

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 834 576**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2015 PCT/FR2015/051472**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185861**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2015 E 15774647 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2020 EP 3152309**

54 Título: **Uso de micropéptidos para favorecer el crecimiento de las plantas**

30 Prioridad:

03.06.2014 FR 1455045

03.06.2014 FR 1455046

24.03.2015 FR 1552469

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.06.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ TOULOUSE III-PAUL SABATIER
(50.0%)**

**118, Route de Narbonne
31062 Toulouse Cedex 9, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**COMBIER, JEAN-PHILIPPE;
LAURESSERGUES, DOMINIQUE y
BECARD, GUILLAUME**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 834 576 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

Uso de micropéptidos para favorecer el crecimiento de las plantas

La presente invención se refiere al uso de micropéptidos (péptidos codificados por microARN o "miPEP") para favorecer el crecimiento de las plantas.

- 5 Los microARN (miR) son pequeños ARN no codificantes, de aproximadamente 21 nucleótidos después de la maduración, que controlan la expresión de genes diana a nivel postranscripcional, degradando el ARNm diana o inhibiendo su traducción.

10 Los MiR se encuentran principalmente en plantas. Los genes a los que se dirigen los miR suelen ser genes clave en los procesos de desarrollo. Por ejemplo, genes diana de miR164 de la familia CUC (Blein et al., Science, 322 (5909): 1835-9, 2008). Por tanto, la familia miR164 participa en el desarrollo de los meristemas y, en particular, en el desarrollo de la hoja (Laufs et al., Development, 131 (17): 4311-22, 2004; Nikovics et al., Plant Cell, 18 (11): 2929-45, 2006). En otro ejemplo, miR319 se dirige a factores de transcripción de la familia TCP, implicados en el crecimiento celular (Nag et al., Proc Natl Acad Sci USA, 106 (52): 22534-9, 2009). La sobreexpresión de miR319a conduce a un fenotipo de hoja (fenotipo Jaw, Palatnik et al., Nature, 425 (6955): 257-63, 2003), así como a un fenotipo floral (Nag et al., 2009).

- 15 Por tanto, los miRs podrían representar, por su acción de regulación de la expresión de ciertos genes, un objetivo de interés para controlar el crecimiento de las plantas y, en particular, para favorecer su crecimiento.

20 Se sabe poco sobre la regulación de la expresión de miR, pero se ha demostrado que, como la mayoría de los genes codificadores, implica una ARN polimerasa II: esta enzima produce un transcrito primario, denominado "pri-miR", que luego madura mediante un complejo proteico que contiene en particular las enzimas del tipo Dicer. Esta maduración conduce en primer lugar a la formación de un precursor de miR llamado "pre-miR", que tiene una estructura secundaria en forma de tallo-bucle que contiene el miR y su secuencia miR* complementaria. Luego, el precursor madura, lo que conduce a la formación de un ARN bicatenario más corto que contiene el miR y el miR*. El miR es absorbido luego por el complejo RISC que escinde el ARNm del gen diana o inhibe su traducción.

- 25 Hasta ahora, los miR y, por extensión, su transcrito primario, siempre se han considerado, debido a su particular modo de acción, como ARN reguladores no codificantes que no producen ningún péptido. Ahora, los inventores demostraron recientemente en la solicitud de patente FR 13/60727 la existencia de micropéptidos (o "miPEP", PEptidos codificados por microARN) capaces de modular la acumulación de miR.

En este contexto, la presente invención tiene como objetivo proporcionar nuevas herramientas eficientes y ecológicas para favorecer el crecimiento de las plantas.

- 30 Uno de los aspectos de la invención es proponer un uso novedoso de miPEP para favorecer el crecimiento de las plantas.

Otro aspecto de la invención también se refiere a un nuevo procedimiento para cultivar plantas.

Otro aspecto de la invención es proponer una composición de miPEP que permita favorecer el crecimiento de plantas.

- 35 Otro aspecto de la invención también es proponer una planta transgénica y partes de plantas transgénicas, y un procedimiento para su producción.

Otro aspecto de la invención es también proponer órganos, células y semillas de plantas transgénicas.

Uno de los otros aspectos de la invención es proponer plantas modificadas ecológicamente.

- 40 Por tanto, la invención se refiere al uso de un péptido para favorecer el crecimiento de una planta, introduciéndose dicho péptido en la planta, teniendo dicho péptido una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de un miPEP naturalmente presente en dicha planta, siendo dicho miPEP naturalmente presente en dicha planta un péptido de 3 a 100 aminoácidos, en particular de 4 a 100 aminoácidos, cuya secuencia está codificada por un marco de lectura abierto situado en el transcrito primario de un miR, siendo dicho miPEP capaz de modular la acumulación de dicho miR en dicha planta, cuyo miR regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, en particular las raíces, el tallo, las hojas o las flores.

Sorprendente e inesperadamente, los inventores han descubierto que el uso de péptidos cuya secuencia comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de los miPEP codificados en los transcritos primarios de miR, permite favorecer el crecimiento de las plantas.

- 50 En la invención, los términos "microARN", "microARN no codificante" y "miR" son equivalentes y se pueden usar indistintamente. Definen pequeñas moléculas de ARN de aproximadamente 21 nucleótidos, que no se traducen y no conducen a un péptido ni a una proteína. Sin embargo, en esta forma madura, los miR aseguran una función de regulación de ciertos genes a través de mecanismos postranscripcionales tales como, por ejemplo, a través del

complejo RISC.

El "transcrito primario de miR" (o "pri-miR") corresponde a la molécula de ARN obtenida directamente de la transcripción de la molécula de ADN. Generalmente, este transcrito primario sufre una o más modificaciones postranscripcionales, que conducen, por ejemplo, a una estructura particular del ARN o una escisión de ciertas partes del ARN por fenómenos de empalme, y que conducen a la forma precursora de miR o ("pre-miR") y luego a la forma madura de miR.

Los términos "micropéptidos" y "miPEP" (PEPTides codificados por microARN) son equivalentes y pueden usarse indistintamente. Definen un péptido que está codificado por un marco de lectura abierto presente en el transcrito primario de un miR y que es capaz de modular la acumulación de dicho miR. Los miPEP en el sentido de la presente invención no deben entenderse como necesariamente péptidos de pequeño tamaño, en la medida en que "micro" no se corresponda con el tamaño del péptido.

Como se indica en la solicitud de patente FR 13/60727, los miPEP son péptidos:

- de 4 a 100 aminoácidos, preferiblemente de 4 a 60 aminoácidos, en particular de 4 a 59 aminoácidos,
- codificados por un marco de lectura abierto contenido en el transcrito primario de un miR, preferiblemente en la parte 5' del transcrito primario de dicho miR, y
- capaces de modular la acumulación de dicho miR en una célula eucariota.

Las expresiones "marco de lectura abierto" u "ORF" (open reading frame) son equivalentes y pueden usarse indistintamente. Corresponden a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ADN o ARN que potencialmente puede codificar un péptido o una proteína: dicho marco de lectura abierto comienza con un codón de inicio (el codón de inicio que generalmente codifica una metionina), seguido de un serie de codones (donde cada codón codifica un aminoácido) y termina con un codón de terminación (el codón de terminación no se traduce).

En la invención, los ORF pueden denominarse específicamente "miORF" cuando están presentes en los transcritos primarios de miR.

Los miORF como se definen en la invención pueden tener un tamaño de 15 a 303 nucleótidos. Dado que un aminoácido está codificado por un codón de 3 nucleótidos, los miORF de 15 a 303 nucleótidos codifican miPEPS de 4 a 100 aminoácidos.

En particular, los miORF tienen un tamaño de:

15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 47, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 105, 108, 111, 114, 117, 120, 123, 126, 129, 132, 135, 138, 141, 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 198, 201, 204, 207, 210, 213, 216, 219, 222, 225, 228, 231, 234, 237, 240, 243, 246, 249, 252, 255, 258, 261, 264, 267, 270, 273, 276, 279, 282, 285, 288, 291, 294, 297, 300 o 303 nucleótidos, y codifican respectivamente miPEP que tienen un tamaño de:

4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 aminoácidos.

Un miPEP también puede tener un tamaño de 3 aminoácidos.

Dada la degeneración del código genético, un solo miPEP puede ser codificado por varias secuencias de nucleótidos. Estas secuencias de nucleótidos, diferentes entre sí en al menos un nucleótido pero que codifican el mismo péptido, se denominan "secuencias degeneradas".

En la invención, el término "planta" se refiere generalmente a la totalidad o parte de una planta, independientemente de su etapa de desarrollo (incluida la planta en forma de semilla o brote joven), a una o varios órganos de la planta (como, por ejemplo, hojas, raíces, tallo, flores), a una o más células de la planta, o incluso a un grupo de células de la planta.

En la invención, el término "crecimiento" se refiere al desarrollo de la totalidad o parte de una planta a lo largo del tiempo. Por tanto, el crecimiento de la planta puede determinarse y cuantificarse mediante el seguimiento de los parámetros evolutivos observables de determinadas partes, células u órganos de la planta, como las hojas, las raíces, los tallos o las flores.

De manera no limitativa, los parámetros que permiten determinar y cuantificar el crecimiento de una planta pueden ser en particular:

- el tamaño, la superficie, el volumen, la masa y el número de hojas,

- la forma de las hojas,
- el tamaño y la cantidad de flores,
- el tamaño del tallo (o el tallo de la flor),
- la biomasa de las raíces
- 5 - el número, la longitud y el nivel de ramificación de las raíces,
- la precocidad de la germinación,
- el vigor de la germinación y la duración de la fase juvenil,
- la precocidad de la gemación,
- la precocidad de la inducción floral (o transición floral),
- 10 - o el número de células.

Además, en la invención, la expresión “favorecer el crecimiento de la planta” o “mejorar el crecimiento de la planta”, indica:

- ya sea una aceleración del desarrollo (como, por ejemplo, un tamaño de las hojas más importante para una planta en un momento dado en comparación con una planta de referencia),
- 15 - un aumento en el desarrollo (como, por ejemplo, un tamaño de hoja más importante para una planta que no puede alcanzar una planta de referencia),
- o a una aceleración y un aumento en el desarrollo de la planta.

Es importante señalar que el uso según la invención tiene la ventaja de ser ecológico, en comparación con los procedimientos químicos utilizados convencionalmente en la industria botánica o en la agricultura, ya que miPEP es un péptido que ocurre naturalmente en la planta.

La invención también se refiere al uso de un miPEP introducido por vía exógena en una planta para favorecer su crecimiento, siendo dicho miPEP por vía exógena introducido un péptido que comprende, o consiste en, una secuencia idéntica a la de un miPEP naturalmente presente en dicha planta,

25 cuyo miPEP naturalmente presente es un péptido de 3 a 100 aminoácidos, en particular de 4 a 100 aminoácidos, cuya secuencia está codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de un miR, siendo dicho miPEP capaz de modular la acumulación de dicho miR en dicha planta, cuyo miR regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, en particular las raíces, el tallo, las hojas o las flores,

30 la suma de la cantidad de dicho miPEP introducido por vía exógena y la de dicho miPEP naturalmente presente es estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP naturalmente presente.

En la invención, la expresión “miPEP introducido por vía exógena” se refiere a un miPEP introducido artificialmente en la planta, exista o no en forma natural en la planta.

Si el miPEP existe en forma natural en la planta, se trata de un “miPEP de origen endógeno”.

Si el miPEP no existe en forma natural en la planta, es un “miPEP de origen exógeno”.

35 Cuando se introduce un “miPEP de origen exógeno” en la planta, es necesario introducir también el miR correspondiente y su transcrito primario.

La introducción de un miPEP por vía exógena en la planta implica, por tanto, una etapa técnica, que no es un fenómeno natural y no corresponde ni a un cruce ni a una selección.

40 El miPEP introducido por vía exógena puede ser un péptido producido fuera de la planta (como un péptido aislado y/o purificado, un péptido sintético o un péptido recombinante) o un péptido producido en la planta como resultado de la introducción no natural de un ácido nucleico que codifica dicho miPEP en dicha planta.

45 La planta en la que no se ha introducido miPEP tiene una cantidad basal de dicho miPEP, que corresponde a la de dicho miPEP naturalmente presente. El uso de un miPEP que comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de dicho miPEP da como resultado un aumento en la cantidad total de miPEP, que modula la acumulación de miR cuyo transcrito primario contiene la secuencia que codifica dicho miPEP.

Además, el miPEP introducido se encuentra en la planta y su introducción no tiene ningún impacto en su estabilidad.

En la invención, por “acumulación” se entiende la producción de una molécula, como un miR o miPEP, en la célula.

Así, la “modulación de la acumulación” de una molécula en una célula corresponde a una modificación de la cantidad de esta molécula en la célula.

- 5 En una realización, la invención se refiere al uso tal como se definió con anterioridad, en el que la modulación de la acumulación de dicho miR es una disminución o un aumento en la acumulación de dicho miR, en particular un aumento.

Una “disminución en la acumulación de miR” corresponde a una disminución en la cantidad de dicha molécula en la célula.

- 10 Por el contrario, un “aumento en la acumulación de miR” corresponde a un aumento en la cantidad de dicha molécula en la célula.

En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: NAC1 (N° de acceso AT1G56010.1), NAC4 (N° de acceso AT5G07680.1), NAC5 (N° de acceso AT5G61430.1), CUC1 (N° de acceso AT3G15170.1) y CUC2 (N° de acceso AT5G53950.1) (números de acceso según la base de datos The Arabidopsis Information Resource “TAIR”).

- 15

En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miARN es miR164a, en particular, en el que dicho miR164a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 1.

- 20 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miARN es miR164a, en particular, en el que dicho miR164a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 1, y dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: NAC1 (N° de acceso AT1G56010.1), NAC4 (N° de acceso AT5G07680.1), NAC5 (N° de acceso AT5G61430.1), CUC1 (N° de acceso AT3G15170.1) y CUC2 (N° de acceso AT5G53950.1) (números de acceso según la base de datos The Arabidopsis Information Resource “TAIR”).

- 25 En particular, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miR164a tiene una secuencia de nucleótidos que exhibe al menos un 80% de identidad, preferiblemente al menos un 90% de identidad, con el secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1.

En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en donde dicho miPEP es miPEP164a, en particular, en donde dicho miPEP164a tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2.

- 30

En particular, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP164a tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad, preferiblemente al menos un 90% de identidad, con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

- 35 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: REVOLUTA (N° de acceso AT5G60690), PHABULOSA (N° de acceso AT2G34710), PHAVOLUTA (N° de acceso AT1G30490), ATHB-8 (N° de acceso AT4G32880) y ATHB-15 (N° de acceso AT1G52150) (números de acceso según la base de datos The Arabidopsis Information Resource “TAIR”).

- 40 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miARN es miR165a, en particular, en el que dicho miR165a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en SEQ ID NO: 5.

En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miARN es miR165a, en particular, en el que dicho miR165a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 5, y dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: REVOLUTA (N° de acceso AT5G60690), PHABULOSA (N° de acceso AT2G34710), PHAVOLUTA (N° de acceso AT1G30490), ATHB-8 (N° de acceso AT4G32880) y ATHB-15 (N° de acceso AT1G52150) (números de acceso según la base de datos The Arabidopsis Information Resource “TAIR”).

- 45

En particular, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miR165a tiene una secuencia de nucleótidos que exhibe al menos un 80% de identidad, preferiblemente al menos un 90% de identidad, con el secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5.

- 50 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP es miPEP165a, en particular, en el que dicho miPEP165a tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 6.

En particular, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP165a tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad, preferiblemente al menos un 90% de identidad, con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6.

5 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: TCP3 (Nº de acceso AT1G53230.1) y TCP4 (Nº de acceso AT3G15030.1) (números de acceso según la base de datos The Arabidopsis Information Resource "TAIR").

10 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miARN es miR319a, en particular, en el que dicho miR319a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 9.

15 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miARN es miR319a, en particular, en el que dicho miR319a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 9, y dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: TCP3 (Nº de acceso AT1G53230.1) y TCP4 (Nº de acceso AT3G15030.1) (números de acceso según la base de datos The Arabidopsis Information Resource "TAIR").

En particular, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miR319a tiene una secuencia de nucleótidos que exhibe al menos un 80% de identidad, preferiblemente al menos un 90% de identidad, con la secuencia nucleótido SEQ ID NO: 9.

20 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP es miPEP319a, en particular, en el que dicho miPEP319a tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 10.

En particular, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP319a tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad, preferiblemente al menos un 90% de identidad, con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10.

25 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicha planta es una planta crucífera como *Arabidopsis thaliana*, una planta leguminosa como *Glycine max* (soja), *Medicago truncatula* y *Medicago sativa* (alfalfa) o una planta solanácea como *Nicotiana benthamiana* (tabaco), *Solanum tuberosum* (patata), *Solanum lycopersicum* (tomate) o *Solanum melongena* (berenjena).

30 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicha planta es una planta crucífera.

En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en la que dicha planta es una planta crucífera y el miR es miR164a.

En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en la que dicha planta es una planta crucífera y el miR es miR165a.

35 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en la que dicha planta es una planta crucífera y el miR es miR319a.

En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en la que dicha planta es *Arabidopsis thaliana*.

40 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, para favorecer el crecimiento de una planta de *Arabidopsis thaliana*, en el que el miPEP164a se introduce por vía exógena en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, estando el miPEP164a también naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, siendo dicho miPEP164a introducido por vía exógena un péptido cuya secuencia comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de dicho miPEP164a naturalmente presente, estando dicha secuencia de miPEP164a naturalmente presente codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de miR164a,

45 que miR164a regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de partes vegetativas o reproductivas de *Arabidopsis thaliana*, siendo la suma de la cantidad de dicho miPEP164a introducido por vía exógena y la de dicho miPEP164a naturalmente presente estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP164a naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*.

50 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, para favorecer el crecimiento de una planta de *Arabidopsis thaliana*, en el que el miPEP165a se introduce por vía exógena en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, estando el miPEP165a también naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, siendo dicho miPEP165a introducido por vía exógena un péptido cuya secuencia comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de dicho miPEP165a naturalmente presente, estando codificada dicha secuencia de miPEP165a naturalmente presente por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de miR165a,

que miR165a regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de *Arabidopsis thaliana*, siendo la suma de la cantidad de dicho miPEP165a introducido por vía exógena y siendo la de dicho miPEP165a naturalmente presente estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP165a naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*.

5 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, para favorecer el crecimiento de una planta de *Arabidopsis thaliana*, en el que miPEP319a se introduce por vía exógena en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, estando miPEP319a también naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, siendo dicho miPEP319a introducido por vía exógena un péptido cuya secuencia comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de dicho miPEP319a naturalmente presente, estando dicha secuencia de miPEP319a naturalmente presente
10 codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de miR319a, cuyo miR319a regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de partes vegetativas o reproductivas de *Arabidopsis thaliana*, siendo la suma de la cantidad de dicho miPEP319a introducido por vía exógena y la de dicho miPEP319a naturalmente presente estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP319a naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*.

15 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP se introduce externamente en la planta, preferiblemente mediante riego, pulverización o mediante la adición de un fertilizante, un compost, un sustrato de cultivo o un soporte en contacto con la planta.

En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP se introduce externamente en un grano o una semilla, preferiblemente mediante riego, pulverización o mediante la adición de
20 fertilizante, un compost, un sustrato de cultivo o un soporte en contacto con el grano o la semilla.

En una realización, la invención se refiere al procedimiento definido con anterioridad, en el que dicho miPEP se usa para tratar la planta en forma de grano o de semilla.

En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP se introduce mediante riego y pulverización.

25 En una realización, la invención se refiere al uso tal como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP se introduce mediante riego y adición de un fertilizante.

En una realización, la invención se refiere al uso tal como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP se introduce mediante pulverización y adición de un fertilizante.

30 En una realización, la invención se refiere al uso tal como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP se introduce, mediante riego, mediante pulverización y mediante la adición de un fertilizante.

De hecho, los inventores han observado de manera inesperada que es posible aplicar directamente una composición que comprende un miPEP en la planta para modular la acumulación del correspondiente miR en la planta, lo que indica que el miPEP es absorbido por la planta.

35 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que la planta se trata con una composición que comprende 10^{-9} M a 10^{-4} M de dicho miPEP, en particular 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M o 10^{-4} M de dicho miPEP.

Preferiblemente, las composiciones tienen una concentración de 10^{-8} M a 10^{-5} M para su aplicación por riego o pulverización sobre la planta.

40 En forma complementaria, se pueden considerar composiciones más o menos concentradas para tratar la planta con miPEP. Por ejemplo, y de manera no limitativa, se pueden utilizar composiciones más concentradas que comprenden 10^{-1} M a 10^{-3} M, en particular 10^{-2} M de miPEP, en el caso de que el miPEP introducido por vía exógena se administre a la planta por expansión.

45 Las propiedades de solubilidad de los miPEP están determinadas, en particular, por su composición de aminoácidos. Los miPEP hidrófilos se pueden solubilizar y envasar en soluciones acuosas, como el agua. Los miPEP hidrófobos se pueden solubilizar y envasar en disolventes, como los disolventes orgánicos.

Para el tratamiento de plantas con miPEP, los disolventes orgánicos son disolventes no tóxicos para las plantas en pequeñas cantidades, es decir, no tienen ningún efecto perjudicial sobre el desarrollo de la planta. De manera no limitativa, los disolventes orgánicos pueden elegirse entre acetonitrilo y ácido acético.

50 Los miPEP también se pueden solubilizar y envasar en mezclas de disolventes orgánicos como, por ejemplo, una mezcla de acetonitrilo y ácido acético. En particular, los miPEP se pueden solubilizar en una solución que comprende 50% de acetonitrilo, 10% de ácido acético y 40% de agua (volumen/volumen/volumen).

En particular, el miPEP164a se solubiliza en agua.

En particular, el miPEP164a se encuentra en una concentración de 10^{-9} M a 10^{-4} M en agua.

En particular, el miPEP165a se solubiliza en agua.

En particular, el miPEP165a se encuentra en una concentración de 10^{-9} M a 10^{-4} M en agua.

5 En particular, el miPEP319a se disuelve en una solución que comprende 50% de acetonitrilo, 10% de ácido acético y 40% de agua (volumen/volumen/volumen).

En particular, el miPEP319a disuelto en una solución que comprende 50% de acetonitrilo, 10% de ácido acético y 40% de agua (volumen/volumen/volumen) se diluye a una concentración de 10^{-9} M a 10^{-4} M con agua.

En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP se introduce en la planta a través de un ácido nucleico que codifica dicho miPEP, introduciéndose dicho ácido nucleico en la planta.

10 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que el tamaño del tallo aumenta en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el tamaño del tallo de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido miPEP, o bien en relación con el tamaño del tallo de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

15 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que el número de hojas se incrementa en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el número de hojas de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido miPEP, o bien en relación con el número de hojas de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

20 En una realización, la invención se refiere al uso tal como se definió con anterioridad, en el que el tamaño de las hojas aumenta en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el tamaño de las hojas de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido miPEP, o bien en relación al tamaño de las hojas de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

25 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que el número de raíces se incrementa en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el número de raíces de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido miPEP, o bien en relación con el número de raíces de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

En una realización, la invención se refiere al uso tal como se definió con anterioridad, en el que la longitud de las raíces aumenta en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con la longitud de las raíces de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido miPEP, o bien en relación con la longitud de las raíces de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

30 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que el número de flores aumenta en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el número de flores de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido miPEP, o bien en relación con el número de flores de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

35 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que la fecha de floración se adelanta en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en comparación con la fecha de floración de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido miPEP, o bien en relación con la fecha de floración de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

40 En una realización, la invención se refiere al uso como se definió con anterioridad, en el que el tamaño del tallo floral se incrementa en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el tamaño del tallo floral de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido miPEP, o en relación al tamaño del tallo floral de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

45 El aumento de los parámetros que permiten determinar y cuantificar el crecimiento de la planta en la que se ha introducido el miPEP (como el tamaño del tallo, el número y tamaño de las hojas, o el número y la longitud de las raíces) se demuestra preferiblemente por comparación con una planta idéntica (es decir, una planta de la misma especie y/o variedad), de la misma edad y cultivada en las mismas condiciones pero en la que no se ha introducido un miPEP.

50 La invención también se refiere al uso de un miPEP introducido por vía exógena en una planta para favorecer su crecimiento, donde dicho miPEP está codificado por el transcrito primario, introducido artificialmente en la planta, de un miR, dicho transcrito primario, dicho miR y dicho miPEP están naturalmente ausentes en la planta, en donde dicho miPEP es capaz de modular la acumulación de dicho miR en dicha planta, cuyo miR regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, en particular las raíces, el tallo, las hojas o las flores.

En una realización particular, dicho transcrito primario de miR, el miR y dicho miPEP se introducen en la planta

utilizando un vector.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para favorecer el crecimiento de una planta, que comprende una etapa de introducción de un miPEP en una planta por vía exógena, estando dicho miPEP también naturalmente presente en dicha planta, siendo dicho miPEP introducido por vía exógena un péptido de 3 a 100 aminoácidos, en particular de 4 a 100 aminoácidos, cuya secuencia comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de dicho miPEP naturalmente presente, cuya secuencia del miPEP naturalmente presente está codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' sobre el transcrito primario de un miR, siendo dicho miPEP capaz de modular la acumulación de dicho miR, cuyo miR regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, especialmente las raíces, el tallo, las hojas o las flores, siendo la suma de la cantidad de dicho miPEP introducido por vía exógena y la de dicho miPEP naturalmente presente estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP naturalmente presente.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: NAC1 (Nº de acceso AT1G56010.1), NAC4 (Nº de acceso AT5G07680.1), NAC5 (Nº de acceso AT5G61430.1), CUC1 (Nº de acceso AT3G15170.1) y CUC2 (Nº de acceso AT5G53950.1).

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicho miARN es miR164a, en particular, en el que dicho miR164a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 1.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicho miARN es miR164a, en particular, en el que dicho miR164a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 1, y dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: NAC1 (Nº de acceso AT1G56010.1), NAC4 (Nº de acceso AT5G07680.1), NAC5 (Nº de acceso AT5G61430.1), CUC1 (Nº de acceso AT3G15170.1) y CUC2 (Nº de acceso AT5G53950.1).

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP es miPEP164a, en particular, en el que dicho miPEP164a tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 2.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicho gen, implicado en el desarrollo de partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: REVOLUTA (Nº de acceso AT5G60690), PHABULOSA (Nº de acceso AT2G34710), PHAVOLUTA (Nº de acceso AT1G30490), ATHB-8 (Nº de acceso AT4G32880) y ATHB-15 (Nº de acceso AT1G52150).

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicho miARN es miR165a, en particular, en el que dicho miR165a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 5.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicho miARN es miR165a, en particular, en el que dicho miR165a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 5, y dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: REVOLUTA (Nº de acceso AT5G60690), PHABULOSA (Nº de acceso AT2G34710), PHAVOLUTA (Nº de acceso AT1G30490), ATHB-8 (número de registro AT4G32880) y ATHB-15 (número de registro AT1G52150).

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP es miPEP165a, en particular, en el que dicho miPEP165a tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 6.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: TCP3 (Número de acceso AT1G53230.1) y TCP4 (número de acceso AT3G15030.1).

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicho miARN es miR319a, en particular, en el que dicho miR319a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en SEQ ID NO: 9.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicho miARN es miR319a, en particular, en el que dicho miR319a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 9, y dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: TCP3 (número de acceso AT1G53230.1) y TCP4 (número de acceso AT3G15030.1).

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP es miPEP319a, en particular, en el que dicho miPEP319a tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 10.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicha planta es una planta crucífera como *Arabidopsis thaliana*, una planta leguminosa como *Glycine max* (soja), *Medicago truncatula* y *Medicago sativa* (alfalfa) o una planta solanácea como *Nicotiana benthamiana* (tabaco), *Solanum tuberosum* (patata), *Solanum lycopersicum* (tomate) o *Solanum melongena* (berenjena).

- 5 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicha planta es una planta crucífera.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicha planta es *Arabidopsis thaliana*.

- 10 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicha planta es una planta crucífera y el miR es miR164a.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicha planta es una planta crucífera y el miR es miR165a.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicha planta es una planta crucífera y el miR es miR319a.

- 15 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, para favorecer el crecimiento de una planta de *Arabidopsis thaliana*, en el que el miPEP164a se introduce por vía exógena en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, dicho miPEP164a estando presente también naturalmente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, siendo dicho miPEP164a introducido por vía exógena un péptido que comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de dicho miPEP164a naturalmente presente, cuyo miPEP164a naturalmente presente es
20 un péptido de 3 a 100, en particular de 4 a 100 aminoácidos, cuya secuencia está codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de miR164a, siendo capaz dicho miPEP164a de incrementar la acumulación de dicho miR164a, cuyo miR164a regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de partes vegetativas o reproductivas de *Arabidopsis thaliana*, siendo la suma de la cantidad de dicho miPEP164a introducido por vía exógena y la de dicho miPEP164a naturalmente presente estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP164a naturalmente presente.
25

- En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, para favorecer el crecimiento de una planta de *Arabidopsis thaliana*, en el que el miPEP165a se introduce por vía exógena en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, dicho miPEP165a estando presente también naturalmente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, siendo dicho miPEP165a introducido por vía exógena un péptido que comprende o consiste en
30 una secuencia idéntica a la de dicho miPEP165a naturalmente presente, cuyo miPEP165a naturalmente presente es un péptido de 3 a 100 aminoácidos, en particular de 4 con 100 aminoácidos, cuya secuencia está codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de miR165a, siendo capaz dicho miPEP165a de incrementar la acumulación de dicho miR165a, cuyo miR165a regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de partes vegetativas o reproductivas de *Arabidopsis thaliana*, siendo la suma de la cantidad de dicho miPEP165a introducido por vía exógena y la de dicho miPEP165a naturalmente presente estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP165a naturalmente presente.
35

- En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, para favorecer el crecimiento de una planta de *Arabidopsis thaliana*, en el que el miPEP319a se introduce por vía exógena en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, estando dicho miPEP319a también naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, siendo dicho miPEP319a introducido por vía exógena un péptido que comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de dicho miPEP319a naturalmente presente, cuyo miPEP319a naturalmente presente es un péptido de 3 a 100 aminoácidos, en particular de 4 con 100 aminoácidos, cuya secuencia está codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de miR319a, siendo capaz dicho miPEP319a de incrementar la acumulación de dicho miR319a, cuyo miR319a regula la expresión de al menos un gen implicado en el
40 desarrollo de partes vegetativas o reproductivas de *Arabidopsis thaliana*, siendo la suma de la cantidad de dicho miPEP319a introducido por vía exógena y la de dicho miPEP319a naturalmente presente estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP319a naturalmente presente.
45

- En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP se introduce externamente en la planta, preferiblemente mediante riego, pulverización o mediante la adición de un fertilizante, un compost, un sustrato de cultivo o un soporte en contacto con la planta.
50

En una realización, la invención se refiere a un proceso como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP se introduce externamente en el grano o la semilla, preferiblemente mediante riego, pulverización o adición de un fertilizante, un compost, un sustrato de cultivo o un soporte en contacto con el grano o la semilla.

- 55 En una realización, la invención se refiere al procedimiento definido con anterioridad, en el que dicho miPEP se usa para tratar la planta en forma de grano o de semilla.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP

se administra a la planta en forma de una composición que comprende 10^{-9} M a 10^{-4} M de dicho miPEP, en particular 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} o 10^{-4} M de dicho miPEP.

5 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP se introduce en la planta por medio de un ácido nucleico que codifica dicho miPEP, introduciéndose dicho ácido nucleico en la planta.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que se aumenta el tamaño del tallo en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el tamaño del tallo de una planta idéntica de la misma edad en la que no se haya introducido miPEP, o bien en relación con el tamaño del tallo de una planta idéntica de la misma edad en la que no se haya introducido dicho miPEP.

10 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que se incrementa el número de hojas en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el número de hojas de una planta idéntica y de la misma edad en la que no se ha introducido miPEP, o bien en relación al número de hojas de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

15 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que el tamaño de las hojas se incrementa en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el tamaño de las hojas de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido miPEP, o bien en relación con el tamaño de las hojas de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

20 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que se aumenta el número de raíces en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el número de raíces de una planta idéntica y de la misma edad en la que no se ha introducido miPEP, o bien en relación con el número de raíces de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

25 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que la longitud de las raíces se incrementa en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con la longitud de las raíces de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido miPEP, o bien en relación con la longitud de las raíces de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que se incrementa el número de flores en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el número de flores de una planta idéntica y de la misma edad en la que no se ha introducido miPEP, o bien en relación con el número de flores de una planta idéntica y de la misma edad en que no se ha introducido dicho miPEP.

30 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que la fecha de floración se adelanta en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en comparación con la fecha de floración de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido miPEP, o bien en relación con la fecha de floración de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

35 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento como se definió con anterioridad, en el que el tamaño del tallo floral se incrementa en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el tamaño del tallo floral de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido miPEP, o en relación al tamaño del tallo floral de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

En otro aspecto, la invención se refiere a una planta en la que se ha introducido un miPEP según el uso o procedimiento para favorecer el crecimiento de una planta descrito con anterioridad.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica que comprende:

a) una etapa de introducción de un ácido nucleico que codifica un miPEP de 3 a 100 aminoácidos, en particular de 4 a 100 aminoácidos en una planta, o en al menos una célula de dicha planta, en condiciones que permitan la expresión de dicho miPEP, estando dicho miPEP también naturalmente presente en dicha planta, siendo dicho miPEP de origen natural un péptido cuya secuencia está codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de un miR, siendo dicho miPEP capaz de modular la acumulación de dicho miR en la planta, cuyo miR regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, en particular las raíces, tallo, hojas o flores, y

b) una etapa de cultivo de la planta, o al menos una célula de dicha planta, obtenidas en la etapa a) en condiciones que permitan obtener una planta transgénica.

50 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que dicha planta transgénica obtenida en la etapa b) tiene un crecimiento mejorado en comparación con una planta idéntica en la que no se ha introducido dicho ácido nucleico.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el cual la etapa a) se lleva a cabo usando un vector que contiene dicho ácido nucleico,

preferiblemente un plásmido.

En una realización, la invención se refiere a un proceso para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que dicho ácido nucleico no comprende la secuencia completa de dicho miR.

5 En una realización, la invención se refiere a un proceso para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que la expresión de dicho ácido nucleico de la etapa a) se coloca bajo el control de un promotor fuerte, preferiblemente un promotor fuerte constitutivo tal como el promotor 35S.

10 En una realización, la invención se refiere a un proceso para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: NAC1 (N° de acceso AT1G56010.1), NAC4 (N° de acceso ATSG07680.1), NAC5 (N° de acceso AT5G61430.1), CUC1 (N° de acceso AT3G15170.1) y CUC2 (N° de acceso AT5G53950.1).

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que dicho miARN es miR164a, en particular, en el que dicho miR164a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 1.

15 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, donde dicho miARN es miR164a, en particular, donde dicho miR164a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 1, y dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: NAC1 (N° de acceso AT1G56010.1), NAC4 (N° de acceso AT5G07680.1), NAC5 (N° de acceso AT5G61430.1), CUC1 (N° de acceso AT3G15170.1) y CUC2 (N° de acceso AT5G53950.1).

20 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP es miPEP164a, en particular, en el que dicho miPEP164a tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 2.

25 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que dicho ácido nucleico introducido en la etapa a) comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 3.

30 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: REVOLUTA (N° de acceso AT5G60690), PHABULOSA (N° de acceso AT2G34710), PHAVOLUTA (N° de acceso AT1G30490), ATHB-8 (N° de acceso AT4G32880) y ATHB-15 (N° de acceso AT1G52150).

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que dicho miARN es miR165a, en particular, en el que dicho miR165a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 5.

35 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, donde dicho miARN es miR165a, en particular, donde dicho miR165a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 5, y dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: REVOLUTA (N° de acceso AT5G60690), PHABULOSA (N° de acceso AT2G34710), PHAVOLUTA (N° de acceso AT1G30490), ATHB-8 (N° de acceso AT4G32880) y ATHB-15 (N° de acceso AT1G52150).

40 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP es miPEP165a, en particular, en el que dicho miPEP165a tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 6.

45 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que dicho ácido nucleico introducido en la etapa a) comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 7.

En una realización, la invención se refiere a un proceso para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona entre el grupo que consiste en: TCP3 (número de acceso AT1G53230.1) y TCP4 (número de acceso AT3G15030.1).

50 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, donde dicho miARN es miR319a, en particular, donde dicho miR319a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 9.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que dicho miARN es miR319a, en particular, en el que dicho miR319a tiene una secuencia de

nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 9, y dicho gen, implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, se selecciona del grupo que consiste en: TCP3 (Nº de acceso AT1G53230.1) y TCP4 (Nº de acceso AT3G15030.1).

5 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento de producción de una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP es miPEP319a, en particular, en el que dicho miPEP319a tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 10.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que dicho ácido nucleico introducido en la etapa a) comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 11.

10 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, donde dicha planta transgénica es una planta crucífera como *Arabidopsis thaliana*, una planta leguminosa como *Glycine max* (soja), *Medicago truncatula* y *Medicago sativa* (alfalfa) o una planta solanácea como *Nicotiana benthamiana* (tabaco), *Solanum tuberosum* (papa), *Solanum lycopersicum* (tomate) o *Solanum melongena* (berenjena).

15 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que dicha planta transgénica es una planta crucífera.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en donde dicha planta transgénica es *Arabidopsis thaliana*.

20 En una realización, la invención se refiere a un proceso para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, que comprende:

a) una etapa de introducción de un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 3, que codifica el miPEP164a que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, en una planta de *Arabidopsis thaliana*, o en al menos una célula de dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, en condiciones que permitan la expresión de miPEP164a, estando dicho miPEP164a también naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, siendo dicho miPEP natural un péptido cuya secuencia está codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de miR164a, siendo dicho miPEP164a capaz de modular la acumulación de dicho miR164, cuyo miR164a regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de partes vegetativas o reproductivas de *Arabidopsis thaliana*, y

30 b) una etapa de cultivo de la planta, o al menos una célula de dicha planta, obtenidas en la etapa a) en condiciones que permitan obtener una planta transgénica de *Arabidopsis thaliana*.

En una realización, la invención se refiere a un proceso para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, que comprende:

35 a) una etapa de introducción de un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7, que codifica el miPEP165a que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6, en una planta de *Arabidopsis thaliana*, o en al menos una célula de dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, en condiciones que permitan la expresión de miPEP165a, estando dicho miPEP165a también naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, siendo dicho miPEP de origen natural un péptido cuya secuencia está codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de miR165a, siendo dicho miPEP165a capaz de modular la acumulación dicho miR165a, cuyo miR165a regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de partes vegetativas o reproductivas de *Arabidopsis thaliana*, y

40 b) una etapa de cultivo de la planta, o al menos una célula de dicha planta, obtenidas en la etapa a) en condiciones que permitan obtener una planta transgénica de *Arabidopsis thaliana*.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, que comprende:

45 a) una etapa de introducción de un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 11, que codifica el miPEP319a que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10, en una planta de *Arabidopsis thaliana*, o en al menos una célula de dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, en condiciones que permitan la expresión de miPEP319a, estando dicho miPEP319a también naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, siendo dicho miPEP de origen natural un péptido cuya secuencia está codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de miR319a, siendo dicho miPEP319a capaz de modular la acumulación dicho miR319a, cuyo miR319a regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de partes vegetativas o reproductivas de *Arabidopsis thaliana*, y

50 b) una etapa de cultivo de la planta, o al menos una célula de dicha planta, obtenidas en la etapa a) en condiciones que permitan obtener una planta transgénica de *Arabidopsis thaliana*.

En una realización, la invención se refiere a un proceso de producción como se definió con anterioridad, en el que dicho miPEP se introduce en la planta a través de un ácido nucleico que codifica dicho miPEP, introduciéndose dicho ácido nucleico en la planta.

5 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento de producción de una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que el tamaño del tallo aumenta en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el tamaño del tallo de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP, o bien en relación con el tamaño del tallo de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

10 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que el número de hojas aumenta en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en comparación con el número de hojas de una planta idéntica de la misma edad en las que no se ha introducido dicho miPEP, o bien en relación con el número de hojas de una planta idéntica de la misma edad en las que no se ha introducido dicho miPEP.

15 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que el tamaño de las hojas aumenta en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el tamaño de las hojas de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP, o en relación al tamaño de las hojas de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

20 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que el número de raíces se incrementa en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en comparación con el número de raíces de una planta idéntica de la misma edad en las que no se ha introducido dicho miPEP, o bien en relación con el número de raíces de una planta idéntica de la misma edad en las que no se ha introducido dicho miPEP.

25 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que la longitud de las raíces aumenta en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en comparación con la longitud de las raíces de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP, o en relación con la longitud de las raíces de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

30 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que el número de flores se incrementa en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el número de flores de una planta idéntica de la misma edad en las que no se ha introducido dicho miPEP, o bien en relación con el número de flores de una planta idéntica de la misma edad en las que no se ha introducido dicho miPEP.

35 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que la fecha de floración se adelanta en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con la fecha de floración de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP, o en relación con la fecha de floración de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

40 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento de producción de una planta transgénica como se definió con anterioridad, en el que el tamaño del tallo de la flor aumenta en la planta en la que se ha introducido dicho miPEP en relación con el tamaño del tallo floral de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP, o bien en relación con el tamaño del tallo floral de una planta idéntica de la misma edad en la que no se ha introducido dicho miPEP.

En un aspecto, la invención también se refiere a una planta transgénica obtenida mediante el procedimiento de producción definido con anterioridad.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a una planta en la que se ha introducido un miPEP según el uso o el procedimiento para promover el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición, en particular una composición fitosanitaria, que comprende el miPEP164a como sustancia activa, preferentemente dicho miPEP164a consiste en la SEQ ID NO: 1.

50 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición, en particular una composición fitosanitaria, que comprende el miPEP165a como sustancia activa, preferentemente dicho miPEP165a consiste en la SEQ ID NO: 5.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición, en particular una composición fitosanitaria, que comprende el miPEP319a como sustancia activa, preferentemente dicho miPEP319a consiste en la SEQ ID NO: 9.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición como se definió con anterioridad, en la que dicho miPEP164a está en una concentración de 10^{-9} M a 10^{-4} M, en particular 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} o 10^{-4} M.

Preferiblemente, una composición como se definió con anterioridad tiene una concentración de 10^{-8} M a 10^{-5} M para la aplicación mediante riego o pulverización sobre la planta.

- 5 De forma complementaria, se pueden contemplar composiciones más o menos concentradas para el tratamiento de la planta con el miPEP. Por ejemplo, y de manera no limitativa, se pueden utilizar composiciones más concentradas que comprenden 10^{-1} M a 10^{-3} M, en particular 10^{-2} M de miPEP, en el caso de que el miPEP introducido por vía exógena se administre a la planta por expansión.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición como se definió con anterioridad, que comprende además un excipiente, un diluyente o un disolvente.

- 10 En una realización, la invención se refiere a una composición como se definió con anterioridad formulada para formar un recubrimiento.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende en combinación una cantidad de semillas de una planta y una cantidad de un péptido cuya secuencia comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de un miPEP naturalmente presente en dicha planta.

- 15 En una realización, la invención se refiere a una composición que comprende en combinación una cantidad de semillas de una planta crucífera, en particular *A. thaliana*, y una cantidad de un péptido cuya secuencia comprende o consiste en una secuencia idéntica a la del miPEP164a.

En una realización, la invención se refiere a una composición que comprende en combinación una cantidad de semillas de una planta crucífera, en particular *A. thaliana*, y una cantidad de un péptido cuya secuencia comprende o consiste en una secuencia idéntica a la del miPEP165a.

- 20 En una realización, la invención se refiere a una composición que comprende en combinación una cantidad de semillas de una planta crucífera, en particular *A. thaliana*, y una cantidad de un péptido cuya secuencia comprende o consiste en una secuencia idéntica a la del miPEP319a.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición como se definió con anterioridad, que comprende además un excipiente, un diluyente o un disolvente.

- 25 En una realización, la invención se refiere a una composición como se definió con anterioridad formulada para formar una semilla recubierta.

El recubrimiento se puede realizar según los procedimientos convencionalmente utilizados en la industria agroalimentaria y se puede obtener utilizando un material apto para desintegrarse en un disolvente o en la tierra, como un aglutinante o arcilla.

- 30 Según la invención, el recubrimiento puede usarse, por ejemplo, para conferir propiedades particulares a una composición de miPEP, o también a una composición de semillas en combinación con un miPEP.

En otro aspecto, la invención se refiere a un protocolo para producir un péptido recombinante, cuya secuencia comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de un miPEP como se definió con anterioridad, que comprende una etapa de transformación de un organismo con un vector de expresión que codifica dicho péptido recombinante.

- 35 En una realización, dicho organismo se selecciona del grupo que comprende bacterias, levaduras, hongos (distintos de las levaduras), células animales, plantas y animales.

En una realización, dicho organismo es *Escherichia coli*.

En particular, la invención se refiere a un protocolo para producir un péptido recombinante como se definió con anterioridad, que comprende las siguientes etapas:

- 40 - el ácido nucleico que codifica dicho péptido recombinante está unido a un ácido nucleico que codifica una etiqueta, como GST,
- el vector de expresión que contiene dicho ácido nucleico que codifica dicho péptido recombinante se introduce en la bacteria *E. coli*,
- 45 - la bacteria *E. coli* que contiene el vector de expresión se cultiva en medio LB, preferiblemente hasta una DO comprendida entre 0,2 y 0,4,
- la producción del péptido recombinante se induce con IPTG, preferiblemente durante 4 a 5 horas,
- las bacterias *E. coli* se centrifugan y lisan,
- el sobrenadante se filtra,

- dicho péptido recombinante se purifica en una columna de afinidad de glutatión sefarosa,
- si es necesario, se escinde el GST con una proteasa.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo que reconoce específicamente miPEP164a, en particular dicho miPEP164a que consiste en la SEQ ID NO: 2.

- 5 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo que reconoce específicamente miPEP165a, en particular dicho miPEP165a que consiste en la SEQ ID NO: 6.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo que reconoce específicamente miPEP319a, en particular dicho miPEP319a que consiste en la SEQ ID NO: 10.

- 10 Dicho anticuerpo puede obtenerse mediante un procedimiento conocido por los expertos en la técnica tales como, por ejemplo, inyectando dicho miPEP164a en un animal no humano para desencadenar una reacción de inmunización y la producción de anticuerpos por dicho animal.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento de inmunolocalización de miPEP164a que comprende una etapa de marcar una muestra biológica de una planta con un anticuerpo que reconoce específicamente dicho miPEP164a.

- 15 En otro aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento de inmunolocalización de miPEP165a que comprende una etapa de marcar una muestra biológica de una planta con un anticuerpo que reconoce específicamente dicho miPEP165a.

- 20 En otro aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento de inmunolocalización de miPEP319a que comprende una etapa de marcar una muestra biológica de una planta con un anticuerpo que reconoce específicamente dicho miPEP319a.

Las secuencias de miPEP164a, de su marco de lectura abierto, de miR164a y de los transcritos primarios de miR164a en *Arabidopsis thaliana* se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

miR164a	uggagaagcagggcagcugca	SEQ ID NO : 1
miPEP164a	MPSWHGMVLLPYVKHTHASTHTHTHNIYGC ACELVFH	SEQ ID NO : 2
miORF164a	ATGCCATCATGGCATGGTATGGTTCTTTTGC CTTACGTAAAACACACTCACGCCAGCACAC ACACACACACACATAACATATACGGATGTG CGTGTGAGCTAGTCTTCCATTAA	SEQ ID NO : 3
pri-miR164a	AGACAAGCCCCCACACTAAAAAACAGTAA TATGGAATAAAAAAAGCTTTCAAACTTA GCAGTTATTAGACAAGGTATTGTTTGGCCCT AGCTAGCGATCGTTTAGCTCTCTTCACTCTC TCACTTTTTTAGTTCAACCCTTCTTTTGCGTG AGATGCCATCATGGCATGGTATGGTTCTTTT GCCTTACGTAAAACACACTCACGCCAGCAC	SEQ ID NO : 4

	ACACACACACACACATAACATATACGGATG TGCGTGTGAGCTAGTCTTCCATTAATGCAAT CTTTGGGCCTATATATACAAACCTTTCCATA ACCAAAGTTCTCATACTACAAACGCCCCCTC ATGTGCTTGGAATGCGGGTGAGAATCTCC ATGTTGGAGAAGCAGGGCACGTGCAAACCA ACAAACACGAAATCCGTCTCATTTGCTTATT TGCACGTACTTAACCTTCTCCAACATGAGCTC TTCACCC	
--	--	--

Las secuencias de miPEP165a, de su marco de lectura abierto, de miR164a y de los transcritos primarios de miR165a en *Arabidopsis thaliana* se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

miR165a	ucggaccagguucauuccccc	SEQ ID NO : 5
miPEP165a	MRVKLFQLRGMLSGSRIL	SEQ ID NO : 6
miORF165a	ATGAGGGTTAAGCTATTTTCAGTTGAGGGGA ATGTTGTCTGGATCGAGGATATTATAG	SEQ ID NO : 7
pri-miR165a	CTAGGGTTTAGGAATGACGACCTGTTTCTGT TGTGTCTTATTAAAAGCCCATCTTCGTCTCC GCCACTCATCATTCCTCATCATAACACCAT CATCACCATTACCAACCTCTCTCTCTCTCT CCTCTATCACTCTCTACAACAAAAATTTGTG AATCTGCTAAGATCGATTATCATGAGGGTT AAGCTATTTTCAGTTGAGGGGAATGTTGTCT GGATCGAGGATATTATAGATATATACATGT GTATGTTAATGATTCAAGTGATCATAGAGA GTATCCTCGGACCAGGCTTCATCCCCCCCCAA CATGTTATTGCCTCTGATCACCATTATTGT TACATTTTTTTTTTGTTAATTAATTGCGCAA TTACAAAAGCTTGGTTTTTGTGATGACTTTG AATCTTTCTTGCAATGGCTTCTTAAGAGTAGA TTTACGGATCCGTCTATGCTTTTTTGCTTTTTG TTTCGTTTATTTGTATTTAAAC	SEQ ID NO : 8

5

Las secuencias de miPEP319a, de su marco de lectura abierto, de miR319a y de los transcritos primarios de miR319a en *Arabidopsis thaliana* se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

miR319a	uuggacugaaggagcuccu	SEQ ID NO : 9
miPEP319a	MNIHTYHHLLFPSLVFHQSSDVPNALSLHIHT YEYIIVVIDPFRITLAFR	SEQ ID NO : 10

miORF319a	ATGAATATACATACATACCATCATCTTCTTT TCCCATCTCTAGTTTTTCATCAATCTTCTGAT GTTCCAAACGCTCTATCTCTTCATATACATA CATACGAATATATTATTGTTGTCATAGATCC ATTTAGAATCACTTTAGCTTTTAGATGA	SEQ ID NO : 11
pri-miR319a	TTGTATCCGCAGTGTATTTCTCGCATCTAC CATCCCTTTTCTACGCCTCTCTCCCTCTCTCT CTTCTCCATCAAATCTTGTTTTGTTCAAAC TCTCTCTCTCTCATCTATTCTCTCCATACAAT ACATGAATATACATACATACCATCATCTTCT TTCCCATCTCTAGTTTTTCATCAATCTTCTG ATGTTCCAAACGCTCTATCTCTTCATATACA TACATACGAATATATTATTGTTGTCATAGAT CCATTTAGAATCACTTTAGCTTTTAGATGAG ATCTAGGGTTTCTTTGTTTTCTTTCAAATTTT GTTGCATATTCTTCTAAATCATGGTTTTTCG CTTGCTAGGTTATAGATCCATGCAAATATG GAGTAGATGTACAAACACACGCTCGGACGC ATATTACACATGTTTCATACACTTAATACTCG CTGTTTTGAATTGATGTTTTAGGAATATATA TGTAGAGAGAGCTTCCTTGAGTCCATTAC AGGTCGTGATATGATTCAATTAGCTTCCGAC TCATTCATCCAAATACCGAGTCGCCAAAAT TCAAAC TAGACTCGTTAAATGAATGAATGA TGCGGTAGACAAATTGGATCATTGATTCTCT TTGATTGGACTGAAGGGAGCTCCCTCT	SEQ ID NO : 12

- 5 El objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a micropéptidos (péptidos codificados por microARN o “miPEP”) y su uso para modular la expresión de genes.

Los microARN (miR) son pequeños ARN no codificantes, de aproximadamente 21 nucleótidos después de la maduración, que controlan la expresión de genes diana a nivel postranscripcional, degradando el ARNm diana o inhibiendo su traducción. Los MiR se encuentran en plantas y animales.

- 10 Los genes diana son a menudo genes clave para los procesos de desarrollo. Codifican, por ejemplo, factores de transcripción o proteínas del proteasoma.

Se sabe poco sobre la regulación de la expresión de los miR, pero se sabe en particular que esto implica, como la mayoría de los genes codificadores, una ARN polimerasa II: esta enzima produce un transcrito primario, llamado “pri-miR”, que luego se madura mediante un complejo de proteínas que contiene en particular enzimas del tipo Dicer. Esta maduración conduce en primer lugar a la formación de un precursor de miR llamado “pre-miR”, que tiene una estructura

- 15

secundaria en forma de tallo-bucle que contiene miR y su secuencia miR* complementaria. Luego, el precursor maduro, lo que conduce a la formación de un ARN bicatenario más corto que contiene el miR y el miR*. El miR es absorbido luego por el complejo RISC que escinde el ARNm del gen diana o inhibe su traducción.

- 5 Además, se ha demostrado que la presencia de intrones en el transcrito primario del microARN aumenta la expresión del microARN maduro (Schwab et al., EMBO Rep., 14(7): 615-21, 2013). Sin embargo, debido a dificultades experimentales, los transcritos primarios de microARN, o pri-miR, están poco estudiados.

- 10 Aproximadamente el 50% de los genes eucariotas tienen, dentro de su región 5'UTR (región no traducida 5') aguas arriba de la secuencia codificante, pequeños marcos de lectura abiertos. Estos pequeños marcos de lectura abiertos (o "uORF" para ORF ascendentes) pueden desempeñar un papel de regulador de la traducción, principalmente en cis, al modular la unión y la velocidad de los ribosomas en el ARNm, pero también en trans según un mecanismo aún desconocido, a través de péptidos codificados por dichos uORFs (Combiér et al., Gene Dev, 22: 1549-1559, 2008). Por definición, los uORF están presentes corriente arriba de los genes codificantes.

- 15 Recientemente, también se han descubierto pequeños ORF en ARN no codificantes intergénicos largos (lincARN) cuya función putativa, si existe, se desconoce (Ingolia et al., Cell, 147 (4): 789-802, 2011; Guttman & Rinn, Nature, 482 (7385): 339-46, 2012).

Sin embargo, todavía no se ha informado de ningún ejemplo sobre la existencia de ORF que codifiquen péptidos dentro de microARN no codificantes. Hasta ahora, los microARN, y por extensión su transcrito primario, siempre se han considerado, en virtud de su modo de acción particular, como ARN reguladores no codificantes que no producen ningún péptido.

- 20 Uno de los aspectos del objeto de la solicitud FR 13 60727 es proporcionar péptidos capaces de modular la expresión de microARN.

Otro aspecto del objeto de la solicitud FR 13 60727 es proporcionar un medio que permita modular la expresión de uno o más genes diana de un microARN.

- 25 El objeto de la solicitud FR 13 60727 tiene la ventaja de permitir un control más fácil y eficaz de la expresión de genes diana de los microARN, utilizando un medio distinto al microARN.

El objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere, por tanto, a un procedimiento para detectar e identificar un micropéptido (miPEP) codificado por una secuencia de nucleótidos contenida en la secuencia del transcrito primario de un microARN, que comprende:

- 30 - a) una etapa de detección de un marco de lectura abierto de 15 a 303 nucleótidos contenido en la secuencia del transcrito primario de dicho microARN, luego

- b) una etapa de comparación entre:

- la acumulación de dicho microARN en una célula eucariota específica que expresa dicho microARN,

- 35 en presencia de un péptido codificado por una secuencia de nucleótidos idéntica o degenerada con respecto a la de dicho marco de lectura abierto, estando dicho péptido presente en la célula independientemente de la transcripción del transcrito primario de dicho microARN, y

- la acumulación de dicho microARN en una célula eucariota del mismo tipo que la célula eucariota determinada con anterioridad mencionada que expresa dicho microARN, en ausencia de dicho péptido,

- 40 en donde la modulación de la acumulación de dicho microARN en presencia de dicho péptido en relación con la acumulación de dicho microARN en ausencia de dicho péptido indica la existencia de un micropéptido codificado por dicho marco de lectura abierto.

En una primera etapa, el procedimiento de detección e identificación de un micropéptido consiste, por tanto, en detectar en el transcrito primario de un microARN la existencia de un marco de lectura abierto que potencialmente codifica un péptido.

- 45 La segunda etapa permite caracterizar dicho péptido, es decir, determinar si dicho péptido corresponde a un péptido realmente producido en la célula, buscando un efecto de dicho péptido sobre la acumulación de dicho microARN.

Para demostrar un efecto del péptido sobre la acumulación de microARN, se introduce una cantidad importante de péptido en una primera célula que expresa dicho microARN. Luego se mide la acumulación de microARN en esta primera célula y se compara con la acumulación de microARN en una segunda célula idéntica a la primera, pero que no contiene dicho péptido.

- 50 La observación de una variación en las cantidades de microARN entre células en presencia y ausencia del péptido indica, por tanto, (i) que hay un péptido codificado en el transcrito primario de dicho microARN, (ii) que la secuencia

de este péptido está codificado por el marco de lectura abierto identificado en el transcrito primario de dicho microARN, y (iii) que dicho péptido actúa sobre la acumulación de dicho microARN.

- 5 Por lo tanto, el tema de la solicitud FR 13 60727 se basa en la doble observación inesperada realizada por los inventores de que, por un lado, existen marcos de lectura abiertos capaces de codificar micropéptidos presentes en los transcritos primarios de microARN, y por otro lado, que dichos micropéptidos son capaces de modular la acumulación de dichos microARN.

En la solicitud FR 13 60727, las expresiones “microARN”, “microARN no codificante” y “miR” son equivalentes y se pueden usar indistintamente. Definen pequeñas moléculas de ARN de aproximadamente 21 nucleótidos, que no se traducen y no conducen a un péptido ni a una proteína.

- 10 Sin embargo, en esta forma madura, los microARN realizan una función reguladora de ciertos genes a través de mecanismos postranscripcionales como, por ejemplo, a través del complejo RISC.

- 15 La transcripción primaria de microARN o “pri-miR” corresponde a la molécula de ARN obtenida directamente de la transcripción de la molécula de ADN. Generalmente, este transcrito primario sufre una o más modificaciones postranscripcionales, que conducen, por ejemplo, a una estructura particular del ARN o una escisión de ciertas partes del ARN por fenómenos de empalme, y que conducen a la forma precursora de microARN o “pre-miR” y luego a la forma madura de microARN o “miR”.

- 20 Los términos “micropéptidos” y “miPEP” (microRNA encoded PEPTides) son equivalentes y se pueden usar indistintamente. Definen un péptido que está codificado por un marco de lectura abierto presente en el transcrito primario de un microARN, y que es capaz de modular la acumulación de dicho microARN. Los micropéptidos en el sentido de la solicitud FR 13 60727 no deben entenderse como necesariamente péptidos de pequeño tamaño, en la medida en que “micro” no se corresponda con el tamaño del péptido.

Dada la degeneración del código genético, el mismo micropéptido puede estar codificado por varias secuencias de nucleótidos. Estas secuencias de nucleótidos, diferentes entre sí en al menos un nucleótido pero que codifican el mismo péptido, se denominan “secuencias degeneradas”.

- 25 Las expresiones “marco de lectura abierto” u “ORF” son equivalentes y pueden utilizarse indistintamente. Corresponden a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ADN o ARN que potencialmente puede codificar un péptido o una proteína: dicho marco de lectura abierto comienza con un codón de inicio, seguido de una serie de codones y termina con un codón de terminación.

- 30 En la solicitud FR 13 60727, los ORF pueden denominarse específicamente “miORF” cuando están presentes en los transcritos primarios de microARN.

En la solicitud FR 13 60727, por “acumulación” se entiende la producción de una molécula, como un microARN o un micropéptido, en la célula.

Así, la “modulación” de la acumulación de una molécula en una célula corresponde a una modificación de la cantidad de esta molécula presente en la célula.

- 35 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para detectar e identificar un miPEP como se definió con anterioridad, en el que la modulación de la acumulación de dicho microARN es una disminución o aumento de la acumulación de dicho microARN, en particular un aumento.

- 40 Una “disminución en la acumulación” corresponde a una disminución en la cantidad de dicha molécula en la célula. Por el contrario, un “aumento de acumulación” corresponde a un aumento de la cantidad de dicha molécula en la célula.

En una forma de realización ventajosa, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento de detección e identificación de un miPEP según se definió con anterioridad, en el que la modulación de la acumulación de dicho microARN es un aumento en la acumulación de dicho microARN.

- 45 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para la detección e identificación de un miPEP como se definió con anterioridad, en el que la presencia de dicho péptido en la célula da como resultado:

- la introducción en la célula de un ácido nucleico que codifica dicho péptido, o
- la introducción en la célula de dicho péptido.

- 50 Para caracterizar un miPEP, es necesario tener un modelo celular que exprese un microARN y en el que esté presente dicho péptido por ensayar. Para ello, es posible introducir un péptido en la célula, ya sea poniendo la célula en contacto con dicho péptido, o introduciendo en la célula un ácido nucleico que codifique dicho péptido, cuyo ácido nucleico se traducirá luego en péptido en el interior de la célula.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para detectar e identificar un miPEP como se definió con anterioridad, en el que dicho marco de lectura abierto de la etapa a) está contenido en la parte 5' o 3' de dicho transcrito primario del microARN, preferiblemente en la parte 5'.

5 Las partes 5' o 3' del transcrito primario de microARN corresponden a las partes terminales de la molécula de ARN que se escinden durante la maduración del microARN.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para la detección e identificación de un miPEP como se definió con anterioridad, en el que dicho microARN está presente en una célula vegetal salvaje.

En la solicitud FR 13 60727, una célula vegetal salvaje corresponde a una célula vegetal que no ha sido modificada genéticamente por el hombre.

10 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para detectar e identificar un miPEP como se definió con anterioridad, en el que dicha célula eucariota determinada y dicha célula eucariota del mismo tipo que la célula eucariota determinada con anterioridad mencionada, utilizadas en la etapa b), son células vegetales, preferiblemente células de *Medicago truncatula* o *Arabidopsis thaliana*.

15 En el procedimiento de detección e identificación de un micropéptido como se definió con anterioridad, después de haber identificado un ORF capaz de codificar un péptido en el transcrito primario de un microARN, es necesario tener un modelo celular que tiene dicho microARN y dicho péptido, para poder demostrar un posible efecto del péptido sobre dicho microARN.

Por tanto, son posibles dos opciones:

20 - el modelo celular en el que se identificó el miORF y en el que se demuestra el efecto del péptido sobre el miR son idénticos, o

- el modelo celular en el que se identificó el miORF y en el que se demuestra el efecto del péptido sobre el miR son diferentes.

25 En la primera opción, el modelo celular utilizado para observar un efecto del péptido es el mismo que en el que se aisló el transcrito primario de dicho microARN. En este modelo celular, las células eucariotas determinadas contienen en forma natural dicho microARN y solo debe introducirse en estas células el péptido por ensayar. En este contexto, dicho microARN se califica como "de origen endógeno" porque existe en forma natural en las células. Sin embargo, en una célula se pueden añadir otras copias de un microARN de origen endógeno, por ejemplo, introduciendo en la célula un vector que codifique dicho microARN de origen endógeno.

30 En la segunda opción, el modelo celular utilizado para observar un efecto del péptido es diferente de aquel en el que se aisló el transcrito primario de dicho microARN. En este modelo celular, las células eucariotas determinadas no contienen ni el microARN ni el péptido por ensayar. Por tanto, estos dos elementos deben introducirse en estas células. En este contexto, dicho microARN se califica como "de origen exógeno" porque no existe en forma natural en las células.

35 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para detectar e identificar un miPEP como se definió con anterioridad, en el que dicho microARN es de origen endógeno en dicha célula eucariota y en dicha célula eucariota del mismo tipo que la célula eucariota determinada antes mencionada, utilizada en la etapa b).

40 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para detectar e identificar un miPEP como se definió con anterioridad en el que dicho microARN es de origen exógeno en dicha célula eucariota y en dicha célula eucariota del mismo tipo que la célula eucariota determinada antes mencionada, utilizada en la etapa b), donde dichas células eucariotas contienen un vector que permite la expresión de dicho microARN.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para detectar e identificar un miPEP como se definió con anterioridad, en el que la acumulación de dicho microARN se determina introduciendo una RT-PCR cuantitativa o una transferencia Northern.

45 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para detectar e identificar un miPEP como se definió con anterioridad, en el que la acumulación de dicho microARN se determina implementando un chip de ADN o ARN.

La acumulación de dicho microARN se puede determinar mediante técnicas de biología molecular que permitan el ensayo de moléculas específicas de ácido nucleico.

50 En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 también se refiere a un procedimiento para detectar e identificar un microARN cuya secuencia de transcrito primario contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un miPEP, que comprende:

- a) una etapa de detección de un marco de lectura abierto de 15 a 303 nucleótidos contenido en la secuencia del transcrito primario de dicho microARN, luego

- b) una etapa de comparación entre:

- la acumulación de dicho microARN en una célula eucariota específica que expresa dicho microARN,

5 en presencia de un péptido codificado por una secuencia de nucleótidos idéntica o degenerada con respecto a la de dicho marco de lectura abierto, estando dicho péptido presente en la célula independientemente de la transcripción del transcrito primario de dicho microARN, y

- la acumulación de dicho microARN en una célula eucariota, del mismo tipo que la célula eucariota determinada con anterioridad mencionada que expresa dicho microARN, en ausencia de dicho péptido,

10 en donde, una modulación de la acumulación de dicho microARN en presencia de dicho péptido con relación a la acumulación de dicho microARN en ausencia de dicho péptido indica la existencia de un microARN cuyo transcrito primario contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un micropéptido.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para detectar e identificar un microARN como se definió con anterioridad, en el que la modulación de la acumulación de dicho microARN es una
15 disminución o aumento de la acumulación de dicho microARN, en particular un aumento.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para la detección e identificación de un microARN como se definió con anterioridad, en el que la presencia de dicho péptido en la célula resulta:

- de la introducción en la célula de un ácido nucleico que codifica dicho péptido, o

- de la introducción en la célula de dicho péptido.

20 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para detectar e identificar un microARN como se definió con anterioridad, en el que dicho marco de lectura abierto de la etapa a) está contenido en la parte 5' o 3' de dicho transcrito primario del microARN, preferiblemente en la parte 5'.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para detectar e identificar un microARN como se definió con anterioridad, en el que dicho microARN está presente en una célula de planta salvaje.

25 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para detectar e identificar un microARN como se definió con anterioridad, en el que dicha célula eucariota y dicha célula eucariota del mismo tipo que la célula eucariota determinada antes mencionada, usada en la etapa b) son células vegetales, preferiblemente células de *Medicago truncatula*.

30 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para detectar e identificar un microARN como se definió con anterioridad, en el que dicho microARN es de origen endógeno en dicha célula eucariota y en dicha célula eucariota del mismo tipo que la célula eucariota determinada antes mencionada, utilizada en la etapa b).

35 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para detectar e identificar un microARN como se definió con anterioridad, en el que dicho microARN es de origen exógeno en dicha célula eucariota y en dicha célula eucariota del mismo tipo que la célula eucariota determinada antes mencionada, utilizada en la etapa b), en donde dichas células eucariotas contienen un vector que permite la expresión de dicho microARN.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para la detección e identificación de un microARN como se definió con anterioridad, en el que la acumulación de dicho microARN se determina usando una RT-PCR cuantitativa o una transferencia Northern.

40 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para la detección e identificación de un microARN como se definió con anterioridad, en el que la acumulación de dicho microARN se determina usando implementa un chip de ADN o ARN.

En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un miPEP obtenida mediante la implementación del procedimiento definido con anterioridad.

45 Otro aspecto del objeto de la solicitud FR 13 60727 también se refiere a un miPEP de 4 a 100 aminoácidos, preferiblemente de 4 a 40 aminoácidos, codificada por una secuencia de nucleótidos contenida en el transcrito primario de un microARN, siendo dicho miPEP capaz de modular la acumulación de dicho microARN en una célula eucariota.

Además, debe tenerse en cuenta que se pueden identificar varios miORFS en el transcrito primario de un microARN, lo que indica que una transcripción de microARN primaria puede codificar potencialmente múltiples miPEP.

50 También debe tenerse en cuenta que el efecto de un miPEP es generalmente específico para un único microARN, es

decir, el que resulta del transcrito primario que codifica dicho miPEP.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un miPEP como se definió con anterioridad, estando contenida dicha secuencia de nucleótidos en la parte 5' o 3' de dicha transcripción primaria de un microARN, de preferiblemente en la parte 5'.

- 5 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un miPEP como se definió con anterioridad, correspondiendo dicha secuencia de nucleótidos al primer marco de lectura abierto presente en dicha transcripción primaria de un microARN.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un miPEP como se definió con anterioridad, teniendo dicho miPEP un punto isoeléctrico básico, preferiblemente mayor que 8.

- 10 En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un miPEP como se definió con anterioridad.

En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un vector que comprende al menos una molécula de ácido nucleico como se definió con anterioridad.

En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 también se refiere al uso de al menos:

- 15 - un miPEP como se definió con anterioridad,
- un ácido nucleico que codifica dicho miPEP, o
- un vector que contiene dicho ácido nucleico,

- 20 para modular la expresión de al menos un gen en una célula eucariota determinada, siendo dicha célula eucariota determinada capaz de expresar un microARN, cuyo transcrito primario contiene al menos una secuencia de nucleótidos que codifica dicho al menos un miPEP y cuya acumulación está modulada por dicho al menos un miPEP, estando regulada la expresión de dicho al menos un gen por dicho microARN.

En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 también se refiere al uso de al menos:

- 25 - un miPEP de 4 a 100 aminoácidos, preferiblemente de 4 a 40 aminoácidos, codificada por una secuencia de nucleótidos contenida en el transcrito primario de un microARN, siendo dicho miPEP capaz de modular la acumulación de dicho microARN en una célula eucariota,
- un ácido nucleico que codifica dicho miPEP, o
- un vector que contiene dicho ácido nucleico,

- 30 para modular la expresión de al menos un gen en una célula eucariota determinada, siendo dicha célula eucariota determinada capaz de expresar un microARN, cuya transcripción primaria contiene al menos una secuencia de nucleótidos que codifica dicho al menos un miPEP y cuya acumulación está modulada por dicha al menos un miPEP, estando regulada la expresión de dicho al menos un gen por dicho microARN.

El objeto de la solicitud FR 13 60727 se basa en la sorprendente observación realizada por los inventores de que es posible modular la expresión de uno o más genes diana del mismo microARN modulando la acumulación de dicho microARN usando un miPEP.

- 35 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso como se definió con anterioridad en el que dicha célula eucariota determinada es una célula vegetal.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso como se definió con anterioridad en el que dicho microARN y dicho gen son de origen endógeno en dicha célula eucariota determinada.

- 40 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso como se definió con anterioridad en el que dicho microARN y dicho gen son de origen exógeno en dicha célula eucariota determinada, dicha célula eucariota determinada que contiene al menos un vector que permite la expresión de dicho microARN y dicho gen.

En la solicitud FR 13 60727, las expresiones “de origen endógeno” y “de origen exógeno” se utilizan para distinguir dichos microARN y/o genes de diferentes especies, dada la conservación de secuencias entre especies.

- 45 Por lo tanto, la expresión “de origen endógeno” indica que el microARN y/o el gen pueden estar presentes en forma natural en la célula en cuestión. No obstante, se pueden añadir artificialmente a la célula en cuestión otras copias del microARN y/o del gen de origen endógeno, por ejemplo, mediante clonación.

Por el contrario, la expresión “de origen exógeno” indica que el microARN y/o el gen nunca están presentes en forma natural en la célula en cuestión. Es un microARN y/o un gen identificado en otro tipo celular o en un organismo de otra

especie, por lo que este microARN y/o este gen se introducen necesariamente en forma artificial en la célula en cuestión.

5 En la solicitud FR 13 60727, una célula transformada genéticamente puede contener, por lo tanto, 2 grupos de microARN y/o genes potencialmente cercanos en términos de secuencia, uno de origen endógeno y el otro de origen exógeno.

En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para modular la expresión de un gen regulado por un microARN en una célula eucariota, que comprende la implementación de una etapa de acumulación de un miPEP en dicha célula eucariota, teniendo dicho miPEP:

- un tamaño de 4 a 100 aminoácidos, preferiblemente de 4 a 20 aminoácidos, y

10 - una secuencia peptídica idéntica a la codificada por una secuencia de nucleótidos contenida en el transcrito primario de un microARN que regula la expresión de dicho gen, y

- que puede modular la acumulación de dicho microARN,

en el que la acumulación de dicho miPEP en dicha célula eucariota induce la modulación de la expresión de dicho gen en relación con la expresión de dicho gen sin acumulación de dicho miPEP.

15 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para modular la expresión de un gen como se definió con anterioridad, en el que la acumulación de dicho miPEP en la célula resulta:

- de la introducción en la célula de un ácido nucleico que codifica dicho miPEP, o

- de la introducción en la célula de dicho miPEP.

20 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para modular la expresión de un gen como se definió con anterioridad en el que dicha célula eucariota es una célula vegetal.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para modular la expresión de un gen como se definió con anterioridad en el que dicho microARN y dicho gen son de origen endógeno en dicha célula eucariota.

25 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a un procedimiento para modular la expresión de un gen como se definió con anterioridad en el que dicho microARN y dicho gen son de origen exógeno en dicha célula eucariota, conteniendo dicha célula eucariota al menos un vector que permite la expresión de dicho microARN y de dicho gen.

En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a una célula eucariota modificada que contiene un péptido idéntico a un miPEP como se definió con anterioridad, péptido presente en dicha célula eucariota independientemente de la transcripción del transcrito primario del microARN que lleva la secuencia de nucleótidos que codifica dicho miPEP.

30 En la solicitud FR 13 60727, la expresión "célula eucariota modificada" significa que dicha célula eucariota contiene un miPEP introducido artificialmente en la célula, ya sea como péptido o mediante un vector que codifica dicho miPEP.

35 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a una célula eucariota modificada como se definió con anterioridad, en la que dicho microARN es de origen endógeno.

En otra realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a una célula eucariota modificada como se definió con anterioridad en la que dicho microARN es de origen exógeno, conteniendo dicha célula eucariota modificada un vector que permite la expresión de dicho microARN.

40 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a una célula eucariota modificada como se definió con anterioridad, siendo dicha célula una célula vegetal. En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a una planta que comprende al menos una célula eucariota modificada como se definió con anterioridad.

En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a una composición que comprende al menos:

- un miPEP como se definió con anterioridad,

- un ácido nucleico que codifica dicho miPEP, o

45 - un vector que contiene dicho ácido nucleico.

En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a una composición plaguicida que comprende al menos:

- un miPEP como se definió con anterioridad,
- un ácido nucleico que codifica dicho miPEP, o
- un vector que contiene dicho ácido nucleico.

5 En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a una composición fitofarmacéutica que comprende al menos:

- un miPEP como se definió con anterioridad,
- un ácido nucleico que codifica dicho miPEP, o
- un vector que contiene dicho ácido nucleico.

En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a una composición inductora que comprende al menos:

- 10
- un miPEP como se definió con anterioridad,
 - un ácido nucleico que codifica dicho miPEP, o
 - un vector que contiene dicho ácido nucleico.

15 La expresión "composición inductora" denota una composición capaz de conferir a la planta una mejor aptitud para la simbiosis o una mejor resistencia a diversos estreses, ya sean de naturaleza térmica, hídrica o química. A tal efecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 también se refiere a composiciones que actúan sobre el crecimiento (inhibición del crecimiento o, por el contrario, aumento del crecimiento) y fisiología (mejor capacidad micorrizante, para nodular, mejor tolerancia a diversos estreses) de la planta.

En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a una composición herbicida que comprende al menos:

- 20
- un miPEP como se definió con anterioridad,
 - un ácido nucleico que codifica dicho miPEP, o
 - un vector que contiene dicho ácido nucleico.

En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere a una composición insecticida que comprende al menos:

- 25
- un miPEP como se definió con anterioridad,
 - un ácido nucleico que codifica dicho miPEP, o
 - un vector que contiene dicho ácido nucleico.

En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso de una composición como la definida con anterioridad, como herbicida para eliminar plantas o ralentizar su crecimiento, preferiblemente como herbicida específico de una especie o de un género de plantas.

30 En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso de una composición como se definió con anterioridad, como agente fitofarmacéutico,

- 35
- para favorecer el crecimiento y/o desarrollo de las plantas, en particular para la modulación de los parámetros fisiológicos de una planta, en particular la biomasa, la superficie foliar, la floración, el tamaño del fruto, la producción y/o la selección de semillas de plantas, en particular para controlar la partenocarpia o monoecia de una planta, o para modificar los parámetros fisiológicos de las semillas de plantas, en particular la germinación, el establecimiento de raíces y la resistencia al estrés hídrico,

- o para prevenir o tratar enfermedades de las plantas,
en particular para favorecer la resistencia a enfermedades infecciosas.

40 En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso de una composición como se definió con anterioridad, para modular los parámetros fisiológicos de una planta, en particular la biomasa, la superficie foliar o el tamaño del fruto.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso de una composición como se definió con anterioridad, para el aclareo de huertos con el fin de aumentar el tamaño de los frutos.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso de una composición como se definió con

anterioridad, para la producción y/o selección de semillas de plantas, utilizándose dicha composición para controlar la partenocarpia o monoecia de una planta.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso de una composición como se definió con anterioridad, siendo administrada dicha composición a dicha planta por vía foliar o vía radicular.

- 5 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso de una composición como se definió con anterioridad, para la producción y/o selección de semillas de plantas.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso de una composición como se definió con anterioridad, en la que dicha composición se usa para modificar los parámetros fisiológicos de dichas semillas de plantas, en particular el establecimiento de raíces, la germinación y la resistencia al estrés hídrico.

- 10 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso de una composición como se definió con anterioridad, en la que dicha composición se aplica mediante revestimiento o recubrimiento de película sobre dichas semillas de plantas.

En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso de una composición como se definió con anterioridad, como plaguicida, para eliminar organismos nocivos de plantas o susceptibles de ser clasificados como tales, especialmente como insecticida, aracnida, limacida o rodenticida.

- 15 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso de una composición como se definió con anterioridad, como insecticida.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso de una composición como se definió con anterioridad, como insecticida.

En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso de una composición como se definió con anterioridad, para eliminar insectos plaga.

- 20 En una realización, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso de una composición como se definió con anterioridad, para eliminar especies animales clasificadas como nocivas o susceptibles de ser clasificadas como tales, en particularmente muridae, especialmente la rata.

En otro aspecto, el objeto de la solicitud FR 13 60727 se refiere al uso de una composición como se definió con anterioridad, en la que dicha composición se aplica a una planta para protegerla de insectos plaga.

- 25 Las siguientes figuras y ejemplos ilustrarán mejor la invención, pero sin limitar su alcance.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Efectos del tratamiento con miPEP164a sobre la expresión de miR164a en *A. thaliana*.

Las fotografías representan los resultados de un análisis de transferencia Northern de la acumulación de miR164a en raíces tratadas con agua (control, fotografía izquierda) o con 0,1 mM de un péptido sintético, que tiene idéntica secuencia a la de miPEP164a, disuelto en agua (0,1 mM de miPEP164a). El ARN de U6 se utiliza como control de carga, lo que permite cuantificar la cantidad de miR164a.

- 30 Este experimento se repitió 4 veces de forma independiente y arrojó resultados similares.

Este experimento se repitió 4 veces de forma independiente y arrojó resultados similares.

El tratamiento de brotes de *A. thaliana* con 0,1 mM de miPEP164a da como resultado una mayor acumulación de miR164a.

- 35 **Figura 2. Efectos del tratamiento con miPEP164a sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.**

Las fotografías muestran dos plantas (vistas superior y lateral) después de 3 semanas de crecimiento: una planta de control regada y rociada con agua (A) y una planta regada y rociada con una composición de 0,1 mM de péptido sintético cuya secuencia es idéntica a miPEP164a (B). Regar las plantas de *Arabidopsis thaliana* con miPEP164a aumenta significativamente el crecimiento de la planta.

- 40 **Figura 3. Efectos del tratamiento con miPEP164a sobre la fecha de floración en *Arabidopsis thaliana***

Las fotografías muestran dos plantas después de 39 días de crecimiento: una planta control regada y rociada con agua (fotografía de la izquierda) y una planta regada y rociada con una composición de 1 mM de péptido sintético cuya secuencia es idéntica a miPEP164a (fotografía de la derecha). Regar las plantas de *Arabidopsis thaliana* con miPEP164a aumenta significativamente el crecimiento y el número de flores de la planta.

- 45 **Figura 4. Efectos del tratamiento con miPEP164a sobre la fecha de floración en *Arabidopsis thaliana***

El eje y indica el número de días después de la germinación en la fecha de floración en una planta tratada con agua (barra izquierda) o con una composición que contiene 1 mM de miPEP164a (barra central) y 1 mM de miPEP165a (barra derecha). La barra de error corresponde al error estándar de la media (número de individuos = 12 plantas de control, 12 plantas tratadas).

Este experimento se repitió en forma independiente y produjo resultados similares.

Figura 5. Efectos del tratamiento con miPEP164a sobre el tamaño de los tallos florales en *Arabidopsis thaliana*

El eje y indica la altura del tallo floral en una planta tratada con agua (barra izquierda) o con una composición que contiene 0,1 mM de miPEP164a (barra derecha).

- 5 La barra de error corresponde al error estándar de la media (número de individuos = 12 plantas de control, 12 plantas tratadas).

Figura 6. Efectos del tratamiento con miPEP164a sobre el número de flores en *Arabidopsis thaliana*

El eje y indica el número de flores después de 39 días de cultivo en una planta tratada con agua (barra izquierda) o con una composición que contiene 0,1 mM de miPEP164a (barra derecha).

- 10 La barra de error corresponde al error estándar de la media (número de individuos = 12 plantas de control, 12 plantas tratadas).

Figura 7. Efectos de la sobreexpresión de AtmiPEP319a sobre la expresión de AtmiR319a en *A. thaliana*.

El eje y indica la expresión relativa de AtmiR319a en una planta de control (columna izquierda) o en una planta en la que AtmiPEP319a se sobreexpresa (columna derecha). La barra de error es el error estándar de la media (número de individuos = 10). La sobreexpresión de AtmiPEP319a induce una mayor acumulación de AtmiR319a.

- 15

Figura 8. Efectos del tratamiento con miPEP319a sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.

Las fotografías muestran dos plantas (vistas superior y lateral) después de 3 semanas de crecimiento: una planta de control regada y rociada con agua (A) y una planta regada y rociada con una composición de 0,1 mM de péptido sintético cuya secuencia es idéntica a miPEP319a (B). Regar las plantas de *Arabidopsis thaliana* con miPEP319a aumenta significativamente el crecimiento de la planta.

- 20

Ejemplos

Ejemplo A1 - Identificación y caracterización de miPEP164a

Para identificar miPEP codificados por pri-miARN de plantas, se buscaron ORF en los datos de RACE-PCR (Xie et al., Plant Physiol, 138: 2145-54, 2005), en los que las secuencias desde el extremo 5' del pri-miR de 50 miR de *A. thaliana* está disponible.

- 25

Se han identificado ORF capaces de codificar péptidos de 4 a 59 aminoácidos en cada uno de los pri-miR, y en particular un miORF, identificado en el pri-miR de miR164a, capaz de codificar un péptido miPEP164a.

Para probar si este péptido es realmente un miPEP, se sintetizó y se utilizó para probar el aumento de la acumulación de miR164a en las raíces de *A. thaliana* tratadas con el péptido sintético. Los análisis de transferencia Northern indican que el tratamiento de la planta con el péptido miPEP164a da como resultado una mayor acumulación de miR164a (Figura 1).

- 30

Además, también se realizaron experimentos de crecimiento en plantas de *A. thaliana* e indican que el riego de las plantas de *A. thaliana* con miPEP164a aumenta significativamente el crecimiento de las plantas (Figura 2).

Ejemplo A2 - Materiales y métodos

Plantas

Las plantas de *A. thaliana* Col-0 se cultivan en un medio básico MS suplementado con 10 g/l de sacarosa.

Péptidos

Los péptidos fueron sintetizados por Smartox y disueltos en agua.

Transferencia Northern

El análisis de transferencia Northern se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en Lauressergues et al. Plant J, 72(3): 512-22, 2012.

- 40

Las muestras biológicas se homogeneizaron en un tampón que contenía 0,1 M de NaCl, 2% de SDS, 50 mM de Tris-HCl (pH 9), 10 mM de EDTA (pH 8) y 20 mM de mercaptoetanol, y el ARN se extrajo dos veces con una mezcla de fenol/cloroformo y se precipitó con etanol.

- 45 Se cargó ARN en gel PAGE al 15% y se transfirió a una membrana de nylon (HybondNX, Amersham). El ARN se

hibridó con una sonda oligonucleotídica, marcada radiactivamente en su extremo, para detectar ARN U6 o para el miR164a.

Las hibridaciones se realizaron a 55 °C. Las señales de hibridación se cuantificaron usando un phosphorimager (Fuji) y se normalizaron con la señal de la sonda específica de ARN U6.

5 Prueba de crecimiento de *A. thaliana*

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* germinaron en GiFi, luego se trasplantaron a tierra para macetas y se cultivaron durante 3 semanas.

El riego se realizó cada 2-3 días con agua para las plantas de control y con agua que contenía 0,1 µM o 1 µM de péptido sintético (cuya secuencia es idéntica a miPEP164a o miPEP165a) para las plantas de prueba.

10 **Ejemplo B1 - Identificación y caracterización de miPEP319a**

Para identificar miPEP codificados por pri-miARN de plantas, se buscaron ORF en los datos de RACE-PCR (Xie et al., Plant Physiol, 138: 2145-54, 2005), en los que las secuencias desde el extremo 5' del pri-miR de 50 miR de *A. thaliana* están disponibles. Se han identificado ORF capaces de codificar péptidos de 4 a 59 aminoácidos en cada uno de los pri-miR, y en particular un miORF, identificado en el pri-miR de miR319a, capaz de codificar un péptido miPEP319a.

15 Para probar si este péptido es realmente un miPEP, se sintetizó y se utilizó para probar el aumento de la acumulación de miR319a en las raíces de *A. thaliana* tratadas con el péptido sintético. Los análisis de qPCR indican que la sobreexpresión de AtmiPEP319a induce un aumento en la acumulación de Atmir319a (Figura 7).

Además, los experimentos de crecimiento también se realizaron en plantas de *A. thaliana* e indican que regar y rociar plantas de *A. thaliana* con miPEP319a aumenta significativamente el crecimiento de las plantas (Figura 8).

20 **Ejemplo B2 - Materiales y métodos**

Plantas

Las plantas de *A. thaliana* Col-0 se cultivan en un medio básico MS suplementado con 10 g/l de sacarosa.

Péptidos

25 Los péptidos se sintetizaron mediante Smartox y se disolvieron en una solución de 40% de agua/50% de acetonitrilo/10% de ácido acético (v/v/v).

Transcripción inversa de microARN

30 El ARN se extrajo usando Tri-Reagent (MRC) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, excepto para la precipitación del ARN que se realizó con 3 volúmenes de etanol. La transcripción inversa de ARN se realizó utilizando el cebador de bucle de tallo RTprimer específico en combinación con hexámeros para realizar la transcripción inversa de ARN de alto peso molecular. Brevemente, se añadió 1 µg de ARN al cebador de bucle de tallo específico (0,2 µM), hexámero (500 ng), tampón RT (1X), enzima transcriptasa inversa SuperScript (SSIII) (una unidad), dNTP (0,2 mM cada uno), DTT (0,8 mM) en una mezcla de reacción final de 25 µl. Para realizar la transcripción inversa se realizó una reacción de transcripción inversa pulsada (40 repeticiones del siguiente ciclo: 16 °C durante 2 minutos, 42 °C durante un minuto y 50 °C durante un segundo, seguido de una inactivación final de transcripción inversa a 85 °C durante 5 minutos).

Análisis cuantitativos de RT-PCR (qRT-PCR)

40 El ARN total de las raíces de *M. truncatula* o las hojas de tabaco se extrajo usando el kit de extracción RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). La transcripción inversa se realizó utilizando transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen) a partir de 500 ng de ARN total. Se realizaron tres repeticiones (n = 3) con dos repeticiones técnicas cada una. Cada experimento se repitió dos o tres veces. Las amplificaciones por qPCR se realizaron utilizando un termociclador LightCycler 480 System (Roche Diagnostics) según el procedimiento descrito en Lauressergues et al. (Plant J., 72 (3): 512-22, 2012).

Construcciones de plásmidos

45 Los fragmentos de ADN de interés se amplificaron con polimerasa Pfu (Promega). Los fragmentos de ADN se clonaron para sobreexpresión bajo el control del promotor fuerte constitutivo 35S según el procedimiento descrito en Combier et al. (Genes & Dev, 22: 1549-1559, 2008). El miORF319a se clonó en pBIN19 según el procedimiento descrito en Combier et al. (Genes & Dev, 22: 1549-1559, 2008).

Análisis estadísticos

Los valores medios de expresión génica relativa o producción de raíces laterales se analizaron mediante la prueba t

de Student o la prueba de Kruskal-Wallis. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (SEM, Standard Error of the Mean). Los asteriscos indican una diferencia significativa ($p < 0,05$).

Prueba de crecimiento de *A. thaliana*

5 Las semillas de *Arabidopsis thaliana* germinaron en GiFi, luego se trasplantaron a tierra para macetas y se cultivaron durante 3 semanas.

El riego se realizó cada 2-3 días y la pulverización se realizó todos los días con agua para las plantas de control y con agua que contenía 0,1 mM de péptido sintético (de los cuales el la secuencia es idéntica a miPEP319a) para las plantas de prueba.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Universidad Toulouse III - Centro Nacional Paul Sabatier de Investigaciones Científicas - CNRS

<120> USO DE MICROPÉPTIDOS PARA FAVORECER EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

<130> WOB 15 AY TTT M164

<150> FR 14 55045

<151> 2014-06-03

15 <150> FR 14 55046

<151> 2014-06-03

<150> FR 15 52469

<151> 2015-03-24

<160> 12

20 <170> Patente en la versión 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ARN

<213> *Arabidopsis thaliana*

25 <400> 1

uggagaagca gggcacgugc a 21

<210> 2

<211> 37

<212> PRT

30 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 2

Met Pro Ser Trp His Gly Met Val Leu Leu Pro Tyr Val Lys His Thr
1 5 10 15

His Ala Ser Thr His Thr His Thr His Asn Ile Tyr Gly Cys Ala Cys
20 25 30

Glu Leu Val Phe His
35

<210> 3

<211> 114

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

5 <400> 3

atgccatcat ggcattggtat ggttcttttg ccttaogtaa aacacactca ogccagcaca 60

cacacacaca cacataacat atacggatgt gcgtgtgagc tagtcttcca ttaa 114

<210> 4

<211> 466

<212> ADN

10 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

agacaagccc ccacactaaa aaaacagtaa tatggaataa aaaaaagctt tcaaaactta 60

gcagttatta gacaaggat tgtttggccc tagctagcga tcgttttagct ctcttcactc 120

tctcactttt ttagttcaac ccttcttttg cgtgagatgc catcatggca tggatatggtt 180

cttttgcctt acgtaaaaca cactcacgcc agcacacaca cacacacaca taacatatat 240

ggatgtgcgt gtgagctagt cttccattaa tgcaatcttt gggcctatat atacaaacct 300

ttccataacc aaagttctca tactacaaac gccctcatg tgcttggaat tgcgggtgag 360

aatctccatg ttggagaagc agggcacgtg caaaccaaca aacacgaaat ccgtctcatt 420

tgcttatttg cacgtactta acttctccaa catgagctct tcaccc 466

<210> 5

<211> 21

15 <212> ARN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 5

ucggaccagg cuucauuccc c 21

20 <210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

Met Arg Val Lys Leu Phe Gln Leu Arg Gly Met Leu Ser Gly Ser Arg
1 5 10 15

Ile Leu

<210> 7

<211> 57

5 <212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 7

atgagggtta agctatttca gttgagggga atgtgtctg gatcgaggat attatag 57

10 <210> 8

<211> 484

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

15 ctaggggtta ggaatgacga cctgtttctg ttgtgtctta taaaagccc atcttcgtct 60

ccgccactca tcattccctc atcataaacac catcatcacc attcaccaac ctctctctct 120
ctctcctcta tcactctcta caacaaaaat ttgtgaatct gctaagatcg attatcatga 180
gggttaagct atttcagttg aggggaatgt tgtctggatc gaggatatta tagatatata 240
catgtgtatg ttaatgattc aagtgatcat agagagtatc ctcgaccag gottcatccc 300
ccccaacatg ttattgcctc tgatcaccat ttattgttac attttttttt gttaattact 360
tgcgcaaatt acaaaagctt ggtttttgtg atgactttga atctttcttg catggcttct 420
taagagtaga tttacggatc cgtctatgct ttttgctttt tgtttcgttt atttgtattt 480
aaac 484

<210> 9

20 <211> 21

<212> ARN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 9

uuggacugaa gggagcuccc u 21

ES 2 834 576 T3

<210> 10

<211> 50

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

5 <400> 10

Met Asn Ile His Thr Tyr His His Leu Leu Phe Pro Ser Leu Val Phe
1 5 10 15

His Gln Ser Ser Asp Val Pro Asn Ala Leu Ser Leu His Ile His Thr
20 25 30

Tyr Glu Tyr Ile Ile Val Val Ile Asp Pro Phe Arg Ile Thr Leu Ala
35 40 45

Phe Arg
50

<210> 11

<211> 153

10 <212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 11

atgaatatac atacatacca tcattcttctt ttcccatctc tagtttttca tcaatcttct 60
gatgttccaa acgctctatc tcttcatata catacatagc aatatattat tgttgtcata 120
gatccattta gaatcacttt agcttttaga tga 153

15 <210> 12

<211> 646

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 12

ttgtatccgc agtgtatttc ctgcaccta ccatcccttt tctacgcctc tctccctctc	60
tctctttctc catcaaactc tgttttggtc aaactctctc tctctcatct attctctcca	120
tacaatacat gaatatacat acataccatc atcttctttt cccatctcta gtttttcac	180
aatcttctga tgttccaaac gctctatctc ttcataatac tacatacgaa tatattattg	240
ttgtcataga tccatttaga atcactttag ctttttagatg agatctaggg tttctttggt	300
ttctttcaaa ttttggtgca tattcttcta aatcatgggt tttcgcttgc taggttatag	360
atccatgcaa atatggagta gatgtacaaa cacacgctcg gacgcatatt acacatgttc	420
atacacttaa tactcgctgt tttgaattga tgttttagga atatatatgt agagagagct	480
tccttgagtc cattcacagg tcgtgatatg attcaattag cttccgactc attcatccaa	540
ataccgagtc gccaaaattc aaactagact cgttaaatac atgaatgatg cggtagacaa	600
attggatcat tgattctctt tgattggact gaaggagct cctctc	646

REIVINDICACIONES

1. Uso de un péptido codificado por un marco de lectura abierto presente en el transcrito primario de un miR (miPEP) introducido externamente en una planta para favorecer el crecimiento, siendo dicho miPEP introducido externamente un péptido que comprende o que consiste en una secuencia idéntica a la de un miPEP naturalmente presente en dicha planta,
 5 cuyo miPEP naturalmente presente es un péptido de 3 a 100 aminoácidos, cuya secuencia está codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de un miR,
 siendo dicho miPEP capaz de modular la acumulación de dicho miR en dicha planta, cuyo miR regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, en particular las raíces, el tallo, las hojas o las flores,
 10 siendo la suma de la cantidad de dicho miPEP introducido externamente y la de dicho miPEP naturalmente presente estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP natural presente,
 estando implicado dicho gen en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta seleccionada del grupo que consiste en: NAC1, NAC4, NAC5, CUC1 y CUC2, el grupo que consiste en: REVOLUTA, PHABULOSA, PHAVOLUTA, ATHB-8 y ATHB-15 o el grupo que consiste en: TCP3 y TCP4,
 15 seleccionándose dicho miR del grupo que consiste en: miR164a, miR165a o miR319a.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho miARN es:
 - miR164a, en el que dicho miR164a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 1,
 - miR165a, en el que dicho miR165a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 5, o
 - 20 - miR319a, en el que dicho miR319a tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en SEQ ID NO: 9.
3. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho miPEP es
 - miPEP164a, en particular, en el que dicho miPEP164a tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 2,
 - miPEP165a, en particular, en el que dicho miPEP165a tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 6, o
 - 25 - miPEP319a, en particular, en el que dicho miPEP319a tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 10.
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha planta es una planta crucífera, tal como *Arabidopsis thaliana*, una solanácea o una planta leguminosa.
- 30 5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para favorecer el crecimiento de una planta de *Arabidopsis thaliana*, en el que el miPEP164a se introduce externamente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, estando dicho miPEP164a también naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, siendo dicho miPEP164a introducido externamente un péptido cuya secuencia comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de dicho miPEP164a naturalmente presente, estando codificada dicha secuencia de miPEP164a naturalmente presente por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario miR164a, cuyo miR164a regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de *Arabidopsis thaliana*, siendo la suma de la cantidad de dicho miPEP164a introducido externamente y la de dicho miPEP164a naturalmente presente estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP164a naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*.
- 35 6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para favorecer el crecimiento de una planta de *Arabidopsis thaliana*, en el que el miPEP165a se introduce externamente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, estando también dicho miPEP165a naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, siendo dicho miPEP165a introducido externamente un péptido cuya secuencia comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de dicho miPEP165a naturalmente presente, estando codificada dicha secuencia de miPEP165a naturalmente presente por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario miR165a, cuyo miR165a regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de partes vegetativas o reproductivas de *Arabidopsis thaliana*, siendo la suma de la cantidad de dicho miPEP165a introducido externamente y la de dicho miPEP165a naturalmente presente estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP165a naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*.
- 45 7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para favorecer el crecimiento de una planta de *Arabidopsis thaliana*, en el que el miPEP319a se introduce externamente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, estando también dicho miPEP319a naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, siendo dicho miPEP319a introducido externamente un péptido cuya secuencia comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de dicho miPEP319a naturalmente presente, estando codificada dicha secuencia de miPEP319a naturalmente presente por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario miR319a, cuyo miR319a regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de *Arabidopsis thaliana*, siendo la suma de la cantidad de dicho miPEP319a introducido externamente y la de dicho miPEP319a
- 50
- 55

naturalmente presente estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP319a naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*.

8. Procedimiento para favorecer el crecimiento de una planta, que comprende una etapa de introducción de un miPEP en una planta por vía externa, estando también dicho miPEP naturalmente presente en dicha planta,

- 5 siendo dicho miPEP introducido por vía externa un péptido de 3 a 100 aminoácidos, cuya secuencia comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de dicho miPEP naturalmente presente, cuya secuencia del miPEP naturalmente presente está codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de un miR, siendo dicho miPEP capaz de modular la acumulación de dicho miR, cuyo miR regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, en particular las raíces, el tallo, las hojas o las flores,
- 10 siendo la suma de la cantidad de dicho miPEP introducido externamente y la de dicho miPEP naturalmente presente estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP naturalmente presente,

en donde dicho gen implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta se selecciona del grupo que consiste en: NAC1, NAC4, NAC5, CUC1 y CUC2, el grupo que consiste en: REVOLUTA, PHABULOSA, PHAVOLUTA, ATHB-8 y ATHB-15 o el grupo que consiste en: TCP3 y TCP4, seleccionándose dicho miR del grupo que consiste en: miR164a, miR165a o miR319a.

9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho miR es:

- miR164a, teniendo dicho miR164a en particular una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 1, siendo dicho miPEP en particular miPEP164a, teniendo dicho miPEP164a en particular una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 2,
- 20 - miR165a, teniendo dicho miR165a en particular una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 5, siendo dicho miPEP en particular miPEP165a, teniendo dicho miPEP165a en particular una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 6, siendo dicha planta en particular una planta crucífera, una planta solanácea o una planta leguminosa, o
- 25 - miR319a, teniendo dicho miR319a en particular una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 9, siendo dicho miPEP en particular miPEP319a, teniendo dicho miPEP319a en particular una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 10, siendo dicha planta en particular una planta crucífera, una planta solanácea o una planta leguminosa.

30 10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, para favorecer el crecimiento de una planta de *Arabidopsis thaliana*, en el que:

- miPEP164a se introduce externamente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, estando dicho miPEP164a también naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*,

- 35 siendo dicho miPEP164a introducido externamente un péptido que comprende o que consiste en una secuencia idéntica a la de dicho miPEP164a naturalmente presente, cuyo miPEP164a naturalmente presente es un péptido de 3 a 100 aminoácidos, cuya secuencia está codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de miR164a, siendo dicho miPEP164a capaz de incrementar la acumulación de dicho miR164a, cuyo miR164a regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de partes vegetativas o reproductivas de *Arabidopsis thaliana*,
- 40 siendo la suma de la cantidad de dicho miPEP164a introducido externamente y la de dicho miPEP164a naturalmente presente estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP164a naturalmente presente,

- miPEP165a se introduce externamente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, estando dicho miPEP165a también naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*,

- 45 siendo dicho miPEP165a introducido externamente un péptido que comprende o que consiste en una secuencia idéntica a la de dicho miPEP165a naturalmente presente, cuyo miPEP165a de origen natural es un péptido de 3 a 100 aminoácidos, cuya secuencia está codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de miR165a, siendo dicho miPEP165a capaz de aumentar la acumulación de dicho miR165a, cuyo miR165a regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de partes vegetativas o reproductivas de *Arabidopsis thaliana*, siendo la suma de la cantidad de dicho miPEP165a introducido externamente y la de dicho miPEP165a naturalmente presente estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP165a naturalmente presente,
- 50

o

55 - miPEP319a se introduce externamente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*, estando también dicho miPEP319a naturalmente presente en dicha planta de *Arabidopsis thaliana*,

siendo dicho miPEP319a introducido externamente un péptido que comprende o que consiste en una secuencia

idéntica a la de dicho miPEP319a naturalmente presente, cuyo miPEP319a naturalmente presente es un péptido de 3 a 100 aminoácidos, cuya secuencia está codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de miR319a,

cuyo miPEP319a es capaz de incrementar la acumulación de dicho miR319a, cuyo miR319a regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de partes vegetativas o reproductivas de *Arabidopsis thaliana*, siendo la suma de la cantidad de dicho miPEP319a introducido externamente y la de dicho miPEP319a naturalmente presente estrictamente mayor que la cantidad de dicho miPEP319a naturalmente presente.

11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho miPEP se introduce en la planta:

- por vía externa, preferiblemente mediante riego, pulverización o adición de un fertilizante, un compost, un sustrato o un soporte en contacto con la planta, siendo administrado en particular dicho miPEP a la planta en forma de una composición que comprende 10^{-9} M a 10^{-4} M de dicho miPEP, en particular 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} o 10^{-4} M de dicho miPEP,

- por vía externa, preferiblemente mediante riego, pulverización o adición de un fertilizante, un compost, un sustrato o un soporte en contacto con la planta, siendo administrado en particular dicho miPEP a un grano o semilla en forma de una composición que comprende 10^{-9} M a 10^{-4} M de dicho miPEP, en particular 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} o 10^{-4} M de dicho miPEP, o

- mediante un ácido nucleico que codifica dicho miPEP, introduciéndose dicho ácido nucleico en la planta.

12. Procedimiento para producir una planta transgénica que comprende:

a) una etapa de introducción de un ácido nucleico que codifica un miPEP de 3 a 100 aminoácidos en una planta, pero dicho ácido nucleico no comprende la secuencia completa del miR correspondiente, o en al menos una célula de dicha planta, en condiciones que permiten la expresión de dicho miPEP, estando dicho miPEP también naturalmente presente en dicha planta, siendo dicho miPEP naturalmente presente un péptido cuya secuencia está codificada por un marco de lectura abierto ubicado en 5' en el transcrito primario de un miR, siendo capaz dicho miPEP de modular la acumulación de dicho miR en la planta, cuyo miR regula la expresión de al menos un gen implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta, en particular las raíces, el tallo, las hojas o las flores, y

b) una etapa de cultivo de la planta, o al menos una célula de dicha planta, obtenida en la etapa a) en condiciones que permitan obtener una planta transgénica,

- seleccionándose dicho gen implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta del grupo que consiste en: NAC1, NAC4, NAC5, CUC1 y CUC2, siendo dicho miARN el miR164a, teniendo dicho miR164a en particular una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 1, o siendo dicho miPEP el miPEP164a, teniendo dicho miPEP164a en particular una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 2,

- seleccionándose dicho gen implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta del grupo que consiste en: REVOLUTA, PHABULOSA, PHAVOLUTA, ATHB-8 y ATHB-15, siendo dicho miARN el miR165a, teniendo dicho miR165a en particular una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 5, o siendo dicho miPEP el miPEP165a, teniendo dicho miPEP165a en particular una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 6, o

- seleccionándose dicho gen implicado en el desarrollo de las partes vegetativas o reproductivas de la planta del grupo que consiste en: TCP3 y TCP4, siendo dicho miARN el miR319a, teniendo dicho miR319a en particular una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 9, o siendo dicho miPEP el miPEP319a, teniendo dicho miPEP319a en particular una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 10.

13. Planta transgénica obtenida mediante el procedimiento definido de acuerdo con la reivindicación 12.

14. Composición que comprende:

- miPEP164a como sustancia activa, en donde dicho miPEP164a consiste preferiblemente en la SEQ ID NO: 2, estando dicho miPEP164a a una concentración de 10^{-9} M a 10^{-4} M, en particular 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} o 10^{-4} M,

- miPEP165a como sustancia activa, en donde dicho miPEP165a consiste preferiblemente en la SEQ ID NO: 6, estando dicho miPEP165a a una concentración de 10^{-9} o 10^{-4} M, o

- miPEP319a como sustancia activa, en donde dicho miPEP319a consiste preferiblemente en la SEQ ID NO: 10, estando dicho miPEP319a a una concentración de 10^{-9} M a 10^{-4} M, en particular 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} o 10^{-4} M, en particular, comprendiendo dicha composición además un excipiente, un diluyente o un disolvente, en particular, estando dicha composición formulada para formar un revestimiento.

15. Composición que comprende en combinación una cantidad de semillas de una planta y una cantidad de un péptido cuya secuencia comprende o consiste en una secuencia idéntica a la de un miPEP naturalmente presente en dicha planta,

teniendo dicho péptido una secuencia que comprende o que consiste en una secuencia idéntica a la de miPEP164a, miPEP165a o miPEP319a, en particular, estando dicha composición formulada para formar una semilla recubierta.

FIGURA 1

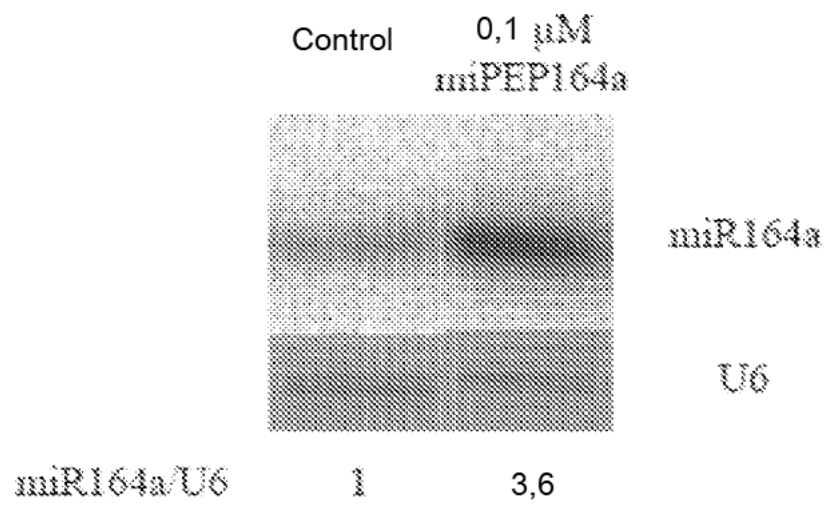
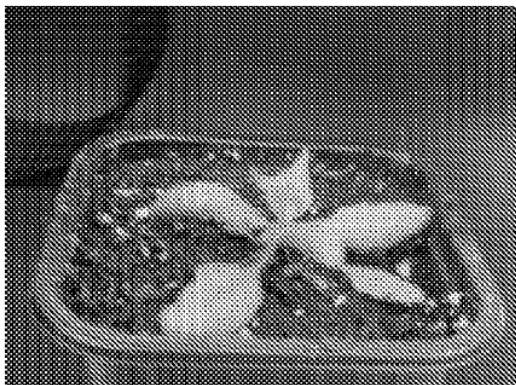
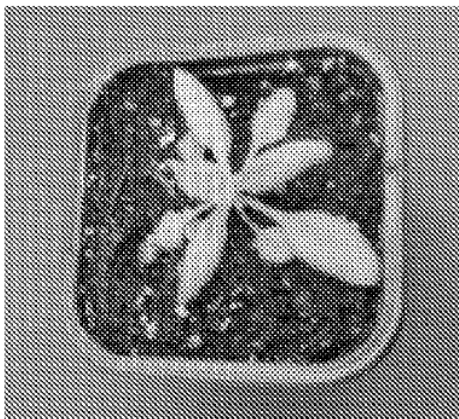


FIGURA 2

A) Planta de control



B) Planta tratada con el miPEP164a

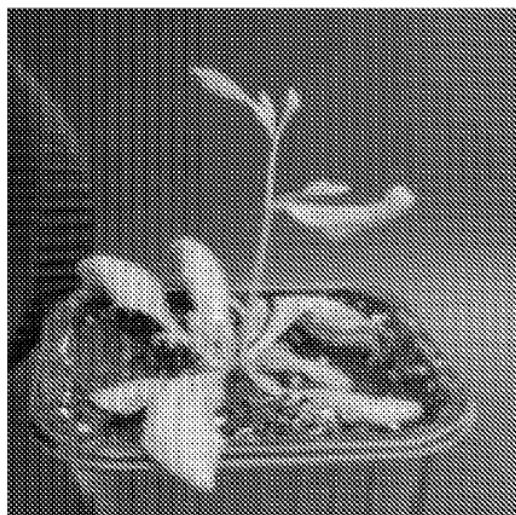
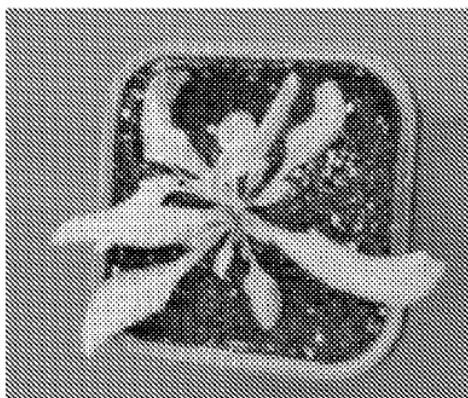


FIGURA 3

CONTROL

miPEP164a 1 μ M

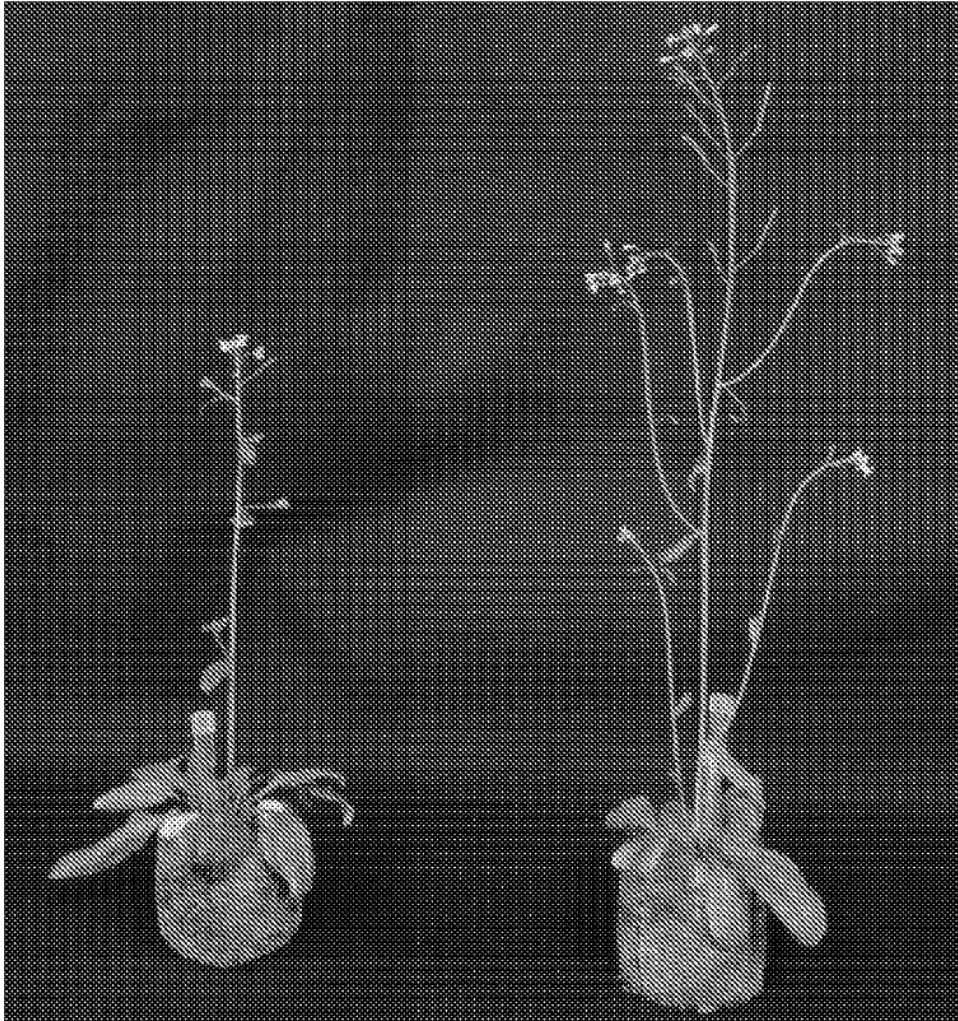


FIGURA 4

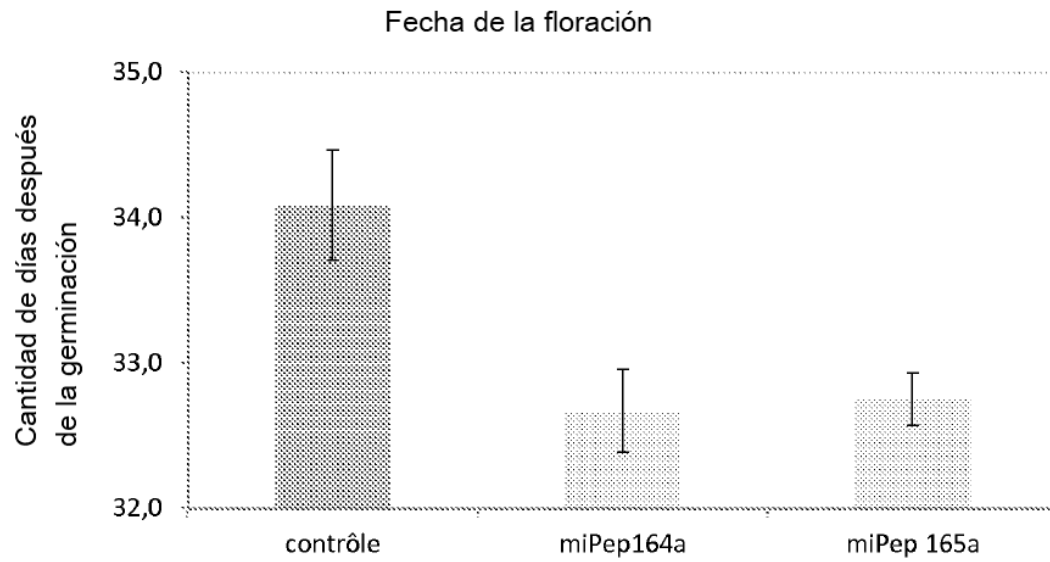


FIGURA 5

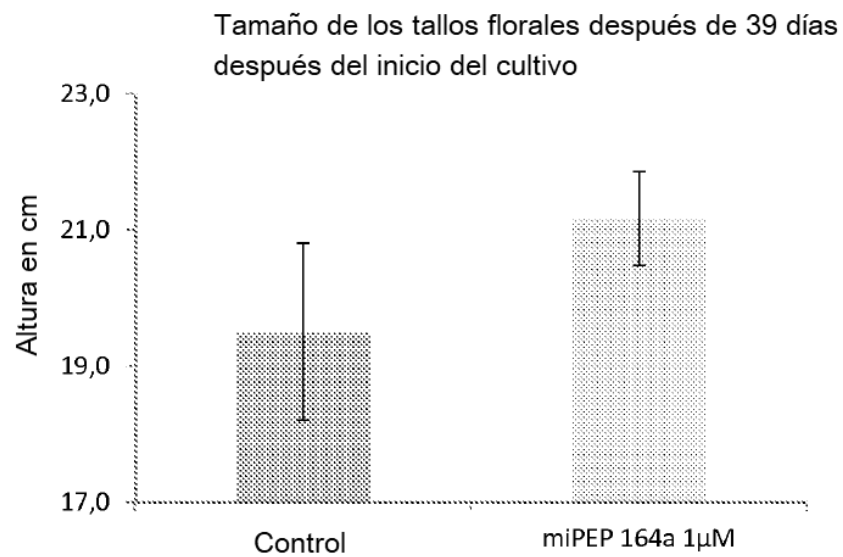


FIGURA 6

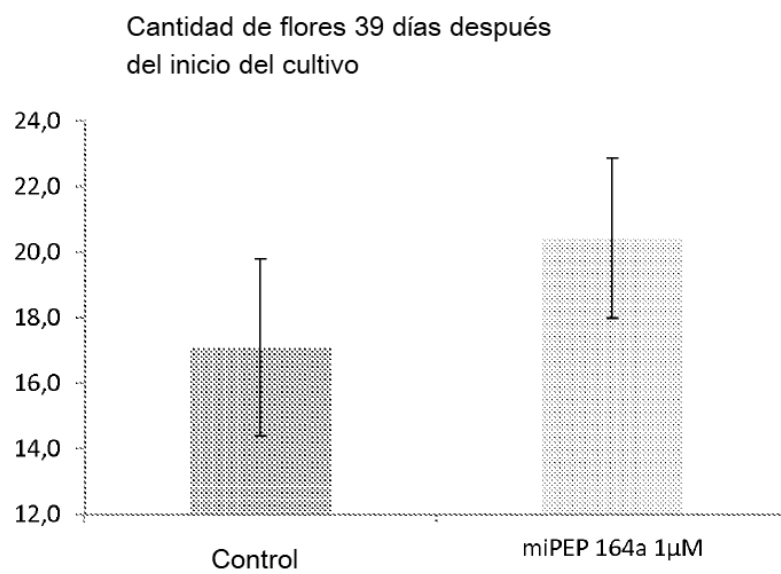


FIGURA 7

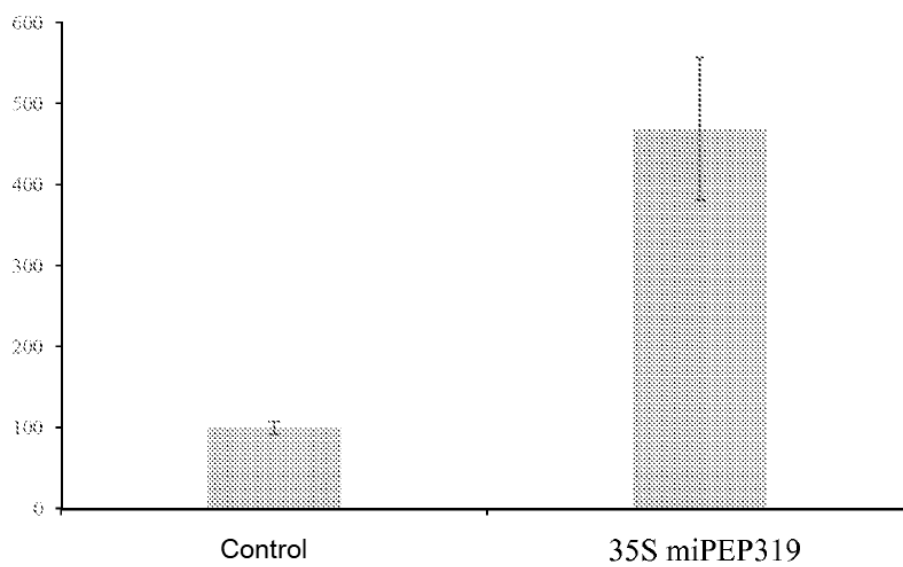
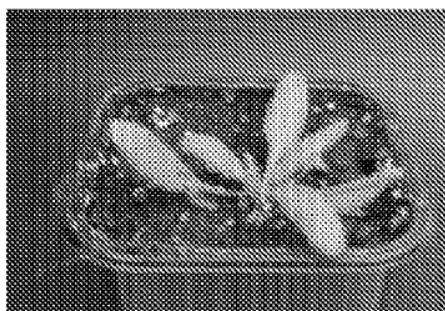
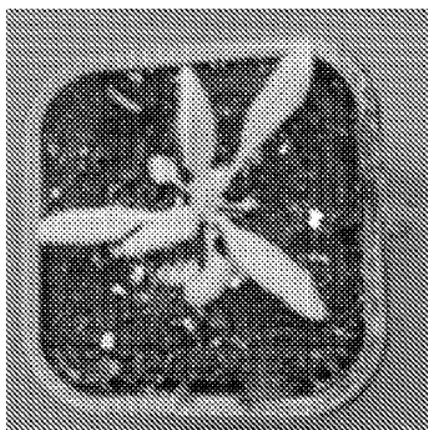


FIGURA 8

A) Planta de control



B) Planta tratada con el miPEP319a

