

(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
7 de abril de 2016 (07.04.2016)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2016/051009 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 15/63 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2015/070722
- (22) Fecha de presentación internacional:
2 de octubre de 2015 (02.10.2015)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P 201431459
2 de octubre de 2014 (02.10.2014) ES
- (71) Solicitante: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES];
C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
- (72) Inventores: **ABBAS, Mohamad**; Instituto De Biología Mol. Y Cel. De Plantas Primo Yufera (ibmcp), Campus Upv. Camino De Vera S/n. Edificio 8e, E-46022 Valencia (ES). **ALABADÍ DIEGO, David**; Instituto De Biología Mol. Y Cel. De Plantas Primo Yufera (ibmcp), Campus Upv. Camino De Vera S/n. Edificio 8e, E-46022 Valencia (ES). **BLAZQUEZ RODRÍGUEZ, Miguel Angel**; Instituto De Biología Mol. Y Cel. De Plantas Primo Yufera (ibmcp), Campus Upv. Camino De Vera S/n. Edificio 8e, E-46022 Valencia (ES). **GÓMER MINGUET, Eugenio**; Instituto De Biología Mol. Y Cel. De Plantas Primo Yufera (ibmcp), Campus Upv. Camino De Vera S/n. Edificio 8e, E-46022 Valencia (ES).
- (74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

— sobre la identidad del inventor (Regla 4.17(i))

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

— con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR INCREASING THE FERTILITY OF PLANTS

(54) Título : MÉTODO PARA INCREMENTAR LA FERTILIDAD DE LAS PLANTAS

(57) Abstract: The invention relates to a method for increasing the fertility of a plant, comprising inhibiting, reducing or blocking the expression of the gene that encodes the protein IAMT1 with regard to a control, or the activity of the protein IAMT1, and to the plant derived from the application of said method. The invention also relates to the use of a gene that encodes the protein IAMT1 for increasing the fertility of the plant.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con un método para incrementar la fertilidad de una planta que comprende inhibir, disminuir o bloquear la expresión del gen que codifica la proteína IAMT1 con respecto a un control o la actividad de la proteína IAMT1, y la planta derivada de la aplicación de dicho método, así como el uso de gen que codifica la proteína IAMT1 para incrementar de fertilidad de la planta.



WO 2016/051009 A1

MÉTODO PARA INCREMENTAR LA FERTILIDAD DE LAS PLANTAS

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a un método para incrementar la fertilidad de las plantas y a las plantas obtenidas mediante dicho método. Por lo tanto, la presente invención pertenece al campo de la agricultura.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El calentamiento global tiene un impacto negativo sobre la agricultura, por ejemplo contrarrestando los efectos positivos que el aumento de CO₂ podría tener sobre la fisiología de las plantas. Por ejemplo, la producción de granos de arroz descende un 10% por cada 1°C que aumenta la temperatura nocturna, y se estima que cada aumento de 1°C por encima de los 15°C reduce la producción de trigo en un 3-4%, mientras que cada día que el maíz pasa por encima de 30°C reduce el rendimiento un 1%. Uno de los problemas más graves que provocan las altas temperaturas sobre los cultivos es el descenso de la fertilidad del polen, documentado ya en varias especies como el tomate, el algodón, la cebada o el arroz. El efecto dañino sobre el polen parece deberse a la combinación de una menor dehiscencia de las anteras, menor producción de granos de polen, esterilidad del polen, y reducida germinación del polen *in vivo*. Por este motivo, la investigación de tratamientos o variedades que permitan a las plantas seguir siendo fértiles en altas temperaturas es muy activa.

Varios compuestos han sido probados con éxito en el laboratorio para mejorar la fertilidad del polen, como el etileno, los brasinosteroides o las auxinas, mientras que la obtención de nuevas variedades se realiza tanto con abordajes de mejora tradicional como mediante aplicaciones biotecnológicas basadas en la genética molecular.

La solicitud de patente EP2394513A1 describe un método para restaurar la esterilidad masculina en plantas gramíneas que comprende la administración de auxinas a las plantas.

La solicitud de patente EP2054516B1 describe plantas modificadas genéticamente que presentan características fenotípicas mejoradas, como un incremento en la producción de semillas y la tolerancia al estrés abiótico. Este documento describe

plantas que tienen una expresión modulada de un ácido nucleico que codifica un polipéptido PRC (Proteínas Relacionada con el Crecimiento) y el procedimiento para obtener dichas plantas.

La patente ES2334539B1 describe el uso del gen que codifica la enzima PPAT (fosfopanteteína adeniltransferasa) para la obtención de plantas transgénicas que presentan una mayor crecimiento vegetativo y reproductivo, mayor producción de semillas, disminución del tiempo de floración, mayor resistencia al estrés osmótico y salino, aumento del contenido de ácidos grasos en semillas y composición aminoacídica modificada.

Liao, P. y col. 2014 (PLoS One, 9(5):e98264) describen un mutante de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintetasa (HMGS), la segunda enzima de la vía del mevalonato (MVA), que mejora el rendimiento en la producción de semillas cuando se sobreexpresa en una planta.

No obstante, todavía existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar plantas cuya fertilidad esté incrementada o no se vea mermada en condiciones de estrés.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han descubierto que la inhibición o el bloqueo de la metilación del ácido indol acético (AIA) en las plantas provoca un mayor crecimiento de los tubos polínicos en comparación con plantas en las que dicha metilación no está inhibida o bloqueada. Como consecuencia de este crecimiento, la fertilidad de las plantas se ve incrementada, llegando incluso a ser restaurada en aquellas plantas en las que debido a condiciones de estrés, como las altas temperaturas o la escasez de agua, su fertilidad se ve mermada. Los inventores llegaron a esta conclusión tras truncar en *Arabidopsis thaliana* el gen que codifica la proteína ácido indolacético-carboximetiltransferasa 1 (IAMT1), enzima encargada de metilar el AIA para dar lugar al AIA-metilado (Me-AIA), y observar que la pérdida de la función de esta enzima origina acelera el crecimiento de los tubos polínicos en comparación con plantas control (ver Ejemplo 1 y Figuras 5 y 6). Por lo tanto, se puede concluir que la inhibición de la metilación del AIA da lugar a un incremento en la

fertilidad de las plantas, lo que se traduce en un mayor rendimiento de los cultivos al obtener plantas que generan más semillas y con ello, más frutos.

Así, en el contexto de la presente invención, se contempla una planta que comprende la ruta de metilación del AIA bloqueada o inhibida. Como entiende el experto en la materia, el bloqueo o la inhibición de una ruta metabólica puede llevarse a cabo a diferentes niveles: puede inhibirse o bloquearse la expresión del gen que codifica la enzima IAMT1, por ejemplo, mediante el empleo de moléculas que impidan la unión de la ANR polimerasa, mutando el promotor para que no sea reconocido por los factores de transcripción, empleando inhibidores de la transcripción como ARNs de interferencia, mutando la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína para que se exprese una enzima no funcional, etc., puede inhibirse o bloquearse la propia enzima IAMT1 mediante el empleo de compuestos agentes inhibidores que se unan a la enzima e impidan que realice su función (también denominados agentes inhibidores), etc. Independientemente del procedimiento empleado, la consecuencia es que no se produce la metilación del AIA y con ello, se incrementa la fertilidad de la plantas.

A la vista de este descubrimiento, se han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán descritos en detalle a continuación.

Planta de la invención

En vista de lo anteriormente expuesto, en un aspecto la presente invención se relaciona con una planta, de aquí en adelante "planta de la invención", que comprende el gen que codifica la proteína IAMT1, caracterizada porque dicha proteína IAMT1:

- (i) está ausente o en unos niveles no detectables por técnicas conocidas, o
- (ii) no es funcional, es decir, no es capaz de metilar el AIA, o
- (iii) se presenta en la planta en unos niveles inferiores con respecto a la planta control, siendo dicha diferencia estadísticamente significativa, de forma que se observa el fenotipo descrito en la planta de la presente invención, y
- (iv) dicha la planta no pertenece a la especie *Arabidopsis thaliana*.

Particularmente, la planta de la invención se caracteriza porque:

- (i) la expresión de dicho gen está disminuida, bloqueada o inhibida con respecto a un control, o da lugar a una proteína no funcional, y
- (ii) dicha la planta no pertenece a la especie *Arabidopsis thaliana*.

Excepto *A. thaliana*, cualquier planta puede ser objeto de la presente invención, tanto mono- como dicotiledónea. En la presente invención, dentro del término planta se incluyen plantas completas, antecesoras y progenies de las plantas y partes de las plantas incluyendo semillas, brotes, tallos, hojas, raíces (incluyendo tubérculos), flores y tejidos y órganos, donde cada uno de los elementos mencionados comprende disminuida, bloqueada o inhibida la expresión del gen que codifica la proteína IAMT1, o una proteína IAMT1 no funcional.

Las plantas incluidas en la presente invención pertenecen a la superfamilia Viridiplantae, seleccionadas de la lista que comprende *Acer spp.*, *Actinidia spp.*, *Abelmoschus spp.*, *Agave sisalana*, *Agropyron spp.*, *Agrostis stolonifera*, *Allium spp.*, *Amaranthus spp.*, *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona spp.*, *Apium graveolens*, *Arachis spp.*, *Artocarpus spp.*, *Asparagus officinalis*, *Avena spp.* (e.g. *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua var. sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa sp.*, *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsea*, *Beta vulgaris*, *Brassica spp.* (e.g. *Brassica napus*, *Brassica rapa ssp. [canola, oilseed rape, turnip rape]*), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum spp.*, *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya spp.*, *Carthamus tinctorius*, *Castanea spp.*, *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum spp.*, *Citrullus lanatus*, *Citrus spp.*, *Cocos spp.*, *Coffea spp.*, *Colocasia esculenta*, *Cola spp.*, *Corchorus sp.*, *Coriandrum sativum*, *Corylus spp.*, *Crataegus spp.*, *Crocus sativus*, *Cucurbita spp.*, *Cucumis spp.*, *Cynara spp.*, *Daucus carota*, *Desmodium spp.*, *Dimocarpus longan*, *Dioscorea spp.*, *Diospyros spp.*, *Echinochloa spp.*, *Elaeis* (e.g. *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus sp.*, *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus sp.*, *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum spp.*, *Fagus spp.*, *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella spp.*, *Fragaria spp.*, *Ginkgo biloba*, *Glycine spp.* (e.g. *Glycine max*, *Soja hispida* or *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus spp.* (e.g. *Helianthus annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus spp.*, *Hordeum spp.* (e.g. *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans spp.*, *Lactuca sativa*, *Lathyrus spp.*, *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus spp.*, *Luffa acutangula*, *Lupinus spp.*, *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon spp.* (e.g. *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Macrotyloma spp.*, *Malus spp.*, *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot spp.*, *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus spp.*, *Mentha spp.*, *Miscanthus sinensis*, *Momordica spp.*, *Morus nigra*, *Musa spp.*, *Nicotiana spp.*, *Olea spp.*, *Opuntia spp.*, *Ornithopus spp.*, *Oryza spp.* (e.g. *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum*

miliaceum, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus* spp., *Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites australis*, *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp. (e.g. *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium* or *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tagetes* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Tripsac[upsilon]m dactyloides*, *Triticosecale rimpau*, *Triticum* spp. (e.g. *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* or *Triticum vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp., entre otras.

Ejemplos de plantas objeto de la presente invención incluyen, sin limitar a, plantas de interés agronómico, tales como plantas de cereales (trigo, centeno, cebada, etc), árboles frutales, plantas forrajeras (por ejemplo, las leguminosas, berenjenas, pimientos, melones, sandías, pepinos, calabacines, judías, guisantes, habas, cebollas, col china, perejil, rabanito, etc.), y plantas ornamentales.

No obstante, en una realización particular, la planta de la presente invención pertenece al género *Solanum* sp., en particular es una tomatera. La tomatera de la presente invención puede seleccionarse, por ejemplo, de entre *Solanum lycopersicum*, *Solanum peruvianum*, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum lycopersicoides*, *Solanum sitiens*, *Solanum juglandifolium*, *Solanum ochranthum*, *Solanum cheesmaniae* o *Solanum galapagense*. Preferiblemente la tomatera es de la especie *Solanum lycopersicum*, o sus sinónimos *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon esculentum* Mill., *Lycopersicon esculentum* var. *esculentum*, *Solanum esculentum*, *Solanum esculentum* Dunal. Más preferiblemente, la variedad de tomatera puede ser seleccionada de la lista de Anna russian, Applause, Aussie, Baladre, Bella rosa, Black cherry, Black russian, Blondkopfchen, Brandywine, Carbon, Ceylan, Cherokee purple, Cherry, Cherry Redondo, Tomate Cherry Pera Amarillo, Comanche, Costoluto genovese, Ditmarcher, Eros, Gallician, Glacier, Gartenperle, Green sausage, Grushovka, Harzfeuer, Hugh, Japanesse black, Jersey devil, Kosovo, Krim black, Kumato, Liguria, Limachino, Lime green salad, Manitoba, Marvel stripe, Moneymaker, Muchamiel, Estrella, Opalka, RAF,

Black Pear, Piña Hawaiana, Rio grande, San marzano, Siberian, Sprite, Sugary, Sun sugar, Tigerella, White Queen, Raf Claudia, Roma, Valenciano, Pera de Girona, Montserrat, Corazón de Buey, Angela, Colgar en Rama, Ciruela Negro, Optima, Pata Negra, Copia, Velasco, Montenegro, Vertyco, Ventero, Ramyle, Pitenza, Paladium, Mayoral, Razymo, Motto, Caniles, Byelsa, Royalty, Trujillo, Delizia, Dumas Duratom, Larguero, Torry, Tovistar, Pintón, Grueso, Larga Vida, Marenza o Window box Roma.

La planta de la presente invención se puede obtener mediante múltiples procesos, entre los cuales están las técnicas de mejora genética clásica de cruce y selección o los procedimientos microbiológicos como la obtención de híbridos o la fusión de células somáticas.

La planta de la invención comprende el gen que codifica la proteína IAMT1. La proteína IAMT1 es la ácido indolacético-carboximetiltransferasa 1, enzima encargada de metilar el AIA para dar lugar al AIA-metilado (Me-AIA). En una realización particular, la proteína IAMT1 comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, una identidad de secuencia del 50% con la SEQ ID NO: 1. La secuencia SEQ ID NO: 1 corresponde la proteína IAMT1 procedente de *A. thaliana* cuyo número de acceso al NCBI es NP_200336.1, versión es NP_200336.1 GI: 15240487.

Las secuencias con al menos un 50% de identidad con SEQ ID NO: 1 son secuencias homólogas de la proteína IAMT1. Las secuencias homólogas se refieren a secuencias de especies distintas con expresiones fenotípicas similares que proceden de una secuencia ancestral común. Dentro de la homología de secuencia se distinguen dos tipos de homología: la ortología y la paralogía. Las secuencias ortólogas pertenecen a especies que tienen un antepasado común. Las secuencias parálogas son aquellas que se encuentran en el mismo organismo y una procede de la duplicación de la otra.

SEQ ID NO: 1

```
mgskgdnvav cnmklerlls mkggkqdsy annsqaqamh arsmhllee tlenvhlss  
asppftavd lgcssgantv hiidfivkhi skrfdagid ppeftaffsd lpsndfntlf  
qllpplsnt cmeelaadg nrsyfvgvp gsfyrllfpa rtidffhsaf slhwlsqvpe  
svtdrrsaay nrgrvfiha gektttaykr qfqadlaefl raraevkrq gamflvclgr  
tsvdpdqgg agllfgthfq dawddlvreg lvaaekrdgf nipvyapslq dfkevvdang  
sfaidklvvy kgsplvne pddasevgra fasscrsvag vlveahigee lsnklfsrve  
sratshakdv lvnlgffhiv aslsft
```

En la presente invención se entiende por “identidad” o “identidad de secuencia” al grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos obtenido mediante el alineamiento de las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado de identidad expresado en tanto por ciento. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA. GAP utiliza el algoritmo Needleman y Wunsch (1970, J Mol Bio 48: 443-453) para encontrar el alineamiento de las dos secuencias que maximizan el número de emparejamientos y minimiza el número de espacios. El algoritmo BLAST [Altschul S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10] calcula el porcentaje de identidad de secuencias y desarrolla un análisis estadístico de similitud entre las dos secuencias. Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, and TBLASTX, BLASTP and TBLASTN, son de dominio público en la página web de The National Center for Biotechnology Information (NCBI).

En una realización particular, la proteína IAMT1 comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, una identidad de secuencia del 60%, 70%, 80%, 90% o 100% con la SEQ ID NO: 1. En otra realización todavía más particular, la proteína IAMT1 comprende un 72% con la SEQ ID NO: 1 que, en otra realización aún más particular, comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 correspondiente a la proteína IAMT1 de tomate (Nº de acceso NCBI: XP_004251920.1 versión XP_004251920.1 GI:460413073).

SEQ ID NO: 2

```
matlgdnkdn vvvsnlkler mlsmkggkge asyvnsqag gqharsmlhl lketldgvql  
irssdnddip fvivdlgcsc gsntvyiidv ivehmrkrfe kadqqipefs affcdlpsnd  
fntlfqllpp lanngmeecl asnshrsyfa agvpgsfyrr lfparsidvf ysafslhwls  
qvpdvvlkdq nvaynkgriy ihganesttk aykkqfqsdl anflcarske mkrggsmflv  
clgrtsmdpi dqggagllfg thfqdawddl vqeglitsek rdnfnipvya psiqdfkevv  
eangsftinn lqvfrggspl vvnhpdaae vgralaiscr svsgvlvdah igeqlgdelf  
trverraarh akelielklqf fhivaslslv
```

Ejemplos de proteínas IAMT1 de otras especies incluyen, pero no se limitan a (la identidad de secuencia (BLAST) con la SEQ ID NO: 1 se muestra entre corchetes), la secuencia SEQ ID NO: 3 procedente de *Brassica napus* (nº acceso a NCBI:

CDY19899.1) [95%], la secuencia SEQ ID NO: 4 de *Cucumis melo* (nº de acceso NCBI: XP_008447710.1) [77%], la secuencia SEQ ID NO: 5 de *Cucumis sativus* (nº de acceso NCBI: XP_004151408.1) [78%], la secuencia SEQ ID NO: 6 de *Fragaria vesca* (nº de acceso a NCBI: XP_004294422.1) [76%], la secuencia SEQ ID NO: 7 de *Glycine max* (nº de acceso a NCBI: XP_003551758.1) [76%], la secuencia SEQ ID NO: 8 de *Solanum tuberosum* (nº de acceso a NCBI: XP_006344874.1) [72%], la secuencia SEQ ID NO: 9 de *Malus domestica* (nº de acceso NCBI: XP_008364459.1) [74%], la secuencia SEQ ID NO: 10 de *Jatropha curcas* (nº de acceso NCBI: KDP39201.1) [75%], la secuencia SEQ ID NO: 11 de *Prunus persica* (nº de acceso NCBI: XP_007211413.1) [74%], la secuencia SEQ ID NO: 12 de *Theobroma cacao* (nº de acceso NCBI: XP_007020694.1) [74%], la secuencia SEQ ID NO: 13 de *Citrus sinensis* (nº acceso NCBI: XP_006474991.1) [71%], la secuencia SEQ ID NO: 14 de *Vitis vinifera* (nº de acceso a NCBI: XP_002277167.1) [72%] y la secuencia SEQ ID NO: 15 de *Oryza sativa* (nº de acceso BNCI: NP_001054175.1) [63%].

La planta de la invención se caracteriza por tener inhibida la ruta de metilación del AIA, es decir, la cantidad de Me-AIA que la planta es capaz de producir está disminuida respecto a una planta control que no presenta inhibida dicha ruta metabólica. Tal como se ha explicado anteriormente, la metilación del AIA se lleva a cabo, principalmente, por la enzima IAMT1. Por lo tanto, inhibiendo la expresión o la función de dicha enzima, se inhibe o inactiva la metilación del AIA. Por otro lado, como entiende el experto en la materia, también cabe la posibilidad de eliminar o delecionar el gen completo (o parte) que codifica la proteína IAMT1, de forma que dicha proteína está ausente en la planta (o en unos niveles no detectables por técnicas conocidas).

En una realización particular, la planta de la invención se caracteriza porque la expresión del gen que codifica la IAMT1 está disminuida, bloqueada o inhibida con respecto a un control, o da lugar a una proteína no funcional.

En la presente invención se entiende que la expresión de un gen está disminuida/reducida, bloqueada o inhibida/eliminada respecto a un control, cuando los niveles de la proteína codificada por el gen y/o la actividad de la proteína son menores en comparación una planta control (planta silvestre o *wild type*). Así, en el contexto de la presente invención se entiende por "control" a una planta silvestre o *wild type*. La reducción o eliminación de la expresión o la actividad de la proteína está en orden aumentado de preferencia por lo menos de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%,

90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. Un ensayo sobre cómo se puede determinar la actividad de la proteína IAMT1 se describe en el ejemplo 1 de la presente solicitud (e.g. midiendo la cantidad de AIA-Me).

Las distintas técnicas que pueden emplearse para disminuir, bloquear o inhibir la expresión de un gen son ampliamente conocidas en el estado de la técnica y su uso es práctica de rutina para el experto en la materia.

Para la disminución/reducción, bloqueo o inhibición/eliminación de la expresión de un gen endógeno en una planta, se requiere una longitud suficiente de nucleótidos sustancialmente contiguos. Para realizar el silenciamiento génico, este puede ser tan pequeño como 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10 o menos 50 nucleótidos, como alternativa éste puede ser tanto como el gen completo (incluyendo la UTR 5' y/o 3', ya sea en parte o en su totalidad). El tramo de los nucleótidos sustancialmente contiguos puede derivar del gen que codifica la proteína de interés (gen diana que, en la presente invención es el gen que codifica la proteína IAMT1), o de cualquier gen que codifique una proteína con una identidad de secuencia del 50% con la SEQ ID NO: 1.

Un procedimiento para la disminución/reducción, bloqueo o inhibición/eliminación de la expresión del gen endógeno es introducir y expresar en una planta una construcción genética en la que el ácido nucleico se clona como una repetición invertida (en parte o completamente), separado por un espaciador (ADN no codificante). En dicho procedimiento, la expresión del gen endógeno se reduce o se elimina sustancialmente a través del silenciamiento mediado por ARN utilizando una repetición invertida de un ácido nucleico o una parte del mismo, preferentemente capaz de formar una estructura en horquilla. La repetición invertida se clona en un vector de expresión que comprende las secuencias de control. Una secuencia de ADN no codificante (un espaciador, por ejemplo un fragmento de la región de unión de matriz (MAR), un intrón, un poliengarce, etc.) se localiza entre los dos ácidos nucleicos invertidos que forman la repetición invertida. Después de la transcripción de la repetición invertida, se forma un ARN quimérico con una estructura auto-complementaria (parcial o completa). Esta estructura de ARN bicatenario se denomina ARN en horquilla (ARNhp). El ARNhp se procesa en la planta en los ARNip que se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, RNA). El RISC escinde adicionalmente los transcritos de ARNm, reduciendo por lo tanto sustancialmente el número de transcritos de ARNm que van a traducirse en los polipéptidos. Para detalles generales adicionales véase,

por ejemplo, Grierson y col. (1998) WO 98/53083; Waterhouse y col. (1999) WO 99/53050).

La realización de los procedimientos como se describe en el presente documento no se basa en introducir y expresar en una planta una construcción genética en la que el ácido nucleico se clona como una repetición invertida, sino que pueden utilizarse cualquiera de uno o más de los diversos procedimientos de "silenciamiento génico" bien conocidos para lograr los mismos efectos.

Un procedimiento de este tipo para la reducción de la expresión del gen endógeno es el silenciamiento mediado por ARN de la expresión del gen (regulación por disminución). El silenciamiento en este caso se activa en una planta mediante una secuencia de ARN bicatenario (ARNbc) que es sustancialmente similar al gen endógeno diana. Este ARNbc se procesa adicionalmente por la planta de aproximadamente 20 a aproximadamente 26 nucleótidos, denominado ARN de interferencia pequeño (ARNip). Los ARNip se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) que escinde el transcrito de ARNm del gen endógeno diana, reduciendo por tanto sustancialmente el número de transcritos de ARNm que se traducen en un polipéptido. Preferentemente, la secuencia de ARN bicatenario corresponde a un gen diana.

Otro ejemplo de un procedimiento de silenciamiento de ARN implica la introducción de secuencias de ácidos nucleicos o partes de las mismas (en este caso un tramo de nucleótidos sustancialmente contiguos derivados del gen de interés) en una orientación en sentido en una planta. "Orientación en sentido" se refiere a una secuencia de ADN que es homóloga a un transcrito de ARNm de la misma. Por lo tanto, en una planta se introduciría al menos una copia de la secuencia de ácidos nucleicos. La secuencia de ácidos nucleicos adicional reduciría la expresión del gen endógeno, dando lugar a un fenómeno conocido como co-supresión. La reducción de la expresión del gen sería más pronunciada si en una planta se introducen diversas copias adicionales de una secuencia de ácidos nucleicos, cuando hay una correlación positiva entre altos niveles de transcrito y la activación de la co-supresión.

Otro ejemplo de un procedimiento de silenciamiento de ARN implica el uso de las secuencias de ácidos nucleicos antisentido. Una secuencia de "ácidos nucleicos antisentido" comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una

secuencia de ácidos nucleicos "en sentido" que codifica una proteína, es decir, complementaria a la cadena codificante de una molécula de ADN bicatenario o complementario a una secuencia de transcritto de ARNm. La secuencia de ácidos nucleicos antisentido es preferentemente complementaria al gen endógeno a silenciar. La complementariedad puede localizarse en la "región codificante" y/o en la "región no codificante" de un gen. La expresión "región codificante" se refiere a una región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que se traducen en restos de aminoácido. La expresión "región no codificante" se refiere a las secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante que se transcriben pero no se traducen en aminoácidos (denominado también regiones no traducidas 5' y 3').

Las secuencias de ácidos nucleicos antisentido pueden diseñarse de acuerdo con las normas de emparejamiento de bases de Watson y Crick. La secuencia de ácidos nucleicos antisentido puede ser complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos completa, pero también puede ser un oligonucleótido que es antisentido para solo a una parte de la secuencia de ácidos nucleicos (incluyendo la UTR 5' y 3' del ARNm). Por ejemplo, la secuencia de oligonucleótidos antisentido puede ser complementaria a la región que rodea el sitio de inicio de traducción de un transcritto de ARNm que codifica un polipéptido. La longitud de una secuencia de oligonucleótidos antisentido adecuada se conoce en la técnica y puede iniciar de aproximadamente 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 o 10 nucleótidos de longitud o menos. Una secuencia de ácidos nucleicos antisentido como se describe en el presente documento puede construirse usando síntesis química y las reacciones de ligamiento enzimático utilizando los procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos antisentido (por ejemplo, una secuencia de oligonucleótidos antisentido) puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos de origen natural o varios nucleótidos modificados diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para el aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre las secuencias de ácidos nucleicos antisentido y sentido, por ejemplo, pueden utilizarse derivados fosforotioato y nucleótidos sustituidos por acridina. En la técnica se conocen bien ejemplos de nucleótidos modificados que pueden utilizarse para generar las secuencias de ácidos nucleicos antisentido.

La secuencia de ácidos nucleicos antisentido puede producirse biológicamente utilizando un vector de expresión en el que se ha subclonado una secuencia de ácidos nucleicos en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito del ácido nucleico insertado tendrá una orientación antisentido con respecto a un ácido nucleico diana de

interés). La transformación o transfección de células vegetales puede llevarse a cabo mediante técnicas convencionales. Como es bien conocido, pueden utilizarse múltiples sistemas tales como vectores plasmídicos, liposomas, electroporación, micro inyección, difusión, bombardeo de partículas (gene gun), coprecipitación con fosfato de calcio, empleo de vectores virales, etc. 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.

Preferentemente, la producción de las secuencias de ácidos nucleicos antisentido en plantas se produce mediante una construcción de ácido nucleico establemente integrada que comprende un promotor, un oligonucleótido antisentido unido operativamente y un terminador. Las moléculas de ácido nucleico utilizadas para el silenciamiento en los procedimientos descritos en el presente documento (tanto si se introduce en una planta como se genera *in situ*) se hibridan con o se unen a los transcritos de ARNm y/o ADN genómico que codifica un polipéptido para inhibir así la expresión de la proteína, por ejemplo, al inhibir la transcripción y/o traducción. La hibridación puede ser cualquier complementariedad convencional de nucleótidos para formar un dúplex estable o, por ejemplo, en el caso de una secuencia de ácidos nucleicos antisentido que se une a los dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco principal de la doble hélice. Las secuencias de ácidos nucleicos antisentido pueden introducirse en una planta mediante transformación o inyección directa en un sitio de tejido específico. Como alternativa, las secuencias de ácidos nucleicos antisentido pueden modificarse para dirigir las células seleccionadas y después administrarse por vía sistémica. Por ejemplo, para administración sistémica, las secuencias de ácidos nucleicos antisentido pueden modificarse de tal manera que se unan específicamente a los receptores o antígenos expresados sobre una superficie celular seleccionada, por ejemplo, al ligar la secuencia de ácidos nucleicos antisentido a los péptidos o anticuerpos que se unen a los receptores o antígenos de superficie celular. Las secuencias de ácidos nucleicos antisentido también pueden administrarse a células usando los vectores descritos en el presente documento. En el contexto de la presente invención, ejemplos de secuencias de nucleótidos que dan lugar ácidos nucleicos antisentido y que pueden emplearse para silenciar la expresión de un gen se describen en las secuencias SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 41 (Ejemplo 3).

La disminución/reducción, bloqueo o inhibición/eliminación de la expresión del gen endógeno también puede realizarse usando ribozimas. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad de ribonucleasa que pueden escindir una secuencia de ácidos nucleicos monocatenaria, tal como un ARNm, en el que tienen una región complementaria. Por tanto, las ribozimas (por ejemplo, ribozimas cabeza de martillo (descritas en Haselhoff y Gerlach (1988) *Nature* 334, 585-591) pueden utilizarse para escindir catalíticamente los transcritos de ARNm que codifican un polipéptido, reduciendo sustancialmente por tanto el número de transcritos de ARNm que van a traducirse en un polipéptido. Se puede diseñar una ribozima que tenga especificidad para una secuencia de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo: Cech y col. Patente de Estados Unidos N° 4.987.071; Y Cech y col. Patente de Estados Unidos N° 5.116.742). Como alternativa, los transcritos de ARNm correspondientes a una secuencia de ácidos nucleicos pueden utilizarse para seleccionar un ARN catalítico que tenga una actividad específica de ribonucleasa de un conjunto de moléculas de ARN (Bartel y Szostak (1993) *Science* 261, 1411-1418). El uso de ribozimas para el silenciamiento génico en plantas es ampliamente conocido en el estado de la técnica.

El silenciamiento génico también puede producirse por mutagénesis de inserción (por ejemplo, inserción de ADN-T o inserción de transposón) o mediante estrategias como describen, entre otros, Angell y Baulcombe ((1999) *Plant J* 20(3): 357-62), (Amplicon VIGS WO 98/36083) o Baulcombe (documento WO 99/15682).

El silenciamiento génico también puede producirse si hay una mutación en un gen endógeno y/o una mutación en un gen aislado/ácido nucleico posteriormente introducido en una planta. La reducción o eliminación sustancial puede estar provocada por una proteína no funcional. Por ejemplo, la proteína puede unirse a diversas proteínas que interaccionan; por lo tanto pueden proporcionarse una o más mutaciones y/o truncamientos para un polipéptido que es aún capaz de unir las proteínas que interaccionan (tal como proteínas receptoras) pero que no pueden exhibir su función normal (tal como ligando de señalización).

Una estrategia adicional para el silenciamiento génico es dirigir la secuencia de ácidos nucleicos complementaria a la región reguladora del gen (por ejemplo, el promotor y/o los potenciadores) para formar estructuras helicoidales triples que impiden la transcripción del gen en células diana. Véase Helene, C., *Anticancer Drug Res.* 6, 569-84, 1991; Helene y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660, 27-36 1992; Y Maher, L.J. *Bioassays*

14, 807-15, 1992. Las expresiones "elemento regulador", "secuencia de control" y "promotor" se utilizan todas indistintamente en el presente documento y se toman en un contexto amplio para referirse a una secuencia de ácidos nucleicos reguladora capaz de efectuar la expresión de las secuencias a las que se unen. El término "promotor" típicamente se refiere a una secuencia de control de ácidos nucleicos localizada en dirección 5' del inicio transcripcional de un gen y que está implicado en el reconocimiento y unión de la ARN polimerasa y otras proteínas, dirigiendo de este modo la transcripción de un ácido nucleico unido operativamente. Incluidas en los términos anteriormente mencionados se encuentran las secuencias reguladoras transcripcionales derivadas de un gen genómico eucariota clásico (que incluye la caja TATA que es necesaria para el inicio de transcripción adecuado, con o sin secuencia de caja CCAAT) y elementos reguladores adicionales (es decir, secuencias activadoras en dirección 5', potenciadores y silenciadores) que alteran la expresión génica en respuesta al desarrollo y/o estímulo externo, o en una forma específica de tejido. También se incluye dentro del término una secuencia reguladora transcripcional de un gen procariota clásico, en cuyo caso puede incluir una secuencia de caja -35 y/o secuencias reguladoras transcripcionales de caja -10. La expresión "elemento regulador" también incluye una molécula de fusión sintética o un derivado que confiere, activa o potencia la expresión de una molécula de ácido nucleico en una célula, tejido u órgano. Los promotores en la dirección 5' de la secuencia de nucleótidos útiles en los procedimientos de la presente invención pueden modificarse mediante una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de nucleótido sin interferir con la funcionalidad o actividad de cualquiera de los promotores, la fase de lectura abierta (ORF, *Open Reading Frame*) o la región reguladora e 3' tal como terminadores u otras regiones reguladoras 3' que se ubican lejos de la ORF. Para la expresión en plantas, la molécula de ácido nucleico debe, como se ha descrito anteriormente, estar unida operativamente a o comprender un promotor adecuado que exprese el gen de manera adecuada en tiempo y con el patrón de expresión espacial requerido. La expresión "unido operativamente" como se usa en el presente documento se refiere a un enlace funcional entre la secuencia promotora y el gen de interés, de tal manera que la secuencia promotora es capaz de iniciar la transcripción del gen de interés.

Un experto conocerá otros procedimientos, tales como el uso de anticuerpos dirigidos a un polipéptido endógeno para inhibir su función en la planta, o la interferencia en la ruta de señalización en la que un polipéptido está implicado. En particular, se puede

prever que las moléculas fabricadas por el hombre pueden ser útiles para inhibir la función biológica de un polipéptido diana o para interferir con la ruta de señalización en la que está implicado el polipéptido diana. Como alternativa, puede establecerse un programa de detección hasta identificar en una población de plantas las variantes naturales de un gen, cuyas variantes codifican los polipéptidos con actividad reducida. Dichas variantes naturales también pueden utilizarse, por ejemplo, para realizar recombinación homóloga. Para desactivar la expresión génica y/o traducción de ARNm pueden utilizarse microARN (miARN) artificiales y/o naturales. Los miARN endógenos son ARN pequeños monocatenarios típicamente con una longitud de 19-24 nucleótidos. Principalmente funcionan para regular la expresión génica y/o la traducción de ARNm. La mayor parte de los microARN (miARN) de planta tienen complementariedad perfecta o casi perfecta con sus secuencias diana.

Sin embargo, hay dianas naturales con hasta cinco emparejamiento erróneos. Se procesan a partir de ARN no codificantes más largos con estructuras de plegamiento características mediante RNAsas específicas bicatenarias de la familia Dicer. Después del procesamiento, se incorporan en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) al unirse a su componente principal, una proteína Argonauta. Los miARN sirven como componentes de especificidad del RISC, debido al emparejamiento de bases con ácidos nucleicos diana, principalmente ARNm, en el citoplasma. Los acontecimientos reguladores posteriores incluyen la escisión de ARNm diana y la destrucción y/o inhibición traduccional. Por tanto, los efectos de la sobreexpresión de miARN se reflejan frecuentemente en niveles de ARNm reducidos de los genes diana. Los microARN artificiales (amiARN), que típicamente tienen 21 nucleótidos de longitud, pueden modificarse por ingeniería genética específicamente para regular negativamente la expresión génica de un solo gen o de múltiples genes de interés. En la técnica se conocen bien los determinantes de la selección diana de microARN de planta. Se han definido los parámetros empíricos para el reconocimiento diana y pueden utilizarse para ayudar en el diseño de los amiARN específicos (Schwab y col., *Dev. Cell* 8, 517-527, 2005). Están disponibles para el público las herramientas convenientes para el diseño y la generación de los amiARN y sus precursores (Schwab y col., *Plant Cell* 18, 1121-1133, 2006).

Para un rendimiento óptimo, las técnicas de silenciamiento génico utilizadas para reducir la expresión en una planta de un gen endógeno requieren el uso de secuencias de ácidos nucleicos de plantas monocotiledóneas para la transformación de plantas

monocotiledóneas, y de plantas dicotiledóneas para la transformación de plantas dicotiledóneas. Preferentemente, una secuencia de ácidos nucleicos de cualquier especie de planta dada se introduce dentro de esta misma especie. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos de arroz se transforma en una planta de arroz. Sin embargo, no es un requisito absoluto que la secuencia de ácidos nucleicos que se introduce se origine de la misma especie de planta como la planta en la que se introducirá. Basta con que exista una homología sustancial entre el gen diana endógeno y el ácido nucleico a introducir.

Anteriormente se han descrito ejemplos de diversos procedimientos para la disminución/reducción, bloqueo o inhibición/eliminación de la expresión en una planta de un gen endógeno. Un experto en la técnica será capaz de adaptar fácilmente los procedimientos anteriormente mencionados para el silenciamiento para conseguir la reducción de la expresión de un gen endógeno en una planta completa o en partes de la misma a través del uso de un promotor apropiado.

Por otro lado, también se contempla la posibilidad de llevar modificaciones post-traduccionales para inactivar la proteína IAMT1 y que ésta no pueda llevar a cabo la metilación del AIA. La modificación postraduccional de una proteína es un cambio químico ocurrido en ésta después de su síntesis. Las modificaciones postraduccionales ocurren mediante cambios químicos de los aminoácidos que constituyen las proteínas y pueden ser de muchos tipos. Ejemplos de modificación postraduccionales incluyen, sin limitar a, acilación, fosforilación, metilación, hidroxilación, glicosilación, glicación, sulfonilación, prenilación, nitrosilación y nitración.

En resumen, la planta puede ser manipulada genéticamente para obtener plantas en la que el promotor que regula la transcripción del gen en cuestión esté inactivo (por ejemplo, mediante la introducción de mutaciones en el genoma), administrar compuestos que impidan la transcripción del gen y/o la traducción del ARNm, tales como ARN de interferencia (siARN, miARN o piARN), etc. Por otro lado, la planta de la invención también puede caracterizarse por que la expresión del gen que codifica la IAMT1 da lugar a una proteína no funcional (en la presente invención, la proteína IAMT1 no puede llevar a cabo la metilación del AIA). Como en el caso anterior, técnicas de ingeniería genética pueden emplearse para expresar proteínas no funcionales, por ejemplo, introducción de truncaciones, mutaciones, deleciones, inserciones, etc. que originan que la proteína IAMT1 no pueda desempeñar su función, es decir, no puedan reconocer al sustrato (AIA) y metitarlo. Adicionalmente, técnicas

para obtener las plantas de la invención incluyen, pero no se limitan a, la técnica de *Tilling* y la técnica de CRISPR/CAR.

La técnica de *Tilling* (del inglés *Targeting Induced Local Lesions in Genomes*) es una técnica de genética molecular emplea una mutagénesis química inducida, por ejemplo mediante etilmetanosulfonato o naranja de acridina, sobre un grupo de individuos y tras este protocolo, se detecta mediante la técnica adecuada la presencia de mutaciones en el gen deseado. El *TILLING* combina mutagénesis de alta densidad con procedimientos de detección de alto rendimiento. La técnica de *TILLING* es ampliamente conocida en el estado de la técnica (McCallum y col. 2000, *Nat Biotechnol* 18: 455-457; revisado por Stemple 2004, *Nat Rev Genet* 5(2): 145-50).

La técnica de CRISPR (del inglés de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) puede usarse para introducir mutaciones genéticas en localizaciones específicas del ADN genómico, tal como se describe en la solicitud de patente US2014273235A1.

En una realización particular, el gen que codifica la proteína IAMT1 presenta una deleción que origina la pérdida en la proteína del aminoácido Gly en la posición correspondiente al aminoácido 226 con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1. Sin querer estar vinculados a ninguna teoría, se cree que debido a esta deleción, la proteína IAMT1 no es capaz de unirse al AIA (el sustrato) y llevar a cabo su metilación.

Adicionalmente, en el contexto de la presente invención, también se contemplan agentes inhibidores, inactivadores o bloqueadores de la propia proteína IAMT1 (tal como se ha mencionado previamente), y su uso para el incremento o la restauración de la fertilidad de las plantas, consiguiendo con ello una mayor producción de semillas y frutos.

Como se ha explicado previamente, una característica de la planta de la invención es que ésta presenta una fertilidad incrementada con respecto a una planta control, es decir, puede producir más semillas y más frutos que una planta control, tanto en condiciones óptimas como en condiciones de estrés abiótico, tanto por sequía como por altas temperaturas. Así, en una realización particular, la planta presenta un incremento de la fertilidad en condiciones de estrés hídrico (escasez de agua) o térmico (altas temperaturas), más en particular, el incremento de la fertilidad se

produce a una temperatura de entre 15°C y 37°C, preferiblemente, de entre 20°C y 29°C, más preferiblemente, en días largos, es decir, en presencia de más de 12 horas de luz.

Como entiende el experto en la materia, la planta de la invención comprende en su genoma el gen que codifica la proteína IAMT1, en donde la expresión de dicho gen está disminuida, bloqueada o inhibida con respecto a un control o da lugar a una proteína no funcional. Como se ha explicado anteriormente, dicha expresión disminuida, bloqueada o inhibida o de lugar a una proteína no funcional puede conseguirse mediante técnicas de silenciamiento genético que conlleven la introducción de modificaciones genéticas en el gen que codifica dicha la proteína IAMT1. Por este motivo, dentro de la presente invención, también se contempla el germoplasma derivado de la planta de la invención que lleva incorporado en su genoma la modificación genética que origina que su expresión este disminuida, bloqueada o inhibida con respecto a un control o da lugar a una proteína no funcional.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un germoplasma procedente de la planta de la invención en donde dicho germoplasma (i) se selecciona del grupo que consiste en una célula, una célula germinal (polen) y una semilla procedente de dicha planta, y (ii) comprende una modificación genética en el gen que codifica la proteína IAMT1 que origina que su expresión esté disminuida, bloqueada o inhibida o de lugar a una proteína no funcional. En la presente invención se entiende por "germoplasma" el material biológico que contiene la variabilidad genética intraespecífica o a los materiales genéticos que pueden perpetuar una especie o una población de un organismo.

El término "célula" tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una célula vegetal. Así pues, el término célula comprende, al menos, una célula del parénquima, célula meristemática o de cualquier tipo, diferenciada o indiferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición un protoplasto (célula de una planta que carece de pared celular).

En una realización particular, el gen que codifica la proteína IAMT1 presenta una delección que origina la pérdida en la proteína del aminoácido Gly en la posición correspondiente al aminoácido 226 con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.

Método de la invención

Tal como se ha explicado anteriormente, los inventores han descubierto que la inhibición de la metilación del AIA da lugar a un incremento en la fertilidad de las plantas. Así, en el contexto de la presente invención, se contempla un método para incrementar o restaurar la fertilidad de una planta que comprende inhibir, disminuir o bloquear la ruta de metilación del AIA. Los métodos y técnicas para inhibir, disminuir o bloquear la ruta de metilación del AIA han sido descritos previamente y son aplicables al presente aspecto inventivo. Entre dichas técnicas, se encuentra la inhibición, la disminución o el bloqueo de la enzima encargada de metilar el AIA, es decir, la proteína IAMT1.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para incrementar la fertilidad de una planta, de aquí en adelante método de la invención, que comprende inhibir, disminuir o bloquear

- (i) la expresión del gen que codifica la proteína IAMT1 con respecto a un control o
- (ii) la actividad de la proteína IAMT1.

Los términos “inhibir”, “disminuir” y “bloquear” han sido definidos y explicados previamente en la presente descripción, así como los métodos que existen en el estado de la técnica para inhibir, disminuir o bloquear la expresión de genes o la actividad de las enzimas. Dichas definiciones y explicaciones son aplicables al presente aspecto inventivo.

Así, en una realización particular, la planta pertenece al género *Solanum* sp., en particular, a la especie *Solanum lycopersicum* (tomate).

En otra realización particular, la proteína IAMT1 comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, una identidad de secuencia del 50% con la SEQ ID NO: 1.

En otra realización particular, el gen que codifica la proteína IAMT presenta una deleción que origina la pérdida en la proteína del aminoácido Gly en la posición correspondiente al aminoácido 226 con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.

En otra realización particular, la inhibición, la disminución o el bloqueo de la expresión del gen o de la actividad de la proteína se lleva a cabo mediante la técnica CRISPR o TILLING.

En otra realización particular, se produce un incremento de fertilidad en condiciones de estrés hídrico o estrés térmico.

Todas estas realizaciones particulares han sido descritas en detalle previamente en el presente documento y son aplicables al presente aspecto inventivo.

Uso del gen que codifica la proteína IAMT1

Tal como se ha explicado al inicio de la presente descripción, la pérdida de la función de la enzima IAMT1 acelera el crecimiento de los tubos polínicos en comparación con plantas control (ver Ejemplo 1 y Figuras 5 y 6) y con ello, se incrementa la fertilidad de las plantas, lo que se traduce en un mayor rendimiento de los cultivos al obtener plantas que generan más semillas y con ello, más frutos.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del gen que codifica la proteína IAMT1 para incrementar de fertilidad de la planta.

En la presente invención, se entiende por “incrementar la fertilidad” a la mayor producción de semillas con respecto a una planta control, tanto en condiciones óptimas como en condiciones de estrés abiótico, tanto por sequía como por altas temperaturas. En una realización particular, dicho incremento de fertilidad se produce por inhibición, bloqueo o disminución de la expresión del gen que codifica la proteína IAMT1, o por la expresión de dicho gen de una proteína IAMT1 no funcional.

En otra realización particular, la proteína IAMT1 comprende una secuencia de aminoácidos con, al menos, un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 1.

En otra realización particular, el gen que codifica la proteína IAMT presenta una deleción que origina la pérdida en la proteína del aminoácido Gly en la posición correspondiente al aminoácido 226 con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.

Todas estas realizaciones particulares así como los términos empleados han sido definidos y/o explicados en los aspectos inventivos anteriores.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Descripción molecular de los alelos mutantes de *IAMT1* en *Arabidopsis thaliana*. (A) Esquema de las inserciones de T-DNA que dan lugar a los alelos *iamt1-1* (línea SALK_072125) e *iamt1-2* (línea GT_5_41946). (B) Productos de PCR obtenidos por la combinación de oligonucleótidos indicada en cada caso. (C) Nivel de expresión, medido por RT-qPCR, del alelo silvestre del gen *IAMT1* en plantas de *A. thaliana* de 10 días de edad cultivadas en luz continua.

Figura 2. Cuantificación de los niveles de Me-AIA en plántulas silvestres (Col-0) y del mutante *iamt1-1* cultivadas durante diez días en luz continúa. La diferencia entre ambos es estadísticamente significativa ($p < 0,01$) [t-student].

Figura 3. Aspecto general de las plantas silvestres (Col-0) y del mutante *iamt1-1* cultivadas durante 35 días en días largos (16 horas de luz, 8 horas de oscuridad).

Figura 4. Actividad DR5::GUS en ovarios de plantas silvestres (Col-0) y del mutante *iamt1-1*. Las flechas indican las regiones más activas, que corresponden a las que muestran mayor actividad de auxinas (AIA).

Figura 5. Tubos polínicos en ovarios de plantas silvestres (Col-0) y del mutante *iamt1-1* polinizados manualmente con polen silvestre. Los tubos se visualizan mediante la tinción de la calosa que se acumula a su paso. Las flechas indican hasta donde alcanzan los tubos polínicos en cada ovario, 2 horas después de la polinización.

Figura 6. Producción de silicuas (frutos) en plantas silvestres (Col-0) y del mutante *iamt1-1*, cuando éstas son cultivadas constantemente a la temperatura óptima de

crecimiento (20°C), a una temperatura alta que provoca estrés (29°C), o cuando se cultivan a 20°C pero se transfieren a 29°C en el momento de la floración. Los resultados son la media de frutos producidos por planta, después de analizar 36 plantas de cada genotipo en cada condición de crecimiento. La diferencia entre ambos genotipos es estadísticamente significativa ($p < 0,001$) [t-student].

Figura 7. Producción de semillas en plantas silvestres (Col-0) y del mutante *iamt1-1*, cuando éstas son cultivadas constantemente a la temperatura óptima de crecimiento (20°C), a una temperatura alta que provoca estrés (29°C), o cuando se cultivan a 20°C pero se transfieren a 29°C en el momento de la floración. Los resultados son la media de frutos producidos por planta, después de analizar 36 plantas de cada genotipo en cada condición de crecimiento. La diferencia entre ambos genotipos es estadísticamente significativa ($p < 0,001$) [t-student].

Figura 8. Producción de frutos de tomate en plantas sometidas a estrés por sequía y altas temperatura tratadas con auxinas. Las plantas se cultivaron a 25°C en invernadero hasta el momento de comenzar la floración, cuando se transfirieron a una cabina a 37°C y se cesó el riego. La mitad de las plantas fueron rociadas con AIA 100 µM y produjeron frutos, mientras que la otra mitad sin AIA no produjeron frutos.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1

Con el fin de analizar el efecto de la mutación del gen *IAMT1* en *Arabidopsis thaliana*, se obtuvieron del centro de germoplasma de Nottingham (NASC) semillas portadoras de inserciones de T-DNA en la región codificante de dicho gen (Fig. 1A). Éstas correspondían a los códigos SALK_072125 (que se renombró *iamt1-1*) y GT_5_41946 (que se renombró *iamt1-2*). Se seleccionaron plantas homocigotas para cada una de las inserciones (Fig. 1B) mediante PCR (ver Técnica 1) utilizando como cebadores los oligonucleótidos indicados en la Tabla 1. En las plantas homocigotas se determinó mediante RT-qPCR (ver Técnica 2 y Tabla 1) el nivel de expresión de un ARNm completo correspondiente a *IAMT1* en plantas silvestres (accesión Col-0) y del mutante *iamt1-1* en el mismo fondo genético (Fig. 1C). Teniendo en cuenta la

sensibilidad de la técnica, y que se detectan una expresión más de 1000 veces menor en el mutante *iamt1-1*, el resultado indica que dicho mutante no puede sintetizar una proteína IAMT1 completa en ningún caso. De hecho la mutación *iamt1-1* se predice que provocaría en cualquier caso la aparición de una proteína truncada en la que no estaría presente el posible centro activo de la proteína, al faltar varios aminoácidos clave, como la Gly-226.

La determinación, mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (ver Técnica 3), del Me-AIA producido en plántulas cultivadas en luz continua durante diez días indicó que el mutante *iamt1-1* no ha perdido completamente la actividad carboximetil transferasa a pesar de no expresar el alelo silvestre del gen *IAMT1* (Fig. 2). A pesar del defecto en IAMT1, el aspecto general de las plantas mutantes *iamt1-1* era indistinguible del de plantas control (Col-0) (Fig. 3). Sin embargo, en ovarios del mutante sí que fue posible encontrar una mayor acumulación de AIA libre asociada a la falta de metilación del AIA, como indica de forma indirecta la tinción de β -glucuronidasa (GUS) en plantas expresando el gen *GUS* bajo el control del promotor DR5, que es inducible por auxinas (AIA) (Fig. 4) (ver Técnica 4).

Para estudiar el efecto de la mutación de *IAMT1* sobre la capacidad reproductiva de las plantas, se analizó mediante tinción con azul de anilina (Técnica 5) la deposición de calosa en ovarios polinizados manualmente con polen silvestre. Esta tinción permite visualizar los tubos polínicos mientras atraviesan el ovario hasta alcanzar los óvulos. Dos horas después de la polinización, los tubos polínicos apenas habían atravesado el estilo de ovarios de plantas silvestres (Col-0), mientras que en los ovarios del mutante *iamt1-1* los tubos polínicos habían alcanzado ya la posición de los primeros óvulos (Fig. 5).

El crecimiento más rápido de los tubos polínicos en el mutante *iamt1-1* sugería que esta característica podría conferir una ventaja al mutante en condiciones ambientales en las que la viabilidad del polen está comprometida, como en casos de sequía o de elevadas temperaturas. Para comprobar esta hipótesis, se cultivaron plantas del mutante *iamt1-1* y de su parental silvestre (Col-0) hasta completar su ciclo vital en varios regímenes de temperatura (conseguidos en fitotrones regulados a 20°C, o a 29°C). Al finalizar la floración se determinó el número de frutos y de semillas totales por planta. El mutante *iamt1-1* produjo siempre más frutos (Fig. 6) y más semillas (Fig. 7) que el control de plantas silvestres en todas las condiciones: (1) cuando las plantas

eran cultivadas en días largos a 20°C; (2) cuando las plantas se cultivaron en días largos a 29°C desde la germinación; y (3) cuando las plantas se cultivaron en días largos a 20°C y fueron transferidas, justo en el momento de comenzar la floración, a una cámara con igual luminosidad pero a 29°C. Estos resultados indican que las plantas con una capacidad reducida de metilar el AIA muestran una mayor capacidad reproductiva que las silvestres incluso en condiciones de estrés térmico, posiblemente por el crecimiento acelerado de los tubos polínicos en sus ovarios.

Ejemplo 2

Para comprobar que el enriquecimiento en AIA observado en los ovarios del mutante *iamt1-1* de *A. thaliana* es responsable de su mayor capacidad reproductiva en condiciones de estrés, y para averiguar si este efecto podría extenderse a otras especies vegetales, se realizó un análisis de fertilidad en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv Moneymaker) en condiciones de estrés.

Se cultivaron 16 plantas de tomate a 26°C en invernadero, y en el momento de florecer se transfirieron todas a una cabina a 37°C y se cesó el riego, al tiempo que se rociaban 8 de las plantas con una solución de AIA 100 µM, y las 8 restantes sólo con agua. El tratamiento se mantuvo durante dos semanas cada 2 días, y al cabo de ese tiempo se comprobó que ninguna de las plantas tratadas con agua habían producido frutos, mientras que todas las plantas tratadas con AIA habían producido frutos de tamaños variables (Fig. 8). Este resultado está de acuerdo con informes públicos previos utilizando plantas de arroz, y también apoya la idea de que el mayor nivel de AIA en ovarios del mutante *iamt1* es la causa probable del mantenimiento de la capacidad reproductiva en condiciones de estrés térmico y de sequía.

Ejemplo 3: Proteínas homólogas a la proteína IAMT1 e inhibidores de su expresión

Los inventores han identificado dos proteínas homólogas a la proteína IAMT1 cuya inhibición aumenta el tamaño de los tubos polínicos. Dichas proteínas y las secuencias de nucleótidos que las codifican son las siguientes:

- Proteína indol-3-acetato O-metiltransferasa 1 (GenBank gi|460397058|ref|XP_004244085.1) procedente de *Solanum lycopersicum* (SEQ ID NO: 28). La secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína se describe en la secuencia SEQ ID NO: 29 (gen Solyc07g64990, GeneBank

accession number XM_004244037). La secuencia de ADNc se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 30.

- Proteína similar a S-adenosil-L-metionina ácido salicílico carboxil metiltransferasa (en inglés S-adenosyl-L-methionine salicylic acid carboxyl methyltransferase-like protein) (AHRD V1 **** Q9FLN8_ARATH) procedente de *S. lycopersicum* (SEQ ID NO: 31). La secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína se describe en la secuencia SEQ ID NO: 32 (gen Solyc12g14500, Accession number XM_004251872). La secuencia de ADNc se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 33.

Mediante el empleo de técnicas recombinantes se han desarrollado dos fragmentos de ADNc que transferidos a un vector son capaces de inducir el silenciamiento de los genes arriba descritos.

Clonaje de los fragmentos seleccionados

Los fragmentos seleccionados se amplificaron por PCR a partir de ANDc de tomate utilizando los siguientes oligos:

- gen Solyc07g64990
S07 for → 5' CCACCCCGACGATATCGGTCCAAAGAAATGAAGAGAGGTG 3' (SEQ ID NO: 34)
S07 rev → 5' CGCGTCGTCTGGATGGCTAACCACA 3' (SEQ ID NO: 35)
- gen Solyc12g14500
S12 for → 5' GGTCTAAAGAAATGAAGAGAGGTGGT 3' (SEQ ID NO: 36)
S12 rev → 5' CTTTGGACCGATATCGTCGGGGTGGTTGACAACCTAG 3' (SEQ ID NO: 37)

El fragmento S07 se amplificó con los oligos S07for y S07rev. El fragmento S12 se amplificó con los oligos S12for y S12rev. El fragmento S1207 se amplificó con los oligos S12for y S12rev, utilizando los fragmentos S07 y S12 como molde.

Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pCR2.1. Una vez verificadas las secuencias por secuenciación se transfirieron al vector viral pTRV2 mediante digestión con enzimas de restricción y ligación con T4 Ligasa.

Diseño del VIGS (Virus-induced gene silencing):

Se ha usado la herramienta "VIGS tool" de Solgenomics (Tomato Functional Genomics Database) para definir las regiones finalmente seleccionadas de cada uno de los genes de *Solanum lycopersicum*. El resultado es una indicación de las regiones óptimas para utilizar con la técnica VIGS.

Fragmento del cDNA utilizado para transferir al vector viral pTRV2 e inducir el silenciamiento del gen Solyc07g64990 (Desde ahora fragmento S07):

```
GGTCAAAGAAATGAAGAGAGGTGGTTCTATGTTTTAGCTTGTTTAGGTAGA  
ACTTCTGTTGACCCTACTGATCAAGGTGGGGCTGGACTTCTCTTTGGTACACACTTTCA  
AGATGCTTGGGATGATCTTGTCCAAGAGGGCCTAATTACTAGTGAGAAAAGGGAC  
AAGTTCAATATTCCAGTGTATGCACCAAGCATTCAAGATTTCAAAGAAGTGGTAGA  
AGCAAATGACTCATTCAAATAACAATCTTCAAGTTTTAGGGGAGGTAGCCCTC  
TTGTGGTTAGCCATCCAGACGA (SEQ ID NO: 38)
```

Fragmento del cDNA utilizado para transferir al vector viral pTRV2 e inducir el silenciamiento del gen Solyc12g14500 (Desde ahora fragmento S12):

```
GGTCTAAAGAAATGAAGAGAGGTGGTTCCATGTTTTAGTTTGCTTAGGAAGGACC  
TCTATGGATCCAATAGACCAAGGTGGGGCTGGACTTCTTTTTGGGACTCATTTTCA  
AGATGCTTGGGATGATCTTGTCCAAGAGGGTCTAATTACAAGTGAAAAGAGGGAC  
AACTTTAACATCCCAGTGTATGCACCAAGTATAACAAGATTTTAAGGAAGTGGTTGA  
AGCCAATGGCTCATTCACTATCAACAACCTTCAAGTTTTTAGGGGAGGGAGTCCTC  
TAGTTGTCAACCACCCCGACGAT (SEQ ID NO: 39)
```

Fragmento generado combinando los dos fragmentos seleccionados de cada gen para transferir al vector viral pTRV2 e inducir el silenciamiento de ambos genes (Solyc07g64990 y Solyc12g14500; desde ahora fragmento S1207)

```
GGTCTAAAGAAATGAAGAGAGGTGGTTCCATGTTTTAGTTTGCTTAGGAAGGACC  
TCTATGGATCCAATAGACCAAGGTGGGGCTGGACTTCTTTTTGGGACTCATTTTCA  
AGATGCTTGGGATGATCTTGTCCAAGAGGGTCTAATTACAAGTGAAAAGAGGGAC  
AACTTTAACATCCCAGTGTATGCACCAAGTATAACAAGATTTTAAGGAAGTGGTTGA
```

AGCCAATGGCTCATTCACTATCAACAACCTTCAAGTTTTTAGGGGAGGGAGTCCTC
TAGTTGTCAACCACCCCGACGATATCGGTCCAAAGAAATGAAGAGAGGTGGTTCT
ATGTTTTTAGCTTGTTTAGGTAGAACTTCTGTTGACCCTACTGATCAAGGTGGGGC
TGGACTTCTCTTTGGTACACACTTTCAAGATGCTTGGGATGATCTTGTCCAAGAGG
GCCTAATTACTAGTGAGAAAAGGGACAAGTTCAATATTCCAGTGTATGCACCAAGC
ATTCAAGATTTCAAAGAAGTGGTAGAAGCAAATGACTCATTCAAATAACAATCTT
CAAGTTTTTAGGGGAGGTAGCCCTCTTGTGGTTAGCCATCCAGACGACGCG (SEQ
ID NO: 40).

MÉTODOS

TÉCNICA 1. Genotipado por PCR de las inserciones de T-DNA.

Se extrajo el ADN de las plantas empleando el método descrito en Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991), Nucleic Acids Res 19: 1349, usando los cebadores indicados en la Tabla 1 en las combinaciones indicadas en la figura 1, se realizó la reacción estándar de PCR empleando la enzima ExTaq (Takara) y un programa de 30 ciclos (30 segundos a 95°C, 1 minuto a 56°C, 1 minuto a 68°C)

Tabla 1. Oligonucleótidos usados como cebadores en reacciones de PCR

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:	Aplicación
F1	TGCCGGAGAGAAGACAACAAC	16	Genotipado alelos <i>iamt1</i>
R1	TTAAAGAGAGGTGGGGCCATG	17	Genotipado alelos <i>iamt1</i>
F2	CGCCAACGGCTCATTTG	18	Genotipado alelos <i>iamt1</i>
R2	CATCAGAAGTTGGTCGTGCCT	19	Genotipado alelos <i>iamt1</i>
F3	TGTTCTCACGAGTTGAAAGCCGAGC	20	Genotipado alelos <i>iamt1</i>
R3	AAACTAAAATAGATAAAGTCTTTGTACC	21	Genotipado alelos <i>iamt1</i>
LP	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	22	Genotipado alelos <i>iamt1</i>
SP	TACGAATAAGAGCGTCCATTTTAGAGT	23	Genotipado alelos <i>iamt1</i>
qRT1	TTAAAGAGAGAAGGAGAGATCCATAGAGA	24	Análisis expresión <i>IAMT1</i>
qRT2	GCCACCTTTCATGCTGAGAAG	25	Análisis expresión <i>IAMT1</i>
EF-F	ATTGGAACGGATATGCTCCA	26	Expresión del gen control EF1a
EF-R	CCTTACCTGAACGCCTGTCA	27	Expresión del gen control EF1a

TÉCNICA 2. RT-qPCR de *IAMT1* en el mutante *iamt1-1*.

Se extrajo el ARN de las plantas empleando el Mini kit RNAeasy (QIAGEN) siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. La síntesis del cDNA se realizó a partir de 1 µg de ARN mediante el kit Superscript III (Life Technologies), siguiendo las instrucciones de la casa comercial, y la qPCR de IAMT1 y del gen control EF1a se efectuó con los cebadores indicados en la Tabla 1 y el kit SYBR Green Quantitative (Sigma).

TÉCNICA 3. Cuantificación del Me-AIA.

Se recogieron plántulas de *Arabidopsis thaliana* de diez días cultivadas en luz continua y se congelaron en nitrógeno líquido. La extracción se realizó a partir de 100 mg de tejido, con tres réplicas biológicas en paralelo para cada genotipo. Se añadieron 1 mL de metanol y 50 pmol de 2H-Me-AIA, se calentó la mezcla durante 2 minutos a 60°C y después se mantuvo durante al menos 1 hora a temperatura ambiente hasta que todo el metanol se evaporó. El sedimento se disolvió en 2 mL de tampón fosfato sódico (50 mM, pH 7.0) conteniendo 5% de metanol, y se sometió a 10 minutos de tratamiento de ultrasonidos (Branson B5510DTH, Branson Ultrasonics, Dunbury, EEUU). A continuación se ajustó el pH a 2,5 con ácido clorhídrico 1M, y se purificó la muestra mediante extracción en fase sólida usando columnas Oasis HLB 1 mL / 30 mg (Waters Corporation, Milford, EEUU) acondicionadas con 1 mL de metanol y 1 mL de agua, y equilibradas con 0,5 mL de tampón fosfato sódico (50 mM, pH 2,5). Tras la aplicación de la muestra, la columna se lavó dos veces con 1 mL de metanol 5%, y se eluyó con 2 mL de metanol 80%. El eluido se secó completamente usando un concentrador a vacío (Vacufuge plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). A cada extracto se le añadió entonces 20 µl de N,O-bis(trimetilsilil trifluoroacetamida con 1% de trimetilclorosilano (BSTFA+TMCS, 99:1 (v/v), Supelco, Bellefonte, EEUU). Se transfirieron los extractos a viales de 400 µl de GC-MS, y se incubaron durante 70 minutos a 60°C.

Para analizar el Me-AIA, se inyectó 1 µl de cada muestra mediante un autoinyector CombiPAL (CTC Analytics, Zwingen, Suiza) a un cromatógrafo de gases Bruker Scion-455 (BRUKER Daltonics, Bremen, Alemania) equipado con una columna de 30 m x 0,25 mm con una fase estacionaria de 0,25 mm ZB35 (Phenomenex, Torrance, EEUU). Como fase móvil se usó helio a un flujo de 1 mL/minuto. La temperatura del inyector era de 250°C, y la temperatura de la columna se mantuvo a 50°C durante 1,20 minutos. A partir de ahí, la temperatura de la columna fue aumentando a 30°C/minuto hasta alcanzar 120°C, y después a 10°C/minuto hasta los 325°C, manteniéndola a esa temperatura durante 5 minutos más. El efluente de la columna se introdujo en la fuente

iónica de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Bruker Scion-TQ, usándolo en modo EI-MRM. La temperatura de transferencia se fijó a 250°C, y la temperatura de la fuente iónica a 200°C. Los iones se generaron con -70 eV en una corriente de emisión de 80 μ A. El tiempo de permanencia fue de 100 ms, y se registraron las reacciones m/z 261 a 202 (Me-AIA endógeno) y m/z 266 a 207 (2H-Me-AIA estándar). Como gas de colisión se usó argón a 1,5 mTorr. La cantidad del compuesto endógeno se calculó a partir del cociente entre la señal del compuesto no marcado y el fragmento conteniendo el isótopo estable.

TÉCNICA 4. Evaluación de la señalización de auxinas mediante DR5::GUS

Se introdujo mediante cruces genéticos el marcador DR5::GUS en el fondo *iamt1-1* y en las flores de plantas adultas de este mutante y de su parental en Col-0 se examinó la expresión de este marcador mediante el protocolo estándar de tinción de GUS descrito en Blázquez MA, Soowal L, Lee I, Weigel D (1997), *Development* 124: 3835-3844.

TÉCNICA 5. Visualización de los tubos polínicos

Se siguió al pie de la letra lo especificado en la publicación Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T, Kuroiwa T (2006), *Nat. Cell Biol.* 8: 64-71.

REIVINDICACIONES

1. Una planta que comprende el gen que codifica la proteína IAMT1, caracterizada porque dicha proteína IAMT1:
 - (i) está ausente o en unos niveles no detectables por técnicas conocidas, o
 - (ii) no es funcional o
 - (iii) se presenta en la planta en unos niveles inferiores con respecto a la planta control, siendo dicha diferencia estadísticamente significativa, de forma que se observa el fenotipo descrito en la planta de la presente invención, y
 - (iv) dicha la planta no pertenece a la especie *Arabidopsis thaliana*.
2. Planta según la reivindicación 1, en la que
 - (i) la expresión de dicho gen está disminuida, bloqueada o inhibida con respecto a un control o da lugar a una proteína no funcional.
3. Planta según la reivindicación 1 ó 2, en la que la proteína IAMT1 comprende una secuencia de aminoácidos con, al menos, un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 1.
4. Planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el gen que codifica la proteína IAMT1 presenta una delección que origina la pérdida en la proteína del aminoácido Gly en la posición correspondiente al aminoácido 226 con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
5. Planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la planta pertenece al género *Solanum* sp., en particular, a la especie *Solanum lycopersicum*.
6. Un germoplasma procedente de una planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho germoplasma:
 - (i) se selecciona del grupo que consiste en una célula, una célula germinal y una semilla procedente de dicha planta, y
 - (ii) comprende una modificación genética en el gen que codifica la proteína IAMT1 que origina que su expresión esté disminuida, bloqueada o inhibida o de lugar a una proteína no funcional.
7. Método para incrementar la fertilidad de una planta que comprende inhibir, disminuir

o bloquear

- (i) la expresión del gen que codifica la proteína IAMT1 con respecto a un control o
- (ii) la actividad de la proteína IAMT1.

8. Método según la reivindicación 7, en el que la proteína IAMT1 comprende una secuencia de aminoácidos con, al menos, un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 1.
9. Método según la reivindicación 7 u 8, en la que el gen que codifica la proteína IAMT1 presenta una delección que origina la pérdida en la proteína del aminoácido Gly en la posición correspondiente al aminoácido 226 con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la planta pertenece al género *Solanum* sp., en particular, a la especie *Solanum lycopersicum*.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que se produce un incremento de fertilidad en condiciones de estrés hídrico o estrés térmico.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que la inhibición, la disminución o el bloqueo de la expresión del gen o de la actividad de la proteína se lleva a cabo mediante la técnica CRISPR o TILLING.
13. Uso del gen que codifica la proteína IAMT1 para incrementar de fertilidad de la planta.
14. Uso según la reivindicación 13, en la que dicho incremento de fertilidad se produce por inhibición, bloqueo o disminución de la expresión del gen que codifica la proteína IAMT1, o por la expresión de dicho gen de una proteína IAMT1 no funcional.
15. Uso según la reivindicación 13 o 14, en la que la proteína IAMT1 comprende una secuencia de aminoácidos con, al menos, un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 1.

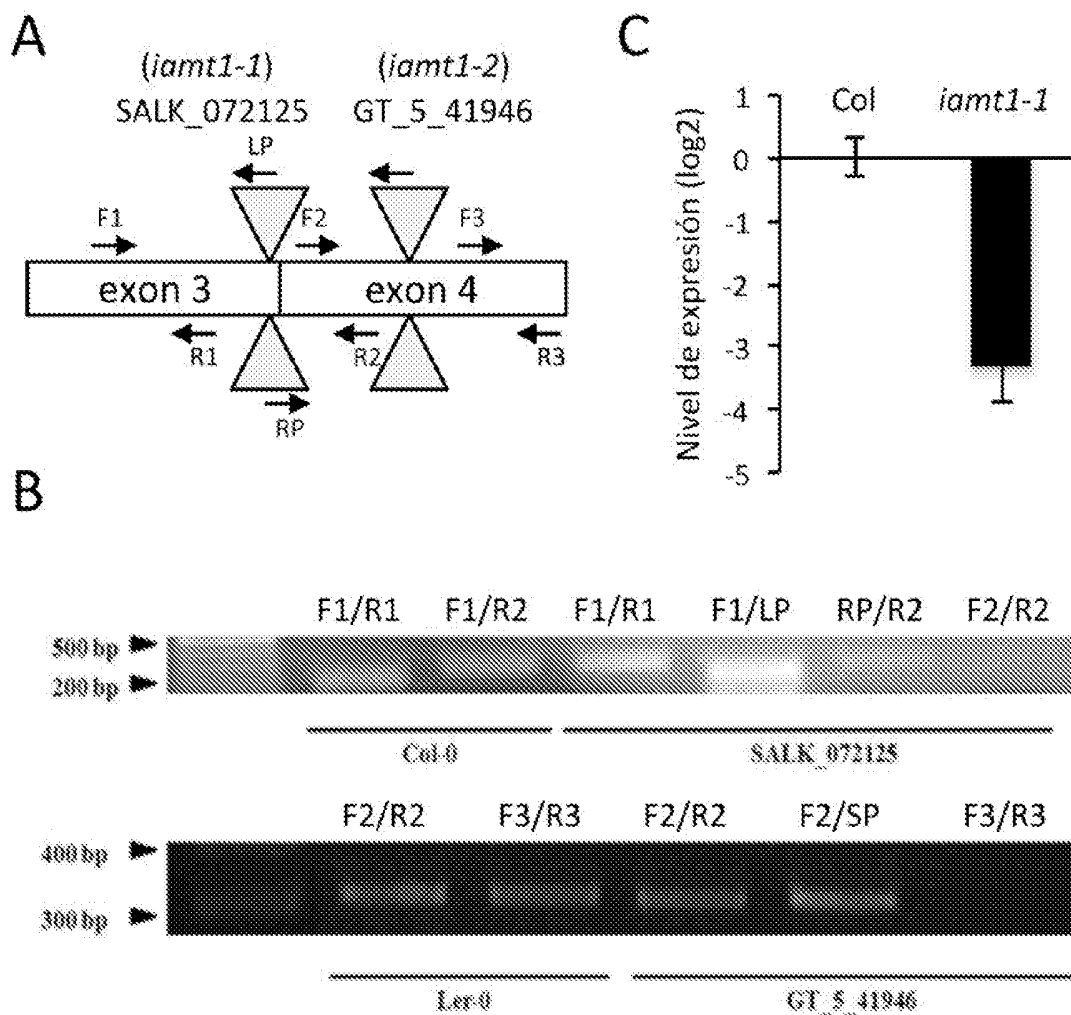


Fig. 1

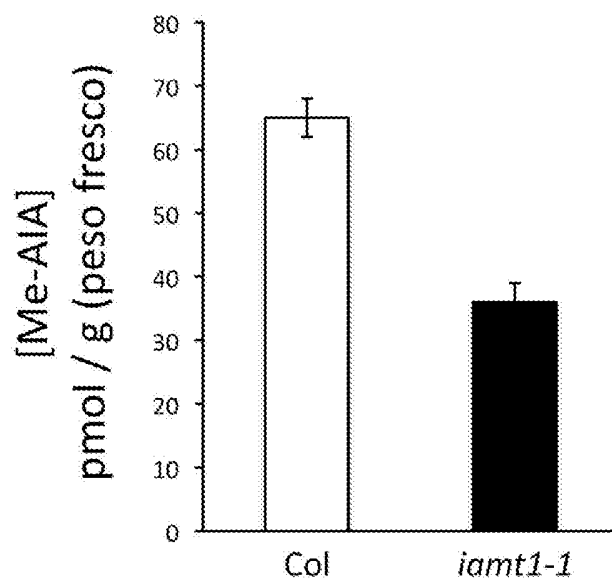


Fig. 2

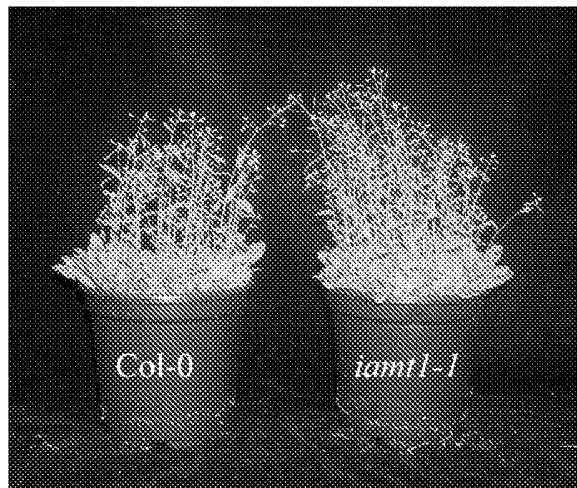


Fig. 3

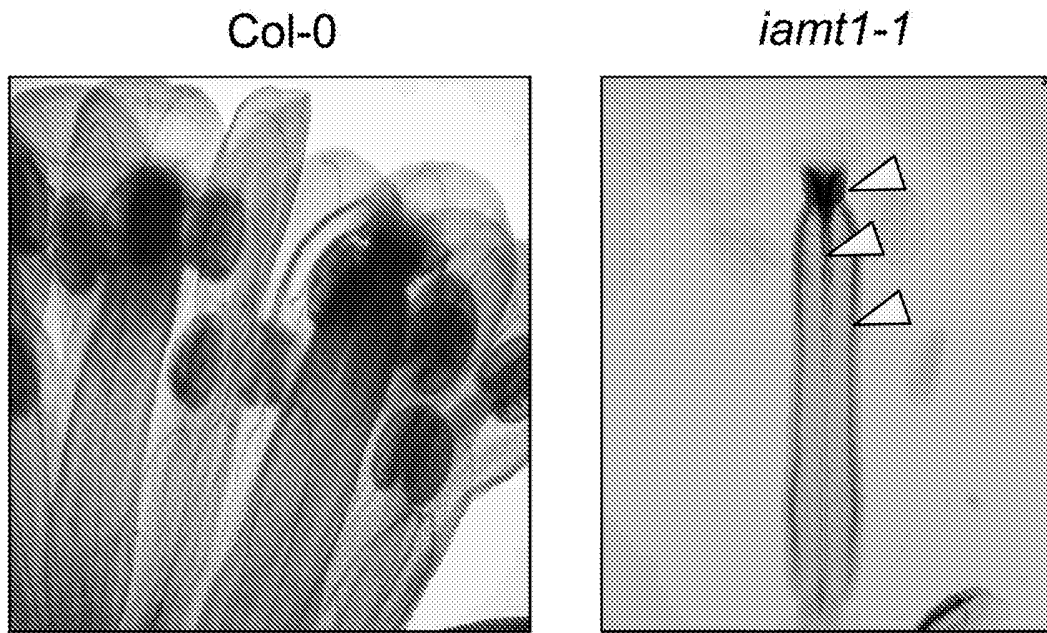


Fig. 4

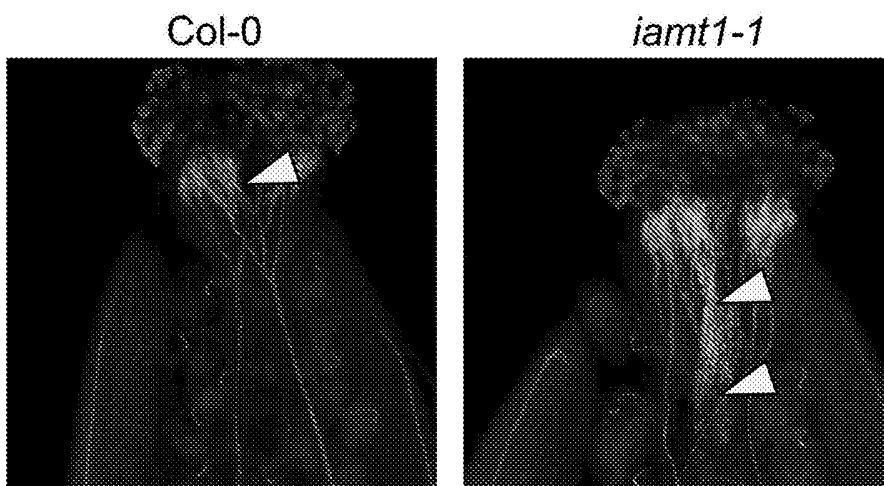


Fig. 5

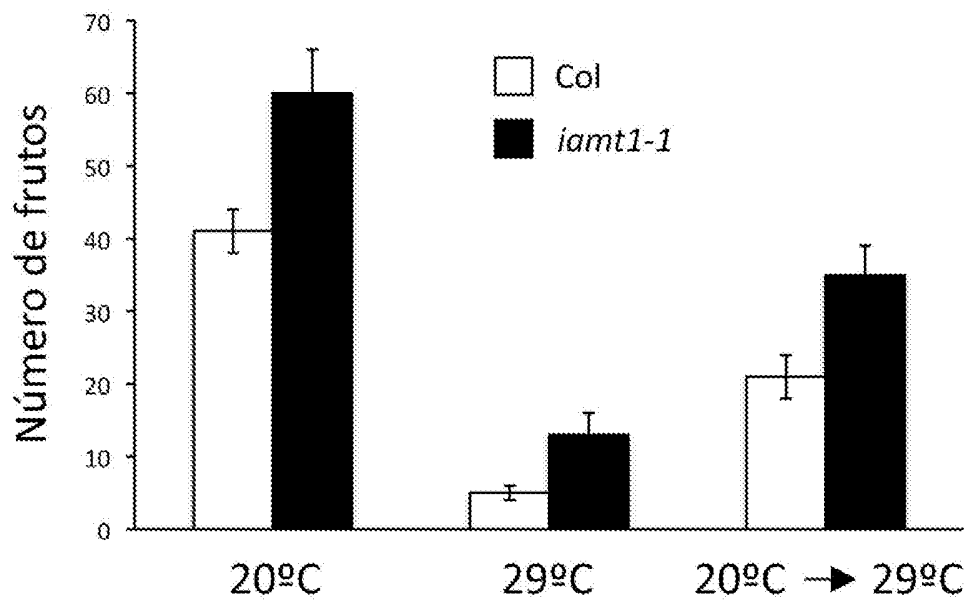


Fig. 6

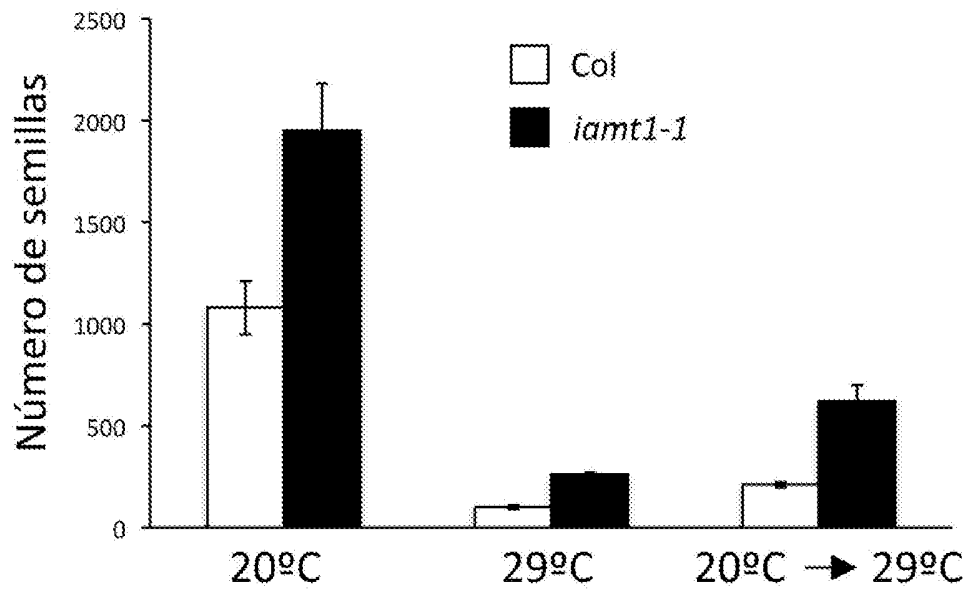


Fig. 7

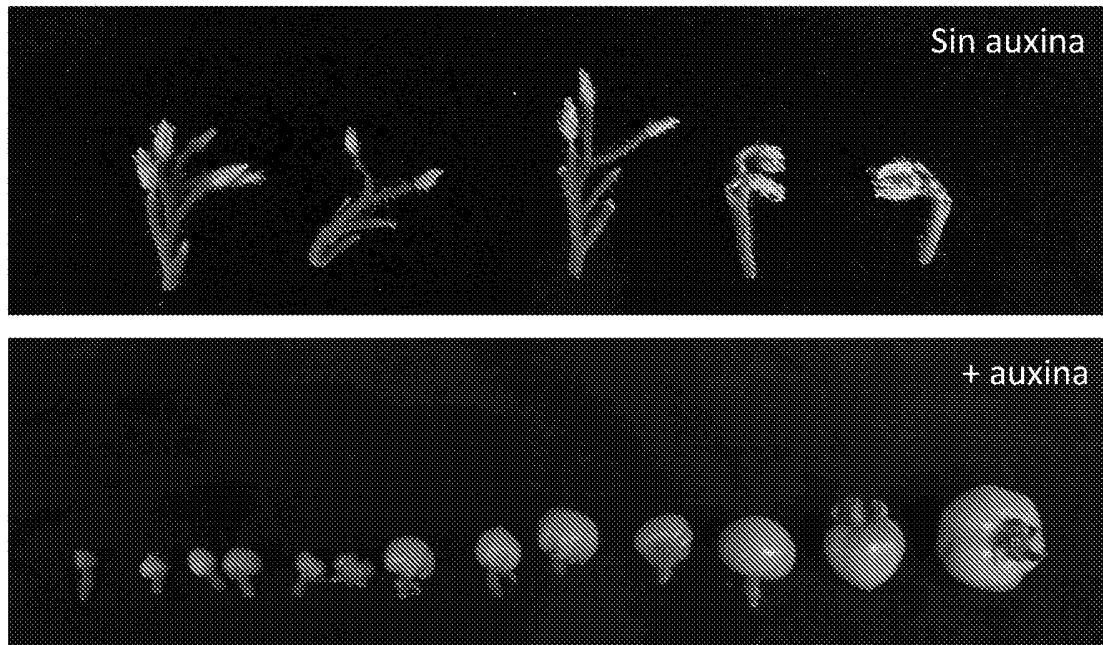


Fig. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070722

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/63 (2006.01)

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)

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)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates <i>Arabidopsis</i> leaf development. <i>Plant Cell</i> . 2005 American Society of Plant Biologists .VOL: 17 No: 10 Pags: 2693 – 2704. Abstract	1-3, 5, 6
Y	WO 9853083 A1 (ZENECA LTD ET AL.) 26/11/1998. Abstract	1-3, 5, 6
A	WO 9915682 A2 (PLANT BIOSCIENCE LTD ET AL.) 01/04/1999. Abstract	1-15
A	WO 9953050 A1 (COMMW SCIENT IND RES ORG ET AL.) 21/10/1999. Abstract	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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 documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
16/12/2015

Date of mailing of the international search report
(17/12/2015)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
I. Rueda Molíns

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493279

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070722

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO9853083 A1	26.11.1998	US2003175965 A1 PT983370E E JP2001525680 A ES2209134T T3 EP1352963 A1 DK0983370T T3 DE69818252T T2 CA2286480 A1 AU7444298 A AU747872B B2 AT250131T T EP0983370 A1 EP0983370 B1	18.09.2003 27.02.2004 11.12.2001 16.06.2004 15.10.2003 26.01.2004 15.07.2004 26.11.1998 11.12.1998 23.05.2002 15.10.2003 08.03.2000 17.09.2003
----- WO9953050 A1	----- 21.10.1999	CY1111682T T1 JP2002511258 A JP5015373B B2 ES2367073T T3 PT1068311E E SI1068311T T1 DK1068311T T3 AT507299T T EP2267139 A2 EP2267139 A3 EP2267138 A2 EP2267138 A3 NZ507093 A CN1306571 A CN1202246C C CA2325344 A1 AU2951499 A AU760041B B2 EP1068311 A1 EP1068311 A4	07.10.2015 16.04.2002 29.08.2012 28.10.2011 20.07.2011 29.07.2011 08.08.2011 15.05.2011 29.12.2010 25.05.2011 29.12.2010 25.05.2011 29.08.2003 01.08.2001 18.05.2005 21.10.1999 01.11.1999 08.05.2003 17.01.2001 23.02.2005
----- WO9915682 A2	----- 01.04.1999	US6531647 B1 US2003229920 A1 US6635805 B1 NZ337753 A JP2001517451 A JP2001512313 A EP1017831 A2 EP0970228 A1 EP0970228 B1 DE69834715T T2 CA2301894 A1 CA2280207 A1 AU9175198 A AU753727B B2 AU6001698 A	11.03.2003 11.12.2003 21.10.2003 29.06.2001 09.10.2001 21.08.2001 12.07.2000 12.01.2000 31.05.2006 10.05.2007 01.04.1999 20.08.1998 12.04.1999 24.10.2002 08.09.1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070722

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
-----	-----	AU736040B B2	26.07.2001

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070722

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
C12N15/63 (2006.01)

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	An indole-3-aceticacid carboxyl methyltransferase regulates <i>Arabidopsis</i> leaf development. <i>Plant Cell</i> . 2005 American Society of Plant Biologists .VOL: 17 No: 10 Pags: 2693 – 2704. Resumen	1-3, 5, 6
Y	WO 9853083 A1 (ZENECA LTD ET AL.) 26/11/1998. Resumen	1-3, 5, 6
A	WO 9915682 A2 (PLANT BIOSCIENCE LTD ET AL.) 01/04/1999. Resumen	1-15
A	WO 9953050 A1 (COMMW SCIENT IND RES ORG ET AL.) 21/10/1999. Resumen	1-15

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

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"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).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"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.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"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.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
16/12/2015

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
17 de diciembre de 2015 (17/12/2015)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
 Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
 Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
I. Rueda Molíns

 Nº de teléfono 91 3493279

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2015/070722

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO9853083 A1	26.11.1998	US2003175965 A1	18.09.2003
		PT983370E E	27.02.2004
		JP2001525680 A	11.12.2001
		ES2209134T T3	16.06.2004
		EP1352963 A1	15.10.2003
		DK0983370T T3	26.01.2004
		DE69818252T T2	15.07.2004
		CA2286480 A1	26.11.1998
		AU7444298 A	11.12.1998
		AU747872B B2	23.05.2002
		AT250131T T	15.10.2003
		EP0983370 A1	08.03.2000
		EP0983370 B1	17.09.2003
		WO9953050 A1	21.10.1999
JP2002511258 A	16.04.2002		
JP5015373B B2	29.08.2012		
ES2367073T T3	28.10.2011		
PT1068311E E	20.07.2011		
SI1068311T T1	29.07.2011		
DK1068311T T3	08.08.2011		
AT507299T T	15.05.2011		
EP2267139 A2	29.12.2010		
EP2267139 A3	25.05.2011		
EP2267138 A2	29.12.2010		
EP2267138 A3	25.05.2011		
NZ507093 A	29.08.2003		
CN1306571 A	01.08.2001		
CN1202246C C	18.05.2005		
CA2325344 A1	21.10.1999		
AU2951499 A	01.11.1999		
AU760041B B2	08.05.2003		
EP1068311 A1	17.01.2001		
EP1068311 A4	23.02.2005		
WO9915682 A2	01.04.1999	US6531647 B1	11.03.2003
		US2003229920 A1	11.12.2003
		US6635805 B1	21.10.2003
		NZ337753 A	29.06.2001
		JP2001517451 A	09.10.2001
		JP2001512313 A	21.08.2001
		EP1017831 A2	12.07.2000
		EP0970228 A1	12.01.2000
		EP0970228 B1	31.05.2006
		DE69834715T T2	10.05.2007
		CA2301894 A1	01.04.1999
		CA2280207 A1	20.08.1998
		AU9175198 A	12.04.1999
		AU753727B B2	24.10.2002
		AU6001698 A	08.09.1998

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2015/070722

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
-----	-----	AU736040B B2	26.07.2001