

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 734**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2009 PCT/ES2009/070538**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2010 WO10081917**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2009 E 09838175 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2383344**

54 Título: **Genes reguladores de la ramificación de plantas, promotores, construcciones genéticas que los contienen y usos**

30 Prioridad:

13.01.2009 ES 200900088

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

27.09.2018

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

**C/ Serrano 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍN TRILLO, MAR;
RODRÍGUEZ BUEY, MARÍA LUISA y
CUBAS DOMÍNGUEZ, PILAR**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 683 734 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

Genes reguladores de la ramificación de plantas, promotores, construcciones genéticas que los contienen y usos.

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

ESTADO DE LA TÉCNICA

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

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

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

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

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

Mediante inhibición del desarrollo axilar podemos promover el crecimiento en un único eje favoreciendo tallos largos y con pocos nudos como es deseable, por ejemplo, en especies de leñosas que se explotan para producción de madera, otras que se cultivan a alta densidad como ciertas gramíneas o aquellas en las que los tallos laterales son una traba para la recolección mecanizada. Podemos favorecer el aporte de nutrientes a los ejes que están desarrollando frutos (Ej. tomate) o prolongar la vida media de almacenamiento de ciertos productos cuyos brotes reducen su calidad (Ej. patatas, cebollas, ajos). La mejora clásica ha permitido obtener variedades con un único tallo o "*monostem*" en algunas especies (Ej. girasol), sin embargo, en otras (Ej. tabaco, tomate) no se ha conseguido disponer de este carácter en líneas de alta producción. Las técnicas alternativas empleadas para obtener plantas con un único tallo (eliminación manual de las ramas laterales, aplicación de productos químicos) no sólo encarecen la producción, sino que favorecen la propagación de enfermedades y pueden conllevar problemas de contaminación ambiental. Favoreciendo el desarrollo axilar, podemos generar arquitecturas arbustivas y aumentar la producción de hojas y flores, elementos apreciados en especies ornamentales o en aquellas en las que las hojas o los frutos son los productos de consumo. El incremento de la formación de retoños tiene también interés en especies que se utilizan para el tapizado de terrenos, en las que se valora el crecimiento compacto (Ej. gramíneas de césped o pasto). Sería de gran valor ecológico fomentar el crecimiento intercalar en especies rastreras adaptadas a terrenos áridos amenazados por la erosión en los que la hierba resulta costosa de mantener. La producción de nuevos brotes también tiene importancia en propagación vegetativa y cultivo *in vitro*.

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

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

Reeves PA y Olmstead RG (Reeves PA y Olmstead RG. *Mol Biol Evol.* 2003 Dec;20(12): 1997-2009) divulga un análisis cladístico de los genes TCP de varias especies de plantas, y su participación en el desarrollo de simetría floral bilateral, pero no revela nada sobre el papel biológico de los genes TCP en el desarrollo de los yemas axilares y crecimiento de ramificaciones.

La solicitud de patente internacional WO2005108587A1 se refiere a una secuencia identificada de aproximadamente 1.7 kilobases, que comprende el promotor del gen *BRANCHED 1* de *Arabidopsis thaliana*, el cual puede regular específicamente la expresión axilar, pero no la expresión apical, de un gen particular.

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

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

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

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

Por tanto, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas producto de estos genes, promotores y las construcciones genéticas producto de esta divulgación constituyen una valiosa herramienta para la manipulación del

desarrollo de las yemas axilares, y el control de la ramificación, para incrementar el rendimiento de las plantas, y en particular de la patata y el tomate. La divulgación también se refiere a las construcciones genéticas que comprenden estas secuencias, así como células transformadas, vectores y plantas transgénicas que las incorporan. Además, se refiere a agentes moduladores de la expresión, y por tanto de la actividad biológica, de estos genes, así como nuevas composiciones incluyendo estos agentes moduladores, y los usos de estas secuencias, construcciones genéticas, agentes moduladores y composiciones para la manipulación de las yemas axilares, el crecimiento y la ramificación de las plantas, y en particular de la tomatera y de patata.

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

En el caso particular de estas dos especies de *Solanaceae*, la inhibición de la expresión de los nuevos genes (*SIBRC1L1*, *SIBRC1L2*, *StBRC1L1*, *StBRC1L2*) mediante tecnología de interferencia de RNA (RNAi), incrementa la ramificación aérea en el caso de la tomatera (solo la inhibición de *SIBRC1L2*) y, en el caso de patata aumenta además la producción de estolones y su ramificación, incrementando el rendimiento agrícola de esta especie. Incrementar la expresión de estos nuevos genes, por el contrario, daría lugar a una reducción en el número de ramas, en el caso de la tomatera, favoreciendo el aporte de nutrientes a los ejes que están desarrollando frutos, y evitando el empleo de técnicas alternativas empleadas para obtener plantas con un único tallo (como la poda manual de las ramas laterales o la aplicación de productos químicos) que no sólo encarecen la producción, sino que favorecen la propagación de enfermedades y pueden conllevar problemas de contaminación ambiental.

Por tanto, se divulga aquí un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 1, seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

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

La presente divulgación muestra que, el polinucleótido de ARN o ADN aislado es capaz de traducirse a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

Adicionalmente, aquí se divulga un polinucleótido de ARN o ADN aislado, capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 2 seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

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

En un primer aspecto de la presente invención, se relaciona un polinucleótido aislado, de aquí en adelante primer polinucleótido de la invención, capaz de traducirse a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2.

En otro aspecto de la presente invención, se revela una secuencia aminoacídica aislada que comprende la SEQ ID NO: 2.

La presente divulgación también revela un polinucleótido de ARN o ADN aislado, capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 3 seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

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

La presente divulgación revela el polinucleótido de ARN o ADN aislado es capaz de traducirse a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.

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

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

La presente divulgación se refiere a el polinucleótido de ARN o ADN aislado es capaz de traducirse a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4.

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

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

La presente divulgación se refiere a l polinucleótido de ARN o ADN aislado es capaz de traducirse a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 50.

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

Por tanto, aquí está divulgado un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de dirigir la expresión de un gen de interés en las yemas axilares, que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 5 seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

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

La presente divulgación muestra que el polinucleótido de ARN o ADN aislado presenta la secuencia nucleotídica que se recoge en la SEQ ID NO: 5.

Otro aspecto de esta invención se refiere a un polinucleótido aislado, de ahora en adelante segundo polinucleótido de la invención, capaz de dirigir la expresión de un gen de interés en las yemas axilares, siendo preferiblemente el gen de interés el polinucleótido aislado del primer aspecto de la presente invención, en el que la secuencia de expresión reguladora es la SEQ ID NO: 6.

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

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

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

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

En la presente divulgación, se proporciona una construcción genética de ADN o ARN que comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:

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

La presente divulgación se refiere a que el promotor es el polinucleótido capaz de dirigir la expresión de un gen de interés en las yemas axilares, teniendo una identidad con SEQ ID NO: 5 seleccionada de una de las siguientes a) al menos un 95%, o b) al menos un 99%.

5 La presente divulgación también se refiere a una construcción genética de ADN o ARN, que comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:

a) secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, el primer polinucleótido de la invención, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*, o

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

15

La presente divulgación establece que, el promotor es el segundo polinucleótido de la invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una construcción genética que comprende:

20 a. El primer polinucleótido de la presente invención, o
b. El segundo polinucleótido de la presente invención operativamente unido al primer polinucleótido de la presente invención.

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

25

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

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

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

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

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

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

Una "secuencia codificadora" o "secuencia codificante" es una secuencia de polinucleótidos que se transcribe a mRNA y/o se traduce a un polipéptido cuando está bajo control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites
65 de la secuencia codificante se determinan mediante un codón de inicio de traducción en el extremo 5' y un codón de

finalización de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a mRNA, cDNA, y secuencias de polinucleótidos recombinantes.

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

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

La presente divulgación se refiere al uso de los polinucleótidos, o las construcciones genéticas aquí descritas, en la producción de células y plantas transgénicas que presentan una arquitectura vegetal modificada.

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del primer polinucleótido, o del segundo polinucleótido, o de la primera construcción genética, o de la secuencia aminoacídica aislada que comprende la SEQ ID NO: 2, de la presente invención, para modificar la arquitectura de una planta, reduciendo el número de ramificaciones respecto a la planta control.

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

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

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

35 En otro aspecto de la presente invención, se refiere a una planta, de aquí en adelante la primera planta de la invención, que comprende la primera construcción genética de la invención que comprende el primer polinucleótido de la invención.

En una realización preferida de la presente invención, la planta puede ser clasificada taxonómicamente por pertenecer a la especie *Solanum lycopersicum*.

40 La presente divulgación también se refiere a una planta, de aquí en adelante la segunda planta de la divulgación, la cual puede ser clasificada taxonómicamente por pertenecer a la especie *Solanum lycopersicum* que tiene una arquitectura de planta modificada mostrando un número reducido de ramificaciones con respecto a la planta control, donde el número reducido de ramificaciones se debe a mutaciones no transgénicas en el polinucleótido de acuerdo con el primer polinucleótido de la presente invención.

45 En otro aspecto de la presente invención, se refiere a una semilla, una célula vegetal, una parte de la planta o un grano de polen, que pueden ser clasificados taxonómicamente por pertenecer a la especie *Solanum lycopersicum*, que comprende la primera construcción genética de la presente invención.

50 En otro aspecto de la invención se proporciona un método para modificar la arquitectura vegetal de una planta, reduciendo el número de ramificaciones con respecto a una planta control, donde el método comprende:

a) transfectar el primer polinucleótido de la invención o la primera construcción genética de la invención en una célula o cultivo de células vegetales hospedantes, y

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

55 En una realización preferida de este aspecto de la presente invención, la célula transfectada puede ser clasificada taxonómicamente por pertenecer a la especie *Solanum lycopersicum*.

60 Un "hospedador", "célula hospedadora" ó "célula hospedante" como se emplea en esta memoria se refiere a un organismo, célula o tejido, particularmente a una célula vegetal, que sirve como diana o recipiente de los elementos transfectados (por ejemplo, el primer polinucleótido o la primera construcción genética de la invención). Una célula hospedadora u hospedador puede indicar, también, una célula u hospedador que expresa una proteína recombinante de interés (por ejemplo, el producto de la expresión del primer polinucleótido de la invención) donde la célula hospedadora se transforma con un vector de expresión conteniendo los polinucleótidos o también los promotores de la presente divulgación que dirigen la expresión de un gen de interés.

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

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

10 La descripción divulga que la célula, el cultivo de células vegetales y/o la planta pueden clasificarse taxonómicamente en la especie *Solanum tuberosum* L.

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

- 15 El método para modificar la arquitectura vegetal de una planta proporcionado por la invención comprende cualquier proceso de transformación de plantas en el que los elementos alógenos introducidos comprenden el primer polinucleótido de la invención o la primera construcción genética de la invención.

20 La presente divulgación también se refiere a un método para expresar un gen de interés en los meristemos axilares de una planta que comprende:

- a) transfectar los polinucleótidos o las construcciones genéticas divulgadas en la presente divulgación en una célula o cultivo de células vegetales hospedantes,
- b) crecer la célula o el cultivo de células vegetales hospedantes en un medio adecuado, hasta regenerar una planta completa.

25 Adicionalmente, la presente divulgación se refiere a la célula, el cultivo de células vegetales y/o la planta las cuales pueden clasificarse taxonómicamente en la especie *Solanum tuberosum* L. Además, la divulgación también se refiere a la célula, el cultivo de células vegetales y/o la planta pueden clasificarse taxonómicamente en la especie *Solanum lycopersicum*.

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

- 35 Los polinucleótidos y algunas de las construcciones genéticas de la presente divulgación se expresan de forma regulada temporal y espacialmente (por ejemplo, en determinados estadios del desarrollo y en ciertos tejidos, yemas axilares) y a niveles controlados. Adicionalmente, la presente divulgación también se refiere a alterar.

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

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

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

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

- 65 En el contexto de la presente divulgación, *SIBRC1L2* se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido,

que constituye la secuencia codificante de la proteína SIBRC1L2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,

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

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2, en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína SIBRC1L2.

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

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

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 3,

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

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 3, en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína StBRC1L1.

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

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

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

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

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 4, en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína StBRC1L2.

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

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

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

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

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

El silenciamiento génico post-transcripcional, y en particular del ARN de interferencia también da lugar a una menor producción de estos factores de transcripción. El ARN interferente o ARN de interferencia (ARNi, *interfering RNA* ó *iRNA*), es una molécula de ARN que provoca la degradación del ARN de genes específicos. En esta memoria, dentro del ARN de interferencia se incluye tanto el siRNA (*small interfering RNA* ó ARNip), como el tsRNA ("*trans-splicing RNA*"), VIGS ("*Virus induced gene silencing*") y el miRNA o microARN. Los siRNA son hebras de ARN doble banda perfectamente complementarias de aproximadamente 20-21 nucleótidos (nt) con 2 nucleótidos libres en cada extremo 3'. Cada hebra de ARN tiene un grupo fosfato 5' y un grupo hidroxilo (-OH) 3'. Esta estructura proviene del

procesamiento llevado a cabo por Dicer, una enzima que corta hebras largas de ARN doble banda (dsRNA, *double strand RNA*) en siRNAs. Una de las hebras del siRNA (la antisentido) se ensambla en un complejo proteico denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), que utiliza la hebra de siRNA como guía para identificar el ARN mensajero complementario. El complejo RISC cataliza el corte del ARNm complementario en dos mitades, que son degradadas por la maquinaria celular, bloqueando así la expresión del gen. Los miRNAs son pequeños ARN interferentes que se generan a partir de precursores específicos codificados en el genoma, que al transcribirse se pliegan en horquillas (*hairpins*) intramoleculares que contienen segmentos de complementariedad imperfecta. El procesamiento de los precursores ocurre generalmente en dos etapas, catalizado por dos enzimas, Drosha en el núcleo y Dicer en el citoplasma. Una de las hebras del miRNA (la antisentido), como ocurre con los siRNAs, se incorpora a un complejo similar al RISC. Dependiendo del grado de complementariedad del miRNA con el ARNm, los miRNAs pueden bien inhibir la traducción del ARNm o bien inducir su degradación. Sin embargo, a diferencia con la vía de los siRNAs, la degradación de ARNm mediada por miRNAs se inicia con la eliminación enzimática de la cola de poly-A del ARNm.

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

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

Los autores de la presente invención han desarrollado cuatro secuencias de RNA interferente, dos de ellas dirigidas a reducir los niveles del mRNA de los genes *SIBRC1L1* y *SIBRC1L2* de la tomatera (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, respectivamente) y dos de ellas dirigidas a reducir los niveles de mRNA de los genes *StBRC1L1* y *StBRC1L2* de la patata (SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 respectivamente). Por tanto, la presente divulgación también se refiere a una secuencia que se selecciona de la lista que comprende la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 ó SEQ ID NO: 14.

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

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

La preparación de otras secuencias de siRNA o miRNA o de las construcciones de RNA de la presente divulgación

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

El diseño de las secuencias de nucleótidos del siRNA o miRNA que se divulgan aquí también sería evidente para un experto en la materia. Así, para el siRNA se podría realizar mediante un diseño aleatorio en el que se seleccionen 19-25 bases del mRNA diana sin tener en cuenta la secuencia o la información posicional que tiene en el transcrito.

Otra alternativa no limitativa divulgada en la presente divulgación sería el diseño convencional mediante parámetros simples desarrollados por los pioneros de la técnica (Calipel *et al.*, 2003. *J Biol Chem.* 278(43): 42409–42418) completados con un análisis BLAST de nucleótidos. Otra posibilidad podría ser un diseño racional, en el que se emplee un procedimiento informático dirigido a identificar las dianas óptimas de siRNA en un mRNA. Las secuencias diana se analizan en grupos de 19 nucleótidos a la vez y se identifican las que tienen mejores características en función de un algoritmo que incorpora un gran número de parámetros termodinámicos y de secuencia.

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

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

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

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

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

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

Forman también parte de la invención las composiciones que comprenden los oligonucleótidos antisentido (siRNA, miRNA o la construcción de ARN), los anticuerpos, o las construcciones genéticas moduladoras de la expresión de

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

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

Adicionalmente, la presente divulgación se refiere a una célula vegetal, cuyo material genético integra los polinucleótidos aislados o las construcciones genéticas de la presente divulgación. Preferiblemente, las células vegetales de la presente divulgación pueden clasificarse taxonómicamente como pertenecientes a la especie *Solanum tuberosum* L. La presente divulgación también afirma que, puede clasificarse taxonómicamente como perteneciente a la especie *Solanum lycopersicum*.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un cultivo de células vegetales, , cuyo material genético integra los polinucleótidos aislados o las construcciones genéticas de la presente divulgación. Preferiblemente, las células vegetales del cultivo de la presente divulgación pueden clasificarse taxonómicamente como pertenecientes a la especie *Solanum tuberosum* L. particularmente, pueden clasificarse taxonómicamente como pertenecientes a la especie *Solanum lycopersicum*.

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

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

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

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

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

Por selección de mutantes espontáneos: se debe tener en cuenta que en cada división celular hay una pequeña probabilidad de que ocurra un cambio genético, por lo cual no es sorprendente que en una gran masa celular la población sea heterogénea. Esta distribución puede presentar problemas de rendimiento debido a que en general las variantes tienen menores niveles de producción que la población parental. Estos cambios definitivos (mutaciones) se deben distinguir de las variaciones fenotípicas que dependen de las condiciones ambientales y que tienen lugar en todas las células de la población que expresan la misma modificación fisiológica, dentro de las variaciones permitidas por su genotipo. En las mutaciones espontáneas, si el elemento responsable de la mutación no es conocido, es muy difícil diferenciar estas variaciones fenotípicas de aquellas que presentan modificaciones en

los genes responsables de la arquitectura vegetal y que son estables y hereditarias. La presente divulgación proporciona las herramientas necesarias para llevar a cabo una selección de aquellos mutantes no solo mediante la observación de las características morfológicas de interés, sino también mediante la detección de mutaciones en los genes responsables de dichas mutaciones (*SIBRC1L1*, *SIBRC1L2*, *StBRC1L1* y *StBRC1L2*), diseñando un procedimiento simple de cribado selectivo para un tipo particular de mutantes. Por ejemplo, se podrían seleccionar morfológicamente aquellas plantas, preferiblemente la tomatera o la patata, que presenten una arquitectura vegetal ventajosa, y comprobar posteriormente si los genes *SIBRC1L1*, *SIBRC1L2*, *StBRC1L1* y *StBRC1L2* presentan mutaciones respecto a un genotipo silvestre control.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La presente divulgación también se refiere a que la mutación se produce en al menos una copia del gen *SIBRC1L2*. Particularmente, la inducción de la mutación del paso (b) se realiza mediante mutágenos químicos.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método para obtener plantas de patata con arquitectura vegetal modificada, en comparación con la planta silvestre control, que comprende:

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

La presente divulgación también se refiere a que la inducción de la mutación del paso (b) se realiza mediante mutágenos químicos.

En otro aspecto de la presente divulgación, se refiere a un método para obtener la planta de la presente invención, preferiblemente la planta la cual puede ser clasificada taxonómicamente por pertenecer a la especie *Solanum lycopersicum* que tiene una arquitectura de planta modificada mostrando un número reducido de ramificaciones con respecto a la planta control, en la que el número reducido de ramificaciones es debido a mutaciones no transgénicas en el primer polinucleótido de la presente invención, donde el método comprende:

- a. obtener material vegetal de una planta (parental) la cual puede ser clasificada taxonómicamente por pertenecer a la especie *Solanum lycopersicum*,
- b. someter al material vegetal de la etapa (a) a un proceso de mutagenesis,
- c. cultivar el material vegetal mutado hasta regenerar una planta completa, y sus descendientes,
- d. analizar los descendientes de las plantas de la etapa (c) para detectar al menos una mutacion en al menos una copia del primer polinucleótido de la presente invencion,
- e. seleccionar los descendientes con al menos una mutacion en al menos una copia del primer polinucleótido de la presente invención, el cual tiene su arquitectura de planta modificada mostrando un número reducido de ramificaciones en comparación con la planta control,
- f. opcionalmente, cultivar la planta seleccionada para obtener descendientes los cuales tienen modificada la arquitectura de la planta mostrando un número reducido de ramificaciones.

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

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

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

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

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

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

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

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

EJEMPLOS

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

EJEMPLO 1: Clonaje de las secuencias genómicas, promotoras y codificantes de los genes *SIBRC1L1* y *SIBRC1L2*.

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

Para amplificar los cDNAs completos (SEQ ID NO: 15 para *SIBRC1L1* y SEQ ID NO: 16 para *SIBRC1L2*) de ambos genes, se siguieron dos estrategias diferentes. En el caso del *SIBRC1L1*, se diseñaron dos cebadores anidados (Le1, SEQ ID NO:17 y Le2, SEQ ID NO:18) en la región 5' del gen, y se amplificó por PCR el cDNA completo con oligo dT a partir de cDNA de yemas axilares de tomatara. En el caso del gen *SIBRC1L2*, la secuencia disponible no incluía ni el extremo 5' ni el 3', por lo que se procedió al clonaje de ambos extremos mediante el kit SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech). Mediante el uso de este kit, se incorporaron adaptadores sintéticos en los extremos 5' y 3' durante la síntesis del cDNA realizada a partir de RNA total de yemas axilares de tomatara. Para la amplificación de ambos extremos utilizando la secuencia de los adaptadores sintéticos, se diseñaron dos pares de cebadores anidados en la secuencia disponible del gen *SIBRC1L2*: LeTCP2-F1 (SEQ ID NO: 19) y LeTCP2-F1 nested (SEQ ID NO: 20) para el extremo 3' y LeTCP2-R1 (SEQ ID NO: 21) y LeTCP2-R1 nested (SEQ ID NO: 22) para el extremo 5'. Una vez obtenida la secuencia de ambos fragmentos solapantes 5' y 3' se diseñaron cebadores (LeTCP2 cDNA-F, SEQ ID NO: 23) y LeTCP2 cDNA-R, SEQ ID NO: 24) para amplificar el gen completo.

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

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

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

EJEMPLO 2: Generación de plantas transgénicas de tomate (*Solanum Lycopersicum* variedad Moneymaker) con pérdida de función de los genes *SIBRC1L1* y *SIBRC1L2* silenciados por la técnica de RNAi.

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

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

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

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

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

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes con la estructura en horquilla del RNAi, y comprobados por secuenciación, se extrajo el casette con el transgén (3330 pb) del pHannibal cortando con *Not* I y se clonó en el sitio para la misma enzima de restricción del plásmido pBluescriptII SK+. De esta forma se consiguió dejar a un lado de la secuencia un sitio *Sac*I y al otro lado un sitio *Sma*I, de manera que mediante una digestión con ambas enzimas de los fragmentos y del plásmido binario pBIN19 (Fig. 7), se subclonaron ambos fragmentos dando lugar a las construcciones que se han introducido en la planta de tomate (Figura 7). Se optó por la utilización de este plásmido binario ya que ha sido bien establecido que el plásmido pBIN19 transforma tomate eficazmente, confiriendo resistencia a kanamicina en bacteria y en planta. La expresión del transgén está dirigida por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) (1346 pb) promoviendo su expresión constitutiva, mientras que en el extremo 3' del gen se encuentra la octopina sintasa (terminador OCS) (766 pb) de *Agrobacterium* que actúa como terminador de la transcripción. Una vez obtenidas las construcciones en *Escherichia coli*, se realizó una preparación de los plásmidos que se utilizaron para transformar *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. De las colonias portadoras de nuestros plásmidos, se seleccionó una única colonia que se utilizó para la transformación de las plantas de tomatera.

Transformación de plantas de tomatera.

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

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

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

MEDIO DE PRECULTIVO (MPC)

MS basal salt mixture con 0,8% agar
Sacarosa 30g/l
Myo-inositol 100mg/l
Vitaminas SH 10ml/l
IAA 4mg/l
Kinetina 4mg/l

MEDIO DE COCULTIVO (MCC)

MS basal salt mixture con 0,8% agar
Sacarosa 30g/l
Myo-inositol 100mg/l
Vitaminas SH 10ml/l
IAA 4mg/l
Kinetina 4mg/l
Acetosiringona (39,2g/l)

MEDIO DE LAVADO (ML)

MS basal salt mixture
Sacarosa 20g/l
Myo-inositol 100mg/l
Claforán 500 mg/l

MEDIO DE RECUPERACIÓN (MR)

MS basal salt mixture con 0,8% agar
Sacarosa 30g/l
Myo-inositol 100mg/l
Vitaminas SH 10ml/l
IAA 4mg/l
Kinetina 4mg/l
Claforán 300 mg/l

MEDIO DE SELECCIÓN (MS)

MS basal salt mixture con 0,8% agar
Sacarosa 30g/l
Myo-inositol 100mg/l
Vitaminas SH 10ml/l
IAA 4mg/l
Kinetina 4mg/l
Zeatina 1mg/l

Kanamicina 50mg/l
Claforán 300mg/l

MEDIO DE ENRAIZAMIENTO (ME)

MS basal salt mixture con 0,8% agar
Sacarosa 30g/l
Myo-inositol 100mg/l
Tiamina HCl 1mg/l
IAA 0,1mg/l

Caracterización de las líneas RNAi 35S::SIBRC1L1 y 35S::SIBRC2L2.

Se generaron 10 líneas transgénicas independientes de tomatera de la variedad Moneymaker portadoras de la construcción 35S::SIBRC1L1 RNAi y otras 10 portadoras de la construcción 35S::SIBRC1L2 RNAi que fueron analizadas fenotípicamente. Los individuos de T1 indicaron que, mientras que los individuos 35S::SIBRC1L1 RNAi tenían una fuerte dominancia apical (no tenían ramas), bajo las mismas condiciones, los individuos 35S::SIBRC1L2 RNAi tenían un claro exceso de ramas laterales en comparación con las plantas silvestres (Figuras 1 y 2). Estos resultados muestran que el gen *SIBRC1L2* tiene una mayor importancia que *SIBRC1L1* en el control del crecimiento de las ramas laterales en la tomatera.

EJEMPLO 3: Clonaje de las secuencias genómicas, promotoras y codificantes de los genes StBRC1L1 y StBRC1L2.

Para clonar los ortólogos a *BRC1* de patata se realizó una búsqueda de genes TCP tipo *BRC1* en diferentes bases de datos de solanáceas: TIGR Solanaceae Genomics Resource BLAST page, TIGR Plant Transcript Assemblies Database y SOL Genomics Network. Para llevar a cabo la comparación se utilizó la secuencia de aminoácidos de la caja TCP del gen *BRC1* de Arabidopsis. Se encontraron dos unigenes: TC168465 y TC129597 que se denominaron *StBRC1L1* y *StBRC1L2*, respectivamente. Además, conociendo la alta homología existente entre tomate y patata, y teniendo clonado el gen *SIBRC1L1* de tomate, se probaron los mismos cebadores con ADN genómico de patata, para el extremo 5' Le1 (SEQ ID NO:17) y Le2 (SEQ ID NO:18), siendo este último un cebador anidado del anterior, y Le3 (SEQ ID NO:25) para el extremo 3'. En base a esta secuencia se diseñó un cebador específico (racest1-5', SEQ ID NO: 34) para localizar el extremo 5' del gen usando la técnica PCR-RACE con cDNA de yemas axilares y estolones de patata. En base a la secuencia obtenida se diseñó un cebador en el extremo 5': StTCP1-ORF1 (SEQ ID NO: 35). Para amplificar la secuencia de cDNA se usó cDNA sintetizado a partir del mismo ARN que para el extremo 5', pero utilizando el cebador B26 (SEQ ID NO: 36) que incluye en su secuencia una cola de poliT a continuación de la secuencia del cebador B25 (SEQ ID NO: 37), lo que permite usarlo como cebador del extremo 3'.

El gen *StBRC1L1* se amplificó de ADN usando los cebadores genómico-StTCP1 A (SEQ ID NO: 38) y genómico-StTCP1 B (SEQ ID NO: 39).

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

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

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

EJEMPLO 4 DE REFERENCIA: Generación de plantas transgénicas de patata (*Solanum tuberosum* variedad Desiree) con pérdida de función de los genes *StBRC1L1* y *StBRC1L2* silenciados por la técnica de RNAi.

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

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

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

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

Para *StBRC1L1*

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

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

Para *StBRC1L2*

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

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

Una vez obtenido el plásmido recombinante con la estructura en horquilla del RNAi, y comprobada por secuenciación, se extrajo el transgen (3330 pb) del pHannibal cortando con Not I y se clonó en el sitio para la misma enzima de restricción del plásmido binario pART27 (Gleave, 1992 *Plant Mol Biol.* 1992 Dec;20(6):1203-7) (Figura 7), que confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina en bacteria y a kanamicina en planta. El sitio NotI del pART27 se localiza entre los bordes derecho e izquierdo del plásmido, lo que garantiza su transferencia a la célula vegetal al transformarla. El transgen está flanqueado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) (1346 pb) para una expresión constitutiva y el extremo 3' del gen de la octopina sintasa (terminador OCS) (766 pb) de *Agrobacterium* que actúa como terminador de la transcripción.

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

35 **Transformación de plantas de patata.**

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

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

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

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

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

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

Para crecer las plantas en invernadero, plantas que llevan en medio MS2 entre 1 ó 2 semanas son transferidas a recipientes con una capacidad de 50 ml de sustrato. Las raíces se tapan con el sustrato, y la planta al completo se

cubre con plástico para mantener alta la humedad, condición característica de crecimiento *in vitro*. Después de 3-4 días dicha cubierta se retira.

Medio de inducción de callos (MIC) con 1,6% glucosa

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

Medio de inducción de ramas (MIR)

MS con 1.6% glucosa	
Zeatinroboside	2 mg/l
NAA	0.02 mg/l
GA ₃	0.02 mg/l
Claforan	250 mg/l
Kanamicina	50 mg/l
Plant Agar Duchefa	5.5 g/l

Caracterización de las líneas RNAi 35S::StBRC1L1 y 35S::StBRC2L2.

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

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

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

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

<120> Genes reguladores de la ramificación de plantas, promotores, construcciones genéticas que los contienen y usos.

<130> ES1664.344

<150> PCT/ES2009/070538

<151> 2009-11-27

<160> 52

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 346

<212> PRT

ES 2 683 734 T3

<213> Solanum lycopersicum

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55 Pro Ser Ala Glu Ser Cys Glu Val Ile Asp Glu Ser Ala Ala Thr Asn
195 200 205

60 Thr Ala Glu Thr Gln Lys Gln Gln Lys Lys Lys Val Lys Ser Ile Arg
210 215 220

65 Arg Ala Ile Ile His Pro Val Val Ala Lys Glu Ser Arg Lys Glu Ala
225 230 235 240

ES 2 683 734 T3

Arg Ala Arg Ala Arg Glu Arg Thr Ile Ile Lys Lys Ser Leu Asn Asp
 245 250 255
 5
 Asn Thr Asn Asn Asn Asn Gly Asp Gln Ser Met Ala Asp Glu Asp
 260 265 270
 10
 Leu Thr Arg Ser Leu Arg Ser Trp Asn Thr Thr Phe Glu Asp His Gln
 275 280 285
 15
 Ser Gly Ile Gln Gly Tyr Asn Asn Asn Asn Met Asn Val Val Asp
 290 295 300
 20
 Asn Phe Asn Leu Val Asp Thr Ser Asn Trp Ser Pro Phe Met Phe Asn
 305 310 315 320
 Tyr His Gln Ile Asn Thr Glu Ile Ser Gln Glu His Gln Phe Ala Asn
 325 330 335
 25
 Phe Arg Tyr Ser Gly Lys Leu Trp Glu Ala
 340 345
 30
 <210> 2
 <211> 337
 <212> PRT
 <213> Solanum lycopersicum
 35
 <400> 2
 Met Gln Tyr Glu His Glu Leu Tyr Phe Gln Ser Phe Asn His Asp Asn
 1 5 10 15
 40
 Gln Tyr Tyr Phe Gln Gln Gln Gln Leu Val Pro Ser Ile Asp Asp Leu
 20 25 30
 45
 Ser Pro His Ile Leu Ala Asp Ser Cys Thr Glu Ile Ile Thr Lys Pro
 35 40 45
 50
 Ser Asn Cys Asn His Glu Leu Gln Gly Met Glu Glu Gly Arg Gly Glu
 50 55 60
 55
 Lys Lys Gly Asp Asp Asp Val Met Ser Ser Arg Ile Ser Gly Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Lys Asn Asn Lys Arg Ser Ser Asn Lys Asp Arg His Ser Lys Ile
 85 90 95
 60
 Asn Thr Ala Arg Gly Pro Arg Asp Arg Arg Met Arg Leu Ser Leu Asp
 100 105 110
 65
 Ala Ala Arg Lys Phe Phe Arg Leu Gln Asp Leu Leu Gly Phe Asp Lys

ES 2 683 734 T3

115 120 125

5 Ala Ser Lys Thr Val Glu Trp Leu Leu Thr Gln Ser Asp Ser Ala Ile
130 135 140

10 Glu Glu Leu Val Ala Ala Lys Gly Asn Asp Ala Gln Val Ala Gln Gln
145 150 155 160

15 Thr Ser Cys Asn Thr Pro Thr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Ala Ile Cys
165 170 175

20 Ala Ser Asn Ser Ile Ser Glu Ser Cys Glu Val Ile Ser Gly Thr Asp
180 185 190

25 Glu Thr Ser Ser Asn Asp Lys Asn Lys Glu Thr Ala Gln Asp Glu Glu
195 200 205

30 Lys Lys Lys Arg Lys Lys Val Val Asn Thr Ala Arg Arg Ala Val Leu
210 215 220

35 Glu Pro Leu Thr Lys Glu Ser Arg Asn Gln Ala Arg Ala Arg Ala Arg
225 230 235 240

40 Glu Arg Thr Lys Ser Lys Lys Met Ser Gln Thr Gly Lys Ser Lys Ser
245 250 255

45 Leu Ala Asn Asp Leu Asn Pro Ser Gly Ser Arg Arg Pro Ala Asn Lys
260 265 270

50 Thr Cys Glu Glu Pro Gly Thr His Glu Glu Leu Asn Phe His Gln Glu
275 280 285

55 Lys Asn Thr Val Asp Asp Cys Asn Phe Met Val Asn Gly Asn Trp Asn
290 295 300

60 Pro Phe Thr Ile Phe Ser Tyr His Glu Gln Tyr Ala Gly Ile Ser Asn
305 310 315 320

65 Glu His Gln Leu Val Thr Asp Leu Gln Phe Cys Gly Lys Leu Trp Glu
325 330 335

Gly

<210> 3
<211> 353
<212> PRT
<213> Solanum tuberosum

<400> 3

ES 2 683 734 T3

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

ES 2 683 734 T3

Ala Pro Asp Glu Asp Leu Thr Arg Ser Leu Gly Ser Trp Ser Thr Thr
260 265 270

5 Phe Glu Asp His Gln Ser Gly Ile Gln Ala Tyr Asn Asn Thr Asn Asn
275 280 285

10 Ile Met Asn Ala Val Asp Asn Phe Asn Leu Val Asp Thr Ser Asn Trp
290 295 300

15 Ser Pro Phe Met Phe Asn Tyr His Gln Ile Asn Thr Glu Ile Ser Gln
305 310 315 320

20 Glu Val Cys Ile Asn Leu Ile Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ile
325 330 335

Arg Ser Pro Ile Tyr Leu Phe Leu Phe Leu Phe Phe Cys Cys Ser Ile
340 345 350

25 Asn

30 <210> 4
<211> 364
<212> PRT
<213> Solanum tuberosum

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> Xaa puede ser cualquier amino ácido que ocurre de forma natural

40 <400> 4

Met Tyr Pro Pro Ser Asn Asn Asn Cys Asn Tyr Ser Pro Ile Leu Ser
1 5 10 15

45 Ser Phe Ile Cys Gln Asn Ile Pro Ser Ser Pro Xaa Met Gln Tyr Glu
20 25 30

50 His Glu Leu Tyr Phe Gln Asn Phe Asn His Asp Asp Gln Tyr Tyr Phe
35 40 45

55 Gln Leu Gln Gln Gln Val Pro Leu Ile Asp Asp Leu Ser Pro His Val
50 55 60

60 Leu Ala Asp Ser Cys Thr Glu Thr Val Thr Lys Pro Ser Asn Cys Asn
65 70 75 80

His Val Leu Glu Gly Met Glu Glu Gly Arg Gly Gly Asn Lys Gly Asp
85 90 95

65

ES 2 683 734 T3

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

ES 2 683 734 T3

Thr Asp Leu Gln Phe Tyr Gly Lys Leu Trp Glu Ser
355 360

5 <210> 5
<211> 1723
<212> PRT
<213> Solanum lycopersicum

10 <400> 5

agctgaacc ccttcacct caactgtgg aagcaggaag aattcaccaa aactttaata 60
acatattcag taaaaatatt tataatgcgt ctaagaaaag taaaatgtac gtagaattta 120
15 tctgcctcg taaaaataaa gattgtatct aaaaaaaacc tcgactcaaa taatacatat 180
taacaaaatt acaaaatfac tatcactcaa cccaatatt tactcaagt tgtagggat 240
20 cacttaaggg ccttctttt tctcctttt tttttttt ttggagaaga tgaagggtgaa 300
agagatggg gatgatggag ctaggaaaga ggagattgaa gggatatttt ttgtcaaag 360
tatgtgtcag ttgctatcac gtgaactga aactaagggg caccattaga gaagacttta 420
25 gctataatat acattcattt ctataaaaaa aaatcacmac ataacatgc ccttttttaa 480
cttagcttta atatatcttt taaattgat tatgcagaaa tagatattha aatttatata 540
30 aaatttaaaa agtctatcta acaatgtgt gtctacata tattatatct ggtatgatat 600
atatgtgta ctgtttta tttatataaa tttaaattt ttttatgca aattcaaat 660
taagagatat aaatatcaag ctaaatcgaa gtcaatgaa atatatatat ataattatgc 720
35 caataaaaa tcagtgaac tatacaaaa gtactatagt gtcccctca ctctttttt 780
ctcaaatcc ttctcact ttaactccc acatgagcta gctagagaag tctttttt 840
40 ttttaagat tcgkggtgt tacatcaatt taaacatatt ttgactaatt tcatagaata 900
tttatcatct cttaataa acatgtgtca tattcataaa tgaatagaaa ttactaaata 960
cagtagtact yctttaatt ttttctaata aaatttaaa cgtgaaacct catgattcct 1020
45 aattatccac ttcatgaacc atcgactcac accaaccctt tgggtgaagc gaagcctct 1080
ttatctttat agcagatagg ggtccttga aaagatggaa gtacaattac acctctctt 1140
50 gtccccttg aggtaataac ataacatgac tttctttat ctcatcttt cttctttgt 1200
caacaagaac ataccaccac atgaatgtct ctccattag ctaatatatt ccagctaact 1260
agcttaata tatagtgtca atacytcac gaacacaaa atagccacta atatacact 1320
55 atacctagct attattatta ttatcataat taagcacwca ccaagcaaca tacatgtaa 1380
gccacatatt ttaatcacc tgtcttctc aacaaaaag ctatattatc atcattatat 1440
60 tgaaaaaaa attaaaaata accacatata cttccact ttctctatgt gctatcttg 1500
tattcaaat ttatatcc aagagaatta tgaagagtct ctctaaaaa aagtttaatt 1560
taattataa cctttctt tttctactt ttgttgatg cagctagga gctagattat 1620
65

ES 2 683 734 T3

taaaagtgtc aaactgaaga agctgatgtt tgtgggtatt tcaactcaa tacaagtgtg 1680
 ctagggtgtc cttatcaacc agtttctttt ttttttta aag 1723
 5
 <210> 6
 <211> 665
 <212> DNA
 <213> Solanum lycopersicum
 10
 <400> 6
 tcacatgaag gggcacgata acaagttgtt cgtatccatc cattcacttc caacaatacc 60
 gctacgtacc actacctgct tccttctat cccagctctt tgcaaaactt cctttccctt 120
 15
 tccaattact ttttcttaa tagagatgtt tgtttccttt tcccttcccc ccatattctt 180
 cccctttttt ttatctctc tttcacaata gtagcaccat gcctgtagct ttgatgctta 240
 20
 gacgggcgca cgcgcacgcg cactcacaca actagaatag aatcactctc tctatatatt 300
 catagttatc aaaactactt atcatatacc aaaaaaacc actgtcattc tcaagcaaatt 360
 aatatctttt ttaaaaaaga agaactacat atatatatat agtactacta ctattttcat 420
 25
 catcactttg gtcaatccat acagttctaa gtagtcattg cttcctctgt caaattactg 480
 tatacagtac attgaactag ctaggggaaa attaatctac taactctaatt ttgtttgttt 540
 30
 aattctcttc ttattgcagc tagatttgcc taattagcag aaaacccaaa agctgtgttc 600
 atactgtctt tctcaagatc tagaccacc atagaccg cctcaactac agctactcca 660
 caaga 665
 35
 <210> 7
 <211> 1133
 <212> DNA
 <213> Solanum lycopersicum
 40
 <400> 7
 atgtaccctt cgagcaatta cagccccaat attccagct cttcatcttt ctttcacatt 60
 45
 aatattccat ctccttctat gcaatatgaa cccgaattca tccaatattt ccatgatttt 120
 caattcatcc aacctagtta cgatcagaat accaatattc ctgcagaaga agctgctgat 180
 tcggacaaac tagataaaat agaagaagat caatcaatca taaaaagctg caataataac 240
 50
 aagaaggatg agaagagtag tagcagtact agtactattc gtagaaaaaa caacaagaga 300
 actacgagtg gtagtgctgg ttaggacct tcgaagaaag atagacacag caaaatcaac 360
 55
 acggcacatg gcccaagaga ccgaagaatg agactatcac ttgaaattgc tcgcaaattc 420
 ttcaatttgc aagacttgct tgggttcgat aaagccagca aaactgtaga atggctactc 480
 acaaaagtcaa aatcagcggg gaacgatctg gttcagaaaa ttaacaaaga caaatgcagc 540
 60
 ggtagtgaat atcctaatat tgctactgta tcatctcctt ccgccgaatc atgtgaagtt 600
 atcgacgaat cagctgcaac taatacagca gaaactcaga agcaacagaa gaaaaaagtt 660
 65
 aagtcgattc gtagggcaat aattcatcca gttgttgcaa aggaatcaag gaaagaagca 720

agagcaaggg caagggaaag aacaataata aagaaaagcc taaatgataa cacgaataat 780

5 aataataatg gtgatcaatc tatggctgat gaggatttaa caagatcatt aagatcttgg 840

aatactacat ttgaagatca tcaatcaggt attcaaggct ataataataa taataatatg 900

aatgttgttg ataactttaa ttgggtggat actagcaatt ggagcccat tatgttcaac 960

10 tatcaccaaa tcaatactga aatttctcaa gaggtatgta ctaattaat taataaatta 1020

tttttctat tattattatt aaccgatcg ccaagtattt atttatatt ttgtgtgca 1080

gcatcaattt gcgaactcc agtattctgg gaagtatgg gaagctaat tag 1133

15

<210> 8
<211> 1124
<212> DNA
20 <213> Solanum lycopersicum

<400> 8
atgcaatatg aacacgaact atacttcaa agctttaatc atgataacca atattattt 60

25 caacaacagc aactagtcc ctgatagat gatttgagtc ctacatctt agctgacagc 120

tgacccgaga ttattactaa gccttgaat tgcaaccacg aactacaagg aatggaagaa 180

ggccgaggcg aaaagaaagg agatgatgat gttatgagta gcagaattag tggacggatc 240

30 tcaaaaaata ataagagatc ttcaataaa gatcgacaca gcaagatcaa caccgctcgt 300

ggccaagag atcgaaggat gagacttca ctgatgctg ctgcaagtt ttccgtttg 360

35 caggacttat tgggattcga taaggccagc aaaactgttg aatggttgct tactcaatcg 420

gattctgcaa ttgaagagct tgttgccgct aaaggcaatg atgcacaggt tgctcagcaa 480

actagtgcga atacccccac tactactact ggaattgggt caatttggtc atctaattct 540

40 atttctgagt cgtgtgaagt tataatcagga actgatgaaa ctctcttaa tgacaaaaac 600

aaggaaaccg ctcaagatga ggagaagaag aaaaggaaga aggtgggtta cacagctcgt 660

45 agagctgtgt tagaacctct tacgaaggaa tcgaggaatc aagcaagagc cagggttaga 720

gagagaacaa aatcaaagaa atgagccaa actggaaaat ccaaatccct agctaatgat 780

ttgaaccctt caggatctcg gaggccggt aataaaactt gtgaagaacc tggaacacat 840

50 gaagaactca acttccatca agagaagaac actgtcgatg actgtaattt tatggtaaat 900

ggaaattgga atccattac aatcttagc tatcatgagc aatacgctgg aattccaac 960

55 gaggtgaggg ttccagactt tgttttttag ggcttcaata attgaacca catattcttc 1020

tcattctctg attattattt ttttaaaaa aaaaaattct tgttctctg cagcatcaat 1080

tggttacaga ctgcaattt tgtgaaagc tatggaagg ctag 1124

60

<210> 9
<211> 1059
<212> DNA
65 <213> Solanum tuberosum

<400> 9
atgtaccctt cgagcccaa tattccagc tcttcatct tcttcacat taatattcca 60

5 tctccttcta tgcaatatga accggaattc atccaatatt tccatgactt tcaattcatc 120
caacctgctg cttacgatca gaataatttg gataccaata ttacggcaga agaagctgat 180
cataagatgg aagaagatga attgatcatg aaaagctgca agaacaagaa ggatgagagt 240

10 actagtacca ctactactat tcgtaggaaa aacaacaaga gaactacgag tggacttggt 300
gtaggacctt cgaagaaaga tagacacagc aaaataaaca cggcacatgg cccaagagac 360

15 cgaagaatga gactttcact tgaaattgct agaaaattct tcaatttgca agacttgctt 420
gggttcgata aggctagcaa aactgtagaa tggctactca caaagtcaaa atcagctgta 480
aacgatctcg ttcagaaaaa taacaaagga aaatgcagcg ctagtacaaa tcctaatatt 540

20 ggtgttgat catctccctc cgagtcattg gaagtcata ctggagtaat cgacgaatca 600
gcagcaacta ataatactca caagcaacag aagaaaaaaa agtcgattcg tagggcaata 660

25 ttatccag ttgtgcaaa ggaatcaagg aaagaagcaa gggcaagggc aagggaagaa 720
acaaaaataa agaaaagcct aaataataat aatggtgatc aatccatggc gcctgatgag 780
gatttaacaa gatcattagg atcttggagt actacattg aagatcatca atcaggtatt 840

30 caagcctata ataatactaa caatattatg aatgctgttg ataactttaa ttggtggat 900
actagcaatt ggagcccat tttgttcaac tatcaccaaa tcaatactga aatttctcag 960

35 gaggtatgta ttaactaat tagattatta ttattattat tattaatccg atcgccaata 1020
tattatttt tatttttatt ctctgttgc agcatcaat 1059

40 <210> 10
<211> 1092
<212> DNA
<213> Solanum tuberosum

45 <400> 10
atgtatcctc caagcaacaa taactgcaac tacagcccaa tttgtcttc tttcatatgc 60
caaaatattc catcttctcc ttgatgcaa tatgaacacg aactatactt tcaaaacttc 120

50 aatcatgatg accaatatta tttcaacta cagcaacaag ttcccttgat agatgacttg 180
agtctctcag tcttagctga cagctgcact gagactgtta ctaagccttc aaattgcaat 240
cacgtactag aaggaatgga agaaggccga ggcggaacaa aaggagatga tgtgttatg 300

55 agtagcagaa ttagtattat tagtgacgg atctcgaaaa acaataagag atctccaat 360
aaggatcgac acagcaagat caacacggct cgtgttccaa gagatcgaag gatgagactt 420

60 tcacttgatg ctgctcgcaa gttttccgt ttgcaggact tgttgggatt tgataaggcc 480
agcaaaactg tagaatggtt gcttactcaa tcrattccg caattgaaga gctcgtcgcc 540
gttaaaggca atgatgctca ggttctcag caaactagct gcaatacccc cactactact 600

65

ES 2 683 734 T3

actggaattg gtgcaatttg tgcataat tctattctg agtcatgtga agttatatca 660
ggaactgatg aaacttcctc taatgacaaa aacaaggaaa ctactgctaa agatgagaag 720
5 gagaaaaaga agaagccggt taacacagct cgtagacctg cgtttgaacc tcttacaag 780
gaatcaagga atcaagcaag agccagggt agagagagaa caaaaacaaa gaaatgagc 840
caagttggaa aatccaaatc cccagctcat gatttgaacc cttcaggatc tcggaggccg 900
10 gctaatagaa ctttgaaga acctggaaca catgaacaac acacctcca tcatgttgat 960
gacagtagtt ttgtggttaa tggaaattgg aatccattta caatctcac ttctcatgaa 1020
15 caatatgctg gaatttcaa tgagcatcaa ttagttacag acttgcaatt ttatggaaag 1080
ctgtgggaaa gc 1092

20 <210> 11
<211> 225
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

25 <220>
<223> RNAi para el gen SIBRC1L1

<400> 11
20 tggctactca caaagtcaaa atcagcgggt aacgatctgg ttcagaaaat taacaagac 60
30 aaatgcagcg gtatgaaaaa tctaataatt gctactgtat catctccttc cgccgaatca 120
tgtgaagtta tcgacgaatc agctgcaact aatacagcag aaactcagaa gcaacagaag 180
35 aaaaaagtta agtcgattcg tagggcaata attcatccag ttgtt 225

40 <210> 12
<211> 415
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> RNAi para el gen SIBRC1L2

<400> 12
caacaccgct cgtgtgcaa gagatcgaag gatgagactt tacttgatg ctgctcgcaa 60
gttttccgt ttgcaggact tattgggatt cgataaggcc agcaaaactg ttgaatggtt 120
50 gcttactcaa tcggattctg caattgaaga gcttgtgcc gctaaaggca atgatgcaca 180
ggttgctcag caaactagct gcaatacccc cactactact actggaattg gtgcaattg 240
55 tgcataat tctattctg agtcgtgtga agttatatca ggaactgatg aaacttcctc 300
taatgacaaa aacaaggaaa ccgctcaaga tgaggagaag aagaaaagga agaagggtgt 360
taacacagct cgtagagctg ttttagaacc tcttacaag gaatcgagga atcaa 415
60

<210> 13
<211> 185
<212> DNA
65 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> RNAi para el gen StBRC1L1

5 <400> 13
agaaaattag caaaggaaaa tgcagcgcta gtacaaatcc taatattggt gttgtatcat 60
ctccctccga gtcattgtgaa gtcatactct gagtaatcga cgaatcagca gcaactaata 120
10 atactcacia gcaacagaag aaaaaaaagt cgattcgtag ggcaatattt catccagttg 180
ttgca 185

15 <210> 14
<211> 168
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> RNAi para el gen StBRC1L2

<400> 14
gccgttaaag gcaatgatgc tcagggtcct cagcaaaacta gctgcaatac cccactact 60
25 actactggaa ttggtgcaat ttgtgatct aattctattt ctgagtcattg tgaagtata 120
tcaggaactg atgaaacttc ctctaagac aaaaacaagg aaactgct 168

30 <210> 15
<211> 1041
<212> DNA
<213> Solanum lycopersicum

35 <400> 15
atgtaccctt cgagcaatta cagccccaat attccagct cttcatctt cttcacatt 60
aatattccat ctcttctat gcaatatgaa cccgaattca tccaatattt ccatgatttt 120
40 caattcatcc aacctagtta cgatcagaat accaatattc ctgcagaaga agctgctgat 180
tcggacaaac tagataaaat agaagaagat caatcaatca taaaagctg caataataac 240
45 aagaaggatg agaagagtag tagcagtact agtactattc gtagaaaaaa caacaagaga 300
actacgagtg gtagtgctgg ttaggacct tcgaagaaag atagacacag caaatcaac 360
acggcacatg gcccaagaga ccgaagaatg agactatcac ttgaaattgc tcgcaaattc 420
50 ttcaattgac aagactgct tgggttcgat aaagccagca aaactgtaga atggctactc 480
acaaagtcaa aatcagcggg gaacgatctg gttcagaaaa ttaacaaaga caaatgcagc 540
55 ggtagtgaat atcctaatat tgctactgta tcatctcctt ccgccgaatc atgtgaagtt 600
atcgacgaat cagctgcaac taatacagca gaaactcaga agcaacagaa gaaaaaagtt 660
aagtgcattc gtagggcaat aattcatcca gttgttgcaa aggaatcaag gaaagaagca 720
60 agagcaaggg caagggaaag aacaataata aagaaaagcc taaatgataa cacgaataat 780
aataataatg gtgatcaatc tatggctgat gaggatttaa caagatcatt aagatcttgg 840
65 aatactacat ttgaagatca tcaatcaggt attcaaggct ataataataa taataatag 900

aatgtgttg ataatcttaa ttggtggat actagcaatt ggagccatt tatgtcaac 960
 tatcacaaa tcaatactga aatttctcaa gagcatcaat ttgcaactt ccagtattct 1020
 5 gggaagttat gggaagctta a 1041

<210> 16
 10 <211> 1014
 <212> DNA
 <213> Solanum lycopersicum

<400> 16
 15 atgcaatag aacacgaact atacttcaa agctttaatc atgataacca atattattt 60
 caacaacagc aactagtcc ctgatatagat gatttgagtc ctacatctt agctgacagc 120
 tgcaccgaga ttattactaa gccttcgaat tgcaaccacg aactacaagg aatggaagaa 180
 20 ggccgaggcg aaaagaaagg agatgatgat gttatgagta gcagaattag tggacggatc 240
 tcaaaaaata ataagagatc ttccaataaa gatcgacaca gcaagatcaa caccgctcgt 300
 25 ggtccaagag atcgaaggat gagacttca ctgatgctg ctgcaagtt ttccggttg 360
 caggacttat tgggattcga taaggccagc aaaactgttg aatggtgct tactcaatcg 420
 gattctgcaa tgaagagct tgtgccgct aaaggcaatg atgcacaggt tgctcagcaa 480
 30 actagtgcga atacccccac tactactact ggaattggtg caattgtgc atctaattct 540
 atttctgagt cgtgtgaagt tataicagga actgatgaaa ctctctctaa tgacaaaaac 600
 35 aaggaaaccg ctcaagatga ggagaagaag aaaaggaaga agtggttaa cacagctcgt 660
 agagctgtgt tagaacctct tacgaaggaa tcgaggaatc aagcaagagc cagggctaga 720
 gagagaacaa aatcaaagaa aatgagccaa actggaaaat ccaaaccct agctaatgat 780
 40 ttgaaccctt caggatctcg gaggccggct aataaaactt gtgaagaacc tggaacacat 840
 gaagaactca acttccatca agagaagaac actgtcgatg actgtaattt tatggtaaat 900
 45 ggaaattgga atccattac aatcttagc tatcatgagc aatacgctgg aattccaac 960
 gagcatcaat tggttacaga ctgcaattt tgggaaagc tatgggaagg ctag 1014

<210> 17
 50 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 55 <223> cebador Le1

<400> 17
 60 atgtaccctt cgagcaatta cagccccaat 30

<210> 18
 <211> 31
 <212> DNA
 65 <213> Artificial Sequence

	<220>		
	<223> cebador Le2		
5	<400> 18		
	tattccagc tcttcacat t	31	
10	<210> 19		
	<211> 22		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
15	<220>		
	<223> cebador LeTCP2-F1		
	<400> 19		
	caacaccgct cgtgtccaa ga	22	
20	<210> 20		
	<211> 28		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
25	<220>		
	<223> cebador LeTCP2-F1 nested		
	<400> 20		
30	ccaagagatc gaaggatgag actttcac	28	
35	<210> 21		
	<211> 23		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
40	<220>		
	<223> cebador LeTCP2-R1		
	<400> 21		
	ttgattcctc gattccttg taa	23	
45	<210> 22		
	<211> 25		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
50	<220>		
	<223> cebador LeTCP2-R1 nested		
	<400> 22		
	gaggttctaa cacagctcta cgagc	25	
55	<210> 23		
	<211> 22		
	<212> DNA		
60	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> cebador LeTCP2 cDNA-F		
65	<400> 23		

	gaatgcaata tgaacacgaa ct	22
5	<210> 24 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
10	<220> <223> cebador LeTCP2 cDNA-R	
	<400> 24 atgaactgca tcgtagtttt attc	24
15	<210> 25 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
20	<220> <223> cebador Le3	
25	<400> 25 attgagaatg acttgaaaga taaagatgag	30
30	<210> 26 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
35	<220> <223> cebador GSP1-TCP1	
	<400> 26 tgtgaaagaa agatgaagag ctggaaa	27
40	<210> 27 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
45	<220> <223> cebador GSP2-TCP1	
50	<400> 27 ttggggctgt aattgctcga aggggt	25
55	<210> 28 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
	<220> <223> cebador GSP1-TCP2	
60	<400> 28 tcagctaaga tggaggact caaatca	27
65	<210> 29 <211> 28	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 5 <223> cebador GSP2-TCP2

 <400> 29
 atctatcgag ggaactagtt gctgttgt 28

 10
 <210> 30
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 15
 <220>
 <223> cebador para el extremo 5' de SIBRC1L1

 <400> 30
 20 ggggctcgag ggatccagaa aattagcaaa ggaa 34

 <210> 31
 <211> 34
 25 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> cebador para el extremo 5' de SIBRC1L1
 30
 <400> 31
 ggggggtacc atcgattgca acaactggat gaaa 34

 35 <210> 32
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 40 <220>
 <223> cebador para el extremo 5' de SIBRC1L2

 <400> 32
 45 ggggctcgag ggatccgccg ttaaaggcaa tgatgctcag 40

 <210> 33
 <211> 41
 <212> DNA
 50 <213> Artificial Sequence

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

 55 <400> 33
 ggggggtacc atcgatagca gtttcctgt tttgtcatt a 41

 <210> 34
 60 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 65 <223> cebador racest1-5'

ES 2 683 734 T3

	<400> 34 tgggctccaa ttgctagtat ccacca	26
5	<210> 35 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
10	<220> <223> cebador StTCP1-ORF1	
15	<400> 35 atgtaccctt cgagcccaaa tatttc	26
20	<210> 36 <211> 34 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
25	<220> <223> cebador B26	
	<400> 36 gactcgagtc gacatcgttt tttttttt tttt	34
30	<210> 37 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
35	<220> <223> cebador B25	
40	<400> 37 gactcgagtc gacatcg	17
45	<210> 38 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
	<220> <223> cebador genómico-StTCP1A	
50	<400> 38 tgaatagaag tgtagtaggt tgtcctt	27
55	<210> 39 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
60	<220> <223> cebador genómico-StTCP1B	
	<400> 39 tgaaagataa agatgagctt attta	25
65		

5 <210> 40
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> cebador StTCP2-A
 10 <400> 40
 agagatcttc caataaggat cgacacagc 29
 15 <210> 41
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> cebador StTCP2-B
 20 <400> 41
 atcaacacgg tcgtgggtcc aagagatcg 29
 25 <210> 42
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 30 <220>
 <223> cebador St2-Seq 1
 <400> 42
 35 tcattctcctt tgttccgcc tcggccttct 30
 <210> 43
 <211> 27
 <212> DNA
 40 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> cebador St2-Seq 2
 45 <400> 43
 ctccattcc ttctagtacg tgattgc 27
 50 <210> 44
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 55 <220>
 <223> cebador StTCP2-5'
 <400> 44
 atgtatcctc caagcaacaa taactg 26
 60 <210> 45
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 65

<220>
 <223> cebador StTCP2-3'

 <400> 45
 5 gctttccac agcttccat aaaattgc 28

 <210> 46
 <211> 34
 10 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> cebador del extremo 5' de StBRC1L1
 15
 <400> 46
 ggggctcgag ggatccagaa aattagcaaa ggaa 34

 20 <210> 47
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 25 <220>
 <223> cebador del extremo 3' de StBRC1L1

 <400> 47
 30 ggggggtacc atcgattgca acaactggat gaaa 34

 <210> 48
 <211> 40
 <212> DNA
 35 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> cebador del extremo 5'
 40
 <400> 48
 ggggctcgag ggatccgccg ttaaaggcaa tgatgctcag 40

 <210> 49
 45 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 50 <223> cebador del extremo 3' del gen StBRC1L2

 <400> 49
 ggggggtacc atcgatagca gttccttgt tttgtcatt a 41

 55
 <210> 50
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> Solanum lycopersicum
 60
 <400> 50

 Met Tyr Pro Ser Ser Asn Tyr Ser Pro Asn Ile Ser Ser Ser Ser Ser
 1 5 10 15
 65

ES 2 683 734 T3

Phe Phe His Ile Asn Ile Pro Ser Pro Ser Met Gln Tyr Glu Pro Glu
 20 25 30
 5
 Phe Ile Gln Tyr Phe His Asp Phe Gln Phe Ile Gln Pro Ser Tyr Asp
 35 40 45
 10
 Gln Asn Thr Asn Ile Pro Ala Glu Glu Ala Ala Asp Ser Asp Lys Leu
 50 55 60
 15
 Asp Lys Ile Glu Glu Asp Gln Ser Ile Ile Lys Ser Cys Asn Asn Asn
 65 70 75 80
 20
 Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ile Arg Arg Lys
 85 90 95
 Asn Asn Lys Arg Thr Thr Ser Gly Ser Ala Gly Val Gly Pro Ser Lys
 100 105 110
 25
 Lys Asp Arg His Ser Lys Ile Asn Thr Ala His Gly Pro Arg Asp Arg
 115 120 125
 30
 Arg Met Arg Leu Ser Leu Glu Ile Ala Arg Lys Phe Phe Asn Leu Gln
 130 135 140
 35
 Asp Leu Leu Gly Phe Asp Lys Ala Ser Lys Thr Val Glu Trp Leu Leu
 145 150 155 160
 40
 Thr Lys Ser Lys Ser Ala Val Asn Asp Leu Val Gln Lys Ile Asn Lys
 165 170 175
 45
 Asp Lys Cys Ser Gly Ser Glu Asn Pro Asn Ile Ala Thr Val Ser Ser
 180 185 190
 50
 Pro Ser Ala Glu Ser Cys Glu Val Ile Asp Glu Ser Ala Ala Thr Asn
 195 200 205
 55
 Thr Ala Glu Thr Gln Lys Gln Gln Lys Lys Lys Val Lys Ser Ile Arg
 210 215 220
 60
 Arg Ala Ile Ile His Pro Val Val Ala Lys Glu Ser Arg Lys Glu Ala
 225 230 235 240
 65
 Arg Ala Arg Ala Arg Glu Arg Thr Ile Ile Lys Lys Ser Leu Asn Asp
 245 250 255
 Asn Thr Asn Asn Asn Asn Asn Gly Asp Gln Ser Met Ala Asp Glu Asp
 260 265 270

ES 2 683 734 T3

Leu Thr Arg Ser Leu Arg Ser Trp Asn Thr Thr Phe Glu Asp His Gln
 275 280 285

5

Ser Ala Ile Gly Ala His Leu Cys Ser Thr Ile Thr Lys Ser Ile Leu
 290 295 300

10

Lys Phe Leu Lys Ser Ile Asn Leu Arg Thr Ser Ser Ile Leu Gly Ser
 305 310 315 320

15

Tyr Gly Lys Leu Asn
 325

20

<210> 51
 <211> 362
 <212> PRT
 <213> Solanum tuberosum

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido que ocurre de forma natural

30

<400> 51
 Met Tyr Pro Pro Ser Asn Asn Asn Cys Asn Tyr Ser Pro Ile Leu Ser
 1 5 10 15

35

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

40

His Glu Leu Tyr Phe Gln Asn Phe Asn His Asp Asp Gln Tyr Tyr Phe
 35 40 45

45

Gln Leu Gln Gln Gln Val Pro Leu Ile Asp Asp Leu Ser Pro His Val
 50 55 60

50

Leu Ala Asp Ser Cys Thr Glu Thr Val Thr Lys Pro Ser Asn Cys Asn
 65 70 75 80

55

His Val Leu Glu Gly Met Glu Glu Gly Arg Gly Gly Asn Lys Gly Asp
 85 90 95

60

Asp Val Met Ser Ser Arg Ile Ser Ile Ile Ser Gly Arg Ile Ser Lys
 100 105 110

65

Asn Asn Lys Arg Ser Ser Asn Lys Asp Arg His Ser Lys Ile Asn Thr
 115 120 125

Ala Arg Gly Pro Arg Asp Arg Arg Met Arg Leu Ser Leu Asp Ala Ala
 130 135 140

ES 2 683 734 T3

Arg Lys Phe Phe Arg Leu Gln Asp Leu Leu Gly Phe Asp Lys Ala Ser
 145 150 155 160
 5 Lys Thr Val Glu Trp Leu Leu Thr Gln Ser Asp Ser Ala Ile Glu Glu
 165 170 175
 10 Leu Val Ala Val Lys Gly Asn Asp Ala Gln Val Pro Gln Gln Thr Ser
 180 185 190
 15 Cys Asn Thr Pro Thr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Ala Ile Cys Ala Ser
 195 200 205
 20 Asn Ser Ile Ser Glu Ser Cys Glu Val Ile Ser Gly Thr Asp Glu Thr
 210 215 220
 Ser Ser Asn Asp Lys Asn Lys Glu Thr Ala Lys Asp Glu Lys Glu Lys
 225 230 235 240
 25 Lys Lys Lys Pro Val Asn Thr Ala Arg Arg Ala Ala Phe Glu Pro Leu
 245 250 255
 30 Thr Lys Glu Ser Arg Asn Gln Ala Arg Ala Arg Ala Arg Glu Arg Thr
 260 265 270
 35 Lys Thr Lys Lys Met Ser Gln Val Gly Lys Ser Lys Ser Pro Val His
 275 280 285
 40 Asp Leu Asn Pro Ser Gly Ser Arg Arg Pro Ala Asn Arg Thr Cys Glu
 290 295 300
 Glu Pro Gly Thr His Glu Gln His Thr Phe His His Val Asp Asp Thr
 305 310 315 320
 45 Asn Phe Val Val Asn Gly Asn Trp Asn Pro Phe Thr Ile Phe Ser Ser
 325 330 335
 50 His Glu Gln Tyr Ala Gly Ile Ser Asn Glu His Gln Leu Val Thr Asp
 340 345 350
 55 Leu Gln Phe Tyr Gly Lys Leu Trp Glu Ser
 355 360
 <210> 52
 <211> 1086
 60 <212> DNA
 <213> Solanum tuberosum
 <400> 52
 atgtatcctc caagcaacaa taactgcaac tacagcccaa tttgtcttc tttcatatgc 60
 65

ES 2 683 734 T3

caaaatattc catcttctcc ttgtatgcaa tatgaacacg aactatactt tcaaaacttc 120
 aatcatgatg accaatatta tttcaacta cagcaacaag ttcccttgat agatgacttg 180
 5 agtcctcacg tcttagctga cagctgact gagactgtta ctaagccttc aaattgcaat 240
 cacgtactag aaggaatgga agaaggccga ggcggaaaca aaggagatga tgttatgagt 300
 agcagaatta gtattattag tggacggatc tcaaaaaaca ataagagatc ttccaataag 360
 10 gatcgacaca gcaagatcaa cacggctcgt ggtccaagag atcgaaggat gagactttca 420
 cttgatgctg ctgcgaagtt ttccggttg caggacttat tgggatttga taaggccagc 480
 15 aaaactgtag aatgggtgct tactcaatca gattccgcaa ttgaagagct cgtcgccgtt 540
 aaaggcaatg atgctcaggt tcctcagcaa actagctgca atacccccac tactactact 600
 ggaattggtg caatttgctg atctaattct atttctgagt catgtgaagt tatacagga 660
 20 actgatgaaa ctctctctaa tgacaaaaac aaggaaactg ctaaagatga gaaggagaaa 720
 aagaagaagc cggtaacac agctcgtaga gctgcgttg aacctctac aaaggaatca 780
 25 aggaatcaag caagagccag ggctagagag agaacaaaaa caaagaaaat gagccaagtt 840
 ggaaaatcca aatccccagc tcatgattg aacccttcag gatctcggag gccggctaatt 900
 agaacttggt aagaacctgg aacacatgaa caacacacct tccatcatgt tgatgacact 960
 30 aattttgtgg ttaatggaaa ttggaatcca ttacaatct tcagctctca tgaacaatat 1020
 gctggaattt ccaatgagca tcaattagtt acagactgc aattttatgg aaagctgtgg 1080
 35 gaaagc 1086

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende la SEQ ID NO: 2.
- 5 2. Un polinucleótido aislado capaz de dirigir la expresión de un gen de interés en los meristemas axilares de una planta, siendo preferiblemente el gen de interés el polinucleótido aislado de acuerdo a la reivindicación 1, donde la secuencia reguladora de expresión es SEQ ID NO: 6.
- 10 3. Una construcción genética que comprende:
 - a. el polinucleótido de según la reivindicación 1, o
 - b. el polinucleótido según reivindicación 2 operativamente unido al polinucleótido de acuerdo a la reivindicación 1.
- 15 4. Una planta que comprende la construcción genética según reivindicación 3 (a) o (b) que comprende el polinucleótido según reivindicación 1.
5. La planta según reivindicación 4, la cual es clasificada taxonómicamente perteneciente a la especie *Solanum lycopersicum*.
- 20 6. Una semilla, una célula vegetal, una parte de una planta o un grano de polen los cuales son clasificados taxonómicamente pertenecientes a la especie *Solanum lycopersicum* que comprende la construcción genética según reivindicación 3.
- 25 7. Una secuencia aminoacídica aislada que comprende la SEQ ID NO: 2.
8. Un uso del polinucleótido según reivindicación 1, o el polinucleótido según reivindicación 2, o la construcción genética según reivindicación 3 (a) o (b) que comprende el polinucleótido según reivindicación 1, o la secuencia aminoacídica aislada según reivindicación 7, para modificar la arquitectura de la planta, reduciendo el número de ramificaciones en respecto al control de la planta.
- 30 9. Un método para modificar la arquitectura de una planta, reduciendo el número de ramificaciones en respecto a el control de la planta, que comprende:
 - a. Transfectar un polinucleótido según reivindicación 1, o una construcción genética según reivindicaciones 3 (a) o (b) que comprende el polinucleótido según reivindicación 1, en una célula o cultivo de células vegetales huésped, y
 - 35 b. Crecer la célula o el cultivo de células vegetal huésped en un medio adecuado, hasta la regeneración de una planta completa.
- 40 10. El método según reivindicación 9, en el que la célula transfectada es clasificada taxonómicamente perteneciente a la especie *Solanum lycopersicum*.

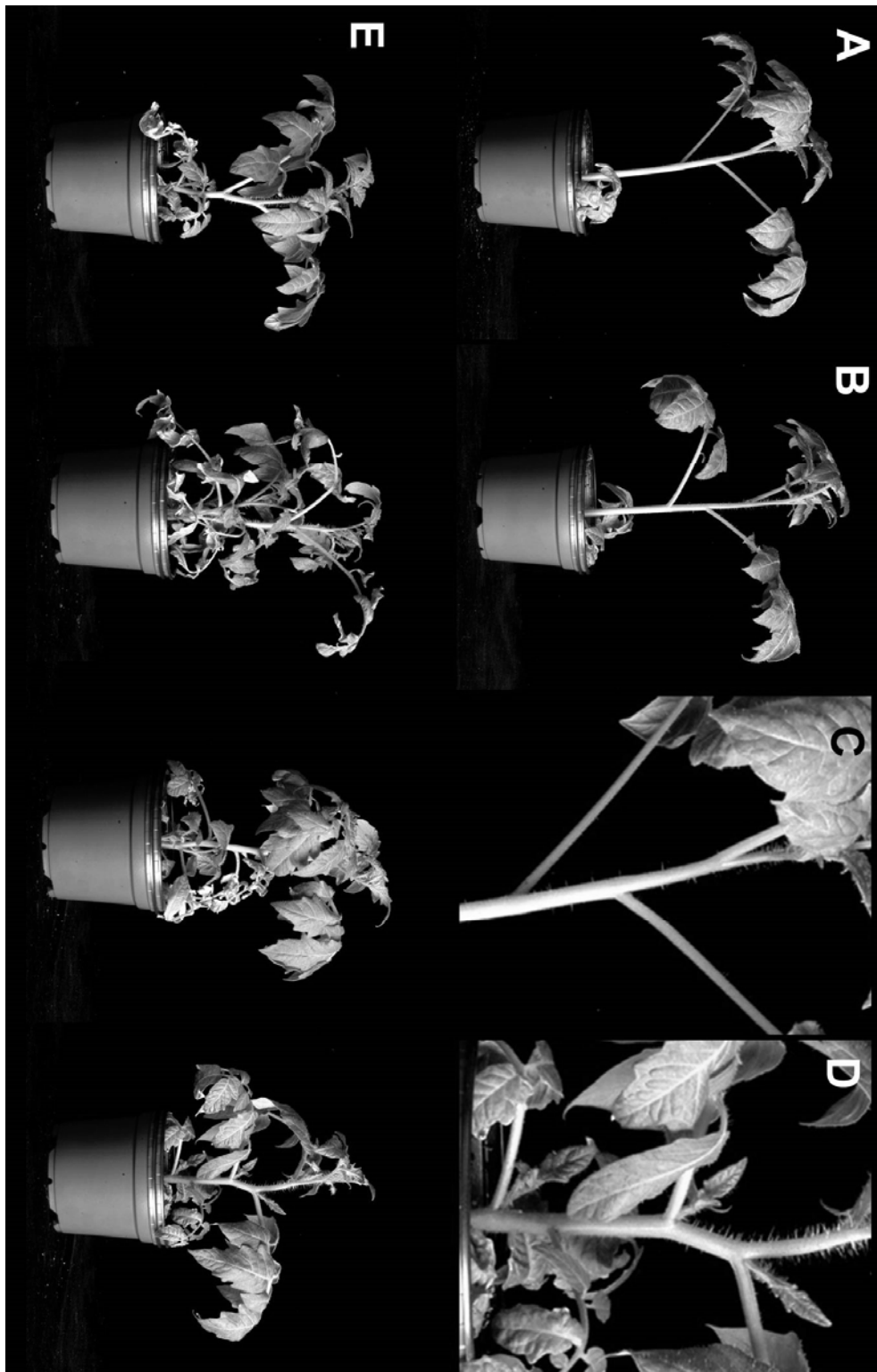
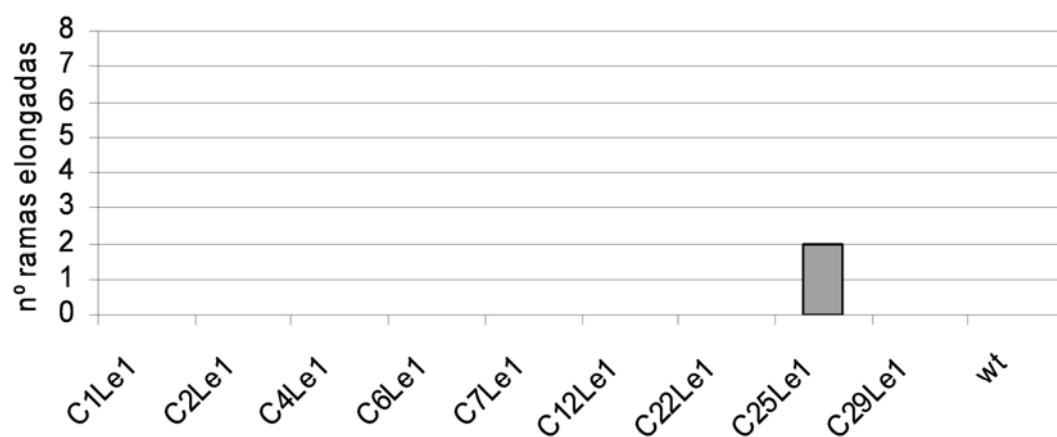


FIG.1

A



B

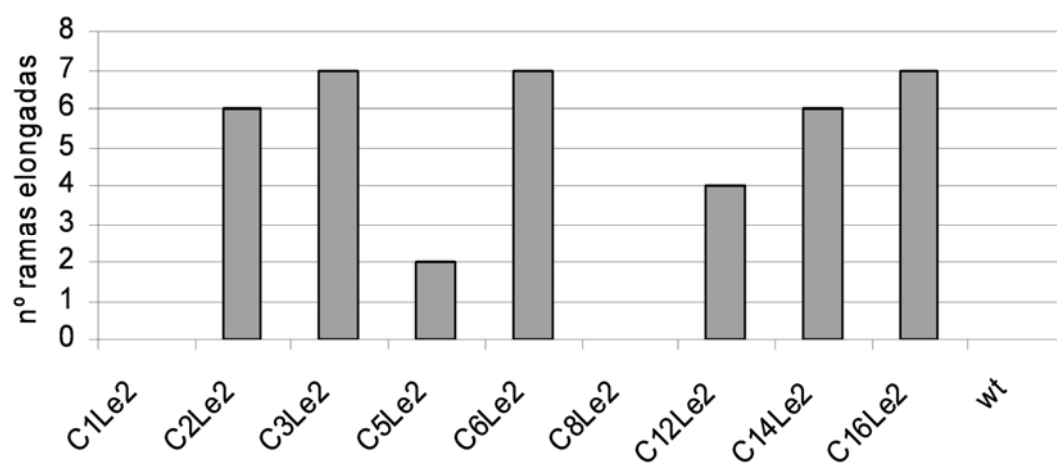


FIG.2

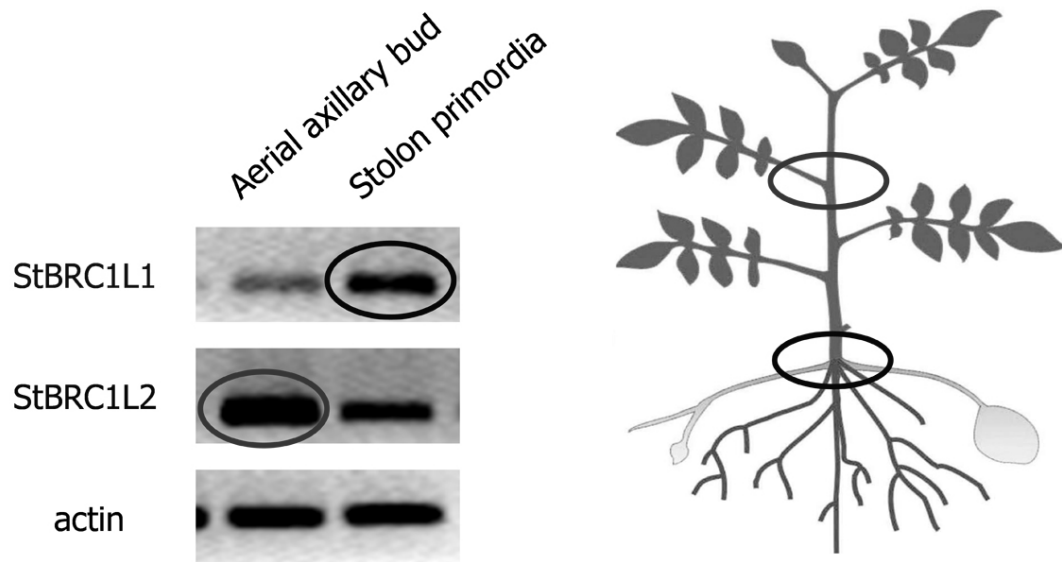


FIG.3

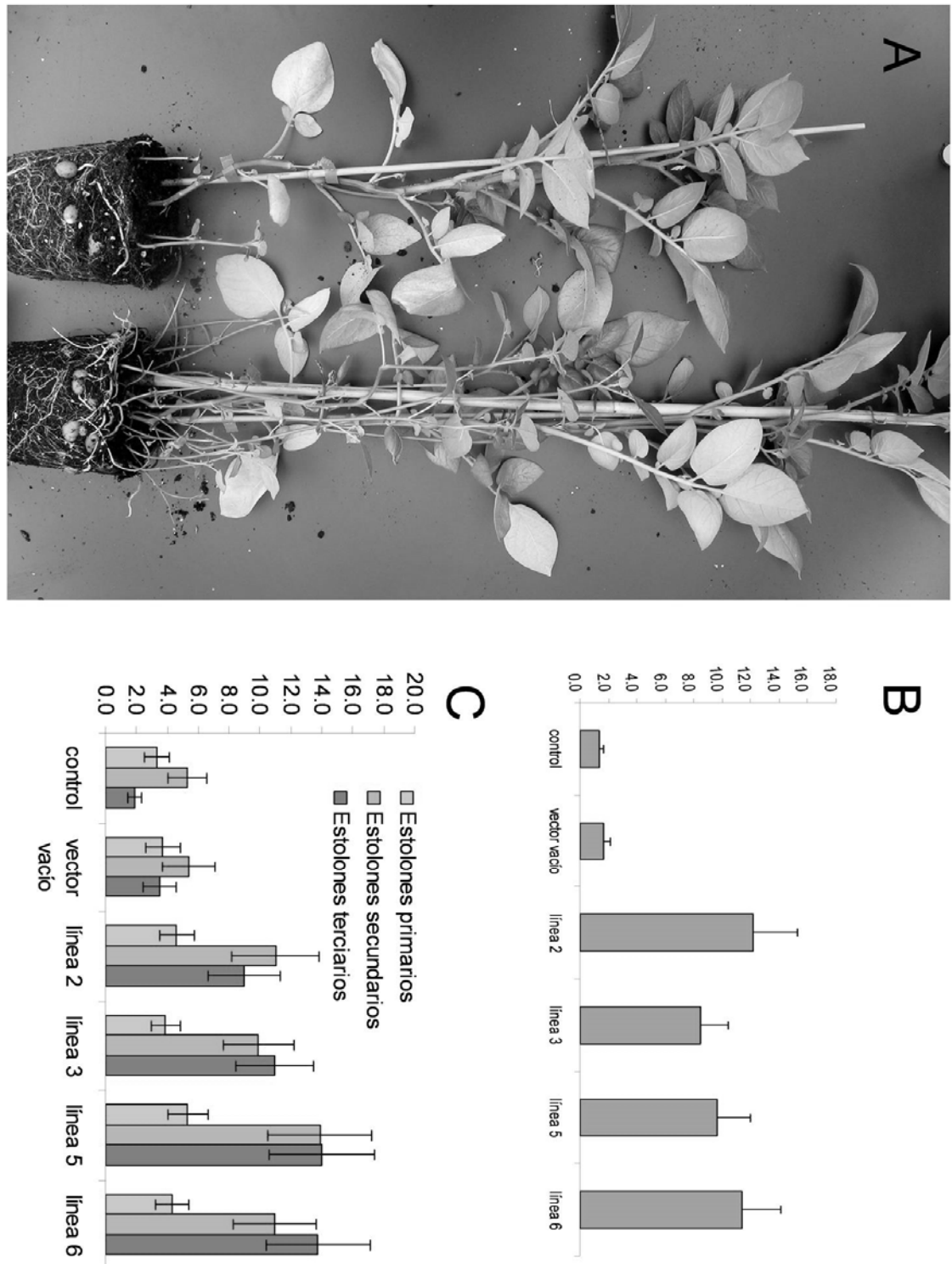


FIG.4

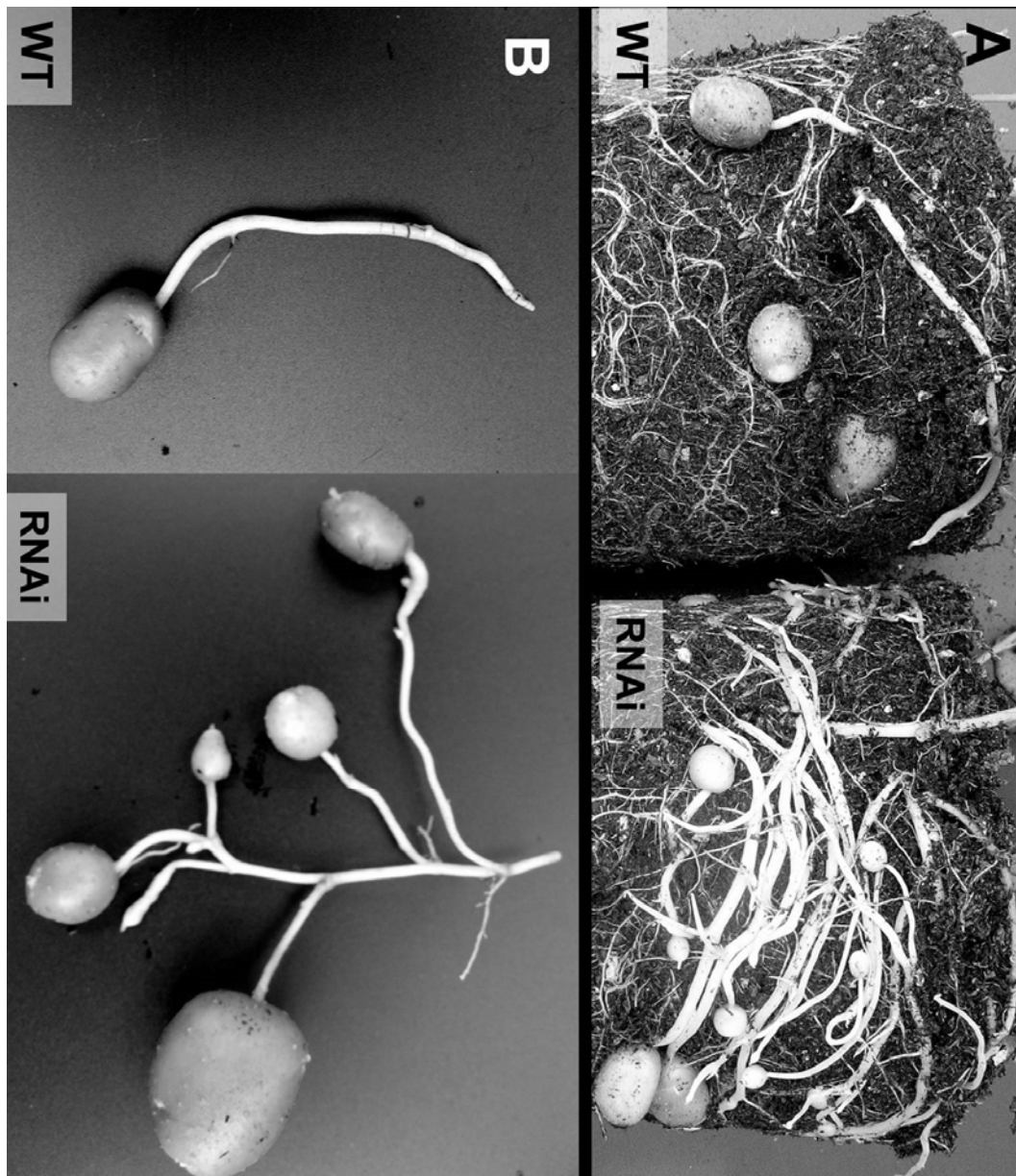


FIG.5

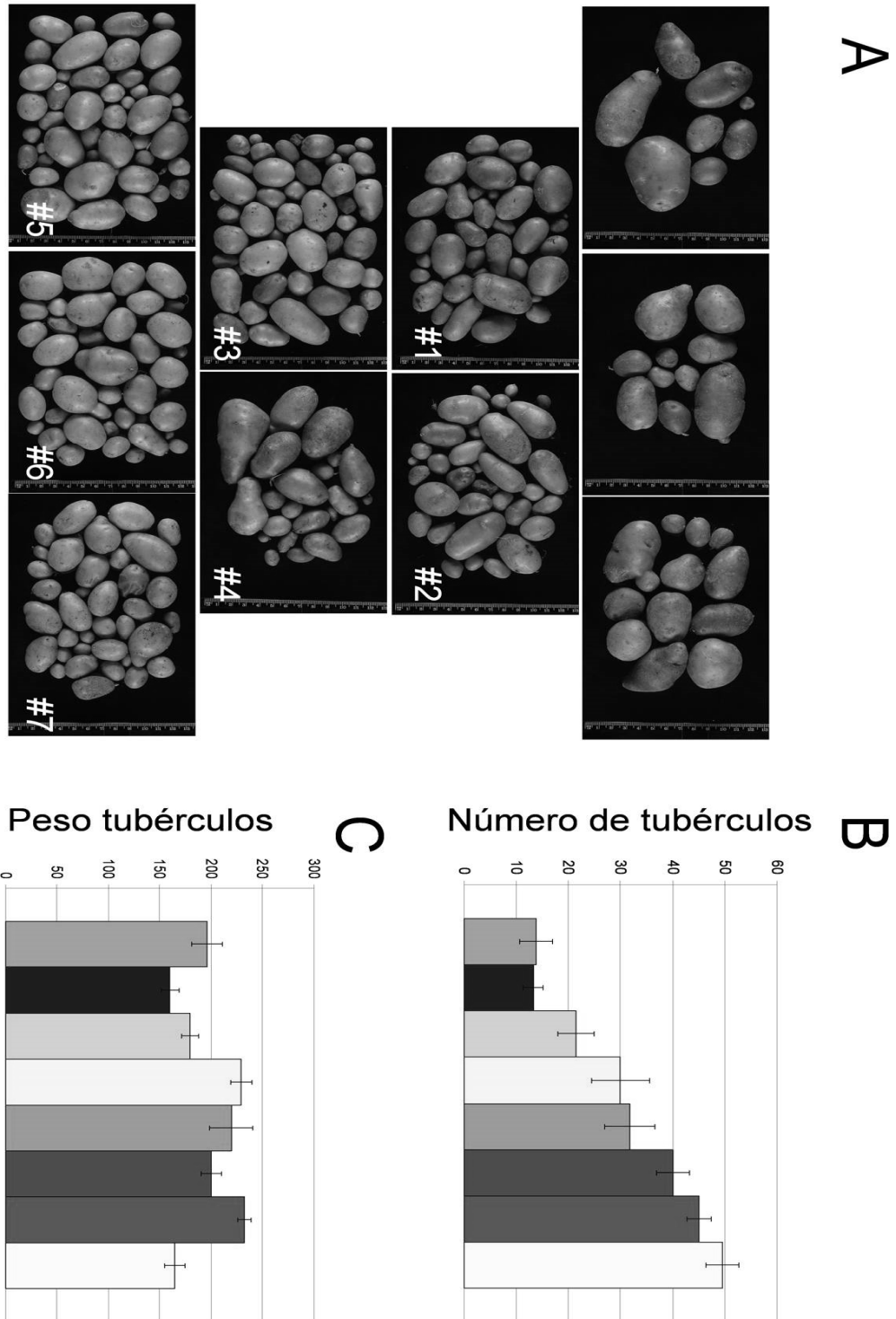


FIG.6

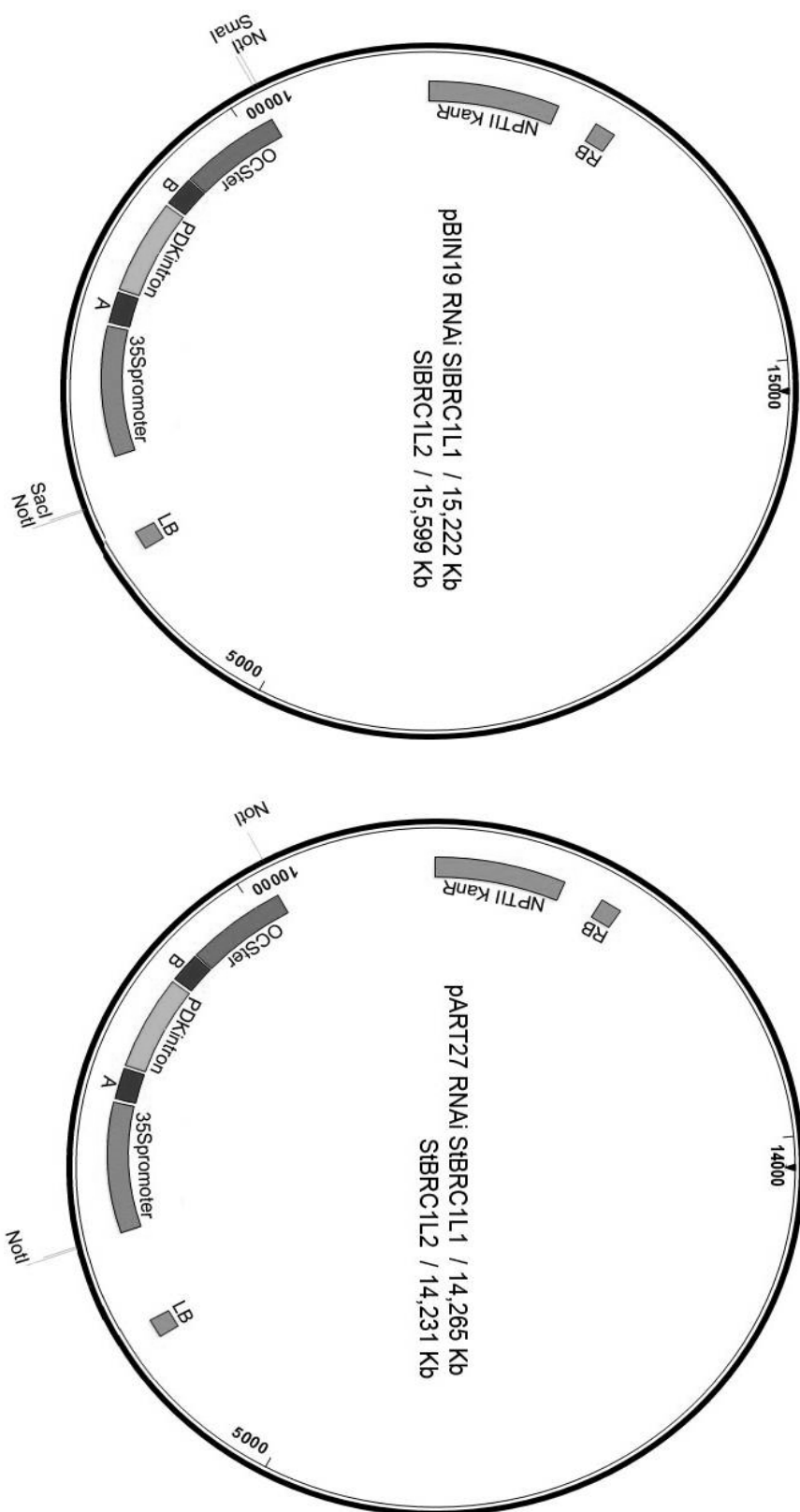


FIG.7