre secuencias de 20 a 22 nucleótidos, se identificaron un total de 62 miARN maduros putativos correspondientes a familias de miARN vegetales conocidas (Tabla II), compuestas así por ortólogos de miARN putativos de diferentes especies vegetales.

La Tabla II muestra secuencias identificadas en *Ascophyllum nodosum* que comparten 100 % de homología con la secuencia de miARN conocidos para plantas superiores.

30 Tabla II

| Nombre | Secuencias | SEQ. ID. | Códigos ID usados para identificar la familia |
|---------|------------------------|--------------|---|
| miR-166 | AGAATGTCGTCTGGTTTCGAGA | SEQ ID NO:1 | <u>miR166, miR166a, miR166a-3p, miR166b, miR166c, miR166c-3p, miR166c-5p, miR166d, miR166d-3p, miR166d-5p, miR166e, miR166e-3p, miR166f, miR166f-3p, miR166g, miR166g-3p, miR166h, miR166h-3p, miR166i, miR166i-3p.</u> |
| | GGGATGTTGTCTGGCTCGACA | SEQ ID NO:2 | |
| | TCGGACCAGGCTTCAATCCCT | SEQ ID NO:3 | |
| | TCGGACCAGGCTTCATTC | SEQ ID NO:4 | |
| | TCGGACCAGGCTTCATTCC | SEQ ID NO:5 | |
| miR-166 | TCGGACCAGGCTTCATTCCCC | SEQ ID NO:6 | <u>miR166i-5p, miR166j, miR166j-3p, miR166k, miR166k-3p, miR166l, miR166l-3p, miR166m, miR166n, miR166n-3p, miR166o, miR166p, miR166q, mir166r, mir166s.</u> <u>mir166t, miR166u</u> |
| | TCGGACCAGGCTTCATTCCCT | SEQ ID NO:7 | |
| | TCGGACCAGGCTTCATTCCCTC | SEQ ID NO:8 | |
| | TCTCGGACCAGGCTTCATTCC | SEQ ID NO:9 | |
| | TTGGACCAGGCTTCATTCCCC | SEQ ID NO:10 | |
| miR-398 | GGGTTGATTTGAGAACATATG | SEQ ID NO:11 | <u>miR398: miR398a miR398a-3p</u> |
| | TATGTTCTCAGGTCGCCCTG | SEQ ID NO:12 | |
| miR-168 | CCCGCCTTGCATCAACTGAAT | SEQ ID NO:13 | <u>miR-168: miR168a, miR168a-3p, miR168a-5p, miR168b, miR168b-3p, miR168b-5p, miR168c, miR168c-5p, miR168d, miR168e</u> |
| | CCTGCCTTGCATCAACTGAAT | SEQ ID NO:14 | |

ES 2 626 560 T3

| Nombre | Secuencias | SEQ. ID. | Códigos ID usados para identificar la familia |
|----------|------------------------|--------------|--|
| | TCCCGCCTTGCACCAAGTGAAT | SEQ ID NO:15 | |
| | TCGCTTGGTGCAGATCGGGAC | SEQ ID NO:16 | |
| | TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAC | SEQ ID NO:17 | |
| miR-396 | GTTCAATAAAGCTGTGGGAAG | SEQ ID NO:18 | miR396: <u>miR396c, miR396c-3p, miR396c-5p, miR396d, miR396d-3p, miR396d-5p, miR396e, miR396e-3p, miR396e-5p, miR396f, miR396f-5p, miR396h, miR396i-5p, miR396k-5p</u> |
| | TTCCACAGCTTTCTTGAAGTT | SEQ ID NO:19 | |
| miR-159 | TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA | SEQ ID NO:20 | miR159: <u>miR159, miR159a, miR159a.1, miR159a-3p, miR159b, miR159b-3p.1, miR159c, miR159d,</u> <u>miR159f, miR159f-3p, miR159j-3p, miR159k-3p</u> |
| miR-6027 | ATGGGTAGCACAAGGATTAATG | SEQ ID NO:21 | miR6027: <u>miR6027, miR6027-3p, miR6027-5p</u> |
| | TGAATCCTTCGGCTATCCATAA | SEQ ID NO:22 | |
| miR-6024 | TTTAGCAAGAGTTGTTTTACC | SEQ ID NO:23 | miR6024: <u>miR6024</u> |
| | TTTTAGCAAGAGTTGTTTTACC | SEQ ID NO:24 | |
| miR-162 | TCGATAAACCTCTGCATCCAG | SEQ ID NO:25 | miR162: <u>miR162, miR162-3p, miR162a, miR162a-3p, miR162b-3p, miR162c</u> |
| miR-156 | GCTTACTCTCTATCTGTCACC | SEQ ID NO:26 | miR156: <u>miR156a, miR156aa, miR156b, miR156c-3p, miR156e-3p, miR156f, miR156g, miR156g-3p, miR156h, miR156i, miR156j, miR156p, miR156q, miR156r, miR156s, miR156x, miR156y, miR156z</u> |
| | TTGACAGAAGATAGAGAGCAC | SEQ ID NO:27 | |
| miR-157 | TTGACAGAAGATAGAGAGCAC | SEQ ID NO:28 | miR157: <u>miR157d, miR157d-5p</u> |
| miR-9471 | TTGGCTGAGTGAGCATCACGG | SEQ ID NO:29 | miR9471: <u>miR9471a-3p, miR9471b-3p</u> |
| | TTGGCTGAGTGAGCATCACT | SEQ ID NO:30 | |
| | TTGGCTGAGTGAGCATCACTG | SEQ ID NO:31 | |
| miR-390 | AAGCTCAGGAGGGATAGCACC | SEQ ID NO:32 | miR390: <u>miR390, miR390-5p, miR390a, miR390a-5p, miR390b-5p, miR390c, miR390d, miR390d-5p, miR390e, miR390f, miR390g</u> |
| | AAGCTCAGGAGGGATAGCGCC | SEQ ID NO:33 | |
| miR-169 | TAGCCAAGGATGACTTGCCT | SEQ ID NO:34 | miR169: <u>miR169, miR169a, miR169b, miR169c, miR169d, miR169e, miR169f, miR169g, miR169h, miR169i, miR169j, miR169k, miR169l, miR169m, miR169n, miR169o, miR169p, miR169q, miR169r, miR169s, miR169t, miR169u</u> |
| miR-1919 | TGTCGCAGATGACTTTCGCC | SEQ ID NO:35 | miR1919, <u>miR1919-5p, miR1919c-5p</u> |

| Nombre | Secuencias | SEQ. ID. | Códigos ID usados para identificar la familia |
|----------|------------------------|--------------|--|
| miR-397 | ATTGAGTGCAGCGTTGATGAC | SEQ ID NO:36 | <u>miR397: miR397, miR397-5p, miR397a, miR397b-5p</u> |
| miR-414 | TCATCCTCATCATCATCGTCC | SEQ ID NO:37 | <u>miR414: miR414</u> |
| miR-4376 | TACGCAGGAGAGATGATGCTG | SEQ ID NO:38 | <u>miR4376: miR4376, miR4376-5p</u> |
| miR-482 | TCTTGCCTACACCGCCCATGCC | SEQ ID NO:39 | <u>miR482. miR482b-3p, miR482d</u> |
| miR-5168 | TCGGACCAGGCTTCAATCCCT | SEQ ID NO:40 | <u>miR5168: miR5168-3p (blast con también la familia miR166)</u> |
| miR-5300 | TCCCCAGTCCAGGCATTCCAAC | SEQ ID NO:41 | <u>miR5300: miR5300</u> |
| miR-827 | TTAGATGACCATCAGCAAACA | SEQ ID NO:42 | <u>miR827: miR827. miR8273p</u> |
| miR-9470 | TTTGCTCATGGATTTTAGC | SEQ ID NO:43 | <u>miR9470: miR6471b-3p</u> |
| miR-9476 | AAAAAGATGCAGGACTAGACC | SEQ ID NO:44 | <u>miR9476: miR9476-3p</u> |

Los resultados muestran que los extractos de *Ascophyllum* contienen pequeños ARN cuyas secuencias son idénticas a los expresados en plantas superiores como miARN. Es muy plausible que estos miARN sean capaces de modular procesos fisiológicos y/o patológicos en plantas por medio de un mecanismo de interferencia ambiental puesto que están muy conservados en las plantas.

Ejemplo II

Liberación vegetal de miARN

Para verificar si una planta es capaz de liberar miARN, se usó un sistema hidropónico. En particular, se cultivaron plantas de *Arabidopsis* en una cámara de crecimiento a 23 °C con un fotoperiodo de 12/12. La intensidad de luz era de 100 micromol de fotones m⁻² s⁻² (como se describe por Gibeaut y col. 1997, *Plant Physiol.*, 115:317-319) y se detectó miARN399d en el medio de cultivo externo.

El análisis se ha llevado a cabo usando una metodología de RT-PCR, acoplada con la detección por PCR cuantitativa de miR399d, pre-miR399d, las secuencias de ARN ARNr 40 S y GAPDH.

El procedimiento de RT de tallo-bucle seguido de análisis por PCR de sybr-green se usó para amplificar la secuencia de miR399. Los resultados mostrados en la Figura 5 muestran claramente que pre-miR399 así como las secuencias de miR399 maduras se detectan en el medio de cultivo externo, mientras que las otras secuencias de ARN de cadena sencilla no se detectaron.

Los resultados fuertemente sugieren que el miARN puede ser liberado de raíces de *Arabidopsis* y soportan la visión de la absorción posterior de los miARN por plantas cercanas. La detección de los miARN en el medio hidropónico externo no estéril sugirió que los miARN son estables incluso fuera de la planta.

La estabilidad de los miARN después de la extracción

Generalmente se cree que los ARN son muy inestables debido a la acción de las ARNasas. Para verificar la estabilidad de las moléculas de ARN pequeñas fuera del compartimento celular, se ha evaluado la estabilidad de los miARN en un extracto bruto de planta.

Se ha extraído el ARN total de los brotes y las raíces de plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan miR399d. Las hojas se congelaron rápidamente en líquido después de la extracción machacando con mortero y la mano de mortero usando tampón citrato 100 mM (pH 6).

El extracto se ha mantenido, sin realizar una etapa de centrifugación, a temperatura ambiente (RT) y a 4 °C durante diversos días.

Inesperadamente, se ha detectado miR399d en los extractos derivados de o bien raíz o brote incluso después de 4 días de incubación. Se han observado diferencias de estabilidad de miR399d no significantes entre las condiciones RT o 4 °C (Figura 6).

5 Estos resultados demuestran la estabilidad de los miARN en un extracto y, por lo tanto, confirman la posibilidad de formular un producto basado en ARN de doble cadena para ser suministrado de manera exógena a las plantas para modular la expresión génica vegetal sin ningún interés en relación con la estabilidad de ARN.
Ejemplo III

10 El cultivo conjunto de plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan miR399d da como resultado el silenciamiento del gen diana (PHO2) en plantas de tipo natural cercanas.

15 Para entender si los miARN exógenos pueden afectar la expresión del gen diana en una planta que no es la que lo produce, los inventores establecen un experimento en el que plantas de *Arabidopsis* de tipo natural (Figura 7A) y plantas que sobreexpresan el gen miR399d (OE-miR399d-Figura 7B) se cultivaron por separado usando un sistema hidropónico.

La composición de la solución hidropónica se informa en la Tabla I

20

Tabla I

| Macronutrientes | |
|-----------------------------------|---------|
| KNO ₃ | 1,25 mM |
| Ca(NO ₃) ₂ | 1,50 mM |
| MgSO ₄ | 0,75 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 0,50 mM |
| Micronutrientes | |
| KCl | 50 µM |
| H ₃ BO ₃ | 50 µM |
| MnSO ₄ | 10 µM |
| CuSO ₄ | 1,5 µM |
| ZnSO ₄ | 2 µM |
| Fe-EDTA | 72 µM |

25 Se cultivaron conjuntamente un grupo de plantas en la misma bandeja. Por tanto, los miARN que finalmente se derraman de las plantas OE-miR399d pueden alcanzar el sistema radicular de las plantas de tipo natural (Figura 7C). Por lo tanto, si los miARN producidos por la OE-miR399d se absorben por las plantas de tipo natural, uno debería esperar que la expresión del gen PHO2, que es la diana de miR399, también esté afectada en las plantas de tipo natural que se cultivaron conjuntamente con las plantas OE-miR399d.

30 Los resultados mostraron que la expresión de PHO2 se ha reducido en las plantas de tipo natural que se cultivaron conjuntamente con las plantas OE-miR399d, indicando así que los miARN salen de las raíces de las plantas OE-miR399d y son absorbidos por las plantas de tipo natural (Figura 8).

35 Puesto que la expresión de PHO2 está fuertemente afectada por el nivel de fosfato en el medio, el experimento se repitió añadiendo fosfato extra al medio.

Los resultados confirmaron que el miARN exógeno reprimía PHO2 en las plantas de tipo natural incluso en presencia de fosfato extra en el medio (Figura 9).

40 En un experimento separado, las plantas de tipo natural se trataron con un medio en el que o bien plantas de tipo natural o plantas OE-miR399d se cultivaron desde la fase de germinación. Este medio debería contener miARN salidos respectivamente de las raíces de tipo natural o de las raíces de OE-miR399d.

45 Los resultados en la Figura 10 muestran la expresión de PHO2 en raíces de cuatro plantas individuales para cada uno de los dos tratamientos. En tres de cada cuatro casos, el medio de las plantas OE-miR399d era capaz de reprimir PHO2 (Figura 10).

En general, estos resultados confirman que los miARN exógenos pueden modular la expresión de un gen diana en la planta tratada con una solución que contiene miARN.

5 Estos resultados también indican que cualquier extracto, solución, producto derivado de una planta y que contiene miARN exógeno puede afectar los procesos de crecimiento vegetal, incluyendo aquellos asociados con rasgos de importancia agronómica.

10 Se puede preparar una solución de miARN a partir de exudados de raíces, de un extracto vegetal o cualquier otro posible procedimiento que pueda proporcionar un producto que contiene miARN.

Estos productos que contienen miARN/ARN pequeño se pueden usar para tratar plantas u órganos vegetales mediante el suministro a las raíces, rociado de hojas o cualquier otro método posible que se usa en la agricultura para administrar fertilizantes, PGR, pesticidas o cualquier otro producto usado sobre plantas y cultivos.

15 Ejemplo IV

El siguiente experimento demuestra que una solución que contiene miARN resultante de la exudación de raíces de plantas que sobreexpresan un miARN específico influye la expresión de genes diana en una planta expuesta a la solución enriquecida con miARN.

20 El sistema de miARN usado es miR156/SPL9, en el que miR156 es capaz de reprimir el ARNm del gen SPL9, un activador de miR172. Esta cascada reguladora afecta el desarrollo de la planta, principalmente la transición desde la fase juvenil a la fase adulta, así como la tolerancia a estrés abiótico.

25 Plantas de tipo natural y plantas que sobreexpresan miR156 se cultivaron en medio de Murashige-Skoog bajo condiciones estériles.

30 En particular, las plantas se cultivaron en medio durante 5 días. A continuación, el medio se intercambiò y las plantas de tipo natural se transfirieron al medio en el que previamente se cultivaron las plantas 35S::miR156 y viceversa.

En este punto, las plantas tratadas se cultivaron en el nuevo medio durante dos días adicionales.

35 Se dejó un conjunto de plantas en el medio original como control.

La siguiente Tabla IV resume la configuración experimental.

Tabla IV

| Muestra | Primeros 5 días | 48 h de tratamiento |
|---------|-----------------|--|
| A | Tipo natural | Plantones de tipo natural en medio de tipo natural |
| B | 35S::miR156 | Plantones de 35S::miR156 en medio de 35S::miR156 |
| C | Tipo natural | Plantones de tipo natural en medio de 35S::miR156 |
| D | 35S::miR156 | Plantones de 35S::miR156 en medio de tipo natural |

40 Se analizó el medio para verificar la presencia de miR156 (Fig. 11A). Los resultados indicaron que el medio en el que se cultivaron las plantas 35S::miR156 está enriquecido con miR156 (muestra B) cuando se comparan con el medio en el que se cultivaron las plantas de tipo natural durante cinco días (muestra A).

45 La muestra de medio C, el cual es el medio en el que se cultivaron las plantas 35S::miR156 durante 5 días pero reemplazadas, a continuación, con plantas de tipo natural, mostró un descenso en el contenido de miR156 (cfr. C con B). Este resultado significa que en ausencia de plantas 35S::miR156, el contenido de miR156 disminuye o, alternativamente, esto significa que el miR156 fue absorbido por las plantas de tipo natural cultivadas en C.

50 Por otro lado, el contenido de miR156 de la muestra D incrementó en comparación con la muestra A.

D es el medio en el que se cultivaron las plantas de tipo natural durante 5 días, y en el que se transfirieron las plantas 35S::miR156 durante 48 h adicionales.

55 El incremento en el contenido de miR156 en esta condición experimental es atribuible a la liberación de miR156 en el medio (cfr. Medio A, el cual es un medio en el que se cultivaron plantas de tipo natural con medio D en el que se cultivaron plantas de tipo natural durante 5 días pero, a continuación, se cultivaron plantas 35S::miR156 durante 2 días extras).

60 Se midió el nivel de expresión del gen diana de miR156 SPL9 (Fig. 11B).

Tal como se esperaba, la expresión del gen SPL9 era reprimida cuando el nivel de expresión de miR156 era alto, tal como en las plantas 35S::miR156 y este era el caso (cfr. B con A).

5 Extraordinariamente, el extracto de tipo natural de plantas que se transfirieron desde dos días extras en el medio acondicionado por plantas 35S::miR156 (muestra C) manifestó un nivel de expresión de SPL9 que era comparable al de las plantas 35S::miR156 (muestra B) y no al de las plantas de tipo natural (muestra A).

Por lo tanto, las moléculas miR156 presentes en el medio acondicionado fueron absorbidas por las plantas de tipo natural en C, y esto dio como resultado la expresión del gen SPL9.

10 Tal como ya se mencionó, el gen SPL9 controla la expresión de miR172. Por lo tanto, en esta condición experimental la expresión de pre-miR172 debería reflejar la de SPL9. Los resultados obtenidos confirmaron esta expectativa (Figura 11C).

15 En particular, los resultados demuestran que los miARN contenidos en un medio que estaba pre-acondicionado cultivando plántones de *Arabidopsis* que sobreexpresan un miARN específico son capaces de modular el correspondiente sistema regulador génico. En el ejemplo proporcionado el medio se enriqueció en miR156 cultivando plántones de 35S::miR156: como se muestra en la figura 1 el nivel de miR156 es 10 veces mayor en "B" (en el que se cultivaron plántones de 35S::miR156) que en "A" (en el que se cultivaron plántones de tipo natural). Colocar los plántones de tipo natural durante 48 h en un medio enriquecido con miR156 (Muestra "C") da como resultado la represión del gen SPL9 y del gen pre-miR172, indicando que las moléculas de miARN presentes en el medio eran capaces de suscitar el silenciamiento del gen.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Valagro S.p.A.
<120> Método para modular procesos vegetales
<130> 11.V2020.12.WO.8M

<160> 44
30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 21
<212> ADN
35 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> miR-166

40 <400> 1
agaatgtcgt ctggttcgag a 21

<210> 2
<211> 21
45 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> miR-166

50 <400> 2
gggatgttgt ctggctcgac a 21

<210> 3
<211> 21
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> miR-166

60 <400> 3
tcggaccagg ctccaatccc t 21

65 <210> 4
<211> 18

ES 2 626 560 T3

| | | |
|----|--|----|
| | <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 5 | <220> <223> miR-166 | |
| | <400> 4 tcggaccagg cttcattc | 18 |
| 10 | <210> 5 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 15 | <220> <223> miR-166 | |
| | <400> 5 tcggaccagg cttcattcc | 19 |
| 25 | <210> 6 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> <223> miR-166 | |
| 30 | <400> 6 tcggaccagg cttcattccc c | 21 |
| 35 | <210> 7 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> <223> miR-166 | |
| 40 | <400> 7 tcggaccagg cttcattccc t | 21 |
| 45 | <210> 8 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> <223> miR-166 | |
| 50 | <400> 8 tcggaccagg cttcattcct c | 21 |
| 55 | <210> 9 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 60 | <220> <223> miR-166 | |
| | <400> 9 tctcgacca ggcttcattc c | 21 |
| 65 | | |

ES 2 626 560 T3

| | | |
|----|---|----|
| 5 | <210> 10 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 10 | <220> <223> miR-166 <400> 10 ttgaccagg cttcattccc c | 21 |
| 15 | <210> 11 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 20 | <220> <223> miR-398 <400> 11 gggttgattt gagaacatat g | 21 |
| 25 | <210> 12 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 30 | <220> <223> miR-398 <400> 12 tatgttctca ggtcgcccct g | 21 |
| 35 | <210> 13 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 40 | <220> <223> miR-168 <400> 13 cccgccttgc atcaactgaa t | 21 |
| 45 | <210> 14 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 50 | <220> <223> miR-168 <400> 14 cctgccttgc atcaactgaa t | 21 |
| 55 | <210> 15 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 60 | <220> <223> miR-168 <400> 15 tccgccttgc caccaagtga at | 22 |

ES 2 626 560 T3

| | | |
|----|---|----|
| 5 | <210> 16 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> <223> miR-168 | |
| 10 | <400> 16 tcgcttggtg cagatcggga c | 21 |
| | <210> 17 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 15 | <220> <223> miR-168 | |
| | <400> 17 tcgcttggtg caggtcggga c | 21 |
| 20 | <210> 18 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> <223> miR-396 | |
| 25 | <400> 18 gttcaataaa gctgtgggaa g | 21 |
| | <210> 19 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 30 | <220> <223> miR-396 | |
| | <400> 19 ttccacagct ttctgaact t | 21 |
| 35 | <210> 20 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> <223> miR-159 | |
| 40 | <400> 20 ttggattga agggagctct a | 21 |
| | <210> 21 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 45 | <220> <223> miR-6027 | |
| | <400> 21 atgggtagca caaggattaa tg | 22 |
| 50 | | |
| | | |
| 55 | | |
| | | |
| 60 | | |
| | | |
| 65 | | |

ES 2 626 560 T3

<210> 22
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> miR-6027
 <400> 22
 10 tgaatccttc ggctatccat aa 22
 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> miR-6024
 20 <400> 23
 ttagcaaga gttgtttac c 21
 <210> 24
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> miR-6024
 30 <400> 24
 ttttagcaag agttgttta cc 22
 <210> 25
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> miR-162
 <400> 25
 tcgataaacc tctgcatcca g 21
 45 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> miR-156
 <400> 26
 55 gcttactctc tatctgtcac c 21
 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> miR-156
 <400> 27
 65 tgacagaag atagagagca c 21

ES 2 626 560 T3

| | | |
|----|---|----|
| 5 | <210> 28 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> <223> miR-157 | |
| 10 | <400> 28 ttgacagaag atagagagca c | 21 |
| | <210> 29 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 15 | <220> <223> miR-9471 | |
| 20 | <400> 29 ttgctgagt gagcatcacg g | 21 |
| | <210> 30 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 25 | <220> <223> miR-9471 | |
| 30 | <400> 30 ttgctgagt gagcatcact | 20 |
| | <210> 31 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 35 | <220> <223> miR-9471 | |
| 40 | <400> 31 ttgctgagt gagcatcact g | 21 |
| | <210> 32 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 45 | <220> <223> miR-390 | |
| 50 | <400> 32 aagctcagga gggatagcac c | 21 |
| | <210> 33 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 55 | <220> <223> miR-390 | |
| 60 | <400> 33 aagctcagga gggatagcgc c | 21 |
| | <210> 33 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 65 | <220> <223> miR-390 | |
| 65 | <400> 33 aagctcagga gggatagcgc c | 21 |

ES 2 626 560 T3

| | | |
|----|--|----|
| 5 | <210> 34 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> miR-169 | |
| 10 | <400> 34 tagccaagga tgactgcct | 20 |
| 15 | <210> 35 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> miR-1919 | |
| 20 | <400> 35 tgtcgagat gacttggcc c | 21 |
| 25 | <210> 36 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> miR-397 | |
| 30 | <400> 36 attgagtga gcgtgatga c | 21 |
| 35 | <210> 37 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> miR-414 | |
| 40 | <400> 37 tcatcctcat catcatcgtc c | 21 |
| 45 | <210> 38 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> miR-4376 | |
| 50 | <400> 38 tacgcaggag agatgatgct g | 21 |
| 55 | <210> 39 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> miR-482 | |
| 60 | <400> 39 tctgcctac accgcccata cc | 22 |

ES 2 626 560 T3

| | | |
|----|---|----|
| 5 | <210> 40 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> <223> miR-5168 | |
| 10 | <400> 40 tcggaccagg cttcaatccc t | 21 |
| | <210> 41 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 15 | <220> <223> miR-5300 | |
| 20 | <400> 41 tccccagtcc aggcattcca ac | 22 |
| | <210> 42 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 25 | <220> <223> miR-827 | |
| 30 | <400> 42 ttatgatgacc atcagcaaac a | 21 |
| | <210> 43 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 35 | <220> <223> miR-9470 | |
| 40 | <400> 43 ttggctcat ggatttagc | 20 |
| | <210> 44 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 45 | <220> <223> miR-9476 | |
| 50 | <400> 44 aaaaagatgc aggactagac c | 21 |
| 55 | | |

REIVINDICACIONES

1. Método para mejorar la absorción de nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico y el crecimiento en plantas que comprende:
- 5 (a) extraer miARN156 y/o miARN399d de una planta; o
(b) recoger exudado de raíz que comprende miARN156 y/o miARN399d; y suministrar a una planta en desarrollo o a una semilla el extracto o el exudado.
- 10 2. El método según la reivindicación 1 en el que el extracto es de hojas de la planta.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho extracto se obtiene congelando rápidamente las hojas en líquido y, a continuación, machacando las hojas congeladas con mortero y la mano de mortero usando tampón citrato 100 mM pH 6.
- 15 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la planta es una planta dicotiledónea o monocotiledónea.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la planta se selecciona entre el grupo que consiste en: Remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), Maíz (*Zea mays*) y Alfalfa (*Medicago sativa*).
- 20 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que adicionalmente comprende una etapa de adición de micronutrientes, preferentemente presentes en una concentración que oscila desde 0,1 a 20 % en p/p, preferentemente desde 1 a 10 % p/p, más preferentemente desde 2 a 6 % p/p.
- 25 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que adicionalmente comprende una etapa de adición de micronutrientes, preferentemente presentes en una concentración que oscila desde 0,5 a 50 % p/p, preferentemente desde 10 a 30 % p/p, más preferentemente desde 12 a 25 % p/p.
- 30 8. El método según la reivindicación 6 o 7, en el que los micronutrientes se seleccionan entre: KCl, H₃BO₃, MnSO₄, CuSO₄, ZnSO₄, y Fe-EDTA; y los macronutrientes se seleccionan entre: KNO₃, Ca(NO₃)₂, MgSO₄ and KH₂PO₄.
- 35 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que adicionalmente comprende una etapa de adición de sustancias capaces de modificar la tensión superficial, tensioactivos, adyuvantes, adhesivos, compuestos humectantes y sustancias capaces de facilitar el transporte de la composición dentro de la planta hacia el sitio diana.
- 40 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el extracto o el exudado se formula como polvo, polvo soluble en agua, gránulo, gel, comprimido o emulsión, concentrado emulsionable o como solución líquida o como suspensión líquida.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el extracto o exudado se aplica a la planta mediante suministro a las raíces y/o rociado de hojas.
- 45 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el extracto o exudado se aplica a la planta en combinación con la administración de bioestimulantes, hormonas, PGR, PGPR.
- 50 13. El método según la reivindicación 12, para reducir las tasas o dosis de aplicación por temporada de dichos bioestimulantes, hormonas, PGR, PGPR.

Figura 1

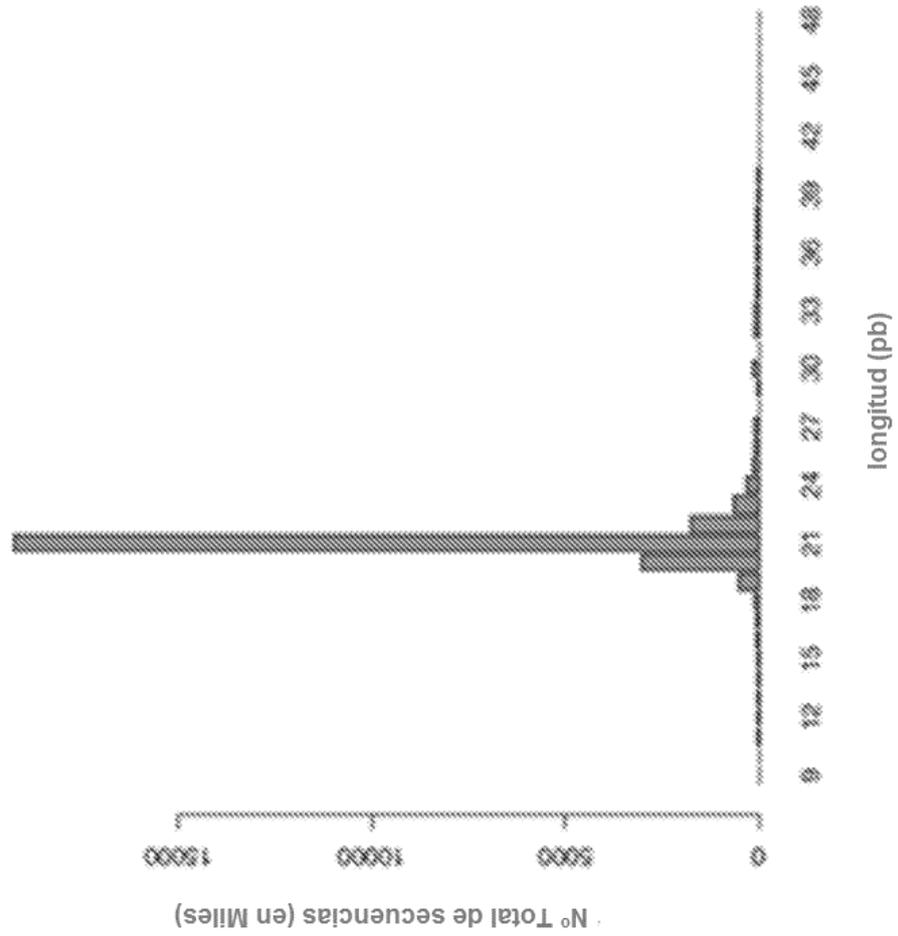


Figura 2

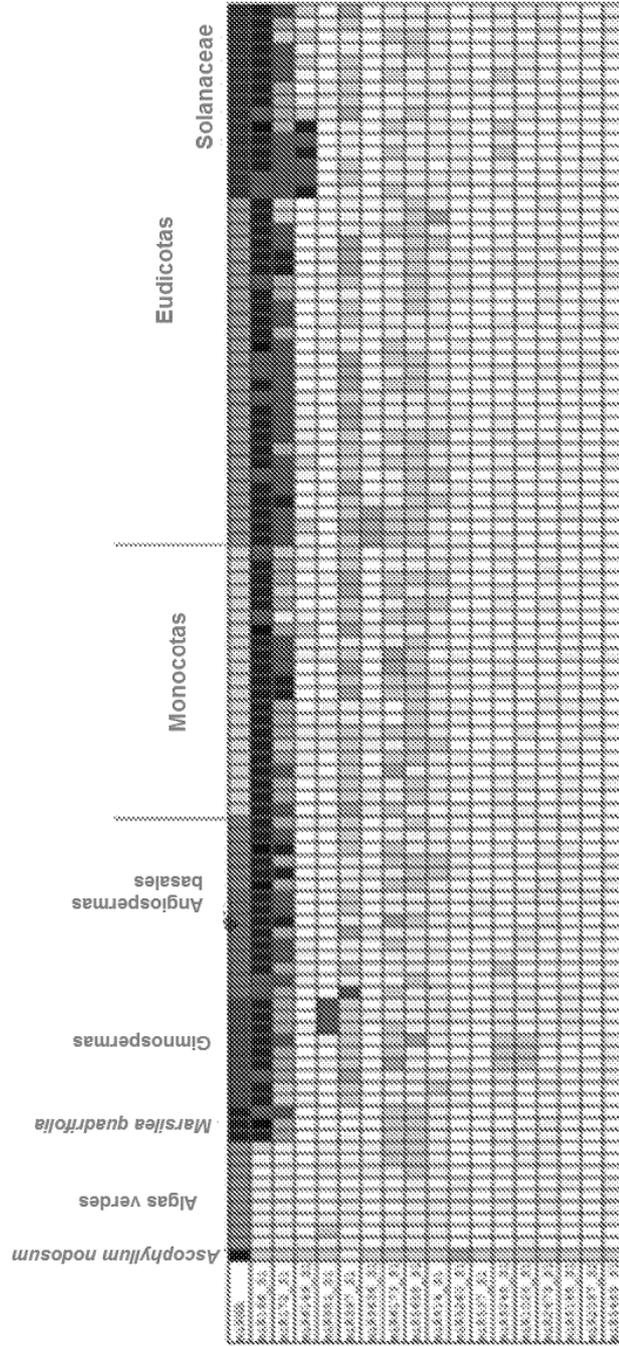


Figura 3

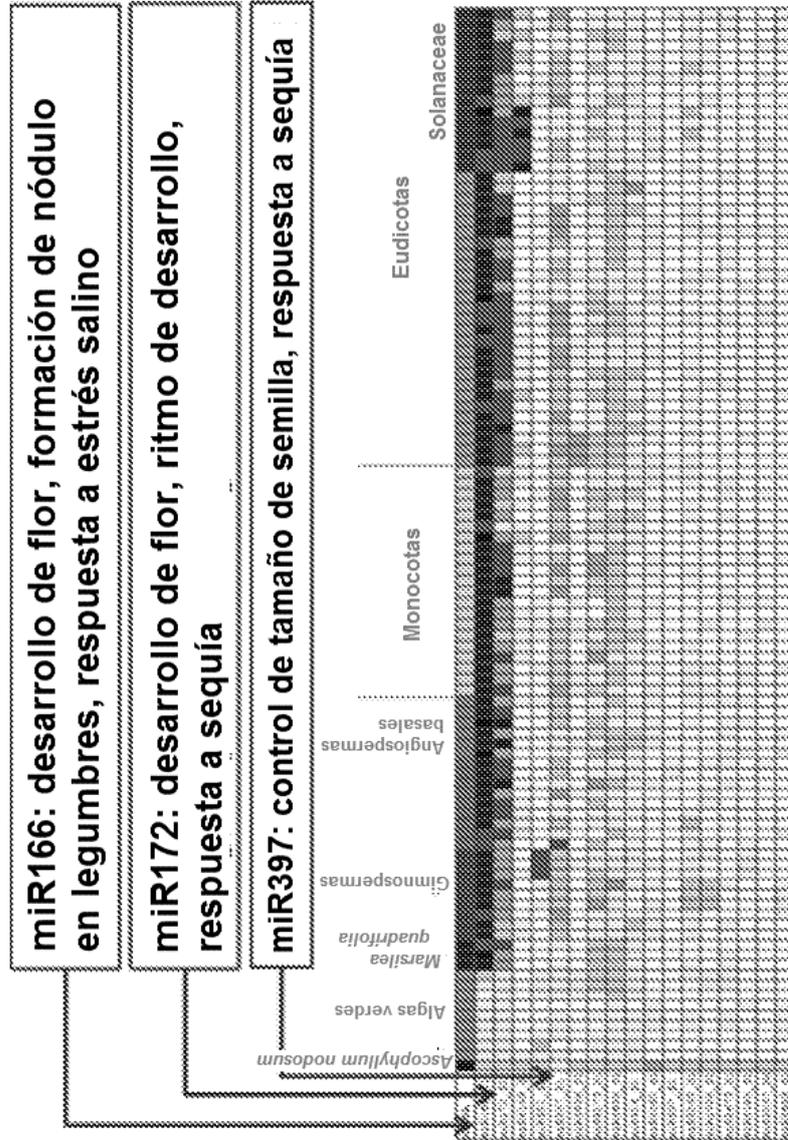


Figura 4

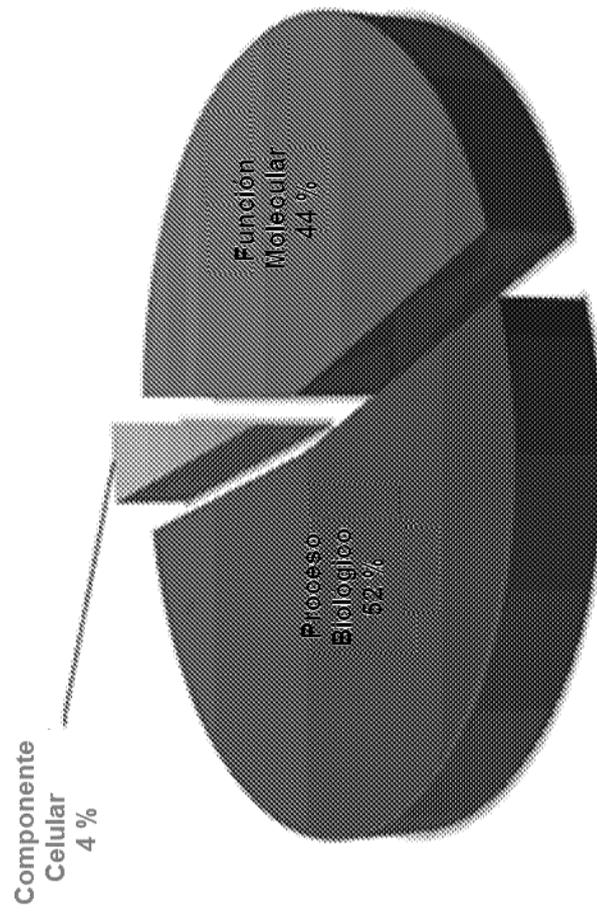


Figura 5

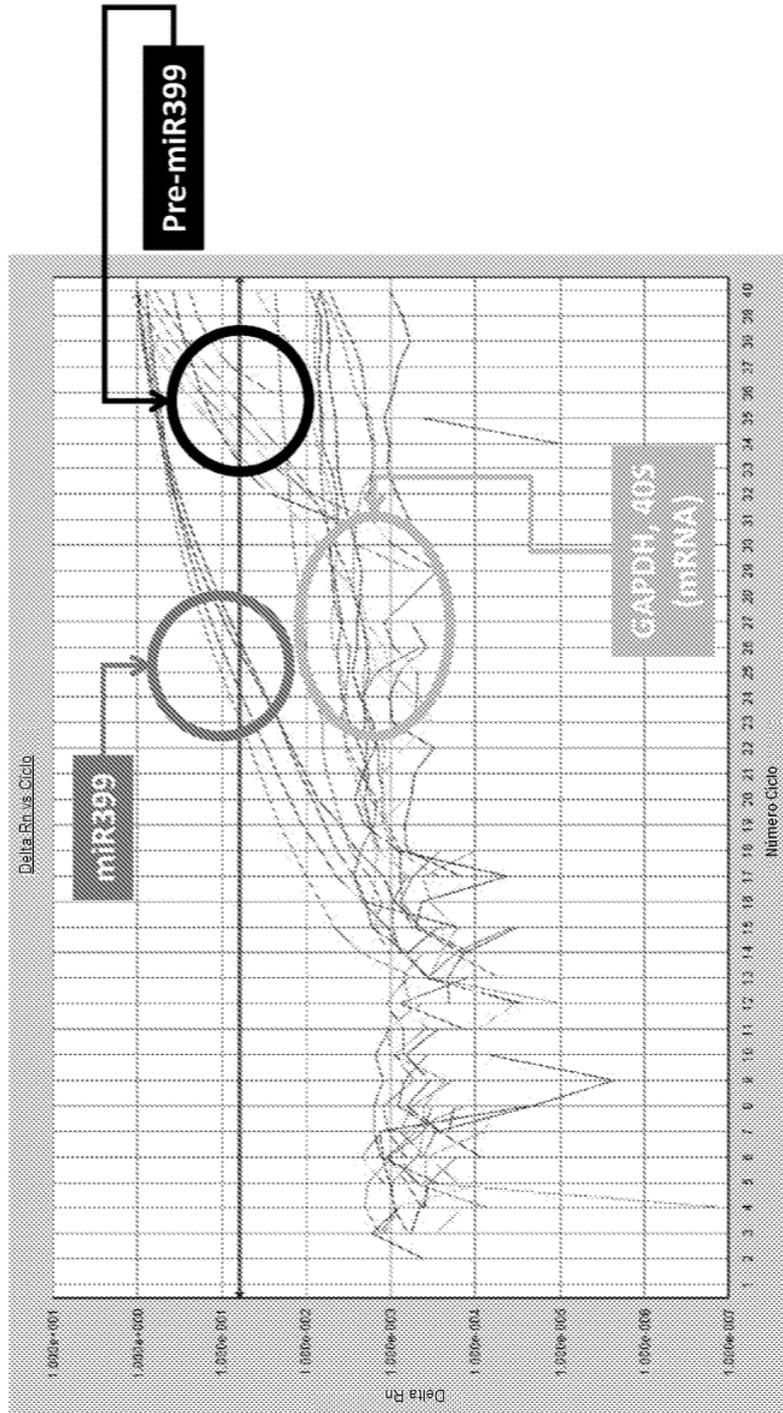


Figura 6

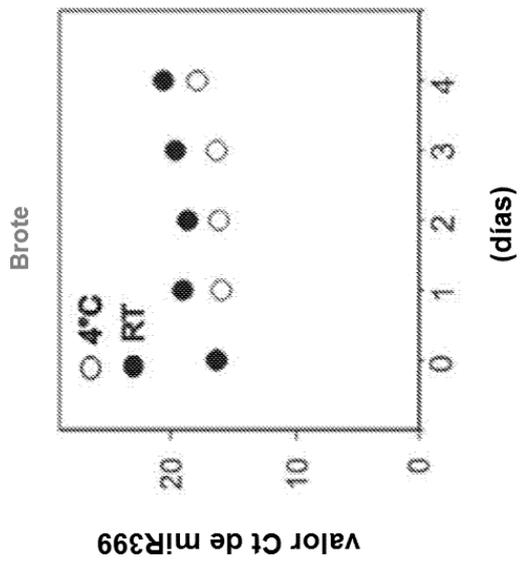
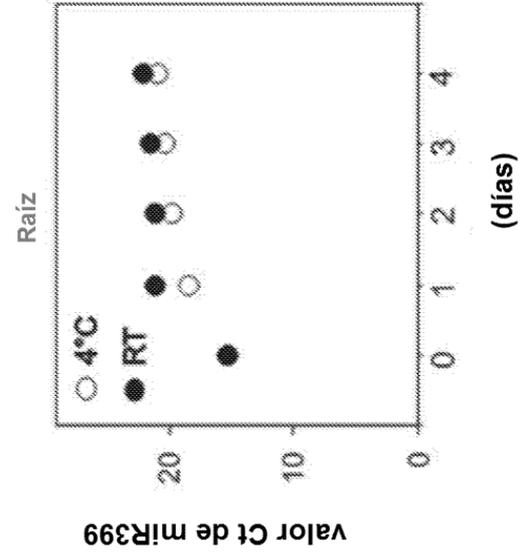


Figura 7

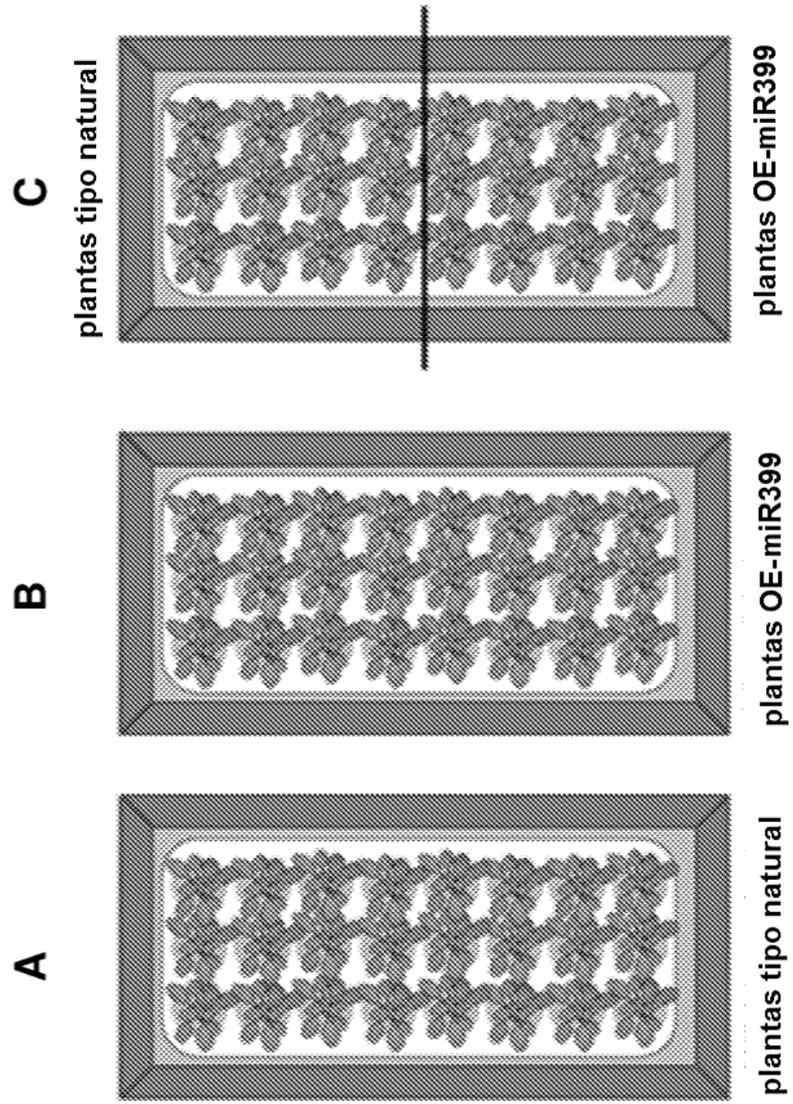


Figura 8

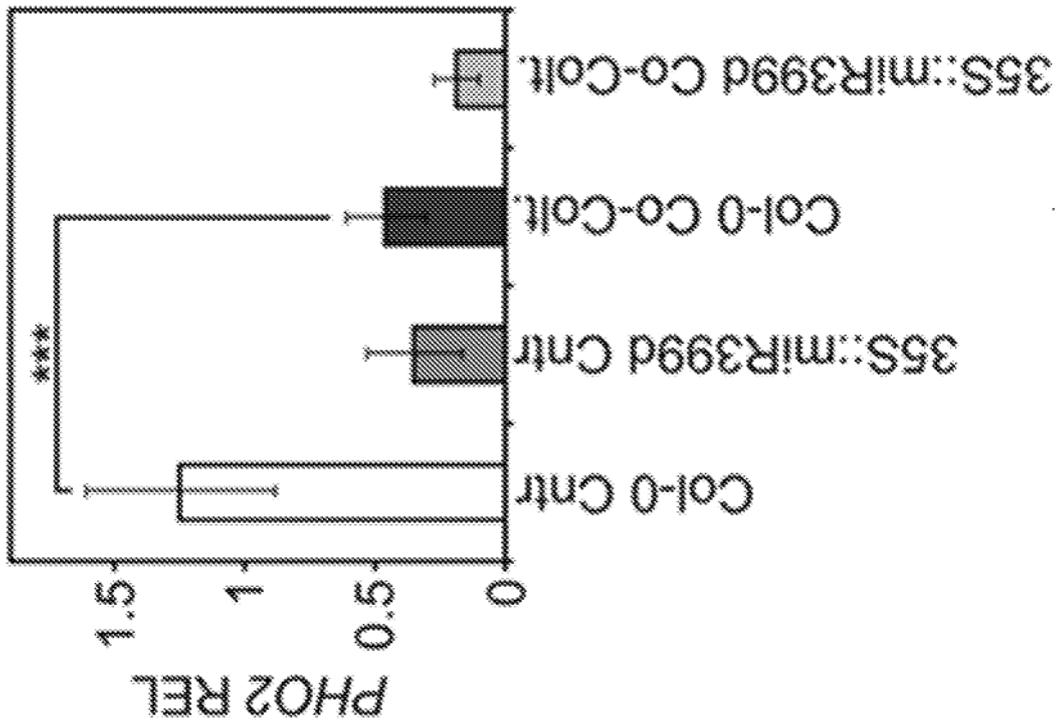


Figura 9

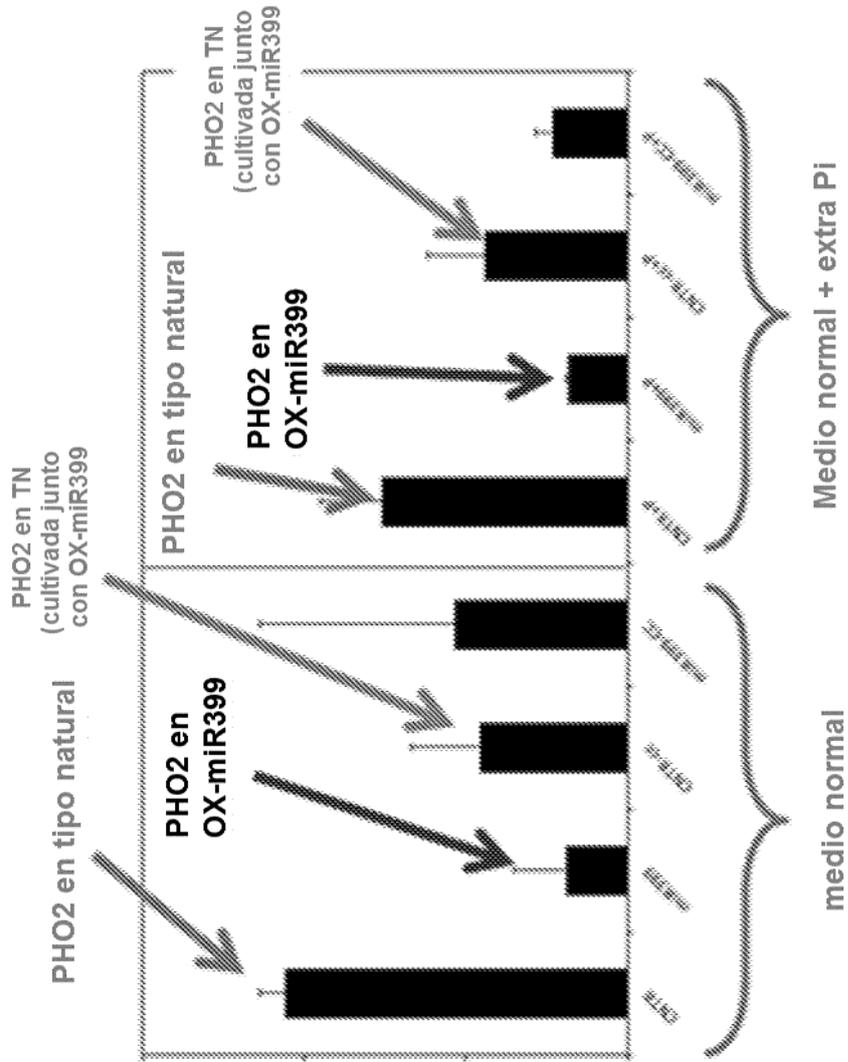


Figura 10

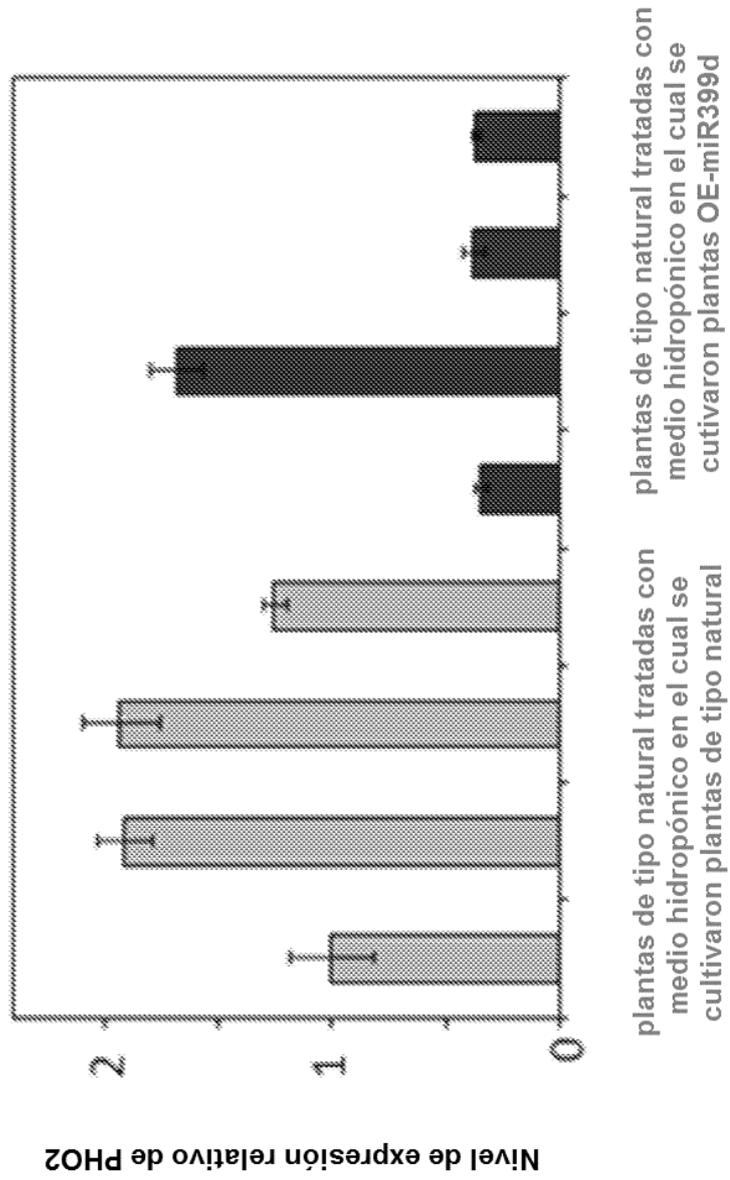


Figura 11

