(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
17 de Noviembre de 2005 (17.11.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/108587 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes[7]: C12N 15/82, A01H 5/00

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2005/070057

(22) Fecha de presentación internacional:
6 de Mayo de 2005 (06.05.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200401102 7 de Mayo de 2004 (07.05.2004) ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ SERRANO, 117, E-28006 MADRID (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **CUBAS DOMÍNGUEZ, Pilar** [ES/ES]; Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus de Cantoblanco, E-28049 MADRID (ES). **MARTÍNEZ ZAPATER, José, Miguel** [ES/ES]; Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus de Cantoblanco, E-28049 MADRID (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
— *con informe de búsqueda internacional*
— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones*
— *con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición*

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) **Title:** REGULATORY SEQUENCE FOR THE EXPRESSION OF A GENE IN THE AXILLARY MERISTEMS OF PLANTS AND APPLICATIONS THEREOF

(54) **Título:** SECUENCIA REGULADORA DE LA EXPRESIÓN DE UN GEN EN MERISTEMOS AXILARES DE PLANTAS Y SUS APLICACIONES

(57) **Abstract:** The invention relates to an identified sequence of approximately 1.7 kilobases, comprising the promoter of the BRANCHED 1 gene of *Arabidopsis thaliana*, which can specifically regulate the axillary expression, but not the apical expression, of a particular gene. The aforementioned sequence can be used in order to genetically manipulate plants and to obtain plants having a modified plant architecture owing to an alteration in the growth or development of the axillary meristems thereof, for example, by promoting or inhibiting the development of the axillary meristems and/or replacing branches with flowers.

(57) **Resumen:** Se ha identificado una secuencia de aproximadamente 1,7 kilobases que comprende el promotor del gen BRANCHED 1 de *Arabidopsis thaliana* capaz de dirigir específicamente la expresión axilar pero no apical de un gen de interés. El empleo de dicha secuencia permite manipular genéticamente las plantas y obtener plantas con arquitectura vegetal modificada debido a una alteración en el crecimiento o desarrollo de sus meristemos axilares, por ejemplo, promoviendo o inhibiendo el desarrollo de los meristemos axilares y/o reemplazando ramas por flores.

WO 2005/108587 A1

TÍTULO

SECUENCIA REGULADORA DE LA EXPRESIÓN DE UN GEN EN MERISTEMOS AXILARES DE PLANTAS Y SUS APLICACIONES

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se relaciona, en general, con el control genético de la arquitectura de las plantas, y, en particular, con una secuencia de ácido nucleico que regula específicamente la expresión de un gen de interés en meristemos axilares y con sus aplicaciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Uno de los objetivos de la ingenieria genética es el de obtener plantas con características mejoradas. Estas características dependen, entre otras cosas, de las aplicaciones de las plantas, e incluyen, entre otras, el control de la maduración del fruto, mejoras en las características nutricionales de las partes comestibles del fruto, resistencia a plagas y enfermedades de plantas, etc., así como la posibilidad de manipular voluntariamente el desarrollo de los meristemos axilares promoviendo o inhibiendo su crecimiento de manera que se generen las estructuras vegetales deseadas.

Mediante la inhibición del crecimiento axilar se promueve el crecimiento de una planta en un único eje, con lo que se favorece la generación de tallos largos y con pocos nudos tal como es deseable, por ejemplo, en especies leñosas que se explotan para producción de madera, o en especies que se cultivan a alta densidad, tales como ciertas gramíneas. En patata, los "ojos" cuya brotación es perjudicial si el tubérculo se va a emplear como alimento, son meristemos axilares. Los tallos que brotan en cebollas y ajos, que reducen la calidad de estos productos, también proceden de meristemos axilares cuyo crecimiento sería deseable poder inhibir. En tomate, durante la floración y formación de los frutos, las ramas que se forman por brotación de meristemos axilares, son cortadas a mano para concentrar el aporte de nutrientes durante el desarrollo del tomate.

Asimismo, favoreciendo el crecimiento de los meristemos axilares se promueve el crecimiento axilar y se pueden generar arquitecturas arbustivas y aumentar, además, la producción de hojas y flores, elementos apreciados en especies ornamentales o en aquellas especies en las que las hojas o los frutos son los productos de consumo. El

incremento de la formación de retoños tiene, además, gran interés en especies que se utilizan para el tapizado de terrenos, en las que se valora el crecimiento compacto, por ejemplo, las gramíneas de césped o pasto. También tiene un gran valor ecológico poder fomentar el crecimiento intercalar en especies rastreras adaptadas a terrenos áridos amenazados por la erosión en los que la hierba resulta costosa de mantener.

El control de la formación de meristemos axilares también tiene importancia en la propagación vegetativa y el cultivo *in vitro*. A modo ilustrativo, una gran parte de la industria de micropropagación de plantas está basada en la capacidad de las citoquininas para relajar la dominancia apical, de forma que los meristemos axilares de las plantas de interés crecen produciendo un gran número de tallos para su cultivo. Estos tratamientos sistémicos tienen efectos indeseados tales como la supresión de formación y crecimiento de raíces, que se podrían evitar induciendo genes con efecto local sobre el crecimiento axilar.

En ciertas especies de leñosas el control de la brotación de las yemas axilares (cuya regulación fisiológica y hormonal es comparable a la de herbáceas) tiene gran importancia económica. En vides, cerezos, manzanos y otras leñosas, las yemas axilares requieren una exposición al frío de días o semanas para brotar. Estas especies se han empezado a cultivar en países cálidos (por ejemplo, Brasil o Tailandia) en los que no se suelen alcanzar temperaturas bajas, por lo que los agricultores se ven obligados a emplear, para hacer brotar las yemas, tratamientos químicos muy tóxicos (ácido cianhídrico, dinitro-ortocresol), o costosos tratamientos hormonales de rápida degradación y que producen efectos no deseados. El problema suscita tanto interés y moviliza tal cantidad de recursos económicos que, anualmente, en el Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas (ISHS) se celebra un symposium para el estudio del *bud break* o brotación de yemas (http://www.actahort.org/books/395/395_15.htm).

Para manipular y controlar de forma estable una determinada característica de una planta se requiere, por una parte, identificar y aislar el gen o genes que codifican o regulan dicha característica particular, y, además, identificar y aislar los elementos genéticos esenciales para la expresión y/o control del gen o genes aislados para que la planta manifieste dicha característica de forma controlada o controlable. Entre dichos elementos genéticos esenciales se encuentran los elementos de control de la transcripción conocidos como promotores.

Se han descrito promotores con expresión axilar, que también tienen expresión apical (por ejemplo *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) y *TERMINAL FLOWER* (*TFL*)) o en meristemos florales (por ejemplo, *REVOLUTA* (*REV*) o *LATERAL SUPPRESSOR* (*LAS*)). Los promotores de este tipo de genes no tienen utilidad para manipular los patrones de ramificación porque, al alterar el programa de desarrollo axilar, se altera, a su vez, el del desarrollo apical o floral comprometiendo de esta forma el crecimiento indeterminado de la planta o su fertilidad/desarrollo reproductivo.

La identificación de promotores específicos de expresión axilar pero no apical es crítica para la introducción de las características específicas previamente mencionadas en las plantas, en particular, para manipular el desarrollo de los meristemos axilares promoviendo o inhibiendo su crecimiento de manera que se generen las estructuras vegetales deseadas.

Existe, por tanto, la necesidad de identificar promotores que distingan las posiciones axilares vegetativas y permitan expresar específicamente en meristemos axilares, sin expresión en meristemos apicales o axilares florales, genes de interés sin alterar el posterior desarrollo de la planta. La caracterización de un promotor específico de meristemos axilares vegetativos es de gran importancia aplicada ya que permite expresar en posición axilar, pero no apical, genes de interés sin afectar con ello el crecimiento apical o la fertilidad de la planta.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La invención tiene por objeto proporcionar una secuencia reguladora de la expresión de un gen capaz de dirigir específicamente la expresión de un gen de interés en meristemos axilares pero no en meristemos apicales.

Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, una región reguladora de *Arabidopsis thaliana* capaz de controlar la expresión de genes exclusivamente en meristemos axilares y en los primordios de hojas jóvenes derivados de ellos. En una realización particular, dicha región reguladora de *A. thaliana* tiene una secuencia de nucleótidos que comprende el promotor del gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana*, y sus homólogos de otras especies, y es capaz de dirigir específicamente la expresión axilar pero no apical de un gen de interés. El Ejemplo 1 ilustra la expresión axilar, pero no apical, de GUS y GFP en *A. thaliana*, patatas y plantas de tomate.

El empleo de un promotor como el proporcionado por esta invención permite manipular genéticamente las plantas y obtener plantas con características mejoradas, tales como plantas con expresión axilar pero no apical de un gen de interés. De hecho, el empleo de dicho promotor permite manipular la arquitectura vegetal alterando el crecimiento o desarrollo de sus meristemos axilares. A modo ilustrativo, el empleo de dicho promotor permite manipular el desarrollo de los meristemos axilares promoviendo o inhibiendo su crecimiento y/o hacer que la planta manipulada genere estructuras distintas a las de las plantas originales (nativas o tipo silvestre) tal como, por ejemplo, reemplazar ramas por flores.

Una de las ventajas de disponer de un promotor como el proporcionado por esta invención radica en que permite circunscribir la expresión del gen de interés al que antecede para que éste se exprese sólo en el lugar deseado (meristemo axilar) para obtener el efecto esperado.

Por consiguiente, un aspecto de esta invención se relaciona con una secuencia de nucleótidos tal como la mostrada en la SEQ. ID. NO: 1, o un fragmento de la misma como la SEQ ID NO 4, o una secuencia de nucleótidos sustancialmente análoga a dichas secuencias. Dicha secuencia de nucleótidos es capaz de dirigir específicamente la expresión de un gen de interés en meristemos axilares, sin expresión apical, lo que permite modificar la arquitectura vegetal de las plantas. El empleo de dicha secuencia de nucleótidos para obtener células y plantas transgénicas constituye un aspecto adicional de esta invención.

Un aspecto adicional de esta invención se relaciona con una construcción de ácido nucleico que comprende la totalidad o parte de dicha secuencia de nucleótidos y un gen de interés, así como un vector recombinante que contiene dicha secuencia de nucleótidos o dicha construcción de ácido nucleico y una célula transformada con dicho vector recombinante.

Otro aspecto adicional de esta invención se relaciona con el empleo de dicha secuencia de nucleótidos en la producción de células y plantas transgénicas que presentan una arquitectura vegetal modificada. Las células y plantas transgénicas resultantes constituyen otro aspecto adicional de esta invención.

Otro aspecto adicional de esta invención se relaciona con un método para modificar la arquitectura vegetal (fenotipo) de una planta que comprende transformar una planta con dicha construcción de ácido nucleico o vector recombinante.

Otro aspecto adicional de esta invención se relaciona con un método para inhibir el crecimiento axilar de una planta que comprende transformar dicha planta con dicha construcción de ácido nucleico o con dicho vector recombinante, en donde dicho gen de interés contenido en dicha construcción de ácido nucleico o en dicho vector recombinante es un gen que codifica para un péptido o proteína útil para inhibir el crecimiento axilar.

Otro aspecto adicional de esta invención se relaciona con un método para promover el crecimiento axilar de una planta que comprende transformar dicha planta con dicha construcción de ácido nucleico o con dicho vector recombinante, en donde dicho gen de interés contenido en dicha construcción de ácido nucleico o en dicho vector recombinante es un gen que codifica para un péptido o proteína útil para promover el crecimiento axilar.

Otro aspecto adicional de esta invención se relaciona con un método para estimular la producción de flores en lugar de ramas en una planta que comprende transformar dicha planta con dicha construcción de ácido nucleico o con dicho vector recombinante, en donde dicho gen de interés contenido en dicha construcción de ácido nucleico o en dicho vector recombinante es un gen que codifica para un péptido o proteína útil para estimular la formación de flores en lugar de ramas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra esquemáticamente la construcción BRC1::GUS (Figura 1A) que portan las plantas transgénicas mostradas en las Figuras 3, 4 y 5, y la construcción BRC1::GFP (Figura 1B) [BRC1-P, secuencia de 1.736 bases del promotor del gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana* (SEQ. ID. NO: 1); HPT, gen de resistencia a higromicina; NPTII, gen de resistencia a kanamicina; Nos-P, promotor del gen de la nopalina sintasa; Nos-T, terminador del gen de la nopalina sintasa; 35S, promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV); GUS, gen de la beta-glucuronidasa; GFP, gen de la proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein); L, brazo izquierdo (left border); R, brazo derecho (right border); se indican, además, los sitios únicos de restricción HindIII y SacI].

La Figura 2 ilustra la expresión silvestre del gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana* revelado mediante hibridación *in situ*. La Figura 2A muestra la sección transversal de una roseta de *A. thaliana* poco después de la transición floral; el mRNA del gen

BRANCHED 1 se visualiza en un color pardo en meristemos axilares vegetativos (flechas negras) pero no en meristemos florales o en meristemo apical (flecha sin relleno). La Figura 2B muestra un detalle de dos meristemos vegetativos jóvenes que acumulan altos niveles de mRNA del gen *BRANCHED 1*. La Figura 2C muestra un detalle de un meristemo que ya ha producido un par de primordios de hoja donde también se expresa el gen *BRANCHED 1*.

La Figura 3 ilustra la expresión GUS de la construcción BRC1::GUS en yemas axilares de *A. thaliana*. La Figura 3A muestra una roseta de una planta en floración [las hojas de roseta han sido retiradas para poder observar las yemas axilares (max) teñidas con GUS (nótese que los meristemos florales (mf) no expresan el gen delator (GUS))]. La Figura 3B muestra la base de la roseta a la que se le ha retirado el eje principal. La Figura 3C muestra una inflorescencia de la misma roseta en la que se aprecia la ausencia de expresión del gen GUS en los meristemos florales y meristemo apical. Las Figuras 3D, 3E y 3F muestran yemas axilares de distintas edades expresando GUS (nótese la ausencia de expresión GUS en la hoja que los sustenta).

La Figura 4 ilustra la expresión de GUS de la construcción BRC1::GUS en yemas axilares de tomate. Las Figuras 4A, 4B, 4C y 4D ilustran estadíos progresivamente más avanzados de una yema axilar de tomate; nótese que se acumula GUS en las yemas jóvenes que no han empezado a elongar (A, y flechas en B, C y D) pero no en yemas que comienzan a elongar (asteriscos en B, C, y D).

La Figura 5 ilustra la expresión de GUS de la construcción BRC1::GUS en yemas axilares de patata. La Figura 5A muestra una yema axilar del tallo. La Figura 5B muestra un tubérculo. La Figura 5C muestra un detalle del tubérculo mostrado en 5B magnificado para visualizar la expresión de GUS.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Tal como se ha mencionado previamente, se ha identificado una secuencia reguladora de la expresión de un gen capaz de dirigir específicamente la expresión de un gen de interés en meristemos axilares pero no en meristemos apicales, útil para modificar la arquitectura vegetal de una planta.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con una secuencia de nucleótidos, en adelante secuencia de nucleótidos de la invención, seleccionada entre:

a) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. NO: 1;

b) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. NO: 4;

c) un fragmento de dicha SEQ. ID. NO: 1 que mantiene la capacidad de dirigir la expresión de un gen de interés en meristemos axilares; y

d) un fragmento de dicha SEQ. ID. NO: 4 que mantiene la capacidad de dirigir la expresión de un gen de interés en meristemos axilares;

e) una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente análoga a la secuencia de nucleótidos definida en a) o en b) o en c) o en d).

La secuencia de nucleótidos de la invención es capaz de dirigir la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés en meristemos axilares con el fin de modificar la arquitectura vegetal de una planta.

En una realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención comprende o está compuesta por la secuencia mostrada en la SEQ. ID. NO: 1, que corresponde a la secuencia de nucleótidos del promotor del gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana*, específico de meristemos axilares que permite la expresión axilar pero no apical de un gen de interés. Ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que dicha secuencia es capaz de dirigir la expresión de los genes GUS y GFP en meristemos axilares de *A. thaliana*, plantas de tomate y patata (Ejemplo 1) por lo que dicha secuencia es capaz de dirigir la expresión de un gen de interés en meristemos axilares con el fin de modificar la arquitectura de una planta, por ejemplo, inhibiendo o promoviendo el desarrollo o crecimiento axilar o generando plantas transformadas o transgénicas con estructuras vegetales diferentes a las plantas silvestres por ejemplo, promoviendo la formación de flores en lugar de ramas con el fin de reemplazar ramas por flores en una planta.

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención es un fragmento de dicha SEQ. ID. NO: 1, que mantiene la capacidad de dirigir la expresión de un gen de interés en meristemos axilares. En una realización particular, dicho fragmento tiene un tamaño comprendido entre 1 y 1,4 kb y conserva la funcionalidad y especificidad de expresión axilar del promotor del gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana*. Se ha comprobado que la SEQ ID NO 4 de 1.371 pares de bases conserva la actividad

mientras que con 1.0 kb pierde la expresion temprana asi que ya no funcionará tan bien como el otro..

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención es una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente análoga a la secuencia de nucleótidos definida en los apartados a) o b) o c) o d) previamente definidos. En el sentido utilizado en esta descripción, el término "análoga" pretende incluir a cualquier secuencia de nucleótidos que posee, al menos, la capacidad de dirigir la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés en meristemos axilares con el fin de modificar la arquitectura de una planta. Típicamente, dicha secuencia de nucleótidos análoga se puede aislar de cualquier organismo productor de dicha secuencia análoga en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. NO: 1, o SEQ. ID. NO: 4 o bien se construye en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. NO: 1 o SEQ. ID. NO: 4 mediante la sustitución de uno o más nucleótidos, la inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la secuencia, o la deleción de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos análoga puede ser un fragmento o sub-secuencia de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. NO: 1 o SEQ. ID. NO: 4. Alternativamente, dicha secuencia de nucleótidos análoga puede ser una secuencia de nucleótidos correspondiente a un gen homólogo al gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana* en otras especies vegetales.

En general, dicha secuencia de nucleótidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos identificada como la SEQ. ID. NO: 1 o a un fragmento de la misma como por ejemplo SEQ. ID. NO: 4. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "sustancialmente homóloga" significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 75%, más preferentemente de, al menos, un 90%, y aún más preferentemente de, al menos un 95%.

La secuencia de nucleótidos de la invención puede proceder de cualquier organismo que la contiene de forma nativa o bien de un organismo hospedador transformado con dicha secuencia de nucleótidos. A modo ilustrativo, la secuencia de nucleótidos de la invención, puede ser aislada, mediante técnicas convencionales, a partir de ácido nucleico de cualquier especie que la contiene mediante el empleo de

oligonucleótidos o sondas preparadas a partir de la información sobre la secuencia de nucleótidos de la invención.

El aislamiento e identificación de un fragmento de 1.736 bases de *A. thaliana* que contiene la secuencia de nucleótidos de la invención, en particular de la SEQ. ID. NO: 1, se ha realizado mediante su clonación a partir de un clon genómico de *A. thaliana*, tal como se indica en el Ejemplo 1 (apartado 1.1 Materiales y Métodos).

La secuencia de nucleótidos de la invención puede actuar como secuencia capaz de dirigir la expresión de un gen de interés en meristemos axilares con el fin de modificar la arquitectura vegetal de una planta. En una realización particular, dicha planta es una planta de interés agronómico. Tal como se utiliza en esta descripción, el término "planta de interés agronómico" se refiere a una planta que se cultiva para obtener un producto de interés, por ejemplo, para consumo humano o animal, o bien para su aprovechamiento industrial, energético, etc.. A modo ilustrativo, dicha planta de interés agronómico incluye plantas propias de horticultura, tales como ajos, patatas, pimientos, tomates, etc.; plantas ornamentales, tales como rosas, claveles, etc.; plantas para tapizado de terrenos, tales como hierbas, gramíneas, etc.; plantas para aplicaciones industriales, tales como producción de papel, madera, etc., por ejemplo, eucalipto, roble, castaño, etc.; plantas para aplicaciones energéticas, por ejemplo, sorgo, girasol, chopos, etc.

La secuencia de nucleótidos de la invención puede utilizarse en el desarrollo de una construcción de ácido nucleico que incluya, además, un gen de interés útil para controlar la arquitectura de una planta mediante su expresión en los meristemos axilares de una planta. Dicha construcción de ácido nucleico, a su vez, puede integrarse en un vector recombinante, tal como un vector de expresión. Para ello, se pueden utilizar distintas técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica [Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3] algunas de las cuales se muestran en la presente invención. Estos vectores recombinantes permiten la expresión de distintos genes de interés en los meristemos apicales de plantas con el fin de controlar su arquitectura vegetal. Las construcciones de ácido nucleico proporcionadas por esta invención pueden contener, además, otros elementos reguladores de la expresión de de dicho gen de interés dependiendo, por ejemplo, del vector recombinante utilizado, etc. Dichas construcciones de ácido nucleico, que contienen como denominador común la secuencia de nucleótidos

de la invención, así como el uso de las mismas para la transformación de plantas forman parte de la presente invención.

Por tanto, la invención proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención operativamente unida a un gen de interés útil para controlar la arquitectura vegetal de una planta. Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión "gen de interés útil para controlar la arquitectura vegetal de una planta" se refiere a cualquier gen que permite controlar o modificar la arquitectura vegetal de una planta como consecuencia de su expresión en los meristemos apicales de las plantas, tales como genes que codifican para péptidos o proteínas útiles para inhibir el crecimiento axilar, o genes que codifican para péptidos o proteínas útiles para promover el crecimiento axilar, o bien genes que codifican para péptidos o proteínas útiles para estimular la formación o generación de flores en lugar de ramas.

En una realización particular, dicho gen de interés útil para controlar la arquitectura vegetal de una planta es un gen que codifica para un péptido o proteína útil para inhibir el crecimiento axilar, por ejemplo, el gen que codifica para la cadena A de la toxina diftérica o el gen que codifica para la barnasa, ambos productos muy eficaces en ablaciones celulares en plantas. El gen que codifica para la cadena A de la toxina diftérica podría ser utilizado, por ejemplo, en plantas ornamentales con flores en las que tallos más largos y con menos ramas son deseables (e.g., rosas y claveles), mientras que la barnasa, una RNasa, es más recomendable para usar en especies para consumo. Mediante el empleo de este tipo de genes se inhibe el crecimiento axilar, promoviéndose el crecimiento de una planta en un único eje, lo que favorece la generación de tallos largos y con pocos nudos tal como es deseable, por ejemplo, en especies leñosas que se explotan para producir madera, o en especies que se cultivan a alta densidad, tales como ciertas gramíneas, así como en ciertas especies cultivadas con fines alimenticios, tales como, patatas, en donde se minimiza o elimina la brotación de "ojos"; ajos y cebollas, en donde se minimiza o elimina la brotación de tallos, que reducen la calidad de dichos productos; tomates, en donde se minimiza o reduce la formación de ramas durante la floración y formación de los frutos lo que permite la concentración del aporte de nutrientes durante el desarrollo del tomate; etc.

En otra realización particular, dicho gen de interés útil para controlar la arquitectura vegetal de una planta es un gen que codifica para un péptido o proteína útil

para promover el crecimiento axilar, por ejemplo, el gen que codifica para la isopentenil sintasa, un gen clave en la síntesis de citoquininas en *Agrobacterium* cuya sobreexpresión aumenta los niveles de citoquininas en plantas, el gen que codifica para la ciclina D3 que ejerce el mismo efecto sobre los meristemos, etc. Asimismo, una contrucción sense-antisense del gen *BRANCHED 1* endógeno de la especie correspondiente dirigiría la degradación de dicho gen promoviendo el desarrollo de ramas. Las citoquininas son hormonas implicadas, entre otros procesos, en la formación de meristemos. La sobreexpresión de isopentenil sintasa o de ciclina D3 en posición axilar parece ser suficiente para romper el reposo de los meristemos axilares de la roseta y estimular su crecimiento. Mediante el empleo de este tipo de genes se favorece el crecimiento de los meristemos axilares, promoviéndose el crecimiento axilar, con lo que

(i) se pueden generar arquitecturas arbustivas y aumentar, además, la producción de hojas y flores, elementos apreciados en especies ornamentales o en especies en las que las hojas o los frutos son los productos de consumo;

(ii) se puede incrementar la formación de retoños, lo que tiene gran interés en especies que se utilizan para el tapizado de terrenos, en las que se valora el crecimiento compacto, por ejemplo, las gramíneas de césped o pasto; y también tiene un gran valor ecológico poder fomentar el crecimiento intercalar en especies rastreras adaptadas a terrenos áridos amenazados por la erosión en los que la hierba resulta costosa de mantener; y

(iii) se minimizan o eliminan problemas relacionados con la propagación vegetativa y el cultivo *in vitro*; utilizando una construcción de ácido nucleico proporcionada por esta invención en la micropropagación de plantas basada en la capacidad de las citoquininas para relajar la dominancia apical se evitan o minimizan los efectos indeseados relacionados con la supresión de formación y crecimiento de raíces, debido a la inducción de genes con efecto local sobre el crecimiento axilar.

Adicionalmente, en ciertas especies de leñosas el control de la brotación de las yemas axilares tiene gran importancia económica. En vides, cerezos, manzanos, y otras leñosas, las yemas axilares requieren una exposición al frío de días o semanas para brotar. Utilizando una construcción de ácido nucleico proporcionada por esta invención en estos casos es posible hacer brotar las yemas y cultivar dichas especies en países

cálidos (que no suelen alcanzar temperaturas bajas) sin necesidad de recurrir a los tratamientos convencionales químicos (muy tóxicos, basados en el empleo de ácido cianhídrico o dinitro-ortocresol), u hormonales (muy costosos, de rápida degradación y productores de efectos no deseados).

En otra realización particular, dicho gen de interés útil para controlar la arquitectura vegetal de una planta es un gen que codifica para un péptido o proteína útil para estimular la formación o generación de flores en lugar de ramas, por ejemplo, el gen *LEAFY* (*LFY*) o el gen *APETALA 1* (*AP1*) que permite sustituir las ramas por flores sin impedir el crecimiento indeterminado de la planta (cuando se expresan en posiciones axilares y no lo hace de forma generalizada o en meristemo apical). El gen *LFY* y, en cierta medida el gen *AP1*, son necesarios y suficientes para determinar la identidad de los meristemos florales [Yanofsky, M. Floral meristems to floral organs: genes controlling early events in *Arabidopsis* flower development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 46, 167-188 (1995)]. Sus mutaciones causan la formación de ramas en posiciones donde deberían formarse flores. Además, cuando se expresan bajo el control de un promotor constitutivo tal como el promotor 35S CaMV, son suficientes para promover la formación de flores en el meristemo apical y axilares en *Arabidopsis,* tabaco, aspen hibrido y arroz [Weigel, D. & Nilsson, O. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377, 495-500 (1995); Mandel, M.A. & Yanofsky, M. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature* 377, 522-524 (1995); Nilsson, O. & Weigel, D. Modulating the time of flowering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 195-199 (1997), He, Z. *et al*. Transformation of rice with the *Arabidopsis* floral regulator *LEAFY* causes early heading. *Transgenic Res.* 9, 223-227 (2000)]. Las ventajas de sustituir ramas por flores radican, sobre todo, en generar plantas ornamentales en las que las flores se dispongan de una forma más compacta a lo largo de un solo eje.

En una realización particular, se ha preparado una construcción de ácido nucleico que comprende el gen GUS (BRC1::GUS) o el gen que codifica para la GFP (BRC1::GFP) bajo el control de la secuencia de nucleótidos de la invención para evaluar la especificidad de la expresión de dicho gen en meristemos axilares (Ejemplo 1). La construcción de ácido nucleido proporcionada por esta invención también puede contener, operativamente unidos, unos elementos reguladores de la expresión

funcionales en plantas, por ejemplo, una secuencia de terminación de la transcripción, etc.

La secuencia de nucleótidos de la invención, o la construcción de ácido nucleico proporcionada por esta invención, puede ser insertada en un vector apropiado. Por tanto, la invención también se refiere a un vector recombinante, tal como un vector de expresión, que comprende dicha secuencia de nucleótidos de la invención, o dicha construcción de ácido nucleico. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector recombinante donde se introduce dicha secuencia de nucleótidos de la invención puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el que (o en los que) se ha integrado. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook et al., 1989, citado *supra*].

La invención también proporciona una célula hospedadora, tal como una célula transformada, que comprende una secuencia de nucleótidos de la invención, o una construcción de ácido nucleico que contiene dicha secuencia de nucleótidos o dicho vector recombinante mencionado más arriba. Las células hospedadoras que se pueden transformar con la secuencia de nucleótidos de la invención pueden ser células procarióticas o, preferentemente, células eucarióticas, tales como células de tejidos vegetales. La transformación de células de tejidos vegetales también puede realizarse por métodos convencionales. Para una revisión de la transferencia génica a plantas, incluyendo vectores, métodos de transferencia de ADN, etc., véase, por ejemplo, el libro titulado "Ingeniería genética y transferencia génica", de Marta Izquierdo, Ed. Pirámide (1999), en particular, el capítulo 9, titulado "Transferencia génica a plantas", páginas 283-316.

La secuencia de nucleótidos de la invención puede ser utilizada para transformar plantas de interés agronómico y obtener plantas transformadas que presentan una arquitectura modificada. La transformación de plantas está ampliamente descrita en el estado de la técnica. Como es bien conocido, pueden utilizarse múltiples sistemas, por ejemplo, vectores plasmídicos, liposomas, electroporación, microinyección, bombardeo de partículas (gene gun), coprecipitación con fosfato de calcio, empleo de vectores virales, etc.

La secuencia de nucleótidos de la invención puede utilizarse para dirigir la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés en meristemos axilares con el fin de modificar la arquitectura de la planta. En este sentido, la secuencia de nucleótidos de la invención puede utilizarse para manipular plantas con el fin de introducir en ellas alguna característica de interés agronómico, tal como, por ejemplo, una arquitectura vegetal modificada. A modo ilustrativo, la secuencia de nucleótidos de la invención puede utilizarse para inhibir o promover el crecimiento axilar o para estimular la generación de flores en lugar de ramas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula transgénica que comprende, insertada en su genoma, una secuencia de nucleótidos de la invención, así como una planta transgénica que comprende, al menos, una de dichas células transgénicas. Dichas plantas transgénicas, que constituyen un objeto adicional de la invención, se pueden obtener mediante el empleo de técnicas convencionales, por ejemplo, utilizando vectores binarios u otros vectores disponibles para las diferentes técnicas de transformación de plantas existentes en la actualidad.

En una realización particular, la invención proporciona un procedimiento para producir una planta transgénica que comprende transformar dicha planta con una construcción de ácido nucleico proporcionada por esta invención, comprendiendo dicha construcción de ácido nucleico un gen de interés útil para controlar la arquitectura vegetal de las plantas, bajo el control de la secuencia de nucleótidos de la invención, de manera que la expresión de dicho gen de interés permite controlar o modificar la arquitectura vegetal de las plantas constituyendo tal modificación una característica mejorada en dicha planta. La planta resultante puede ser utilizada para la producción de nuevas plantas que conservan dichas características mejoradas. Ejemplos no limitativos de plantas a transformar incluyen todo tipo de planta de interés agronómico, por ejemplo, plantas hortícolas, plantas ornamentales, plantas para tapizado de terrenos, plantas para aplicaciones industriales, plantas para aplicaciones energéticas, etc. Asimismo, ejemplos no limitativos de dichas características mejoradas incluyen la inhibición del crecimiento axilar, la promoción del crecimiento axilar, la estimulación de la generación de flores en lugar de ramas, etc.

Por tanto, la invención también proporciona un método para modificar la arquitectura vegetal (fenotipo) de una planta que comprende transformar dicha planta con una construcción de ácido nucleico proporcionada por esta invención, o con un

vector recombinante proporcionado por esta invención, comprendiendo dicha construcción de ácido nucleico o dicho vector un gen de interés útil para controlar la arquitectura vegetal de las plantas, bajo el control de la secuencia de nucleótidos de la invención, de manera que la expresión de dicho gen de interés en meristemos axilares permite controlar o modificar el fenotipo (arquitectura vegetal) de dicha planta transformada.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para inhibir el crecimiento axilar de una planta que comprende transformar dicha planta con una construcción de ácido nucleico proporcionada por esta invención o con un vector recombinante proporcionado por esta invención, en donde dicho gen de interés contenido en dicha construcción de ácido nucleico o en dicho vector recombinante, bajo el control de la secuencia de nucleótidos de la invención, es un gen que codifica para un péptido o proteína útil para inhibir el crecimiento axilar, tal como el gen de la barnasa o el gen de la cadena A de la toxina diftérica, de manera que la expresión de dicho gen de interés en meristemos axilares permite inhibir el crecimiento axilar de dicha planta transformada. Las ventajas asociadas con este método han sido mencionadas previamente al tratar lo relativo al gen de interés útil para controlar la arquitectura vegetal de una planta, en concreto al gen que codifica para un péptido o proteína útil para inhibir el crecimiento axilar.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para promover el crecimiento axilar de una planta que comprende transformar dicha planta con una construcción de ácido nucleico proporcionada por esta invención o con un vector recombinante proporcionado por esta invención, en donde dicho gen de interés contenido en dicha construcción de ácido nucleico o en dicho vector recombinante, bajo el control de la secuencia de nucleótidos de la invención, es un gen que codifica para un péptido o proteína útil para promover el crecimiento axilar, tal como el gen de la isopentenil sintasa o el gen que codifica para la ciclina D3, de manera que la expresión de dicho gen de interés en meristemos axilares permite promover el crecimiento axilar de dicha planta transformada. Las ventajas asociadas con este método han sido mencionadas previamente al tratar lo relativo al gen de interés útil para controlar la arquitectura vegetal de una planta, en concreto al gen que codifica para un péptido o proteína útil para promover el crecimiento axilar.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para estimular la producción o generación de flores en lugar de ramas en una planta que comprende transformar dicha planta con una construcción de ácido nucleico proporcionada por esta invención o con un vector recombinante proporcionado por esta invención, en donde dicho gen de interés contenido en dicha construcción de ácido nucleico o en dicho vector recombinante, bajo el control de la secuencia de nucleótidos de la invención, es un gen que codifica para un péptido o proteína útil para estimular la producción o generación de flores en lugar de ramas en una planta, tal como el gen *LFY* o el gen *AP1*, de manera que la expresión de dicho gen de interés en meristemos axilares permite estimular la producción o generación de flores en lugar de ramas en dicha planta transformada. Las ventajas asociadas con este método han sido mencionadas previamente al tratar lo relativo al gen de interés útil para controlar la arquitectura vegetal de una planta, en concreto al gen que codifica para un péptido o proteína útil para estimular la producción o generación de flores en lugar de ramas en una planta.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

EJEMPLO 1

Obtención de un fragmento de ADN genómico que contiene el promotor del gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana*; construcciones que contienen los genes delatores *GUS* y *GFP* bajo el control de dicho fragmento; y transformación de plantas con dichas construcciones

1.1 Materiales y Métodos

Para aislar el fragmento de ADN genómico (ADNg) de 1.736 bases que contiene el promotor del gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana*, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el enzima Pwo (Roche Diagnostics) sobre ADN del TAC K24M9 [Transformation-competent bacterial Artificial Chromosome, vector que contiene una región de 45.292 pares de bases de ADNg del cromosoma 3 de *A. thaliana* que incluye la zona codificante y el promotor del gen *BRANCHED 1*] (Nottingham Stock Center) utilizando los iniciadores A y B, identificados respectivamente como SEQ. ID. NO: 2 y SEQ. ID. NO: 3, siguiendo las recomendaciones de Roche Diagnostics. La reacccion de PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones: (i) Desnaturalización a 94 grados durante 2 minutos; (ii) 35 ciclos de: Desnaturalización a

94ºC durante 15 segundos, Hibridación a 57ºC durante 30 segundos, y Elongación a 72ºC durante 2 minutos; y (iii) Terminación a 72ºC durante 10 minutos.

Dichos iniciadores contienen en posición 5' sitios attB1 y attB2, respectivamente, que permiten utilizar el fragmento en tecnología Gateway [Gateway™ Cloning Technology (Life Technologies, Invitrogen Corporation)]. Esta tecnología utiliza la recombinación específica de secuencias att del fago lambda para transferir fragmentos de ADN de un vector de clonación a otro (http://www.invitrogen.com/Content/Online%20Seminars/gateway/2.htm).

El producto de PCR fue purificado mediante una columna de Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) y recombinado, mediante una reacción BP (recombinacion especifica entre sitios attB y attP mediada por la mezcla enzimatica "BP clonasa" de Gateway™) con el plásmido pDONR207 que tiene sitios de recombinacion attP (todos los detalles de este plásmido se pueden encontrar en "http://www.lifetech.com" sección TECH-ONLINE™).

Para corroborar que la secuencia amplificada y clonada correspondía a la región genómica de aproximadamente 1,7 kilobases (kb) del gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana* se secuenció el fragmento clonado (ABI System, Perkin Elmer) y se comprobó que la secuencia era idéntica a la descrita en la base de datos del genoma de *Arabidopsis*.

Una vez secuenciado, el plásmido resultante fue recombinado mediante una reacción LR (recombinación específica entre sitios attL y attR mediada por la mezcla enzimática "LR clonasa" de Gateway™ Cloning Technology) con los plásmidos pGWB3 y pGWB4 proporcionados por Tsuyoshi Nakagawa (Universidad de Shimane, Japon) [Plant Biology 2003: Friday, July 25 – Wednesday July 30, 2003 – Honolulu, Hawai, Estados Unidos, organizado por The American Society of Plants Biologists, Abstract #935 "Gateway Binary Vectors (pGWBs) – Application and improved pGWBs", Tsuyoshi Nakagawa et al.]. Dichos plásmidos pGWB3 y pGWB4 contienen secuencias attR que permitieron recombinar el fragmento de 1,7 kb aproximadamente a los genes delatores beta glucuronidasa (GUS) y proteína verde fluorescente (GFP), respectivamente.

Los plásmidos resultantes contienen el promotor del gen *BRANCHED 1* fusionado a GUS y a GFP respectivamente (construcciones BRC1::GUS y BRC1::GFP). Dichas construcciones se introdujeron en plantas de *A. thaliana* mediante el método del "floral dip" (Clough and Bent (1998) Plant Journal 16:735-743) para

generar plantas transgénicas. Se obtuvieron líneas con una única inserción y se comprobó que ese fragmento reproduce la expresión silvestre de *BRANCHED 1* en meristemos axilares y que la expresión de GUS y GFP controlada por ese fragmento era comparable al patrón de expresión de *BRANCHED 1* caracterizado mediante hibridaciones *in situ* llevadas a cabo según metodología previamente descrita (Coen et al. (1990) Cell 63:1311-1322).

Asimismo, utilizando dichas construcciones, se obtuvieron plantas de patata y de tomate transgénicas mediante métodos conocidos:

(http://www.potatogenome.org/nsf3/protocols/potato_trans1.php): para obtener plantas de patata transgénicas; y

(http://www.potatogenome.org/nsf3/protocols/microtom_trans.php): para obtener plantas de tomate (microtom) transgénicas.

1.2 Resultados

Se ha definido una región de 1.736 bases en la región 5' del gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana* que reproduce fielmente la expresión de *BRANCHED 1* en meristemos axilares y en los primordios de hoja formados por estos meristemos. Dicho fragmento tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. NO: 1. Para comprobar que dicho fragmento reproduce la expresión del gen *BRANCHED 1* se realizaron fusiones de un fragmento de 1.736 bases localizado en la posición 5'del ATG del gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana* con el gen GUS y GFP (Figura 1) y se comprobó que dichas expresiones controladas por ese fragmento son comparables al patrón silvestre de expresión de *BRANCHED 1* en *A. thaliana* caracterizado mediante hibridación *in situ* (Figura 2, compárese con la Figura 3). En conclusión, esta región genómica es suficiente para controlar la expresión de *BRANCHED 1*, *GUS*, GFP o cualquier otro gen que se fusione a esa región en meristemos axilares de *Arabidopsis*. Asimismo las mismas construcciones fueron introducidas en patata y tomate para generar líneas transgénicas y se observó que el patrón de expresión también estaba finamente controlado y restringido a posiciones axilares (Figuras 4 y 5). En el caso de la patata, esta expresión GUS también se detectaba en los "ojos" del tubérculo que son meristemos axilares (Figura 5C).

1.3 Discusión

Se ha definido una región reguladora de *A. thaliana* capaz de controlar la expresión de genes exclusivamente en meristemos axilares y en los primordios de hojas jóvenes derivados de ellos. La caracterización de un promotor específico de meristemos axilares es de gran importancia aplicada ya que permite manipular la arquitectura vegetal alterando el crecimiento o desarrollo de sus meristemos axilares. Los promotores con expresión axilar descritos hasta la fecha también tienen expresión apical (e.g., STM, TFL), es decir, son genes que se expresan en todos los meristemos. El promotor proporcionado por esta invención, que distingue las posiciones axilares permite, por tanto, expresar en esta posición genes de interés sin afectar con ello el posterior desarrollo de la planta.

EJEMPLO 1

Obtención de un fragmento de SEQ ID 1 contiene el promotor del gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana*; construcciones que contienen los genes delatores *GUS* y *GFP* bajo el control de dicho fragmento; y transformación de plantas con dichas construcciones

Un fragmento de ADN genómico (ADNg) de 1.371 bases SEQ ID NO 4 de SEQ ID 1 indicado en el ejemplo 1 que contiene el promotor del gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana*,mantiene la expresión del gen. Este producto fue purificado del mismo modo mediante una columna de Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) y recombinado, mediante una reacción BP (recombinacion especifica entre sitios attB y attP mediada por la mezcla enzimatica "BP clonasa" de Gateway™) con el plásmido pDONR207 que tiene sitios de recombinacion attP (todos los detalles de este plásmido se pueden encontrar en "http://www.lifetech.com" sección TECH-ONLINE™).

Para corroborar que la secuencia amplificada y clonada correspondía a la región genómica de aproximadamente 1,371 kilobases (kb) del gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana* se secuenció el fragmento clonado (ABI System, Perkin Elmer) y se comprobó que la secuencia era idéntica a la descrita en la base de datos del genoma de *Arabidopsis*.

Una vez secuenciado, el plásmido resultante fue recombinado mediante una reacción LR (recombinación específica entre sitios attL y attR mediada por la mezcla enzimática "LR clonasa" de Gateway™ Cloning Technology) con los plásmidos pGWB3 y pGWB4 proporcionados por Tsuyoshi Nakagawa (Universidad de Shimane,

Japon) [Plant Biology 2003: Friday, July 25 – Wednesday July 30, 2003 – Honolulu, Hawai, Estados Unidos, organizado por The American Society of Plants Biologists, Abstract #935 "Gateway Binary Vectors (pGWBs) – Application and improved pGWBs", Tsuyoshi Nakagawa et al.]. Dichos plásmidos pGWB3 y pGWB4 contienen secuencias attR que permitieron recombinar el fragmento de 1,7 kb aproximadamente a los genes delatores beta glucuronidasa (GUS) y proteína verde fluorescente (GFP), respectivamente.

Los plásmidos resultantes contienen el promotor del gen *BRANCHED 1* fusionado a GUS y a GFP respectivamente (construcciones BRC2::GUS y BRC2::GFP). Dichas construcciones se introdujeron en plantas de *A. thaliana* mediante el método del "floral dip" (Clough and Bent (1998) Plant Journal 16:735-743) para generar plantas transgénicas. Se obtuvieron líneas con una única inserción y se comprobó que ese fragmento reproduce la expresión silvestre de *BRANCHED 1* en meristemos axilares y que la expresión de GUS y GFP controlada por ese fragmento era comparable al patrón de expresión de *BRANCHED 1* caracterizado mediante hibridaciones *in situ* llevadas a cabo según metodología previamente descrita (Coen et al. (1990) Cell 63:1311-1322).

Asimismo, utilizando dichas construcciones, se obtuvieron plantas de patata y de tomate transgénicas mediante métodos conocidos:

(http://www.potatogenome.org/nsf3/protocols/potato_trans1.php): para obtener plantas de patata transgénicas; y

(http://www.potatogenome.org/nsf3/protocols/microtom_trans.php): para obtener plantas de tomate (microtom) transgénicas.

Se ha definido una región de 1.371 bases en la región 5' del gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana* que reproduce fielmente la expresión de *BRANCHED 1* en meristemos axilares y en los primordios de hoja formados por estos meristemos. Dicho fragmento tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. NO: 4. Para comprobar que dicho fragmento reproduce la expresión del gen *BRANCHED 1* se realizaron fusiones de un fragmento de 1.371 bases localizado en la posición 5'del ATG del gen *BRANCHED 1* de *A. thaliana* con el gen GUS y GFP del mismo modo que en el ejemplo 1 (Figura 1) y se comprobó que dichas expresiones controladas por ese fragmento son comparables

al patrón silvestre de expresión de *BRANCHED 1* en *A. thaliana* caracterizado mediante hibridación *in situ*. En conclusión, esta región genómica es suficiente para controlar la expresión de *BRANCHED 1*, *GUS*, GFP o cualquier otro gen que se fusione a esa región en meristemos axilares de *Arabidopsis*. Asimismo las mismas construcciones fueron introducidas en patata y tomate para generar líneas transgénicas y se observó que el patrón de expresión también estaba finamente controlado y restringido a posiciones axilares. En el caso de la patata, esta expresión GUS también se detectaba en los "ojos" del tubérculo que son meristemos axilares (Figura 5C).

Se ha definido una región reguladora más pequeña que en el ejemplo 1 de *A. thaliana* capaz de controlar la expresión de genes exclusivamente en meristemos axilares y en los primordios de hojas jóvenes derivados de ellos. La caracterización de un promotor específico de meristemos axilares es de gran importancia aplicada ya que permite manipular la arquitectura vegetal alterando el crecimiento o desarrollo de sus meristemos axilares. Los promotores con expresión axilar descritos hasta la fecha también tienen expresión apical (e.g., STM, TFL), es decir, son genes que se expresan en todos los meristemos. El promotor proporcionado por esta invención, que distingue las posiciones axilares permite, por tanto, expresar en esta posición genes de interés sin afectar con ello el posterior desarrollo de la planta.

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

a) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. NO: 1;

b) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. NO: 4;

c) un fragmento de dicha SEQ. ID. NO: 1 que mantiene la capacidad de dirigir la expresión de un gen de interés en meristemos axilares; y

d) un fragmento de dicha SEQ. ID. NO: 4 que mantiene la capacidad de dirigir la expresión de un gen de interés en meristemos axilares; y

e) una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente análoga a la secuencia de nucleótidos definida en a) o en b) o en c) o en d).

2. Una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1, operativamente unida a un gen de interés.

3. Un vector recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1, o una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 3.

4. Una célula transformada que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1, o una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 2, o un vector recombinante según la reivindicación 3.

5. Una célula transgénica que comprende, insertada en su genoma, una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1, o una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 2.

6. Una planta transgénica que comprende, al menos, una célula transgénica según la reivindicación 5.

7. Un método para modificar la arquitectura vegetal de una planta que comprende transformar dicha planta con una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 2 o con un vector recombinante según la reivindicación 3.

8. Un método para inhibir el crecimiento axilar de una planta que comprende transformar dicha planta con una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 2 o con un vector recombinante según la reivindicación 3, en donde dicho gen de interés contenido en dicha construcción de ácido nucleico o en dicho vector recombinante, es un gen que codifica para un péptido o proteína útil para inhibir el crecimiento axilar, de manera que la expresión de dicho gen de interés permite inhibir el crecimiento axilar de dicha planta transformada.

9. Método según la reivindicación 8, en el que dicho gen que codifica para un péptido o proteína útil para inhibir el crecimiento axilar es el gen de la barnasa o el gen de la cadena A de la toxina diftérica.

10. Un método para promover el crecimiento axilar de una planta que comprende transformar dicha planta con una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 2 o con un vector recombinante según la reivindicación 3, en donde dicho gen de interés contenido en dicha construcción de ácido nucleico o en dicho vector recombinante, es un gen que codifica para un péptido o proteína útil para promover el crecimiento axilar, de manera que la expresión de dicho gen de interés permite promover el crecimiento axilar de dicha planta transformada.

11. Método según la reivindicación 10, en el que dicho gen que codifica para un péptido o proteína útil para promover el crecimiento axilar es el gen de la isopentenil sintasa o el gen que codifica para la ciclina D3.

12. Un método para estimular la producción o generación de flores en lugar de ramas en una planta que comprende transformar dicha planta con una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 2 o con un vector recombinante según la reivindicación 3, en donde dicho gen de interés contenido en dicha construcción de ácido nucleico o en dicho vector recombinante, es un gen que codifica para un péptido o proteína útil para estimular la producción o generación de flores en lugar de ramas en una planta, de manera que la expresión de dicho gen de interés permite estimular la producción o generación de flores en lugar de ramas en dicha planta transformada.

13. Método según la reivindicación 12, en el que dicho gen que codifica para estimular la producción o generación de flores en lugar de ramas es el gen *LFY* o el gen *AP1*.

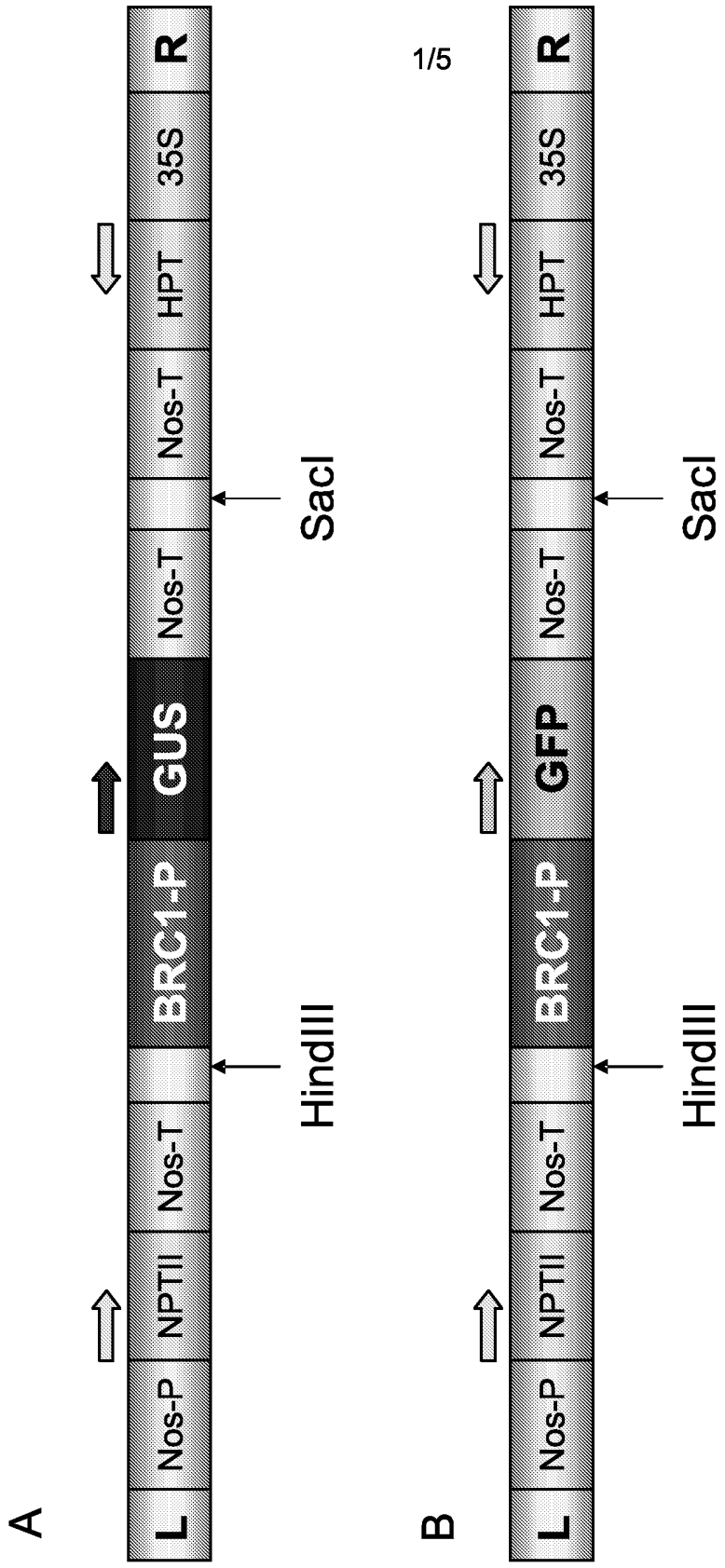
A
L
Nos-P
NPTII
Nos-T
BRC1-P
GUS
Nos-T
SacI
HindIII
Nos-T
HPT
35S
R
B
L
Nos-P
NPTII
Nos-T
BRC1-P
GFP
Nos-T
SacI
HindIII
Nos-T
HPT
35S
R

Figura 1

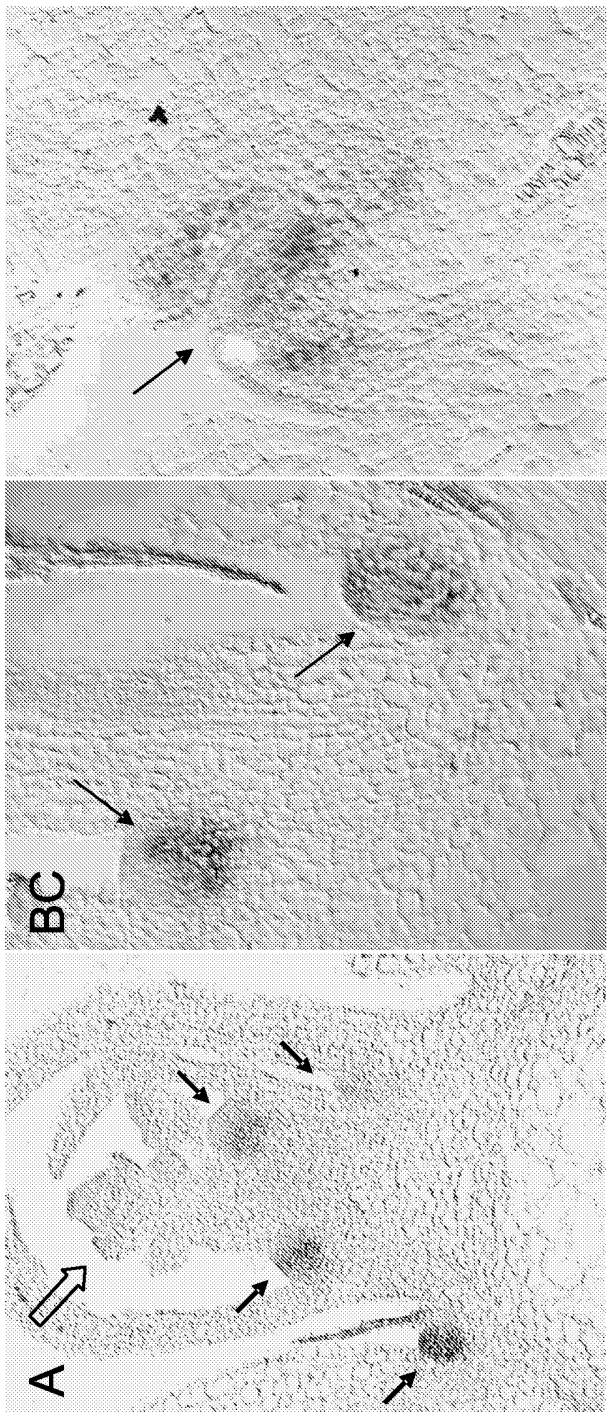

Figura 2

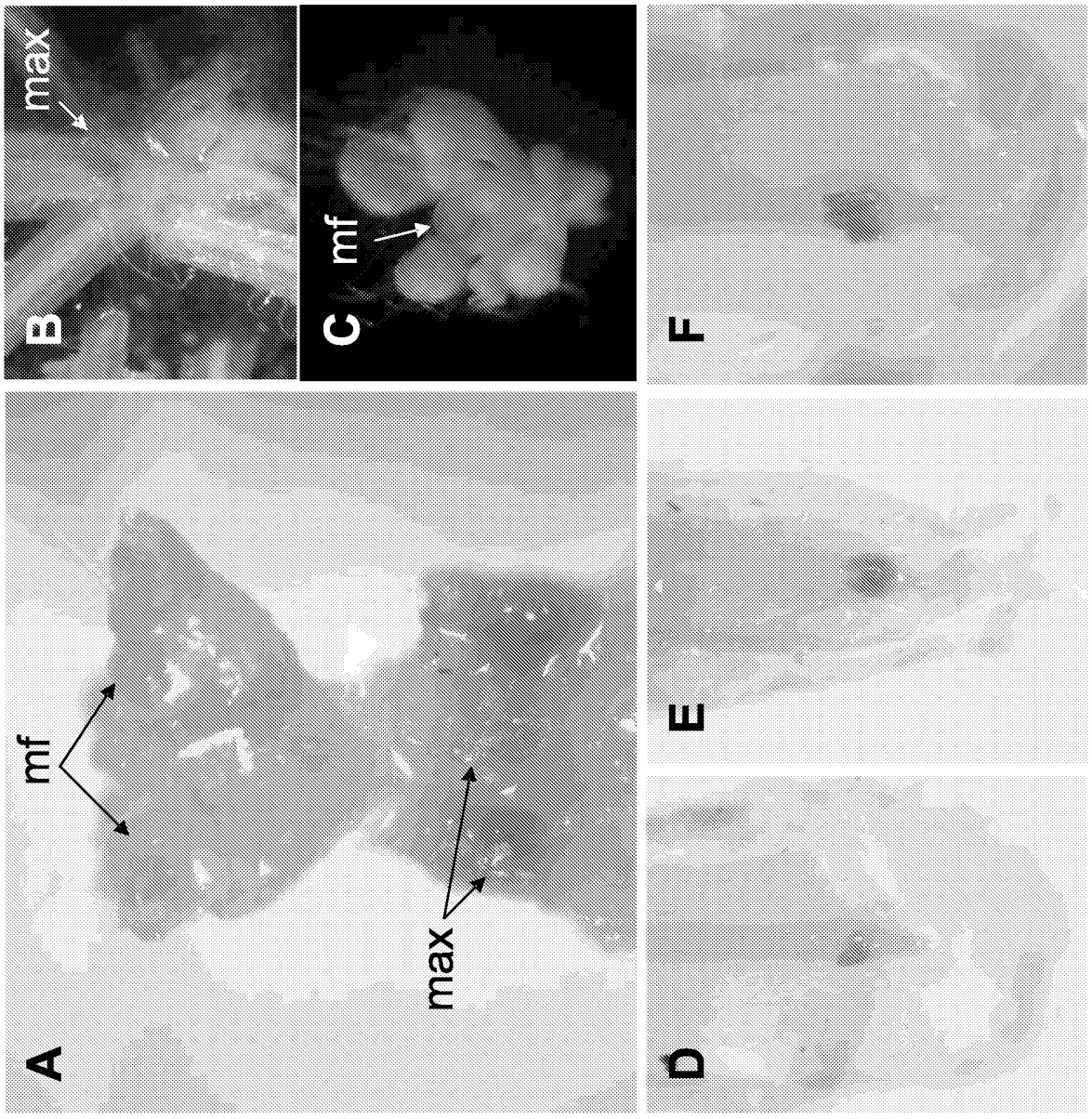

Figura 3

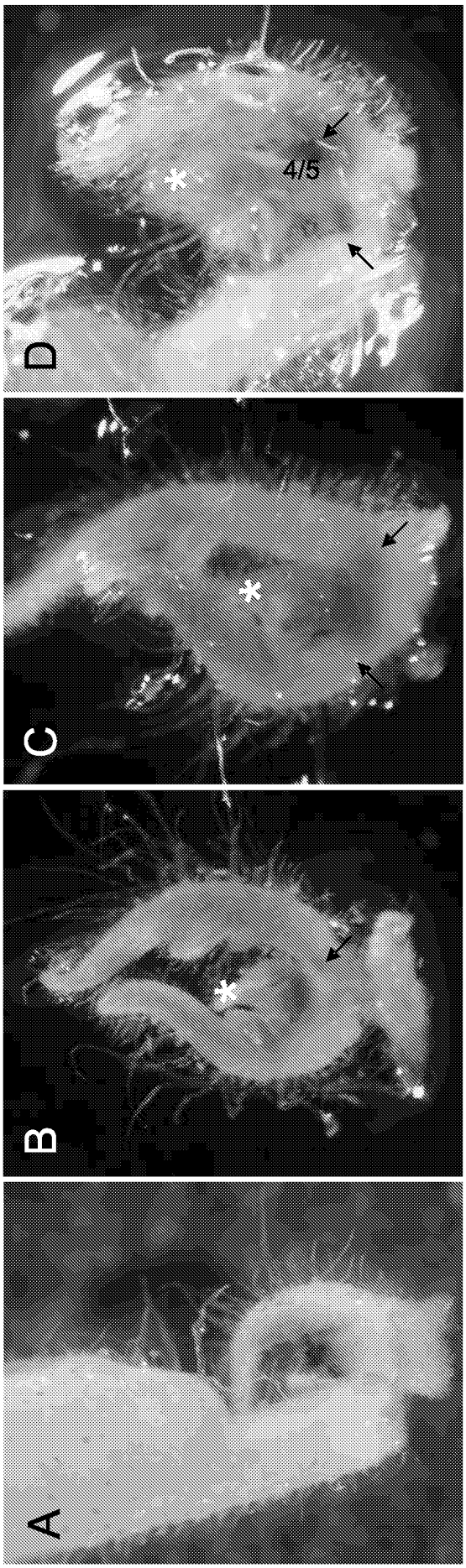

Figura 4

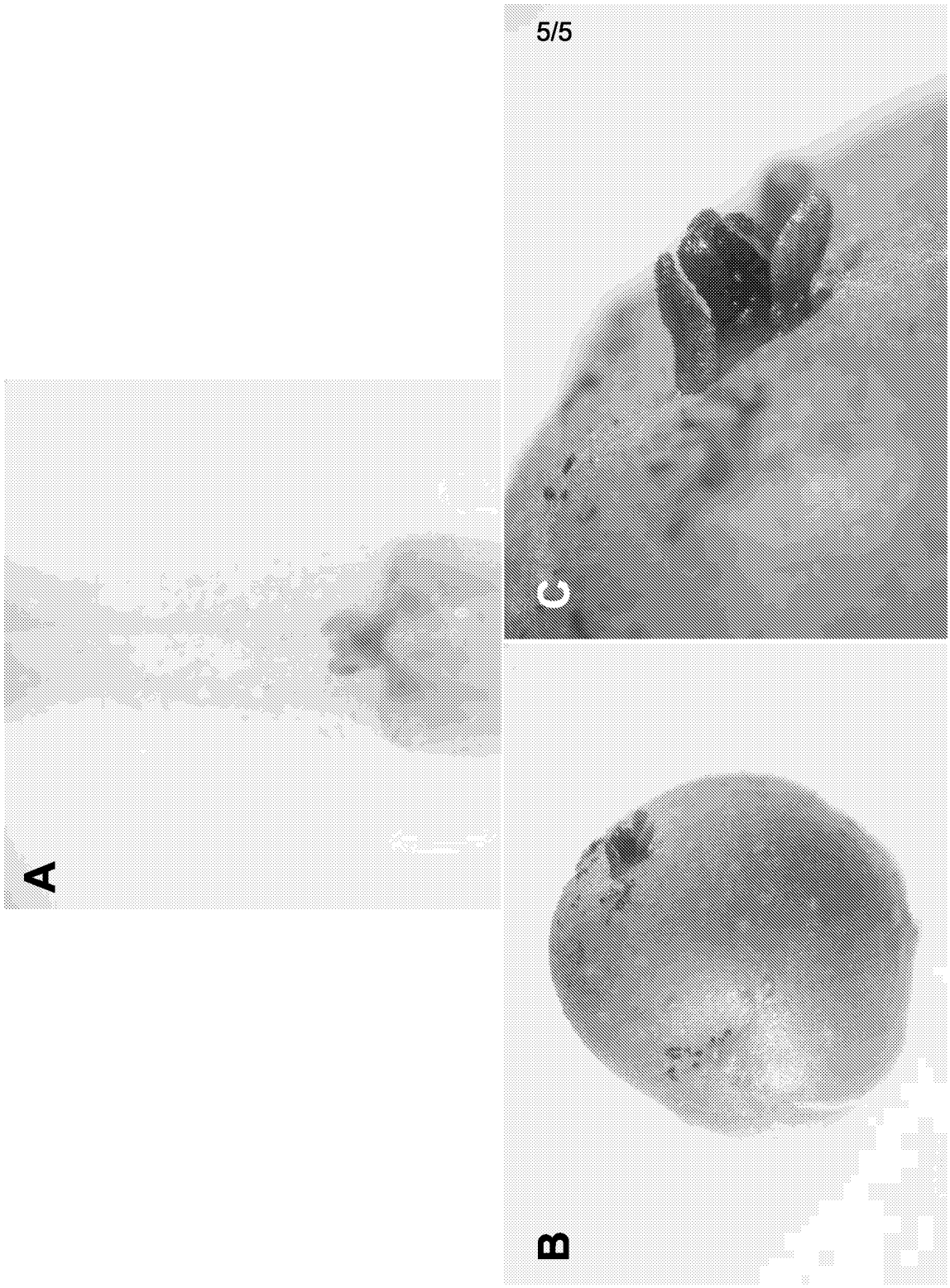

Figura 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2005/070057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 ' C12N 15/82, A01H 5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 ' C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EBI NUCLEOTIDE DATABASES, EPODOC, WPI, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TAKEDA ET AL., "The OsTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice." Plant J. 2003 Feb;33(3):513-20.	1-13
Y	DOEBLEY J, ET AL., "The evolution of apical dominance in maize." Nature. 1997 Apr 3;386(6624):485-8.	1-13
A	NAKAMURA,Y. ET AL., "Structural analysis of Arabidopsis thaliana chromosome 3. II. Sequence features of the regions of 4,251,695 bp covered by ninety P1, TAC and BAC clones." DNA Res. 7:217-221 (2000)	1-13
A	LUKENS L, ET AL., "Molecular evolution of the teosinte branched gene among maize and related grasses." Mol Biol Evol. 2001 Apr;18(4):627-38.	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 August 2005 (11.08.2005)	**07 Septembre 2005 (07.09.2005)**
Name and mailing address of the ISA/ **S.P.T.O.**	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DOEBLEY J, ET AL., "teosinte branched1 and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance." Genetics. 1995 Sep;141(1):333-46.	1-13
A	CUBAS P, ET AL., "The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development." Plant J. 1999 Apr;18(2):215-22	1-13
A	HUBBARD L, ET AL., " Expression patterns and mutant phenotype of teosinte branched1 correlate with growth suppression in maize and teosinte." Genetics. 2002 Dec;162(4):1927-35.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2005/070057

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

No sequence Listing corresponding to SEQ ID 4 has been presented.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2005/070057

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP[7] C12N 15/82, A01H 5/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP[7] C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EBI NUCLEOTIDE DATABASES, EPODOC, WPI, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	TAKEDA ET AL., "The OsTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice." Plant J. 2003 Feb;33(3):513-20.	1-13
Y	DOEBLEY J, ET AL., "The evolution of apical dominance in maize." Nature. 1997 Apr 3;386(6624):485-8.	1-13
A	NAKAMURA,Y. ET AL., "Structural analysis of Arabidopsis thaliana chromosome 3. II. Sequence features of the regions of 4,251,695 bp covered by ninety P1, TAC and BAC clones." DNA Res. 7:217-221 (2000)	1-13
A	LUKENS L, ET AL., "Molecular evolution of the teosinte branched gene among maize and related grasses." Mol Biol Evol. 2001 Apr;18(4):627-38.	1-13

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
11 Agosto 2005 (11.08.2005)	07 Septiembre 2005 (07.09.2005)
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado M. Hernández Cuéllar Nº de teléfono + 34 91 349

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2005/070057

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	DOEBLEY J, ET AL., "teosinte branched1 and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance." Genetics. 1995 Sep;141(1):333-46.	1-13
A	CUBAS P, ET AL., "The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development." Plant J. 1999 Apr;18(2):215-22	1-13
A	HUBBARD L, ET AL., " Expression patterns and mutant phenotype of teosinte branched1 correlate with growth suppression in maize and teosinte." Genetics. 2002 Dec;162(4):1927-35.	1-13

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2005/070057

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17(2)(a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones nos:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. ☐ Las reivindicaciones nos: 1-8 (parcialmente)
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
no se ha presentado lista de secuencias correspondiente a SEQ ID 4

3. ☐ Las reivindicaciones nos:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones nos:

4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones nos:

Indicación en cuanto a la protesta

☐ Se acompañó a las tasas adicionales una protesta por parte del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.