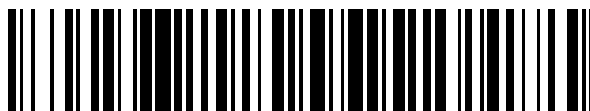


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 840**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2008** **E 08737478 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013** **EP 2121939**

54 Título: **Métodos para la modulación de las vías de metilación del SIRNA y ADN dirigido por ARN**

30 Prioridad:

19.01.2007 US 881418 P

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

13.03.2014

73 Titular/es:

**PLANT BIOSCIENCE LIMITED (33.3%)
Norwich Research Park Colney Lane
Norwich, Norfolk NR4 7UH, GB;
NAVARRO, LIONEL (33.3%) y
VOINNET, OLIVIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**NAVARRO, LIONEL y
VOINNET, OLIVER**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 447 840 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Métodos para la modulación de las vías de metilación del SIRNA y ADN dirigido por ARN**Descripción**5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] Composiciones y métodos para conferir resistencia frente a un amplio espectro de patógenos en plantas.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] En los últimos años ha habido una apreciación creciente de los efectos complejos y pleiotrópicos del silenciamiento génico y los componentes de la maquinaria del silenciamiento génico. A partir de los efectos observados inicialmente por la supresión transgénica de la expresión de genes endógenos en plantas del género *petunia*, ha surgido una interpretación de los efectos en plantas y animales que abarcan el mantenimiento de control en los transposones de control en el estado de metilación y, en efecto, en la actividad transcripcional de la cromatina.

ARN pequeño. Dícers y Argonautas: núcleo bioquímico del silenciamiento de ARN

20 [0003] "Silenciamiento de ARN" se refiere, en conjunto, a diferentes procesos basados en ARN que tienen como resultado la inhibición específica de secuencia de la expresión génica, ya sea a niveles de transcripción, de estabilidad de ARNm o de traducción. Estos procesos comparten tres características químicas: (i) la formación de ARN(s) bicatenario, (ii) el proceso de ARN en ARNs bicatenarios pequeños de 20 a 60 nucleótidos (nt) con extremos en bisel, y (iii) acción inhibitoria de una hebra de ARN pequeño seleccionado en complejos efectores que actúan en el ARN / ADN parcial o totalmente complementario. Puesto que son numerosos los mecanismos que pueden generar ARN bicatenario, las etapas efectoras y de proceso de ARN pequeño tienen un núcleo bioquímico común. Los ARNs pequeños se producen por enzimas de tipo RNasa III llamadas Dícers¹ con uniones de ARN bicatenario, ARN helicasa, RNasa III y dominios PAZ (Piwi / Argonauta / Zwiile). Una de las dos hebras del ARN pequeño se une a complejos efectores llamados RISCs (complejo de silenciamiento inducido por ARN) que contiene invariablemente un miembro de la familia de la proteína Argonauta (Ago). Los Agos tienen un dominio de unión PAZ al ARN pequeño y también contienen un dominio PIWI que proporciona actividad endonucleolítica (conocida como "slicer") a los RISCs programados para segmentar los ARNs^{2,3} diana. De hecho, el Ago2 humano cargado de ARN pequeño por sí solo constituye un RISC capaz de segmentarse *in vitro*, pero muchas proteínas adicionales también pueden ser componentes funcionales de los RISCs *in vivo*⁴.

35 [0004] En la presente, se analizan pruebas recientes de diferentes vías construidas sobre el núcleo Dicer – Ago que realizan un conjunto de funciones biológicas dirigidas por el ARN pequeño en plantas superiores. Estas incluyen la regulación de la expresión de genes endógenos, el control de transposones, la defensa viral y la formación de heterocromatina. El objetivo principal de la presente se centra en plantas ya que muestran un espectro casi completo de efectos conocidos de silenciamiento de ARN, pero también se incluyen otras similitudes y diferencias con otros organismos.

Vías de silenciamiento de ARN exógenamente desencadenado que dan como resultado el clivaje del transcrito45 Transgenes productores de ARN bicatenario y IR - SGPT: práctico, pero misterioso

[0005] El silenciamiento génico post - transcripcional (SGPT) se descubrió en *Petunia* transgénica como una pérdida de los loci transgénicos (ya sea en configuración sentido o antisentido) y del gen de expresión homólogo endógeno⁵. Los loci transgénicos a menudo producían ARN bicatenario ya que formaban conjuntos con patrones de integración complejos^{6,7}. En consecuencia, la eficacia del SGPT aumentó enormemente por la expresión simultánea de sentido y antisentido o por la producción directa de ARNs bicatenarios largos a partir de transgenes⁹ colocados como invertidos repetidos (IR). El último proceso, IR – SGPT, es actualmente la base de ARN de interferencia (ARNi) en plantas, e incluye, al menos, dos clases de ARNs diferentes denominadas ARNs pequeños de interferencia (siRNA). Se cree que los siRNAs de 21 nt guían el clivaje del ARNm, mientras que los siRNAs de 24 nt pueden mediar exclusivamente las modificaciones de cromatina^{10, 11}. Estas dos clases de siRNA acumulan poblaciones en la secuencia completa de los transcritos de IR¹². Aunque se utiliza generalmente como una herramienta de búsqueda, el IR – SGPT sigue siendo uno de los procesos menos conocidos de silenciamiento de ARN de plantas. Un constructo transgénico colocado como invertido repetido (IR), empleado normalmente en el ARNi de plantas, produce transcritos bicatenarios con brazos perfectamente complementarios. Dos enzimas de tipo Dicer (DCL) procesan los transcritos bicatenarios. El DCL3 produce siRNAs de 24 nt, que pueden dirigir la modificación de ADN / histona en los loci homólogos y parece dispensable para el clivaje de ARN. La Figura 3 muestra dos de los numerosos escenarios no excluyentes mutuamente que, posiblemente, explican las modificaciones de cromatina dirigidas al siRNA en los loci endógenos. Cabe destacar que ambos escenarios se basan en esquemas circulares y amplificados en los que la producción de siRNA y la modificación de cromatina se refuerzan entre sí. DCL4 es, probablemente, la enzima preferida para la producción de siRNAs de 21 nt a partir del ARN bicatenario. Una hebra de siRNA se incorpora al RISC cargado con AGO1 para dirigir el clivaje endonucleolítico del ARN homólogo,

conduciéndolo a su degradación. Ambas especies de siRNA se protegen de la degradación añadiendo grupos metilo a los extremos 3' – Terminal de cada hebra de ARN, mediante metiltransferasa HEN1. Por consiguiente, hasta hace poco tiempo, no se había descubierto ningún mutante defectivo en esta vía, a pesar de los esfuerzos considerables de diversos laboratorios. Una de las explicaciones más probables es que los altos niveles de ARN bicatenario producido en IR – SGPT promueve las actividades de los diferentes Dícers y RISCs, que actuarían normalmente en distintas vías, para mediar redundantemente el silenciamiento. Análisis recientes de los *knockouts* de Dícer combinatorio en *Arabidopsis* apoya esta idea^{13, 14}. No obstante, el Dícer de tipo 4 (DCL4) parece ser la enzima preferida para el IR – SGPT, ya que se requiere específicamente para la acumulación de siRNA de 21 nt y el silenciamiento a partir de un transgén¹⁵ IR moderadamente expresado específico del floema. DCL2 también puede estar involucrado en el ARNi, ya que convierte algunos sustratos de DCL4 endógeno en siRNAs de 22 nt en ausencia de DCL4^{13, 14}, aunque no está claro si estas moléculas pueden sustituir funcionalmente los productos de siRNA de 21 nt de DCL4.

S – SGPT y silenciamiento transitivo: introducir RDR

[0006] Existen numerosos ejemplos en los que las inserciones de transgenes de copia única producen transcritos de sentido que desencadenan el SGPT. Esta vía, la de (S) – SGPT sentido, se ha analizado minuciosamente utilizando pantallas de genética clásica que presentan cómo se produce el ARN bicatenario. La vía se muestra en la presente siendo mejorada por ARNs con características anormales, aunque puede haber desencadenantes alternativos. Las anomalías de ARN pueden incluir la falta de una cola poli – A o del capuchón 5'. Este último, normalmente, permitiría la degradación de ARN a través de la actividad de la 5' – 3' exonucleasa XRN4. La falta de XRN4 favorecería la acumulación de ARNm sin capuchón, desencadenando por tanto su conversión en ARN bicatenario por la acción combinada de RDR6, SGS3, SDE3 y, posiblemente, WEX. El ARN bicatenario resultante se procesa a continuación por un DCL, normalmente DCL4 (véase el texto), produciendo siRNAs únicamente de 21 nt y metilados por HEN1. Estas moléculas pueden tomar parte en dos conjuntos de reacciones. En primer lugar, pueden utilizarse como cebadores por RDR6 para reforzar la producción de ARN bicatenario a partir de plantillas de hebra única en un fenómeno conocido como “transitividad”. En el silenciamiento de ARN transitivo, una fuente de ARN bicatenario de siRNAs primarios favorece la producción de siRNAs 5' y 3' secundarios del intervalo inicialmente dirigido de un transcrito. La producción de siRNAs 5' secundarios (caso 1) puede explicarse por la síntesis de hebra complementaria dependiente de RDR6 / SGS3 / SDE – 3, que se ceba por uno de los siRNAs primarios. La producción de siRNAs 3' secundarios (caso 2) no puede explicarse por una reacción cebadora, y es posible que los fragmentos de ARN resultantes del clivaje de un transcrito dirigido a siRNA primario se reconozcan como anormales, iniciando por tanto la síntesis de ARN bicatenario con un S – SGPT. Las reacciones 5' y 3' no deberían considerarse mutuamente excluyentes, al igual que los siRNAs producidos en (2) podrían cebar la posterior síntesis de ARN bicatenario según el esquema representado en (1). DCL4 se muestra como aparentemente involucrado en la biogénesis de siRNA 5' y 3' secundarios. A diferencia de los siRNAs primarios (que pueden ser de 21 nt y 24 nt), los siRNAs secundarios son únicamente de 21 nt. No queda del todo claro si los siRNAs primarios de 24 nt pueden desencadenar el silenciamiento de ARN transitivo. También pueden incorporarse al RISC cargado con AGO1 para dirigir el clivaje específico de secuencia del ARN homólogo. Los productos de clivaje resultantes podrían percibirse como ARNs anormales y, por tanto, podrían favorecer la posterior producción de ARNs bicatenarios, dando como resultado una reacción amplificada. Estas pantallas convergieron en la identificación de la ARN polimerasa RDR6 dependiente de ARN, una de las seis RDRs posibles *Arabidopsis*^{16, 17}. Se cree que RDR6 reconoce y emplea como plantillas ciertos transcritos transgénicos con características anormales que incluyen la falta de capuchón 5'. Por ejemplo, la mutación de XRN4 *Arabidopsis*, una exonucleasa 5' – 3' que degrada los ARN mensajeros sin capuchón, aumentó la acumulación del transgén sin capuchón de los ARN mensajeros. Esto favoreció su conversión en ARN bicatenario por RDR6 y la subsecuente degradación de todos los transcritos transgénicos a través de la vía S – SGPT¹⁸. Lo más probable es que RDR6 sintetice hebras complementarias de su plantilla de ARN, dando como resultado la producción de ARN bicatenario, ya que una mutación con cambio de sentido en el motivo GDD, esencial para la actividad catalítica de todos los RDRs caracterizados, es suficiente para mitigar S – SGPT¹⁷.

[0007] Aunque el Dícer que produce siRNAs a partir de productos RDR6 suele ser identificado, la acumulación de siRNA de S – SGPT en *Arabidopsis* requiere la proteína como una hélice superenrollada de función desconocida SGS3¹⁷, la exonucleasa de RNAsa D WEX¹⁹, la metiltransferasa HEN1²⁰ específica de ARNs y la posible helicasa SDE3²¹ de ARN. A diferencia del RDR6, la presencia de SDE3 no es estrictamente necesaria para el silenciamiento transgénico, y, por tanto, podría resolver las estructuras secundarias encontradas en las plantillas RDR²¹. En consecuencia, un SDE3 homólogo es parte del complejo RDR de *Schizosaccharomyces pombe*²². SDE3 podría también actuar en otras etapas del silenciamiento de ARN ya que la proteína homóloga Armitage es necesaria para la unión de RISC en *Drosophila*, un organismo desprovisto de genes RDR²³. WEX está relacionado con el dominio exonucleasa de *mut – 7* necesario para el silenciamiento del transposón y ARNi en *C. elegans*, pero su papel en el S – SGPT sigue siendo impreciso. La metilación catalizada por HEN1 de extremos terminales libres de hidroxilo protege los ARNs de *Arabidopsis*, incluyendo los siRNAs de S – SGPT, a partir de la adición de uridinas al extremo 3' – Terminal del ARN, una modificación que favorece su inestabilidad (véase la sección miRNA del presente documento)²⁵.

[0008] En una pantalla de S – SGPT mutante, se recuperó una serie alélica extensiva de ago1, sosteniendo que, entre los 10 parálogos de *Arabidopsis* AGO, AGO1 está involucrado específicamente en esta vía^{26, 27}. Incluso los

alelos de ago1 débiles perdían completamente los siRNAs de S – SGPT, sugiriendo inicialmente que AGO1 tenía un papel en la producción de siRNA en lugar de una acción²⁷. Sin embargo, desde que se reconoció AGO1 como una actividad *slicer* de los RISCs cargados con miRNA y siRNA de la planta^{28, 29}, la pérdida de siRNAs en ago1 puede también ser resultado de su pobre incorporación en RISC, mejorando su pérdida. No obstante, no puede excluirse que AGO1 tenga un papel en la producción de siRNA – posiblemente unido a la síntesis de ARN bicatenario dependiente de RDR6 – ya que algunos mutantes defectuosos de ago1 en la acumulación de siRNA en S – SGPT no muestran efecto alguno en IR – SGPT³⁰.

[0009] RDR6 y, quizás otros componentes de S – SGPT, también están involucrados en el fenómeno relacionado al silenciamiento, la transitividad^{31, 32}. La transitividad es la “transición” de siRNAs primarios (correspondientes a un intervalo de secuencia de un ARN dirigido) a siRNAs secundarios que dirigen regiones fuera del intervalo inicial. En las plantas, esta transición puede tener lugar tanto en 5' como en 3' de intervalo primario, posiblemente reflejando actividades dependientes del cebador e independientes del cebador RDR6. La transitividad sirve como un mecanismo de amplificación de siRNA que también cuenta para otros movimientos de silenciamiento en plantas transgénicas³³. Los siRNAs secundarios son exclusivamente de 21 nt. Por tanto, dados estos siRNAs de S – SGPT para acumular especies de 21 nt³², el DCL4 produce siRNAs de 21 nt a partir de transcritos de IR¹⁵, y las actividades de DCL4 y RDR6 están vinculadas a la biogénesis de siRNA de 21 nt *trans* - actuante (véase a continuación), desencadenando la especulación de que DCL4 también es el Dícer preferido para la producción de siRNA tanto en S – SGPT como en transitividad.

[0010] ¿Cuál sería la función biológica de una vía amplificada y autónoma no celular basada en siRNAs de 21 nt? Una respuesta, como mínimo, es la defensa antiviral. Los siRNAs de 21 nt derivados de virus se acumulan en células infectadas³⁴, y las plantas comprometidas por la función de RDR6 son hipersusceptibles a diferentes virus^{17, 35}. Una respuesta amplificada por RDR cebada por siRNAs virales (transitividad) y / o aumentada por ARNs anormales derivados de virus (vía S – SGPT) aseguraría que la maquinaria de silenciamiento sigue las altas velocidades de replicación del patógeno. La naturaleza sistémica de la respuesta inmunizaría las células que están a punto de ser infectadas, dando como resultado, en algunos casos, la exclusión viral. Según esta idea, los meristemos de *Nicotiana benthamiana* con RDR6 de actividad comprometida se verían invadidos por varios virus, aunque estos tejidos son, normalmente, inmunes a infecciones³⁶.

Vías de silenciamiento de ARN endógeno involucrado en regulaciones post – transcripcionales

MicroARNs

[0011] En las plantas, los miRNAs se producen como hebras únicas, especies de ARNs de 20 a 24 nt, escindidos de transcritos endógenos no codificadores con estructura plegada. Los siRNAs actúan en *trans* en los transcritos celulares diana para inducir su degradación por clivaje, o para atenuar la producción de proteínas. Los transcritos de miRNA primarios (pri) con estructuras plegadas son producto de la ARN polimerasa II (Pol II). La posición del miRNA maduro está en *box*. La acción nuclear combinada de DCL1, HYL1 y HEN1 produce un miRNA maduro y metilado. En cuanto a la exportación nuclear, posiblemente mediada por la exportina 5 homóloga HASTY de *Arabidopsis*, el miRNA maduro se incorpora al RISC cargado con AGO1 para favorecer dos posibles conjuntos de reacciones que no son mutuamente excluyentes. Una primera reacción permitiría el clivaje endonucleolítico de ARN homólogo, como el dirigido por los siRNAs de 21 nt. Esto daría como resultado un fragmento de clivaje de 5' con uridinas adicionales – una modificación que puede favorecer su rápida sustitución – y un fragmento 3' más estable que podría degradarse por la exonucleasa XRN4. El esquema también parece albergar la posibilidad de que los miRNAs maduros podrían tener efectos específicos en la secuencia en el núcleo (véase el texto). Estas actividades nucleares incluyen el clivaje de ARN (hasta la incorporación en un posible RISC nuclear) así como la metilación de ADN. Actualmente, se han identificado aproximadamente 100 genes *MIRNA* de *Arabidopsis* incluidos en 25 familias distintas³⁸, pero parece que existen muchos más (*Box 1*). Los miRNAs tienen papeles biológicos importantes en el desarrollo de plantas y animales, como se ha probado por los fuertes defectos de desarrollo de varios mutantes con sobreexpresión de miRNA y pérdida de las funciones³⁷ de los mutantes. Por ejemplo, los elementos reguladores clave de la respuesta de plantas a la hormona auxina, que especifica la forma de órganos y ejes del cuerpo de la planta, se controlan por miRNAs^{39, 40}. Los miRNAs también regulan la acumulación de los factores de transcripción (Fts) involucrados en la identidad / número de órganos florales^{41, 42}, forma de la hoja⁴³, asimetría abaxial / adaxial de la hoja^{44, 45} y formación de raíces laterales⁴⁶. Además, DCL1 y AGO1, involucrados en la vía miRNA, se regulan ellos mismos por miRNAs^{47, 48}. Sin embargo, se han identificado miRNAs de plantas con dianas validadas involucradas en el metabolismo primario y secundario^{39, 49}, lo que indica que sus papeles no se limitan a regulaciones del desarrollo. Los miRNAs pueden, de hecho, tener otras muchas implicaciones en la fisiología de las plantas y en su adaptación al medio (*Box 1*).

Transcripción y biogénesis de miRNA

[0012] La mayoría de los genes miRNA de plantas y animales residen entre genes codificadores de proteínas o en intrones⁵⁰. La mayoría son, probablemente, para ser unidades independientes de transcripción y sus patrones de expresión a menudo muestran tejidos exquisitos – o incluso especificidad de tipo celular, según un papel en el diseño y mantenimiento de estados celulares diferenciados^{51, 52}. No obstante, los factores de transcripción o

mecanismos post – transcripcionales que especifican la expresión génica de miRNA siguen siendo desconocidos. Muchos transcritos humanos de miRNA primario (pri – miRNAs) se sintetizan por la ARN polimerasa II (Pol II), ya que los pri – miRNAs tienen capuchones 5' y colas poli – A típicos de Pol II, sus síntesis se inhiben con fármacos que inhiben Pol II, y esta se encuentra en sus promotores *in vivo*⁵³. Del mismo modo, aunque de manera menos extensa, las pruebas también apuntan a Pol II como la principal polimerasa que produce pri – miRNAs de plantas³⁸.

[0013] Hasta la transcripción, los pri – miRNAs de mamíferos se procesan mediante una vía biosintética bien definida. La ARNasa II Drosha y su cofactor esencial DGCR8 / Pasha – ambos constituyentes del complejo nuclear del Microprocesador – catalizan los cortes iniciales en la base tallo – lazo de un pri – miRNA para producir pre – miRNAs. Los pre – miRNAs se procesan con Dicer en miRNAs maduros hasta la exportación nuclear dependiente de exportina 5⁵⁴. Las plantas no tienen equivalente directo del Microprocesador. En *Arabidopsis*, la biosíntesis de miRNA depende específicamente de DCL1^{55, 56}, necesario para el proceso gradual del núcleo de los pri – miRNAs, pero aunque DCL1 en sí mismo cataliza todas las reacciones sigue sin estar claro⁵⁷. La exportina – 5 homóloga HASTY de plantas está involucrada en la biogénesis de miRNA⁵⁸, pero su papel exacto no está tan claro como en los mamíferos en los que el producto del Microprocesador pre – miRNA es una carga experimentalmente verificada⁵⁹. Los mutantes *hasty* muestran la acumulación disminuida de algunos, aunque no todos, los miRNAs tanto en fracciones nucleares como citoplasmáticas⁵⁸. Estas observaciones apoyan la existencia del sistema de exportación de HASTY independiente de miRNA y la cuestión de si los complejos de miRNAs o que contienen miRNAs son, siquiera, cargas de AHSTY.

[0014] En plantas y animales, el proceso de Dicer tiene lugar junto a proteínas de unión específica a ARN bicatenario. El primero descubierto con el complejo Dcr2 – R2D2 necesario para la carga de RISC en la vía de ARNi en *Drosophila*⁶⁰, se ha descubierto ahora en el complejo Dcr1 – Loqs involucrado en la vía de miRNA en *Drosophila*⁶¹, y el Dicer – TRBP, así como el Dicer – PACT en células humanas^{62, 63}. DCL1 – HYL1 constituye un complejo singular que actúa en el proceso de pri – miRNA en la vía de miRNA en *Arabidopsis*^{64 – 67}. En todos los casos, Dicer produce un duplicado entre el miRNA maduro (miR) y su hebra complementaria (miR*)⁶⁸. La hebra miR es, por lo general, menos estable en cuanto a pares de bases en su extremo 5' – Terminal y es, consecuentemente, cargada como la hebra guía en RISC, en la que se degrada la hebra miR*⁶⁹. En la vía de ARNi de *Drosophila*, R2D2 actúa como un sensor de asimetría termodinámica de los duplicados de siRNA, y Loqs, TRBP, PACT y HYL1 podrían actuar de manera similar.

[0015] HEN1 es una metiltransferasa de unión a S – adenosil metionina (SAM) que metila el extremo 2' – Terminal hidroxilo de los duplicados miR / miR*, una reacción aparentemente específica del reino de las plantas^{70, 71}. La metilación protege los miRNAs de las actividades que añaden uridinas y degradan los ARNs pequeños de las plantas en el extremo 3'²⁵, pero no es necesario para el clivaje dirigido por miRNA dependiente de RISC en extractos de *Arabidopsis*²⁸. Todos los casos conocidos de ARNs pequeños de plantas se desnaturalizan con HEN1²⁵, pero esta modificación parece impactar de manera diferente en la estabilidad del ARN pequeño, quizás porque refleja interacciones variables entre HEN1 y diferentes complejos proteicos o diferentes poblaciones de ARN pequeño. Por ejemplo, el represor de silenciamiento viral Hc – Pro previene la metilación de virus derivados de siRNAs, pero no de miRNAs⁷², y existen numerosos alelos mutantes de *hen1*, en los que la acumulación de miRNA, pero no de S – SGPT de siRNAs, está dismuida²⁰.

Actividades de miRNA de plantas

[0016] La mayoría de los miRNA de plantas identificados tienen complementariedad casi perfecta a sus dianas y favorecen su clivaje. Esto se sigue por la adición de uridinas y la degradación rápida del fragmento de clivaje de 5'⁷³, y la degradación más lenta del fragmento de clivaje de 3' mediado, al menos en algunos casos, por XRN4⁷⁴. Los miRNAs animales muestran, generalmente, una complementariedad imperfecta y reprimen la producción de proteínas de ARNs mensajeros diana intactos. Sin embargo, es posible que la acción de ambos miRNAs animales y de plantas resulten de una combinación de ambos procesos, cuyas contribuciones respectivas probablemente varían dependiendo de la extensión del miRNA: complementariedad diana (Box 4). Aunque el RISC que actúa en la vía de miRNA de la planta apenas se ha definido, AGO1 se asocia con los miRNAs y los miRNAs diana se segmentan *in vitro* por inmutafinidad purificado por AGO1^{28, 29}. Por tanto, en plantas, el mismo Argonauta parece funcionar como un *slicer* para los RISCs cargados con miRNA y siRNA, contrastando con la situación dada en *Drosophila* y *C. elegans*. Los componentes RISC de plantas diferentes a AGO1 esperan ser identificados y puede ser que existan numerosas alternativas a RISC, dado el número de genes de tipo AGO en *Arabidopsis*.

[0017] Los miRNAs maduros de plantas se detectan tanto en fracciones celulares nucleares como en las citosólicas⁵⁸. Asimismo, el RISC programado con el miRNA *let – 7* puede ser inmunopurificado a partir de fracciones celulares nucleares humanas⁷⁵, indicando que los miRNAs de plantas y animales pueden tener funciones nucleares. Estas pueden incluir el clivaje de ARN, como sugiere la actividad que dirige al intrón del miR173 de plantas⁷⁶, pero también podría comprender modificaciones de ADN homólogo⁷⁷. Por tanto, en *Arabidopsis*, el reconocimiento por miR165 del transcrito *spliced* de *PHB* dirige, aparentemente, la *cis* – metilación en la plantilla *PHB* del ADN. Esta metilación es enigmática, sin embargo, ya que ocurre varias Kb corriente abajo del sitio de unión de miRNA⁷⁷. Es concebible que el clivaje inducido por miRNA en el transcrito emergente de *PHB* desencadene la formación de ARN bicatenario iniciada en el extremo 3' – Terminal del transcrito durante una actividad de RDR independiente de

cebador con procesividad moderada. La producción resultante de siRNA sería, por tanto, confinada al extremo 3' – Terminal y podría mediar la metilación de ADN según los esquemas presentados en una sección posterior de la presente divulgación. Curiosamente se han detectado algunos, aunque pocos, siRNAs correspondientes a partes corriente abajo de diversos miRNA diana en *Arabidopsis*, aunque ninguno era directamente complementario a la secuencia metilada *PHB*⁷⁸. La metilación de ADN dirigida por miRNA directa en *cis* y / o *trans* también se ha sugerido desde la observación de algunos miRNAs de 21 nt de *Arabidopsis* acumulados como una segunda especie de 24 nt en etapas de desarrollo específicas⁶⁸.

SiRNAs trans - actuantes: combinando acciones de miRNA y siRNA

[0018] Los siRNAs trans – actuantes (ta) son una clase de ARNs pequeños recientemente descubiertos. Se derivan de transcritos no codificadores de hebra única, los pri –tasiRNAs, que se convierten en ARN bicatenarios por RDR6 – SGS3, dan lugar a siRNAs producidos como especies discretas en fase específica de 21 nt^{79, 80}. Los transcritos de siRNA trans – actuante primarios (pri) son ARNs no codificadores desprovistos de estructuras plegadas. Un miRNA incorporado en RISC cargado con AGO1 dirige el clivaje endonucleolítico del pri –tasiRNAs. Este corte genera dos fragmentos de clivaje, uno de los cuales actúa como una plantilla RDR6, permitiendo la producción de ARN bicatenario. DCL4 inicia el proceso exclusivamente a partir de extremos de ARN bicatenario correspondientes al sitio de corte inicial de miRNA, para producir tasiRNAs en fases metiladas por HEN1. tasiRNAs dirigen, subsecuentemente, el clivaje de ARNs mensajeros homólogos, una vez incorporados en el RISC cargado con AGO1. Las reacciones coloreadas representadas en la incrustación muestra la importancia del corte inicial dirigido a miRNA para determinar la fase apropiada para los tasiRNAs (1). La fase (2) incorrecta daría como resultado la producción de ARNs pequeños no deseados. La implicación de RDR6 – SGS3 es remanente de la biogénesis de siRNA en S – SGPT, pero las necesidades genéticas de estas vías no son idénticas, ya que la acumulación de tasiRNAs es normal en el mutante hipomórfico *ago1 – 27* y en los mutantes defectuosos en *SDE3* y *WEX*⁷⁹. En la mayoría de miRNAs de plantas, los tasiRNAs maduros dirigen el clivaje y la degradación de transcritos celulares homólogos. Hasta la fecha, solo se han identificado tasiRNAs que generan loci (*TAS1 – 3*) en *Arabidopsis*⁷⁶, pero parece que existen en otras especies de plantas y, posiblemente, en otros organismos que contienen RDRs como, por ejemplo, *C. elegans* o *N. crassa*.

[0019] La producción de tasiRNAs involucra una interesante combinación de acciones de miRNA y la maquinaria de biogénesis de siRNA (*Box 3*). Los pri –tasiRNAs contienen un sitio de unión para un miRNA que dirige el clivaje hasta un punto definido. El corte inicial dirigido por miRNA tiene dos consecuencias importantes. En primer lugar, desencadena la transitividad mediada por RDR6 en los productos de clivaje de pri –tasiRNAs, permitiendo la producción de ARNs bicatenarios 5' o 3' del sitio de clivaje. En segundo lugar, proporciona un extremo terminal de ARN bicatenario crucial para la exactitud de una reacción de corte por fases llevada a cabo por DCL4, que produce tasiRNAs maduros.

[0020] ¿Cuál es el papel biológico de tasiRNAs? Tanto *rdr6*, *sgs3* como *dcl4* muestran una fase de transición de joven a adulto acelerada^{13, 14, 80, 81}, lo que indica que los tasiRNAs podrían regular este hecho. La diana de tasiRNAs incluye dos factores de respuesta a auxina (ARF) Tfs y una familia de proteínas con repetición de pentatricopéptido, aunque no hay pruebas de la participación de la única diana funcionalmente caracterizada (ARF3 / ETTIN) en la transición de joven a adulto⁸² ni se observaron defectos heterocronicos en la inserción de mutantes que afectaran a los loci *TAS1* o *TAS2*^{9, 81}. Los mutantes en *AGO7* / *ZIPPY* muestran un defecto en la fase de transición similar⁸³, lo que sugiere que *AGO7* podría formar parte de un RISC programado contra siRNAs específicos, aunque los tasiRNAs se co – inmunoprecipitan con *AGO1* para formar un RISC clivaje competente¹⁸.

Transcrito de siRNA natural antisentido

[0021] Se ha descrito recientemente un ejemplo en el que un par de genes vecinos en hebras de ADN opuestas (genes antisentido *cis*) aumenta en una especie única de siRNA a partir de la región de solapamiento de sus transcritos⁸⁴. Esta especie de siRNA de 24 nt – denominada transcrito de siRNA natural antisentido (nat – siRNA) – dirige el clivaje de uno de los dos transcritos progenitores, y se produce en una única vía que involucra DCL2, RDR6, SGS3 y la subunidad NRPD1a de tipo ARN polimerasa dependiente de ADN atípico (véase el párrafo correspondiente a las vías de silenciamiento de ARN dirigido por cromatina). El clivaje dirigido por nat – siRNA desencadena la producción de una serie de siRNAs de 21 nt secundarios, una reacción similar a la biogénesis de tasiRNA excepto porque el Dícer implicado es DCL1. El papel del nat – siRNA secundario es incierto, pero el clivaje dirigido por nat – siRNA primario contribuye a la adaptación al estrés, y, dado el gran número de pares de genes antisentido *cis* en plantas y otros genomas^{85, 86}, este ejemplo aislado puede reflejar un mecanismo de regulación génica generalizado.

Vías de silenciamiento de ARN dirigido por cromatina

[0022] Además de actuar sobre el ARN, los siRNAs pueden dirigir la formación de heterocromatina transcripcionalmente silenciada en hongos, animales y plantas. La heterocromatina de las plantas se caracteriza por dos conjuntos de modificaciones: metilación de citosinas y de residuos de lisina específicos de histona (histona 3 Lys9 (H3K9) e histona 3 Lys27 (H3K27) en *Arabidopsis*)⁸⁷. En algunos organismos, estas modificaciones actúan

como un conjunto de plataformas para proteínas que favorecen la condensación de cromatina. Las metiltransferasas citosinas de *Arabidopsis* incluyen el homólogo cercano DRM 1 / 2 necesario para la metilación de todo el nuevo ADN, el MET1 necesario para el mantenimiento replicativo de la metilación en los sitios CG y el CTM3 necesario para el mantenimiento en los sitios CNG y en los sitios asimétricos CNN (revisado en ^{88, 89}). Las metiltransferasas de histona involucradas en la metilación de H3K9 y H3K27 pertenecen al grupo de homólogos Su (Var) 3 – 9 e incluyen KYP / SUVH4 y SUVH2 en *Arabidopsis*⁹⁰.

[0023] En numerosos organismos, se han hallado siRNAs correspondientes al número de loci endógenos silenciados, incluyendo retrotransposones, ADNr 5S y repeticiones centroméricas⁸⁸. Se denominan siRNAs cis – actuantes (casiRNAs) debido a que favorecen las modificaciones ADN / histona en los loci que los genera. En las plantas, casiRNAs se metilan por HEN1 y son, predominantemente, de 24 nt (*Box 4*)^{25, 91}. Su acumulación depende específicamente de DCL3 y, en muchas ocasiones, de RDR2¹. La acumulación de casiRNA también exige una isoforma (que contenga subunidades NRPD1a y NRPD2) de una ARN polimerasa específica de una planta y dependiente de ADN, denominada Pol IV^{92 – 94}. Pol IV puede actuar como una ARN polimerasa específica de silenciamiento que produce transcritos para convertirse en siRNAs por las acciones de RDR2 y DCL3. Sin embargo, muchos aspectos de las actividades relativas al silenciamiento de Pol IV siguen siendo desconocidas. Por lo tanto, es incierto incluso si Pol IV posee actividad de ARN polimerasa. Además, una isoforma diferente de Pol IV con subunidades NRPD1b y NRPD2 es necesaria para la metilación dirigida por siRNAs derivados de IR con homología de promotor transgén, sugiriendo que la acción de los complejos Pol IV puede no limitarse a la biogénesis de siRNA⁹⁵. Finalmente, la necesidad de NRPD1a para la acumulación de nat – siRNA en presencia de ambos ARNs mensajeros antisentido (producidos por Pol II) sugiere que Pol IV puede tener funciones relacionadas con el silenciamiento independientes de la actividad de la ARN polimerasa dependiente del ADN⁸⁴. Otros factores implicados en la metilación de promotor dirigida por siRNA derivado de IR incluyen el factor de remodelación de cromatina DRD1⁹⁶ y la posible desacetilasa de histona HDA6⁹⁷, cuya actividad puede necesitarse para proporcionar lisinas libres de histona para la metilación por las enzimas KYP / SUVH. Actualmente se desconoce si DRD1 y HDA6 también están implicadas en el silenciamiento de loci endógenos. Los siRNAs de 24 nt pueden actuar en un complejo de tipo RISC, quizás similar al complejo de silenciamiento transcripcional inducido por ARN, RITS, caracterizado por las levaduras de fisión⁹⁸. Este complejo podría contener AGO4 ya que los mutantes *ago4* tienen fenotipos que se superponen a los de *rdr2*, *dcl3*, *nrdp1a* y *nrdp2*¹¹. En los loci afectados por las mutaciones anteriormente citadas, la metilación de CNG y, particularmente, de CNN se reduce fuertemente, mientras que la pérdida de metilación de CG es menos pronunciada, de acuerdo con la observación de que la metilación del promotor CG dependiente de MET1 podría mantenerse incluso en ausencia de un desencadenante de ARN codificado por un virus de TGS⁹⁹.

[0024] El ADN en sí mismo o los transcritos emergentes son posibles dianas de casiRNAs. A continuación, el ARN bicatenario se procesa por DCL3 en siRNAs de 24 nt que dirigen el clivaje de transcritos emergentes y pueden, posiblemente, dirigir las actividades secuenciales de las desacetilasas de histona (por ejemplo, HDA6), las metiltransferasas de histona (por ejemplo, KYP, SUVH2) y / o las metiltransferasas de ADN (CTM3 / DRM). No está claro si la modificación de histona precede a la metilación de ADN o no. El proceso también puede implicar factores de remodelación de cromatina dirigidos por siRNA, como DRD1. Las posiciones de Pol IVa y Pol IVb en estas reacciones están escasamente definidas. En la vía heterocromática del ARNi de *S. pombe* que tiene como resultado la metilación de H3K9 (pero no citosina), la transcripción diana por Pol II es necesaria para la acción de siRNA, y Ago I se asocia con los transcritos emergentes¹⁰⁰. La metilación de histona dirigida por siRNA del promotor humano EF1A también dependía de la transcripción activa de Pol II¹⁰¹. Sin embargo, no puede excluirse el apareamiento de bases de siRNA – ADN directo. Por ejemplo, en experimentos relacionados con virus derivados de promotores dirigidos por siRNAs, el intervalo de ADN metilado en los promotores diana coincidió con la fuente primaria de siRNA y no se extendió a otras regiones no transcritas⁹⁹. Si los siRNAs interactúan directamente con ADN, ¿cómo se vuelve la doble hélice disponible para el apareamiento de siRNA? Pol IV podría facilitar este acceso, por ejemplo desplazándose por el ADN con helicasas asociadas. El mecanismo molecular preciso que subyace el reclutamiento específico de secuencia de citosina y metiltransferasas de histona para silenciar los loci también es impreciso, como las asociaciones entre ARN pequeño y dichas enzimas que solo se han documentado en un único caso en células humanas¹⁰¹. De hecho, un lazo en el que la producción de siRNA y la metilación de ADN / histona son dependientes mutuamente parece existir loci endógenos silenciados, aumentando la posibilidad de que la producción de siRNAs dirigidos a cromatina *in vivo* pueda incluso ser una consecuencia, en lugar de una causa, de la metilación de ADN / histona.

[0025] La vía RDR2 / DCL3 / NRPD1 / AGO4 tiene un papel claro en la modulación del transposón y en el mantenimiento de la integridad del genoma en plantas, ya que la pérdida de casiRNA causada por mutaciones en los factores anteriores reactiva la actividad del transposón^{11, 91}. Esta vía también puede contener heterocromatina en repeticiones centroméricas, que parecen obligatorias para la segregación precisa del cromosoma en *S. pombe*¹⁰². La maquinaria generadora de siRNA de 24 nt también puede actuar para silenciar los genes codificadores de proteínas. Por ejemplo, la expresión del regulador negativo principal del florecimiento *FLC* se mantiene a un nivel bajo en un ecotipo cercano al florecimiento en *Arabidopsis* debido a la presencia de un transposón intrónico que causa modificaciones represivas de cromatina durante la acción de una vía dependiente de NRPD1a / AGO4¹⁰³. Sin embargo, otros mecanismos, no necesariamente mediados por siRNAs, cuentan para la regulación epigenética de la expresión génica en plantas. Por ejemplo, en *Arabidopsis*, la mutación del factor remodelador de cromatina DDM1

tiene más consecuencias en el silenciamiento de cromatina que cualquier mutante conocido en la maquinaria de silenciamiento de ARN^{104, 105}. Además, la regulación génica por proteínas de tipo policomb en *Arabidopsis* no se ha relacionado con el silenciamiento de ARN¹⁰⁶.

5

Tabla 1: Resumen de las proteínas implicadas en las vías de ARN pequeño de *Arabidopsis*

	Proteína	Dominios y motivos	Actividad bioquímica	Vía	Ref.
10	DCL1	RNasa III ARN bicatenario bd Helicasa DEAD Box	Síntesis de miRNA	miRNA nat - siRNA	55, 85
15		PAZ DUF283 (función no conocida)			
	HYL1	ARN bicatenario bd	ARN bicatenario bd	miRNA	64, 65
20	HST	RanGTP bd	Exportina putativa	miRNA	58
	AGO1	PAZ Piwi	<i>Slicer</i> de siRNA <i>Slicer</i> de siRNA	miRNA S – SGPT tasiRNA	26 – 29
25				Cromatina (?)	
	HEN1	ARN bicatenario bd	Metiltransferasa de ARN pequeño	Todos las vías de ARN pequeño	20.25, 56, 70
30		ARN La en Lupus bd S – adenosil bd			
35	RDR6	GDD específico de RdDP	ARN polimerasa dependiente de ARN	S - SGPT Transitividad tasiRNA nat – siRNA	16, 17, 32, 33, 76, 79, 85
40					
	SGS3	Super hélice Zn ^{II} – bd putativo	Desconocido	S - SGPT Transitividad tasiRNA nat - siRNA	17, 79, 85
45					
	DCL4	RNasa III ARN bicatenario bd Helicasa PAZ	Síntesis de siRNA de 21 nt	tasiRNA IR – SGPT S – SGPT?	13 – 15
50					
	WEX	3´- 5´ exonucleasa	3´- 5´ exonucleasa putativa	S - SGPT	19
55	SDE3	Helicasa DEAD Box	Helicasa de ARN putativa	S - SGPT Transitividad	21, 33
60	DCL2	RNasa III ARN bicatenario bd PAZ	Síntesis de siRNA de 22/24 nt	nat - siRNA	85
65					

5	DCL3	RNasa III Helicasa DEAD box PAZ	Síntesis de siRNA de 24 nt	Cromatina	28, 91
10	RDR2	RdRP	ARN polimerasa dependiente de ARN putativo	Cromatina	91
15	AGO4	PAZ Piwi	Poco claro	Cromatina	11
20	NRPD1a	ARN polimerasa	ARN polimerasa dependiente de ARN putativo	Cromatina	85, 92 - 95
25	NRPD1b	ARN polimerasa	ARN polimerasa dependiente de ARN putativo	Cromatina	93, 95
30	NRPD2	ARN polimerasa	ARN polimerasa dependiente de ADN putativo	Cromatina	92 – 95
35	HDA6	Histona desacetilasa	Histona desacetilasa putativa	Cromatina	97
40	DRD1	ADN y ATP bd relacionado con SNF2	Remodelación putativa de la cromatina	Cromatina	96
45	CMT3	metiltransferasa de la citosina del ADN Cromodominio Dominio adyacente en bromo	metiltransferasa de la citosina del ADN	Cromatina	88
50	DRM1/2	metiltransferasa de la citosina del ADN	metiltransferasa de la citosina del ADN	Cromatina	88
55	MET1	metiltransferasa de la citosina del ADN Dominio adyacente en bromo	metiltransferasa de la citosina del ADN	+Cromatina	88
60	KYP	Dominio SET	Metiltransferasa H3K9	Cromatina	90
65	SUVH2	Dominio SET Dominio pre – SET en Zn ^{II} bd Dominio YDG	Metiltransferasa H3K9	Cromatina	128

60 Actividad de Dícer antiviral en plantas

65 **[0026]** Existe una amplia evidencia de que la vía de ARNi de la planta desempeña un papel fundamental en la defensa antiviral {Voinnet, 2005 # 5046}. El ARN bicatenario derivado de los genomas virales se cortó en siRNAs por las actividades redundantes de DCL4 (principal Dícer antiviral) y DCL2 (sustituto de DCL4) {Deleris, 2006 # 5858}. Estos siRNAs se incorporan a RISC para mediar el *slicing* de los transcritos virales y reducir así la carga viral total en las células de las plantas {Deleris, 2006 # 5858}. AGO1 es una proteína efectora de siRNA cargado con RISC,

aunque pueden involucrarse otros parálogos AGO {Zhang, 2006 # 5861}. Una señal de célula a célula y de larga distancia para el silenciamiento de ARN provoca la propagación sistémica de la respuesta inmune innata antiviral en las plantas {Voinnet, 2005 # 5046}. Como estrategia defensiva, los virus codifican proteínas represoras que se dirigen contra el procesador y efector clave del silenciamiento antiviral. Por ejemplo, la proteína P19 del tombusvirus aísla a los siRNAs e impide su utilización por RISC {Vargason, 2003 # 4872}, la proteína 2b de *Cucumber mosaic virus* interactúa físicamente con AGO1 e inhibe su actividad de clivaje. {Zhang, 2006 # 5861}, la proteína P38 de *Turnip crinckle virus* inhibe fuertemente la actividad de DCL4 {Deleris, 2006 # 5858}. DCL3 (produce siRNAs heterocromáticos) y DCL1 (produce miRNAs), no parecen tener un impacto significativo en la acumulación de virus en la planta.

Resistencia de la enfermedad en plantas

[0027] Además de la defensa antiviral, es poca la información disponible del papel de las vías de ARN pequeño en la defensa contra otros tipos de patógenos, incluyendo bacterias y hongos que representan importantes pérdidas de rendimiento en el mundo. En plantas, se ha estudiado más a fondo la resistencia fúngica y bacteriana en el contexto de las interacciones específicas de la raza, en la que una proteína de resistencia específica (R) protege la planta contra la raza de patógeno particular {Dang1, 2001 # 4961}. Este reconocimiento altamente específico conduce la activación de las respuestas de defensa y la muerte celular local se denomina como “respuesta hipersensitiva” (HR). Un ejemplo ya caracterizado de la obtención de la HR de la interacción específica de la raza se presenta en el gen *RPS2* de *Arabidopsis* que confiere resistencia a la cepa DC3000 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst* DC3000 produce la correspondiente proteína inductora *AvrRpt2* (REF1). La presencia de los componentes de *RPS2* y *AvrRpt2* conduce la resistencia, mientras que la ausencia de cualquiera de los componentes conduce a enfermedad {Dang1, 2001 # 4961}.

[0028] Aparte de la interacción específica de la raza, es un mecanismo de defensa basal denominado como “resistencia no hospedante” que justifica el hecho de que la mayoría de las plantas son resistentes a la mayoría de patógenos. La defensa basal se fundamenta en las respuestas constitutivas e inducibles. La defensa basal inducible se produce en la percepción de los indicadores generales conocidos como “patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)”. Uno de estos PAMPs es un motivo de 22 aminoácidos conservados (flg – 22) de la flagelina bacteriana reconocida en diversas especies de plantas, incluyendo *A. thaliana* (REF2). La percepción de flg – 22 en *Arabidopsis* desencadena una respuesta inmune que eleva la resistencia a la *Pto* DC3000 virulenta (REF3). Esta resistencia basal está pensada para depender de la inducción del conjunto de “genes relacionados con la defensa”; alguno de los cuales aumentan a los pocos minutos de la inducción, y por lo tanto, podrían desempeñar un papel importante en la inmunidad desencadenante por PAMP (REF4). Sin embargo, la base molecular que dispone la activación transcripcional de dichos genes relacionados con la defensa sigue siendo en gran medida desconocida.

CasiARNs, control del transposón y regulación epigenética de la expresión génica

[0029] La clonación y secuenciación de gran escala de ARN pequeño se realiza en *Arabidopsis*, en arroz y en maíz, indica que la gran mayoría de esas moléculas poseen 24 nt y por lo tanto, se deriva de la actividad de DCL3. El mapeo genómico de estas abundantes especies de ARN pequeño muestran que muchos se originan en las repeticiones centroméricas, así como en los loci de transposón y retrotransposón que se encuentran dispersos en los cromosomas. Basándose en pruebas circunstanciales, estos siRNAs derivados de transposones aparecen para actuar en *cis* para reprimir su transcripción promoviendo la metilación de ADN de la secuencia específica y la condensación de la cromatina. En consecuencia, se ha denominado a estas moléculas *cis* actuantes (ca)siRNAs. Una creencia común es que los casiARNs son importantes para el control de la expresión y movilización de los elementos transponibles TEs, evitando así la inestabilidad del genoma debido a las inserciones aleatorias. Sin embargo, las plantas del mutante *dcl3* no muestran signos evidentes de defectos en el desarrollo obvio y las semillas maduran con normalidad. Otra idea parte de la propuesta de Bárbara McClintock, el estado epigenético de los TEs puede influir en la expresión de los genes localizados en sus proximidades. Según lo dicho, los TEs reprimidos en casiARNs pueden disminuir la expresión de los genes próximos y, en cambio, los TEs desreprimidos de forma transcripcional (por ejemplo, en el antecedente de mutación *dcl3*) pueden favorecer la expresión génica.

[0030] Teniendo en cuenta la densidad y diversidad de los TEs en las plantas y la flexibilidad potencial de las regulaciones epigenéticas dirigiendo la adaptación de organismos a su entorno directo, se comprobó si la vía de casiARNs se involucraría en las respuestas de defensa de la planta en el estrés biótico, en particular en las infecciones bacterianas y fúngicas.

[0031] Los enfoques de *knock – out* o *knock – down* de los genes *DCL2* y *DCL3* en diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos, se utilizan para mejorar la resistencia contra patógenos sin alterar el desarrollo de la planta ni el rendimiento de la semilla. Estos enfoques incluyen, pero no se limitan, al foco en lesiones locales inducidas en genes (TILLING) de los genes *DCL2* y *DCL3* de las especies de plantas no transgénicas (*DCL2* y *DCL3* se conservan en la mayoría de especies de plantas, incluyendo los cultivos), el ARNi de los ARNm de *DCL2* y *DCL3* utiliza un constructo de horquilla que transporta una parte de 150 bp del gen *DCL2* y una parte de 150 bp del gen

DCL3 permitiendo el silenciamiento combinatorio de los ARNm de *DCL2* y *DCL3*, genera un microARN artificial que se dirige a los transcritos de *DCL2* y *DCL3*. Estos enfoques descritos en el presente documento son conocidos por los expertos en la disciplina y se utilizan específicamente para *knock – out* o *knock – down* la expresión de *DCL2* y *DCL3* en diversas plantas, incluyendo los cultivos y para obtener cultivos que son significativamente más resistentes a patógenos fúngicos y bacterianos. Dichas plantas pueden transformarse con constructos que transportan al promotor fuerte 35S o al promotor inducible por patógenos (por ejemplo, WRKY6, PR1) fusionado a la secuencia de codificación *DCL4* que permite además la mejora de la resistencia contra patógenos virales (véase la introducción).

[0032] La Solicitud de Patente Europea EP 0480236 y la Solicitud Internacional WO 02/20791 revelan un procedimiento para conferir resistencia al ataque de patógenos en una planta que comprende la modificación de dicha planta para contener un transgén, un gen que aumenta cuando se induce resistencia a un patógeno.

[0033] Se revela en Zhu et al. (Curr. Biol., 17: 54 – 59, 2007; Curr. Biol., 17: 51 – 58, 2007) que los genes relacionados con la defensa de la planta como la “extensina”, el gen de la defensina en la planta PDF1a, 2a, “glucosidasa beta”, tienen una expresión reducida en el mutante de la planta para ROS1.

[0034] Se revela en Agius et al. (PNAS USA., 103: 11796 – 11801, 2006) la producción de ROS1 en un promotor constitutivo y su sobreexpresión conduce a un nivel reducido de metilación de citosina y a una expresión aumentada del gen diana.

[0035] Se revela en Chan et al. (Nature, 6: 351 – 360, 2006) y en Stokes et al. (Genes Dev., 16: 171 – 182, 2002) el silenciamiento por metilación de ADN de un grupo de genes involucrados en la resistencia de la planta (BAL).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0036] La invención se refiere en general a genes, vías y mecanismos de silenciamiento que modulan la respuesta de las plantas, incluyendo las plantas de cultivo, contra la infección por patógenos. Los procedimientos para identificar compuestos o factores endógenos que reprimen o mejoran una vía o actividad deseada o no deseada comprenden respectivamente facilitar un sistema de expresión en el que las secuencias de control asociadas al gen que genera una respuesta deseada o no deseada se une operativamente al indicador cuya producción es detectable. La influencia de los compuestos en la expresión mediada por estas secuencias de control como se determina por el nivel del indicador producido puede utilizarse para la identificación de componentes que modulan dichas actividades o vías. Además, los represores o potenciadores endógenos pueden analizarse mediante la mutagénesis de organismos que contienen los sistemas de expresión anteriores y el análisis del genoma para las diferencias en esos organismos en el que se consigue el efecto deseado.

[0037] Además, la expresión génica que se desea debido a la mejora de la resistencia puede proporcionarse en constructos que contienen secuencias de control receptivas constitutivas o patógenas y se introducen en las plantas para otorgar una mejor resistencia. Alternativamente, las secuencias designadas para interferir con la expresión de los genes que disminuyen la resistencia a la infección por patógenos puede situarse de manera similar en el control de dichos promotores e introducirse en las plantas para inhibir las actividades que interfieren con la resistencia a patógenos.

[0038] Como se muestra en el presente documento, las plantas que carecen de enzimas de tipo Dícer (DCL), *DCL2* y *DCL3* son más resistentes a patógenos fúngicos y bacterianos, y los ARNs de *DCL2* y *DCL3* disminuyen en la respuesta a Pto DC3000 y flg – 22, una proteína flagelina que obtiene una resistencia basada en patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Las plantas que carecen de elementos involucrados en la citosina de metilación de ADN, es decir; la metilación de ADN dirigida por ARN (vía rdDM) son más resistentes a los patógenos, mientras que las plantas que carecen del represor de silenciamiento génico transcripcional 1 (ROS1) que codifica una ADN glicosilasa involucrada en la desmetilación activa del ADN son más susceptibles a los mismos patógenos. Los genes relacionados con la defensa clave se regulan negativamente por casiARNs que desencadenan la metilación de ADN dirigida por ARN. Los resultados proporcionaron una nueva visión en la regulación epigenética de los activadores de la respuesta inmune desencadenada por PAMP.

[0039] Se revela un procedimiento para inhibir la expresión de *DCL2* y *DCL3* en diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos, mediante la introducción de un constructo de ácido nucleico en una planta que comprende un promotor sensible constitutivo o patógeno operativamente unido a una horquilla dirigida contra *DCL2* y *DCL3* o en un precursor de miRNA artificial que transporta un miRNA maduro dirigido contra *DCL2* y *DCL3*. Igualmente, comprende también el foco en lesiones locales inducidas en genes (TILLING) de los genes *DCL2* y *DCL3* que se conservan en las especies de plantas.

[0040] Se revelan procedimientos para identificar represores de la transcripción de *DCL2* y *DCL3* introduciendo un constructo de ácido nucleico en una planta que comprende secuencias promotoras *DCL2* o *DCL3* fusionadas al gen indicador (por ejemplo, una proteína fluorescente, por ejemplo, la proteína verde fluorescente: GFP o cualquier otro indicador que incluya ARNm). También se revela que las plantas que expresan GFP se someten a mutagénesis y en

aquellas con una expresión del indicador disminuido se examinan las diferencias genéticas para identificar los genes aumentados.

[0041] Alternativamente, las plantas o células que producen constitutivamente un indicador como GFP en el que la expresión disminuye por DCL2 o DCL3, habrán mejorado los niveles de GFP cuando se somete a mutagénesis la planta o célula para producir represores de DCL2 o DCL3.

[0042] Como se utiliza en el presente documento, "indicador" se refiere a cualquier secuencia cuya expresión puede controlarse. Los monitores convenientes de la expresión son proteínas fluorescentes de colores, siendo la proteína verde fluorescente la más utilizada. Otros indicadores incluyen diversas actividades enzimáticas o incluso ARNm característico.

[0043] En otro aspecto, la resistencia se confiere cuando los genes identificados se fusionan a promotores constitutivos o promotores inducibles a patógenos para reprimir la expresión de DCL2 y DCL3 en diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos. Los compuestos químicos involucrados en la supresión de la transcripción de DCL2 y DCL3 pueden identificarse por cribado de componentes químicos que inhiben la expresión del indicador de las plantas transgénicas anteriores que indican la actividad transcripcional de DCL2 y DCL3, y estos compuestos pueden utilizarse para conferir resistencia a una infección bacteriana o fúngica.

[0044] Se revelan procedimientos para identificar reguladores positivos de la transcripción de DCL4 que tienen enfoques similares. Estos reguladores mejoran la resistencia a los virus virulentos.

[0045] Se revelan composiciones y procedimientos para aislar genes involucrados en la inmunidad innata de plantas y animales y que son regulados por casiARNs contenidos en sus regiones promotoras, codificadoras o 3' UTR. Este procedimiento emplea el análisis de microarrays junto con análisis bioinformáticos para recuperar transposones remanentes situados cerca de, o en, los reguladores positivos de la respuesta de defensa vegetal o animal.

[0046] La resistencia mejorada a patógenos puede lograrse introduciendo un constructo de ácido nucleico en una planta que comprende un promotor constitutivo operativamente unido a la secuencia de codificación de los genes que están hiperinducidos en el mutante doble *dcl2* – *dcl3* obtenido en PAMP, y en el presente documento se proporciona una lista de dichos candidatos.

[0047] Los precursores de miRNA o siRNA que se involucran en la inmunidad innata de la planta o animal que se regula en la metilación de ADN dirigido por casiARN, se determinan utilizando un procedimiento de análisis de microarrays junto con análisis bioinformáticos para recuperar transposones remanentes ubicados en las regiones aguas arriba de los precursores de miRNA o siRNA sensibles a PAMP involucrados en la resistencia a patógenos. Se proporcionan plantas con resistencia mejorada a patógenos introduciendo un constructo de ácido nucleico en una planta que comprende un promotor constitutivo o un promotor sensible a patógenos operativamente unido a las secuencias identificadas de pre – miRNA o pre – siRNA sensible a PAMP. Se revelan las secuencias de dichos pre – miRNA / siRNA sensible a PAMP.

[0048] La invención se refiere a un procedimiento para modular la expresión de la ADN desmetilasa ROS1 en diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos, comprenden la introducción de un constructo de ácido nucleico en una planta que comprende un promotor sensible constitutivo o patógeno operativamente unido a la secuencia de codificación de la ADN desmetilasa ROS1 de *Arabidopsis*.

[0049] Se revelan procedimientos para identificar represores de la transcripción de ADN metiltransferasa introduciendo un constructo de ácido nucleico en una planta que comprende secuencias promotoras DRM1, DRM2, CMT3 o MET1 fusionadas a un gen indicador (por ejemplo, la proteína verde fluorescente: GFP). Las plantas resultantes se sometieron a mutagénesis para recuperar las plantas que disminuyeron la expresión del indicador y se analiza el genoma para identificar los genes modificados. Los genes modificados se fusionan a un promotor constitutivo o un promotor inducible en patógenos para reprimir constitutiva o condicionalmente la expresión de la ADN metiltransferasa en diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos. De manera similar, los compuestos químicos involucrados en reprimir la transcripción de los genes de la ADN metiltransferasa pueden identificarse cribando los compuestos químicos que inhiben la expresión indicadora de las plantas transgénicas descritas anteriormente. Se utiliza un enfoque similar para identificar los reguladores positivos de la transcripción en ROS1 que además se sobreexpresa condicional o constitutivamente *in planta* para conferir una resistencia mejorada contra patógenos fúngicos o bacterianos en diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos, y para identificar compuestos químicos que mejoran la transcripción en ROS1, utilizados también para conferir resistencia a patógenos no relacionados.

[0050] Los mecanismos de regulación de genes similares a aquellos descritos para las plantas se llevan a cabo en animales, incluyendo los seres humanos. Utilizando los procedimientos descritos en el presente documento, los genes que se inducen por liposacáridos (LPS), flagelina u otros PAMPs, se analizan para la presencia de transposones remanentes en sus regiones promotoras, codificadoras o 3' UTR. Se realizan análisis similares en

promotores de miRNAs inducidos en PAMP (por ejemplo, miR146). Estos genes codificadores y no codificadores de proteínas contribuyen a la respuesta inmune innata de mamíferos y pueden expresarse constitutivamente en células de mamíferos para conferir un amplio espectro de resistencia a patógenos.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0051]

Las Figuras 4A – 4E presentan resultados que demuestran que tanto DCL2 como DCL3 actúan como reguladores negativos de la respuesta de defensa fúngica y antibacteriana.

Las Figuras 5A – 5B muestran resultados que indican que los transcritos DCL2 y DCL3 y no DCL4 disminuyen en la respuesta de flg – 22 o en Pto DC3000.

15 MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

[0052] Como se describe en los ejemplos siguientes, se ha descubierto que la resistencia a patógenos fúngicos y bacterianos en plantas mejora en ausencia de la expresión de DCL2 y DCL3, aunque la mejora de la expresión de DCL4 aumenta la resistencia a los patógenos virales. A continuación, se describen genes adicionales cuya expresión es útil para proporcionar resistencia a patógenos. Dichos genes incrementan en respuesta a los productores de PAMP como flg – 22. Se han localizado secuencias siRNA cis – actuantes (casiARNs) debido a su proximidad, y se han descubierto para reprimir las respuestas PAMP realizando metilación en algunas secuencias promotoras de ADN de pre – miRNA / p – siRNA que podrían producir miRNA o siRNA para atacar al patógeno. Por lo tanto, la expresión de las secuencias de pmi – ARN / SiRNA descritas pueden proporcionarse en los sistemas de expresión de las plantas para conferir resistencia. Además, es deseable para disminuir las ADN metiltransferasas que regulan la respuesta e incluyen MET1, DRM1, DMR2, CMT3 y DDM1.

[0053] Por último, utilizando el procedimiento de la invención, se ha demostrado que la expresión mejorada de la ADN dimetilasa ROS1 mejora la resistencia de la planta contra patógenos o contra cualquier otro estímulo.

[0054] Las diferentes realizaciones descritas en el presente documento incluyen:

1. Un procedimiento para reprimir la vía casiARN en plantas que comprende la introducción de un constructo de ácido nucleico en una planta que comprende un promotor sensible constitutivo o patógeno operativamente unido a una horquilla dirigida contra los ARNms de DCL2 y DCL3 o contra un precursor de miRNA artificial que transporta un miRNA maduro dirigido contra los ARNms de DCL2 y DCL3. Esto también comprende aunque no se limita al TILLING de los genes DCL2 y DCL3. El procedimiento anterior se completa con un enfoque que permite la sobreexpresión constitutiva o condicional de la vía de siRNA derivada de virus en dichas plantas que casi no expresan, o expresan, genes DCL2 y DCL3. Esto comprende la introducción de un constructo de ácido nucleico en una planta que comprende un promotor sensible patógeno o constitutivo operativamente unido a la secuencia de codificación de DCL4 de *Arabidopsis* para conferir resistencia a los virus. Se aplica en diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos, en los que la proteína de DCL4 de *Arabidopsis* debe ser funcional. En estos procedimientos, se evitan los efectos adversos en el desarrollo y fisiología de la planta. Estos procedimientos pueden aplicarse a diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos, en los que están presentes ortólogos de DCL2, DCL3 y DCL4.
2. Un procedimiento para identificar represores de la transcripción de DCL2 y DCL3, así como los reguladores positivos de la transcripción de DCL4. Un enfoque genético asociado a las líneas transgénicas que presenta las actividades transcripcionales de DCL2, DCL3 o DCL4 se somete a mutagénesis para identificar los mutantes que (i) expresan constitutivamente una transcripción menor de DCL2 o DCL3 y (ii) mejoran la transcripción de DCL4. Esto permite la identificación de los represores de las transcripciones de DCL2 y DCL3, así como los activadores de la transcripción de DCL4. El procedimiento permite la identificación de los represores de DCL2 y DCL3, así como los activadores de la transcripción de DCL4 conservados en las especies de plantas y, por lo tanto, pueden sobreexpresarse constitutiva o condicionalmente en diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos, para conferir una mejora en la resistencia a los patógenos no relacionados. Esto permite introducir un constructo de ácido nucleico en una planta que comprende un promotor sensible constitutivo o patógeno operativamente unido a la secuencia de ADN de *Arabidopsis* que codifica los represores transcripcionales de DCL2 y DCL3 o los activadores transcripcionales de DCL4 en diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos. El procedimiento permite además la expresión constitutiva o condicional de la vía de SiRNA viral para conferir resistencia a los virus mediante la introducción de un constructo de ácido nucleico en una planta que comprende un promotor sensible constitutivo o patógeno operativamente unido a la secuencia de codificación de DCL4 de *Arabidopsis* para conferir resistencia a los virus. Se aplica en diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos, en los que la proteína DCL4 de *Arabidopsis* debe ser funcional.
3. Un procedimiento para identificar compuestos químicos que someten de manera eficaz la transcripción de DCL2 y DCL3 para permitir la resistencia fúngica y antibacteriana a patógenos en diversas

especies de plantas. Se consigue utilizando dichas líneas transgénicas descritas anteriormente y el cribado de una biblioteca de compuestos. Se utiliza un enfoque similar para identificar agentes químicos que mejoran la transcripción de DCL4 y confieren, además, resistencia antiviral.

4. Un procedimiento para identificar genes (incluidos los genes codificadores de proteínas y los genes miRNA / siRNA) que participan en la inmunidad innata de plantas y animales utilizando un par de técnicas de microarrays junto al análisis bioinformático para recuperar los transposones remanentes en los genomas de las plantas y animales que se encuentran en sus regiones promotoras, codificadoras y 3' UTR de dichos genes de defensa (incluidos los genes codificadores de proteínas y los genes miRNA / siRNA). Este procedimiento permite la sobreexpresión constitutiva o condicional de los genes de defensa clave (genes codificadores de proteínas) que están regulados por silenciamiento génico transcripcional mediante la introducción de un constructo de ácido nucleico que comprende un promotor sensible constitutivo o patógeno operativamente unido a las secuencias de codificación de *Arabidopsis* correspondientes a los genes que están hiperinducidos en el mutante inductor *dcl2 – dcl3*. Este procedimiento permite la sobreexpresión constitutiva o condicional de los precursores clave de miRNA o siRNA sensibles a PAMP regulados por silenciamiento génico transcripcional introduciendo un constructo de ácido nucleico en una planta que comprende un promotor sensible constitutivo o patógeno operativamente unido a secuencias precursoras de miRNA o siRNA inducido en PAMP (incremento y disminución de horquillas de miRNA o siRNA de 40 nt).
5. Un procedimiento para reprimir la vía de RdDM en plantas que comprenden introducir un constructo de ácido nucleico que comprende un promotor sensible constitutivo o patógeno operativamente unido a una horquilla dirigida contra todos los DRM1, DMR2, CMT3 y MET1 o el precursor artificial de miRNA artificial que transporta un miRNA maduro dirigido contra todos estos transcritos. Esto, también comprende pero no se limita al TILLING de los genes *MET1* y *DDM1* en diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos. Se proporcionan procedimientos para reprimir la transcripción de la ADN metiltransferasa introduciendo en una planta un constructo que transporta las secuencias de control de los genes de la ADN metiltransferasa operativamente unidos a las secuencias indicadoras y a la mutagénesis de dichas líneas transgénicas para identificar los represores transcripcionales de dichas ADN metiltransferasas. Estos represores están además sobreexpresados, condicional o constitutivamente, en diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos, para conferir una mayor resistencia contra patógenos. De este modo, se identifican agentes químicos que someten la transcripción de las ADN metiltransferasas para conferir una mayor resistencia contra patógenos. Se consigue utilizando las mismas líneas transgénicas que presentan las actividades transcripcionales de las ADN metiltransferasas.

[0055] El procedimiento puede también complementarse por la sobreexpresión constitutiva o condicional de la vía de siRNA viral en las plantas citadas que casi no expresan, o expresan, genes de la ADN metiltransferasa.

[0056] Por último, el procedimiento de la invención se dirige a un procedimiento que sobreexpresa condicional o constitutivamente la ADN glicosilasa ROS1 en *Arabidopsis* en diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos. Esto comprende la introducción de un constructo de ácido nucleico en una planta que comprende un promotor sensible constitutivo o patógeno operativamente unido a la secuencia de codificación ROS1 de la *Arabidopsis* para conferir un amplio espectro de resistencia a patógenos.

[0057] Como se ha indicado anteriormente, este procedimiento se completa con la sobreexpresión constitutiva o condicional de la vía de siRNA viral en las plantas citadas que sobreexpresan constitutiva o condicionalmente el gen ROS1 de *Arabidopsis* utilizando DCL4.

[0058] Los procedimientos descritos para la identificación de los activadores transcripcionales establecidos anteriormente pueden también aplicarse a ROS1.

[0059] Los siguientes ejemplos ilustran pero no limitan la invención.

EJEMPLOS

[0060] Todos los resultados descritos se dieron en la especie *Arabidopsis thaliana*, como ejemplo de plantas en general, incluyendo los cultivos. Siempre que se proporcionen los detalles específicos de los ejemplos que permitan a los expertos en la disciplina comprender y poner en práctica esta invención, proporcionar la mejor manera para poner en práctica esta invención y proporcionar una minuciosa descripción de la invención, la invención no debería limitarse a las especificaciones que se describen en estos ejemplos.

Ejemplo 1

El mutante *dcl2 – dcl3* mostró una mayor resistencia de la enfermedad contra patógenos biotróficos bacterianos y fúngicos mediante la potenciación de la vía de defensa dependiente de SA.

[0061] Se provocó a los mutantes únicos deficientes de casiARN *rdr2 - 1*, *dcl2* y *dcl3* con oídio de *Erysiphe cichoracearum* (aislado de UEA). El mutante *dcl 3 - 1* y no los mutantes *rdr 2 - 1* ni *dcl 2 - 1* fue parcialmente más resistente a este hongo si se compara al control infectado Col - 0 (Figura 4A, imagen superior). La Figura 4A muestra los ensayos realizados con los mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la biogénesis de casiARN. Las hojas de las plantas de 5 días (Col - 0: *dc12 - 1*, *dcl3 - 1*, *rdr2 - 1*, No - 0) se inocularon en *Arysiphe cichoracearum* con oídio (aislado de UEA) y el crecimiento fungico se analizó visualmente durante 10 días tras la post - inculcación (imagen superior). La tinción con azul de tripano de las hojas anteriores infectadas (4 días tras la post - infección) reveló la presencia de micro - HR en No - 0 (transporta el gen de resistencia funcional RPW8), *dcl3 - 1* y *dcl2 - 1*.

[0062] Este tipo de resistencia mejorada de la enfermedad se correlacionó con la aparición de microlesiones (denominadas microHRs) tal y como se observa mediante la tinción de azul de tripano (enfoque clásico utilizado para visualizar la muerte celular así como las estructuras fúngicas) de las hojas infectadas de *dcl3* (Figura 4A, imagen inferior). Se observaron microHRs similares en la adhesión de *Arabidopsis* a Nossen que transporta un gen de resistencia funcional *RPW8* involucrado en el reconocimiento de este hongo (Figura 4A, imagen inferior). También se observó microHRs en las hojas infectadas de *dcl2*, sin embargo, no se obtuvo resistencia significativa mejorada de la enfermedad en este antecedente de mutación si se compara al control infectado en Col - 0 (Figura 4A, imagen inferior).

[0063] Estos resultados indican que (i) DCL3 regula negativamente la resistencia de *Arabidopsis* en *E. cichoracearum* y que (ii) tanto DCL2 como DCL3 someten la respuesta hipersensitiva desencadenada por este hongo.

[0064] Para comprobar si en lugar de los factores de compatibilidad específicos de patógenos eran las vías de resistencia a enfermedades las afectadas por las mutaciones *dcl2* y *dcl3*, se analizó además, la resistencia de estos mutantes en la bacteria virulenta Pto DC3000. Se descubrió que las plantas mutantes dobles *dcl2 - dcl3* tuvieron ~ 15 veces menos título bacteriano y menos síntomas de enfermedad bacteriana atenuadas en comparación a las plantas infectadas de tipo salvaje. (Figura 4B, C). La Figura 4B muestra crecimiento bacteriano en los mutantes deficientes de *Arabidopsis* en la biogénesis de casiARN. Las hojas de las plantas viejas de cinco semanas (Col - 0: *dc12 - 1*, *dcl3 - 1*, *rdr2 - 1*, No - 0) se inocularon con 10^5 cfu / ml y los títulos bacterianos se analizaron a los cuatro días tras la post - inoculación. La Figura 4C muestra las imágenes de los síntomas atenuados de la enfermedad de los mutantes dobles *dcl2 - dcl3* (imagen izquierda), así como la presencia de microHRs (imagen derecha).

[0065] Por otra parte, la tinción de azul de tripano de las hojas infectadas de *dcl2 - dcl3* revelaron la presencia de microHRs a las 30 horas de la post - inoculación (hpi) en el que las hojas infectadas en Col - 0 estaban ausentes. (Figura 4C / D). La Figura D muestra la tinción de azul de tripano de las hojas de los mutantes dobles *dcl2 - dcl3* que muestran la presencia de microHRs.

[0066] Estos nucroHRs estaban también presentes en las hojas de tipo salvaje tratadas durante 30 horas con un inóculo bacteriano en la cepa avirulenta Pto DC3000 (AvrRpt2) (Figura 4D) conocida por desencadenar una resistencia de raza específica dependiente de RPS2 en la adhesión a Col - 0 de *Arabidopsis*.

[0067] Estos resultados indican que tanto DCL2 como DCL3 actúan como reguladores negativos de la resistencia de las plantas contra los patógenos biotróficos, fúngicos y bacterianos.

[0068] El ácido salicílico (AS) es la principal molécula de señalización implicada en la resistencia de las plantas contra los patógenos biotróficos. Basándose en los resultados anteriores, se investigó si las proteínas DCL2 y DCL3 interferirían con la vía de señalización de AS durante la infección de Pto DC3000. Se controló la expresión del gen marcador dependiente de AS de *PR1* en *dcl3* y en las plantas *dcl2 - dcl3* provocadas con un inóculo alto de la Pto DC3000 virulenta en un experimento de secuencia temporal, se descubrió que el transcrito *PR1* demostró una inducción temprana en las plantas infectadas en *dcl3* y *dcl2 - dcl3* contra las plantas infectadas en Col - 0. (Figura 4E). La Figura 4E muestra que la expresión de *PR1* se induce antes en *dcl3* y en las plantas infectadas bacterianamente de *dcl2 - dcl3*. Las hojas de las plantas de cuatro semanas (Col - 0: *dc13 - 1*, *dcl2 - dcl3*) se inocularon con 2×10^7 cfu / ml y la acumulación se analizó por PCR en tiempo real semicuantitativa durante 9 horas.

[0069] Sin embargo, los niveles singulares del ARNm de *PR1* se observaron en plantas no tratadas de *dcl3*, *dcl2 - dcl3* y Col - 0 (Figura 4E, tiempo 0), consistentes en un fenotipo de desarrollo normal de los mutantes *dcl2 - dcl3* en ausencia del estímulo del patógeno (en oposición a los mutantes *mpk4* o *cpr* que muestran un enanismo severo como resultado de una activación constitutiva de la vía de defensa dependiente de AS).

[0070] Por lo tanto, la resistencia mejorada de la enfermedad observada en los mutantes *dcl3* y *dcl2 - dcl3* se debe posiblemente a la potenciación pero no a la activación constitutiva de la vía de defensa dependiente de AS durante la infección de patógenos.

[0071] La codificación, así como las secuencias de las proteínas DCL2, DCL3 y DCL4, permiten generar constructos de miRNA, constructos de miRNA artificial, constructos del sobreexpresor DCL4 y recuperar ortólogos

de DCL en otras especies de plantas para utilizarse en estrategias de interferencia génica similares en diversas especies de plantas incluyendo los cultivos.

-Secuencia de codificación de DCL2 de *Arabidopsis* (At3 g3300):

[0072]

```

ATGACCATGGATGCTGATGCGATGGAACTGAGACCACTGATCAAGTCTCTGCTTCTCCTCTACATTTTGC
CAGAAGTTATCAGGTAGAGGCACCTTGAGAAAGCTATCAAGCAGAACACTATTGTCTTCTTGGAGACTGGTT
CTGGCAAGACCCCTTATTGCTATTATGCTTCTTCGTAGCTATGCCTACCTTTTCCGCAAGCCTTCACCATGC
TTCTGTGTCTTCTTGGTTCCTCAAGTGGTTCTTGTCACCTCAGCAAGCAGAAGCCCTGAAGATGCATACTGA
TCTAAAAGTTGGTATGTATTGGGGAGACATGGGGGTGGACTTTTGGGATTCTTCAACATGGAAACAAGAAG
TTGATAAATATGAGGTTCTGGTGATGACCCCTGCCATTTTGCTCGACGCGTTGAGGCATAGTTTTCTGAGC
TTGAGCATGATCAAGGTTCTAATAGTTGATGAGTGTATCATGCAGGGGGAAAGCACCCCTTATGCTTGTAT
CATGAGGGAGTTCTATCATAAGGAGTTAAATTCTGGAACCTCCAATGTTCCACGGATATTTGGGATGACTG
CTTCACTTGTGAAAACAAAGGTTGAAAATCTGGATAGCTACTGGAAAAAAATTCATGAACTCGAACTCTA
ATGAATTCAAAGGTCTATACCTGTGAGAAATGAGTCTGTGCTGGCTGGGTTTGTCCCTTTTCTACACCAAG
CTTCAAGTATTACCAGCACATAAAAAATACCAAGTCCCAAACGAGCAAGCTTGGTAGAGAAGCTAGAAAAGAC
TAACGATAAAGCATCGCTTATCCCTTGGAACTTGGATCTCAACTCCTCTACTGTTGATTCTGTAGAGAAG

```

5 AGACTGTTGAGGATAAGTTCAACTCTAACATATTGTTTGGATGATCTCGGAATTTTGCTGGCCCAGAAGGC
 TGCTCAGTCATTGTGTCAGCCAGTCAGAATGACTCTTTCTGTGGGGCGAACTAAATATGTTTAGCGTGGCCT
 TGGTAAAAAAATTTCTGCTCTGATGCTTCACAGGAGTTTTTGGCTGAGATACCTCAAGGTCTTAATTGGAGT
 GTTGCAAACATAAATGGAAATGCGGAGGCAGGTCTCCTAACTTTAAAACTGTCTGCCTCATTGAGACTCT
 10 TCTTGGTTATAGCTCCTTGGAGAACATACGGTGCATCATTTTTGTGGATAGGGTGATAACAGCCATCGTTC
 TGGAAATCCCTTTTGGCTGAGATTCTTCCAACTGTAATAACTGGAAAACCAAGTACGTTGCAGGAAATAAC
 TCTGGTCTGCAAAATCAAACCTCGGAAGAAGCAAAATGAAATTGTGGAAGACTTCCGGAGAGGCTTGGTTAA
 CATCATTGTAGCAACATCTATTCTAGAGGAGGGTCTAGATGTTCAAAGTTGCAACCTGGTTATCAGATTTG
 ACCCTGCATCCAACATTTGCAGTTTCATACAGTCTCGTGGGCGTGCTAGAATGCAAAATTCAGATTATTTG
 ATGATGGTGGAAAGCGGAGATCTGTAAACACAATCTCGATTAATGAAATATCTTTCTGGTGGGAAAAGAAT
 15 GCGCGAAGAGTCTTTGGATCATTCTCTTGTTCCTGTCCACCTCTTCCAGATGATTGAGATGAACCACTCT
 TCCGTGTGCAAAAGTACTGGAGCAACTGTAACCTTAGCTCAAGCGTCAGCTTAATATATCATTACTGCTCA
 AGGCTTCCTTCAGATGAGTACTTCAAACAGCCCTAGATTTGATGTAAACAAGGATCAGGGGAGTTGCAC
 CCTTTACCTTCCTAAGAGTTGCCAGTAAAGAAAGTTAAAGCTGAAGCAAATAATAAAGTGTAAACAAG
 CTGTCTGTCTTAAAGCTTGCATTCAACTGCACAAAGTTGGAGCTCTAAGTGATCATCTTGTGCCTGACATG
 20 GTTGTGGCGGAAACTGTCTCACAAAACTCGAGAAAAATCCAATATAACACAGAGCAGCCATGTTACTTCCC
 CCCAGAGCTAGTCTCCAGTTTTTCCAGCACAGCCGGAGACAACATACCCTTCTACTTAATAAGAATGAAGC
 CAACTCTCCAAGAAATTTTCATTTAAACGATGTTTTACTAGGCACCAGAGTTGTGCTTGAAGATGACATT
 GGGAAACACAAGCTTCCGGTTGGAAGATCATAGGGGTACAATAGCTGTGACATTGAGTTATGTGGGAGCTTT
 TCACCTTACACAAGAAGAGGTCTTTTTCTGTAGAAGATTTTCAAGATACTCTATTCCGAGTTCTTTTAGATC
 25 ACAGTGTGGAAAATTTGATGGAGGCATTGAATGGATTGCATCTCAGAGATGGGGTGGCATTGATTATCTA
 CTAGTTCCATCCACTCATTACATGAAACATCTCTTATTGATTGGGAAGTGATCAGATCCGTGAATCTAAC
 TTCTCATGAGGTTTTGGAAAAACACGAAAATTTTCTACCAACGGTGTCTCTCGCATTCTACACACAAAAG
 ACGGCTTGTTTTTGTACTTGTGTCTGACAAAATGCAATTGGTTTACACACCACATAATGGATACGTTCTACTGC
 ACAAAGGTGTTCTCAACAATCTAAACGGAAATTCATTATTGACCAAGAGAAAATCTGGCGATCAGACTTA
 30 CATTGAGTACTACGAGGAAAGGCATGGGATTCAATTAATTTTGTGGATGAACCTCTTCTAAATGGAAGAC
 ACATTTTCAGTTGCATAGTTATCTTCACATGGCCAAGAAGAAGAGAGAAAGAGCATGACAGGGAAATTT
 GTTGAACCTACCTCCTGAGCTTTGTCTATGTCATTTTGTCCCCAATATCAGTTGATATGATCTATTTCATATAC
 TTTTATCCCATCTGTTATGCAACGCATTGAATCTTTGCTTATAGCATACAACCTGAAGAAAAGCATCCCAA
 AAGTCAATATTCCAACCATTAAAGGTTTTTGGAAAGCTATTACGACAAAGAAGTGCGAAGATCAGTTCCACTTG
 35 GAATCACTAGAACTCTTGGTGACTCTTTTCTGAAATATGCTGTTTGTGAGCAACTATTCCAACACTGTCA
 TACTCACCATGAGGGTCTTCTTAGCACGAAGAAAGATGGAATGATTTCAAATGTCATGCTCTGCCAATTTG
 GATGTCAGCAGAACTTCAGGGATTTATCCGCGATGAGTGTTTTGAACCCAAAGGTTGGATGGTTCCAGGT
 CAATCATCTGCAGCTTATTCACTTGTAAACGATACTCTACCCGAGTCTAGAAACATATACGTTGCTAGTAG
 40 GAGGAATCTGAAACGCAAGAGTGTGGCCGATGTTGTAGAAATCATTAAATTGGAGCATATCTCAGCGAGGGAG
 GTGAACCTGCAGCTTTGATGTTTCAATGAAATTGGGTTGGAATAAAGGTCGACTTTACAACCTACGAAGATCCAG
 AGAGATTCCCCAATACAAGCAGAGAAGCTTGTGAATGTAGGTTATATGGAGTCGCTGTTGAATTACAGTTT
 TGAGGATAAGTCTCTTCTAGTTGAAGCATTGACTCATGGTTTCATACATGATGCCTGAAATTCGAAGATGCT
 45 ATCAGCGGTTGGAGTTCTTCGGTGACTCTGTATTGGATTATCTCATAACCAAGCATCTATACGACAAATAT
 CCTGTCTGTCCCTGGACTATTAACCGACATGCGATCAGCTTCTGTAAACAATGAATGTTATGCCCTAGT
 GCGCGTGAAAGCAAACCTGCACAAACACATCTGTACGCCCTCTCATCATCTCCATAAGCACATCTCTAGAA
 CTGTCACTGAGTTTGAACAGTCTTCTTTGCAATCCACTTTTCGGATGGGAATCCGATATATCTTTTCCAAAG
 GTTCTTGGAGATGTGATAGAATCTCTAGCAGGCGCGATATTGTTGACTCAGGTTACAACAAGGAAGTAGT
 GTTTGCAAGTATTAAACCACTTTTGGGTTGTATGATACTCCAGAGACTGTCAAGTTGCATCTCTGTGAGAG
 50 AGTTGACAGAATTATGTCAGAAGTGGCAGTTTCGAGTTGAGTAAAGCTAAAGATTTTCGATTCTTTACGGTT
 GAGGTGAAAGCTAAGGAGATGAGTTTTGCTCACACAGCAAAGGCCTCTGATAAGAAAATGGCCAAGAAATT
 GGCTTACAAAGAAGTCTTGAACCTTACTTAAGAACAGCCTGGACTACTAA

- Secuencia de la proteína DCL2 de *Arabidopsis*:

55

60

65

5 MTMDADAMETETTDQVSASPLHFARSYQVEALEKAIKQNTIVFLETGSGKTLIAIMLLRSYAYLFRKPSPC
FCVFLVPQVVLVTQQAELKMHDTDLKVGMYWGDWDFWDSSTWKQEVVDKYEVLMTPAILLDALRHSFLS
LSMIKVLIVDECHHAGGKHYPYACIMREFYHKELNSTSNVPRIFGMTASLVKTKGENLDSYWKKIHELETL
MNSKVYTCENESVLAFVFPFSTPSFKYYQHIKIPSPKRASLVEKLERLTIKHRLSLGTLDLNSSTVDSVEK
10 RLLRISSTLTCLDDLGIILAQKAAQSLSASQNDSTFLWGEINMFSVALVKKFCSDASQEF LAEIPQGLNWS
VANINGNAEAGLLTLKTVCLTIETLLGYSSLENIRCIIFVDRVITAIVLESLLAEILPNCNNWTKYVAGNN
SGLQNQTRKKQNEIVEDFRRGLVNIIVATSILEEGLDVQSCNLVIRFDPASNICSF IQSRGRARMQNSDYL
MMVESGDLTQSRLMKYLSGGKRMREESLDHSLVPCPLPDDSDLEPLFRVESTGATVTLSSSVSLIYHYCS
RLPSDEYFKPAPRFDVNKDQGSCTLYLPKSCPVEVKAEANNKVLKQAVCLKACIQLHKVGALSDHLVPDM
VVAETVSQKLEKIQYNTEQPCYFPPELVSQFSAQPETTYHFYLRMKPNSPRNFHLNDVLLGTRVLEDDI
15 GNTSFRLEDHRGTIAVTL SYVGAFLHTQEEVLF CRRFQITLFRVLLDHSVENLMEALNGLHLRDGVALDYL
LVPSTHSHETSLIDWEVIRSVNLTSHEVLEKHENCSTNGASRILHTKDGLFCTCVVQNALVYTPHNGYVYC
TKGVLNNLNGNSLLTKRNSGDQTYIEYYEERHGIQLNFVDEPLNNGRHIFTLHSYLHMAKKKKEKEHDEF

20 VELPPELCHVILSPISVDMIYSYTFIPSVMQRIESLLIAYNLKKSIPKVNIPTIKVLEAITTKCEDQFHL
ESLETIGDSFLKYAVCQQLFQHCHTHHEGLLSTTKDGMISNVMLCQFGCQKQLQGFIRDEC FE PKGWMVPG
QSSAAYS LVNDTLPE SRNIYVASRRNLKRKSVADVVESLIGAYLSEGGE LAALMF MNWVG IKVDFTTTKIQ
RDSPIQAEKLVNVGYMESLLNYSFEDKSLLEALTHGSYMMPEIPRCYQRLEFLGDSVLDYLI TKHLYDKY
PCLSPGLLTDMRSASVNNECYALVAVKANLHKHILYASHHLHKHISRTVSEFEQSSSQSTFGWESDISFPK
25 VLGDVIESLAGAIFVDSGYNKEVVFAIKPLLGCMITPETVKLHPVRELTEL CQKWQFELSKAKDFDSFTV
EVKAKEMSFAHTAKASDKKMAKKLAYKEVLNLLKNSLDY

30

35

40

45

50

55

60

65

- Secuencia de codificación de DCL3 de *Arabidopsis* (At3g43920):

```

5  ATGCATTTCGTCGTTGGAGCCGGAGAAAAATGGAGGAAGGTGGGGGAAGCAATTTCGTTAAGAGAAAAATCTC
   TGAAATCGATGGAGATCAAAATCTTGATTCTGTCTCTTCTCCTATGATGACTGACTCTAATGGTAGTTATG
   AATTGAAAGTGACGAGGTTGCTAAGAACAGGAACATAATTGCTGTTTTGGGGACAGGGATTGATAAGTCA
   GAGATCACTAAGAGGCTTATCAAAGCTATGGGTTCTTCTGATACAGACAAAAGATTGATAATTTCTTGGC
10  CCCAACTGTGAATCTTCAATGCTGTGAGATCAGAGCACTTGTGAATTTGAAAGTTGAAGAGTACTTTGGAG
   CTAAAGGAGTTGATAAATGGACATCTCAGCGCTGGGATGAGGAATTTAGCAAGCACGATGTTTTAGTTATG
   ACTCCTCAAATATTATTGGATGTCCCTTAGAAGTGCATTCCTGAAACTAGAGATGGTATGTCTTCTAATAAT
   AGATGAATGCCACCATACCACTGGCAATCATCCCTATGCGAAGTTAATGAAGATTTTTAATCCTGAAGAGC
   GTGAAGGAGTGGAAAAGTTTGTACAACGGTTAAAGAAGGTCCAATATTGTATAACCCATCACCATCCTGT
15  AGTTTGGAAATTGAAAGAAAAGTTAGAAATTCACACCTCAAGTTTGTATGCTTCTCTTAGAAGGCTTCAAGA
   GTTGGGAAAAGACAGTTTTCTGAATATGGATAATAAGTTTGAGACATATCAAAGAGATTGTCTATCGACT
   ACAGAGAGATTTTGCATTGCCTTGATAATCTTGGCCTGATTTGCGCACACTTGGCGGCTGAAGTCTGCTTG
   GAGAAAATCTCAGATACGAAAGAGGAAAGTGAAACTTATAAAGAATGCTCAATGGTGTGCAAGGAATTTCT
   TGAGGATATTTTATCCACCATTGGGGTGTATTGCGCAAGATGATAAGAGTCTGGTAGATTGCGAGCAAA
20  ACCATCTGTGAGAGTAAATTTCTGGGCATGTATCTCAAAGCTAAAAGAACTCTTCCATCTATTGGATTCC
   TTTAGAGGTGACAAGCAAAAGCAGTGCCTTATTTGATTGAGAGAATTATAACTGCGAAAGTGATCGAAAG
   ATTCGTTAAGAAAGAAGCCTCTTTGGCTTACCTTAATGTCTTGTATTTAACCAGAAAACAACCCCTCCACCA
   ATGTATCGGCACAGAAAATGCAAATTTGAAATCCCTGATTTATTTCAACATGGCAAGGTGAATCTTTTATTC
   ATCAGAGATGTGGTTGAAGAGGGATTTGAGTTCCAGATTGCTCATGCAATGGTTTGTGTTTACCTGCCCAA
25  AACAATGTGTAGTTACTCGCAGTCTCAAAAACATGCCAAACAGAGTAATCTAAGTCTATCATGTTCTTG
   AAAGAGGGAACCCGAAGCAAGAGACCATCTGCATGACCTTATGCGAAGAGAAGTCTAATTCAGATCCA
   GAAGCTCCAACTTGAAATCGTGTCCACCTCCAGTGAAAAATGGACACGGTGTGAAGGAGATTGGATCCAT
   GGTATCTCCAGATTCTAACATAACTGTATCTGAGGAAGCAGCTTCCACACAAACTATGAGTGATCCTCCTA
   GCAGAAATGAGCAGTTACCACCGTGTAAAAAGTTACGCTTGGATAACAATCTCTTACAATCCAACGGCAAA
30  GAGAAGGTTGCTCTTCTAAAAGTAAATCATCTTCATCGGCTGCAGGTTCAAAAAACGTAAGGAGTTGCA
   CGGAACAACCTGTGCAACGCATTGTGAGGAACCTGGGGAGAAAATATTGATGGCGCCACCTTTTACGGCTT
   ATAAGTTTGACTTCTGTTGTAATATTTCTGGCGAAGTATACTCGAGTTTCTCTCTTTTGTGCTGAGTCACT
   CTCGCGGAGGATGTTGGTAAAGTTGAGATGGACCTTTACTTGGTCAGGAAGCTTGTCAAGGCTTCTGTCTC
   ACCTTGTGGCCAGATACGTTTGAGTCAAGAGGAGCTGGTCAAAGCAAAATATTTTTCAGCAGTTTTCTTTA
35  ATGGCATGTTTGGAAAGTTGTTTGTGGATCTAAGTCACAGGGAACAAAGAGAGAATTTTGTCTCAAACCT
   GACACTAGTTCTCTTTGGCACCTGCCCTTATGTTTCTACTGCTACCAGTTGAAACAAATGATCTAGCTTC
   GAGTGCAGCAATTGATTGGTCAGCTATCAACTCCTGTGCCTCAATAGTTGAGTTCTTGAAGAAAAATCTC
   TTCTTGATCTTCGGGATAGTGATGGGAATCAGTGCAATACCTCATCCGTCAGGAAGTCTTACTAGACGAT
   AAAATGGAAGAAACGAATCTGATTCATTTTGCCAATGCTTCGTCTGATAAAAATAGTCTCGAAGAACTTGT
40  GGTCAATTGCAATTCATACTGGACGGATATACTCTATAGTTGAAGCCGTAAGCGATTCTTCTGCTATGAGCC
   CCTTTGAGGTGGATGCCTCATCAGGCTATGCTACTTATGCAGAATATTTTAAACAAAAGTATGGGATTGTT
   TTAGCGCACCCGAACAGCCGTTGATGAAGTTGAAGCAGAGTCACCATGCGCACAACTTTTAGTCGACTT
   CAATGAAGAGATGGTTGTGAAGACAGAACCAAAAGCTGGCAATGTTAGGAAAAGAAAACCGAATATCCATG
   CGCATTTGCCCTCCAGAGCTTTTGGCTAGAATTGATGTACCGCGTGTGTCTAAAATCAATCTACTTGCTG
45  CCTTCAGTGATGCACCGCCTAGAGTCTCTAATGTTGGCCAGCCAGCTTAGGGAAGAGATTGATTGTAGCAT
   AGATAACTTCAGTATATCAAGTACATCGATTCTTGAAGCAGTTACAACACTTACATGCCCGGAATCATTTT
   CAATGGAGCGGTTGGAAGTGTCTCGGGGATTGAGTCTTGAAGTATGTTGCGAGCTGTATCTATTCTTAAG
   TATCCTGACAAAGATGAGGGGCAACTATCACGGCAGAGACAATCGATTATATCTAACTCAAATCTTACCCG
   CTTGACAACCACTGCGAACTACAGGGATACATAAGAAATGGCGCTTTTGAACCGCGTCGCTGGACTGCAC
50  CTGGTCAATTTTCTCTTTTCTGTTCTTGAAGTGTGGGATTGATAC TAGAGAAGTACCATTGGACCCA
   AAATTTCTTACAGAAAACATGACTATCAAAATAGGCAAGTCTTGCGACATGGGTATAGATGGGTAGTTTC
   AAAATCTGTATCAGATTGCGCTGAGGCCCTGATTGGTGCCTATTATGTAAGCGGTGGATTGTCTGCTTCTC
   TCCATATGATGAAATGGCTCGGTATTGACGTCGATTTTGACCCAAACCTAGTCGTTGAAGCCATCAATAGA
   GTTCTCTACGGTGTGTACATTCTTAAAGAAGATGAGCTCATAGAGTTGGAGAGAAAGATCCAACATGAATT
55  CTCTGCAAAGTTTCTTTTAAAGAGGCTATCACACACTCCTCTCTTCGTGAATCCTATTATACGAGAGAT
   TAGAGTTTCTTGGCGATTCTGTACTGGATTTCTAATAACCCGTCATCTTTTAAACCTACGAACAACT
   GGGCCTGGAGAGATGACCGATCTTCGTTCTGCATGTGTAAACAATGAAAATTTTGCAGCAAGTTGCAGTGAA
   AAATAACCTGCATACCCACCTTCAACGCTGTGCTACGGTTCTCGAGACTCAAATAACGACTATCTGATGT
60
65

```

5

5

20

40

45

50

55

60

65

AATCTAAAGAGCTCAATTTACTGGTTGCCACTAAAGTTGGTGAAGAAGGCCCTTGATATTTCAGACATGCTGT
 CTGTGTATCCGTTATGATTTACCAGAGACTGTTACCAGCTTCATACAGTCCAGAGGTCGTGCTCGAATGCC
 TCAGTCTGAATATGCGTTTCTAGTGGACAGCGGAAACGAGAAAGAGATGGATCCTTATTGAAAATTTTAAAG
 TAAATGAAGATCGAATGAATCTAGAAATTACTTACAGAAGCTCAGAGGAACTTGTCTAGACTTGATGAG
 GAGTTATACAAAGTTCATGAGACAGGAGCTTGTATCAGTGGTGGAAAGCAGCATCTCCCTTCTCTATAAATA
 TTGTTCTAGGCTTCCACATGATGAATTTTTTCAGCCCCAAGCCAGAGTTTCAATTCAAGCCTGTTGACGAAT
 TTGGTGGAACTATCTGTGCGATAACTTTACCTGCTAATGCTCCTATAAGTGAAATCGAAAGTTCACTACTA
 CCTTCGACAGAAGCTGCTAAAAAGGATGCTTGTCTAAAGGCTGTGCATGAGTTGCACAACCTGGGTGTACT
 TAACGATTTTCTGTTGCCAGATTCCAAGGATGAAATTGAGGACGAATTGTCAGATGATGAATTTGATTTTG
 ATAACATCAAAGGTGAAGGCTGTTTACGAGGTGACCTGTATGAGATGCGTGTACCAGTCTTGTTTAAACAA
 AAGTGGGATCCATCTACAAGTTGTGTCAATCTTCAATCTTACTATATAATGTTTGTGCCTCATCCCGCTGA
 TAGGATCTACAAAAAGTTTGGTTTCTTCATGAAGTCACCTCTTCCCCTGAGGCTGAGACTATGGATATCG
 ATCTTCACCTTGCTCATCAAAGATCTGTAAGTGTAAAGATTTTCCATCAGGGGTCACAGAATTCGACAAC
 GATGAGATAAGACTAGCTGAGCTTTTCCAGGAGATTGCCCTGAAGGTTCTTTTGAACGGGGGGAGCTGAT
 CCCGGACTTTGTTCCCTTGGAAGTCAAGACTCTTCTAGAACAAGCAAAATCCACCTTCTACCTTCTTCTTC
 CACTCTGTCTGCATGATGGAGAAAGTGTATATCTGTAGATTGGGTGACTATCAGAAATGCTTGTCTATCA
 CCAATCTTTAAGACTCCATCTGTTTTAGTGGAAAGATATATTTCTCTCTCGGGCTCTCATTTAAAGCTAGC
 AAATGGCTGCTGGAATATTGATGATGTGAAGAACAGCTTGGTTTTTACAACCTACAGTAAACAATTTTACT
 TTGTTGCTGATATCTGCCATGGAAGAAATGGTTTTCAGTCTGTTAAGGAATCTAGCACCAAAAGCCATGTG
 GAGAGCATATATAAGTTGTATGGCGTGGAACTCAAGCATCCTGCACAGCCACTCTTGCGTGTGAAACCACT
 TTGTCATGTTCCGAACTTGCTTCACAACCGAATGCAGACGAATTTGGAACCACAAGAATTCGACGAATACT
 TCATAGAGATTCTCTCCGAACTTTCTCACTTAAAGATAAAAGGATTATCTAAAGACATCGGAAGCTCGTTA
 TCCTTGTACCATCAATCATGCATCGTATGGAGAAATTTACTCGTGGCTATTGAAGTGAACATGTGCTGTC
 TGCTTCGATCCCTGAGATAGCTGAAGTTTCTGGTCAAGGGTACTCGAGGCGCTCACAACAGAGAAATGTC
 ATGAGCGCCTTTCTCTTGAAGGCTTGAGGTGCTTGGTGATGCATTCTCAAGTTTGTGTTAGCCGACAC
 CTTTTCTACACCATGATAGTCTTGATGAAGGAGAGTTGACTCGGAGACGCTCTAACGTTGTTAACAATTC
 CAACTTGTGCAGGCTTGCAATAAAAAAAATCTGCAGGTCTACATCCGTGATCAAGCATTGGATCCTACTC
 AGTTCTTTGCATTTGGCCATCCATGCAGAGTAACCTGTGACGAGGTAGCCAGTAAAGAGGTTCAATCTTG
 AATAGGGATCTTGGGATCTTGGAGTCAAACTAGTGGTGAATCAGATGTAGCAAAGGCCATCATTGGTTGTA
 CAAGAAAACAATTGCTGATGTGGTTGAGGCTCTTGTGGGAGCTTCTTAGTTGACAGTGGCTTCAAAGGTG
 CTGTGAAATTTCTGAAGTGGATTGGTGTAAATGTTGATTTTGAATCCTTGCAAGTACAAGATGCTTGTATT
 GCAAGCAGGCGCTACTTGCCCTCACTACTCGCAATAAATTTGGAGACCTTGAAAACAGCTTGACTATAA
 GTTCTCCACAAAGGTCTACTTGTACAAGCCTTTATCCATCCATCTTACAACAGGCATGGAGGAGGCTGCT
 ACCAGAGATTGGAGTTTCTTGGGGATGCTGTTCTGGACTACTTGATGACATCCTATTTTTTTCACAGTCTTC
 CCGAACTGAAACCTGGTCAACTGACCGATCTAAGATCTCTCTCAGTAAATAATGAGGCGCTAGCAAATGT
 TGCTGTGAGTTTTTTCGCTAAAGAGATTTCTATTTTGCAGTCCATTTATCTTCATGAAGTTATAGAGGATT
 ATACCAATTTCTTGGCATCTTCCCCATTGGCAAGTGGCAATCTGAAGGTCCAAGATGCCCAAAGGTTCTT
 GGTGACTTGGTAGAATCCTGTTTGGGGGCTCTTTTCTCGATTGTGGGTTCAACTTGAATCATGTCTGGAC
 TATGATGCTATCATTTCTAGATCCGGTCAAAACCTTGCTAACCTTCAGATTAGTCCATAAAAGAATGA
 TTGAACCTTTGCCAGTCTTACAAGTGGGATCGGGAAATATCAGCGACGAAAAAGGATGGTGCTTTTACTGTT
 GAACTAAAAGTGACCAAGAATGGTTGTTGCCCTTACAGTTTCTGCAACTGGTCGGAACAAAAGAGAGGGCAC
 AAAAAAGGCTGCACAGCTGATGATTACAAACCTGAAGGCTCATGAGAACATAACAACCTCCCATCCGTTGG
 AGGATGTTCTGAAGAATGGCATCCGAAATGAAGCTAAATTAATTGGCTACAATGAAGATCCTATAGATGTT
 GTGGATCTTGTGGGCTGGACGTTGAAAACCTAAATATCCTAGAACTTTTGGCGGGAATAGTGAAAGAAG
 CAGCTCATACGTCATCAGACGAGGTCTCCCCAAGCACCATCTAAAACAGAAGACAGGCTTCTCAAAGG
 CCATCATAAAAGCAGGTGGACCAAGCAGCAAAACCGCAAAATCCCTCTTGACGAAACATGTGTTGCTAAC
 GTTGGAAAGCCACCACACTTCGAATGTTGTGAAGAGGAAGGACCAGGCCACCTGAAATCATTGCTCTACAA
 GGTAATCCTGGAAGTTGAAGATGCGCCCAATATGACATTGGAATGTTATGGTGAGGCTAGAGCAACGAAGA
 AAGGTGCAGCAGAGCAGCTGCCCAAGCTGCTATATGGTGCTCAAGCATTCTGGATTCTTTGTCTGA

- Secuencia de la proteína de DCL4 de *Arabidopsis*:

MRDEVLDLSLTIPSKLLGKRDREQKNCEEEKNKNKKAKKQKQKDPILLHTSAATHKFLPPPLTMPYSEIGDDL
 RSLDFDHADVSSDLHLTSSSSVSSSSSSSSLSFSAAGTDDPSPKMEKDPKRIARRYQVELCKKATEENVIV
 YLGTGCGKTHIAVMLIYELGHLVLSPPKKSVCIFLAPTVALVEQQAQVIADSVNFKVAIHCGGKRIVKSHSE
 WEREIAANEVLVMTPOILLHNLQHCFIKMECISLLIFDECHHAQQSNHPYAEIMKVIFYKSESLQRPRIFG
 MTASPVVGKGSFQSENLSKINSLENLLNAKVYSVESNVQLDGFVSSPLVKVYYYRSALSDASQSTIRYEN
 MLEDIKQRCLASLKLIDTHQTQLLSMKRLLKRSHDNLIYTLNLGLWGAIQAQKIQLNSDHNVDQDEPVG
 KNPKSKICDTYLSMAAEALSSGVAKDENASDLSLALKEPLFSRKLVLKILSVFRLEPHMKCIFVNR
 IVTARTLSCILNNLELLRSWKSDFLVGLSSGLKSMRSMETILKRFQSKENLLVATKVGEGLDIQTCC
 LVIRYDLPETVTSFIQSRGRARMPQSEYAFLVDSGNEKEMDLIENFKVNEDRMNLEITYRSSEETCPRLDE
 ELYKVHETGACISGGSSISLLYKYCSRPLHDEFFQPKPEFQFKPVDEFGGTICRITLPANAPISEIESLL
 PSTEAAKKDACLKAVHELHNLGVLNDFLLPDSKDEIEDELSDDDFDNIKGECCSRGDLVEMRVPVLFKQ

KWDPSTSCVNLHSSYIMFVPHPADRIYKKGFFFMKSPLPVEAETMDIDLHLAHQRSVSVKIFPSGVTEFDN
 DEIRLAELFQEIALKVLFERGELIPDFVPLELQDSSRTSKSTFYLLPLCLHDGESVISVDWVTIRNCLSS
 PIFKTPSVLVEDIFPPSGSHLKLANGCWNIDDVKNSLVFTTYSKQFYFVADICHGRNGFSPVKESSTKSHV
 ESIYKLYGVELKHPAQPLLRVPLCHVRNLLHNRMQTNLEPQELDEYFIEIPPELSHLKIKGLSKDIGSSL
 SLLPSIMHRMENLLVAIELKHVLSASIPETAEVSGHRVLEALTTEKCHERLSLERLEVLDGDAFLKFAVSRH
 LFLHHDLSDEGELTRRRSNVNNNSNLCRLAIIKKNLQVYIRDQALDPTQFFAFGHPCRVTCDEVASKEVHSL
 NRDLGILESNTEIRCSKGHHWLYKKTIAADVVEALVGAFVDSGFKGAVKFLKWIGVNVDFESLQVQDACI
 ASRRYLPLTTRNNLETLENQLDYKFLHKGLLVQAFIHPSYNRHGGGCYQRLEFLGDAVLVDYLMTSYFFTVF
 PKLKPQQLTDLRSLSVNNEALANVAVSFSLKRFLFCESIYLHEVIEDYTNFLASSPLASGQSEGPRCPKVL
 GDLVESCLGALFLDCGFNLNHVWTMMLSLFDPVKNLSNLQISPIKELIELCQSYKWOREISATKKDGAFTV
 ELKVTNGCCCLTVSATGRNKREGTKKAAQLMITNLKAHENITTSHPLEDVLKNGIRNEAKLIGYNEDPIDV
 VDLVGLDVENLNILETFGGNSERSSSSYVIRRGPLQAPSKTEDRLPQKAIKAGGPSSKTAKSLLHETCVAN
 CWKPPHFECCEEEGPGHLKSFVYKVIIEVEDAPNMTLECYGEARATKKGAAEHAAQAAIWCLKHSGFLC

Ejemplo 2

Los transcritos de DCL2 y DCL3 y no de DCL4 se reprimen durante la respuesta inmune innata

[0073] Debido a que tanto DCL2 como DCL3 regulan negativamente la respuesta inmune innata de *Arabidopsis*, se comprobó si sus niveles de transcritos disminuyeron durante la estimulación de PAMP o la infección patógena. El análisis de PCR cuantitativa reveló que se reprimieron los ARNm de DCL2 y DCL y no de DCL4 ~ 2 – 3 veces en cualquiera de los flg – 22 o en los tratamientos de la Pto DC3000 virulenta (Figura 5A, B). La Figura 5A muestra plantas de semillero de Col – 0 WT que se provocaron con 1 µM de flg – 22 durante 60 min y se analizó una acumulación de ARNm de DCL2, DCL3 y DCL4 en PCR en tiempo real. En la Figura 5B se muestra lo mismo que en la Figura 5A excepto que las plantas de cuatro semanas se provocaron con DC3000 en 2 x 10⁷ cfu / ml durante 6 horas.

[0074] Los resultados sugieren que DCL2 y DCL3 se reprimen transcripcionalmente durante la respuesta inmune innata de la planta.

Ejemplo 3

Identificación de los represores endógenos de la expresión DCL2 / DCL3

[0075] Las líneas transgénicas de *Arabidopsis* que transportan 1,5 Kb regiones aguas arriba de DCL2 o DCL3 se unen a un gen indicador *GFP* y además se someten a mutagénesis (utilizando enfoques conocidos por expertos en la disciplina como etilmetanosulfonato (EMS)). Se realizó además un cribado de la pérdida de GFP para identificar los reguladores negativos de la transcripción de DCL2 o DCL3. Los genes represores candidatos se aíslan por la clonación basada en mapas y se criban para una susceptibilidad aumentada a los patógenos fúngicos y bacterianos virulentos. Los represores se expresan en un promotor fuerte 35S o en promotores inducibles por patógenos (por ejemplo, WRKY6, PR1), y en líneas transgénicas estables generadas para conferir una resistencia de la enfermedad aumentada a los patógenos. Al mejorar constitutivamente la expresión de los reguladores negativos de la expresión *DCL2* y *DCL3*, se incrementa la resistencia a los patógenos fúngicos y bacterianos que se obtienen en varios tipos de plantas, incluyendo los cultivos.

[0076] De manera similar, se identifican los reguladores positivos de la transcripción de DCL4 que desempeñan un papel en la actividad antiviral. Esto comprende la mutagénesis de las líneas transgénicas de *Arabidopsis* que desencadena la transcripción de DCL4 mediante la evaluación del efecto de DCL4 en un constructo constitutivo GFP y aíslan además a los mutantes que anulan la expresión de GFP. Se identifican los correspondientes genes utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la disciplina como la clonación basada en mapas y su sobreexpresión constitutiva o condicional en diversas especies de plantas que se implementa para conferir

resistencia antiviral. Las plantas transgénicas que sobreexpresan de forma constitutiva o condicional represores de la transcripción de DCL2 y DCL3, así como los activadores de la transcripción de DCL4, se producen para conferir un amplio espectro de resistencia a patógenos no relacionados.

[0077] Por otra parte, las mismas líneas transgénicas que analizan las actividades transcripcionales de DCL2 y DCL3 se utilizan para cribar los compuestos químicos que desencadenan la disminución del ARNm de GFP. Esto se logra por el control de los niveles del ARNm de GFP (utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la disciplina como el análisis de Northern, el análisis de PCR en tiempo real semicuantitativo o el análisis de PCR en tiempo real cuantitativo), tras la exposición de estas líneas transgénicas a una biblioteca de agentes químicos. Las moléculas que someten los niveles del ARNm de GFP se utilizan además para conferir resistencia antifúngica y antibacterial en varias especies de plantas, incluyendo los cultivos.

[0078] Además, se utilizará la misma biblioteca de agentes químicos en las líneas transgénicas que analizan la actividad transcripcional de DCL4 para identificar las moléculas que mejoran la expresión de GFP. Estos compuestos químicos conferirán una mayor resistencia contra los patógenos virales promoviendo la transcripción de DCL4. Los cócteles de los agentes químicos que promueven la transcripción de DCL4 e inhiben la transcripción de DCL2 y DCL3 se utilizan además para conferir un amplio espectro de resistencia a patógenos no relacionados.

[0079] Las secuencias de los promotores DCL2, DCL3 y DCL4 permiten a los expertos en la disciplina generar constructos que analizan la transcripción de DCL2, DCL3 o DCL4.

- Secuencia promotora DCL2 de *Arabidopsis*:

```

ATTCTTTGGCCTGCTCTATATAGTTTGTTCCTCGTTTTCTTATCCCCAAATGCATCATCATCGTTTTTCAA
GAAGCAGTACACTCTCAAGAAGTTTCATTGCCAAGAAAGGACCTATCACACTTGTACTGTGGATTCTCCAAG
ACCTCTGCAGAATGCCTGTGGTTTGGTTTCGGTTACATGGCATACTTGTCTATCTCATATTTCTTCCTTGG
TTCTCCGGTGAAGTGTTTGTGCTGATTCTGGAGACAGAGCATACATGACTATTATGGGATGGGTGGTGACGAG
CTCAGGCGCAGATAGGAAACATGAATACATTGGACAACCTGATGTAATGGTTGTGGTGATCCACATGTGG
TCTTTGTGTATATCCCCAGTGTCTTGGTTGTGTGTGTCTGGTTGCTGAGAGAGAAATCTACAAAGATCAC
ATTGGAAGTGTCTCTGGTAAGAAAGAGGATGACCATGACCGGGAAGGAAGAAGAGATCACAACGCCGCTC
ACTGTTATTCTCGAACAGAAGACTGTTTCGGAATCGGTCTTGCTGGCTTCATTAGCTCTATATTGGAAGC
ATTCAAGGTACCACTTGTATATTAATAATGATTTCGTTTTATTTCCATCTTGCAATTGGCAAAAACCTGCGA
TCATGTTTCATCCGTTGTCTGTTTTTCATTCTGCATTACCTTCTGAAGTATATTTTGTTTTTATTGACAGAAT
TGCTGGGCATTAGGTAGAGCTTATGAGATGAATGTGGTTTCATTTCCAGGTTACAGCCTTGTAGTTCCATT
GTTGCTACTATATGTTTATCTGCAAAACCCATAAAGTTCCATGAGATTTGAATCTATGGAAGTTTTGGTGTT
TTTATGATTTTTGATTATGAAGAAACACATTTATAGGGGGTTTTCTTATGTGTTGTTTGATAGAGTTGATAT
ACTATATAGATCAAGAAAGTTAGACCAAAATTATCTGTATCCTTTTGCTTTTATTTTTTTTACAGCTAGA
CCAAAAAAGTACAAGTGGTTTTGCTCAATTTGGAAAAAAAACATTAAAAATATTAATAAACAATAATGA
ATAATGACGTAAGCGAAAGCTTCTGTCTAGTCTCACAGTCACAACAAAACAGTCAATCCCCCAAAGAATT
ATGGTAGCAGTCAATAATCCATAAATAATCTTCTTCAACAGTTTTTTTCTCTTAAATTTTTGTTTCGAAA
ACCGCTCACTACTTCTTAATCGAAATGACTGACTGAGAGCTTTAGCTTTTGATCGTTTCGTCTTCGTGATTC
CTTTCTTCTTCTCTCCGCTACTGTCTGTACCTGAACTACTGTCTCGATCGCTGCTTTGTCTTTTCGA
GGTTCTCTAATTTGTTTTTTCTTATTATTATCTCTGGGGTTTGCTTTTGCGTTAATCCTCTTTCTGCTCGA
CTTACGGCGATTTTTGATATTTGCAGATTAAAAAGTTAGGTTTTTTTTTCGTAAATCTACTGTATATGTTT
TAGATGACC

```

- Secuencia promotora DCL3 de *Arabidopsis*:

```

TTATCCGAATTTGACTGGATATAGATCCGACCCATATATCCAGAATCCGTGTGTCAGAATGTGTTAAATTG
CCCATTTTACCCCTTGACGAAATCTCTTAGTTTGCCTTAGTTTGAGAACATTTTATGTAATATTTTACCCCT
TTATATAGTTATTTATTTTGTAGTAATTTCCAATTAATATTATAGATCAAACCTGTTTCTAATATTAAGTT
AGTGCGTTTTGTATCTATTCTAACCCTTAAGTTAAATAAGACATGCTTTGTACACTGTTTTCTTGGTGAA
TAGAGAGGAAAAATTCACCTTTAGCATTTTGATATATATGGATTTAGTTTTGTGTGTTAAATCTATGAAGGTA
TATGATACTCCTGTGGAGGTGTGGAACCTTTGTTATCTTTTCTGTGATTCTATTCTAAATTTGGATAAT

```

CTCTAGCTAATGTACATTAATTGCAACAAGTTCTAGTGTCTATAATAAACTCTTTTCATCACTCCCTCTCTA
 AGTAAAAATTAGATTATGAATCTTAGGTTTGGTTAAAAGGCCAACCAATTCTTGATATAGGGACTCTAAC
 CATGTGTCTGATCTATGTGATTGATTTTCTCCACTAAAAATCATTTTCTAATCAAACATATGATTCATGG
 TGGTAGTAGATTCTTCACTAGCTAGCTAGCTTCTTCTTATGTGTGAATTTTGTCTCCCACTGAGTTGG
 TCATTCTCCGTTTTTTTATATTTATCTAATTATTTTAAAGTTGGATTGTTAATGAAATTTTATTTTATGTT
 5 GATAATGTCGTTTCACTGAGTCATGTTGGAAAGGTAAACGTAATATCTCTCTGGGATGTACAATTATGTA
 CTTGTTTAGTTAAATAAATATTTAAACTTTTTGGATTATTTTGCATTAAACAAAAACAAAAA
 CCTAAACGTAATAGACGACTAATTTGAACATTAAATAGTGACTCGTTTCGTTGCTTCAGATAATATTTGG
 TAGATCACACCAGATTGCAGAGCATATTCCTCTCATATCCCAATTTTCTTACTTCCAATAGTCGATTTTCGT
 10 CGTATCTAAAACGATTTAGCTGCGCAAATTTATGTTGAATAAACAAAGCAGTGGAAGAGGAAAAAGAAGTT
 AGTTCTAATTAATCTTTTCGTTTAAAGTAATATATAGATCTTTGGGAGACGTAAGTTTTTATTGTTTATCTC
 TTATATAACCTACACTTTTAGGCTCCAATGAATCTATGACTTATTGTACAAGAAAGTTATGGACATGGGTT
 GGTTACATGATTACATAATGGTTTGTGTTAGTTCTACGTTTGTGGTCCATTGTTACAACTTTGTATGAACG
 TACGTGAGTAGGTTAATTAGTTTTGTACTTTACGTTTCTTACTTCCCTGATTCTTGTAGGTATAACTAAGGG
 15 CAACGACTTTCTCTCTAAGCTCAAATCTTCCGTTCTCGATATTTCTCCTTACATGAGAAGGACAAAGAT
 AAGGCTTTA

- Secuencia promotora DCL4 de *Arabidopsis*:

ACGATCAAAATATCAACATATGTGGTCGAACGACTGAAAACCAAAGTAGCCAAAACACACATCAACTTTT
 TTCGGTTTGGCTTAGTTACCCTAGAAGATTACCCTCAAACAAACAAAACCCAAAAAATTAAAAATATTAAT
 TTTAAAAATAGAAGAAACATATTTTAAAGAAAAGTCATTTCTTTTAAATTGTTACTTTAGTTTTGGACACTAC
 AAGCTGACCGAGTAGTCCAACATTCGATATGAAAGAAAGTGGCTCACTGCCTATATAGCTCTCGCCACTGG
 25 GAGAATACAAGGTTTCGATCCTAGATTTTGATGGAATGTCAACCAAGATTCATAATTTGTGCACTTTGTTTTT
 TCCCCATAATTTCTTAGTTAAAGGTACATCAATATAAATTTTAAAGTAGTCAAGTGTGTCCAATCAACAAAA
 GGTAATCTATAAAAAATTTGGAAATTTATCAAAATGAATCAATGTAATGTTGTATAATATGGAAAAATATG
 TAGTTTAGATGTTTTTACTTTTATAATACTTATCATTGCTGCATCACCCTCATATTAAAAATGACTAAATA
 AATACTCAAGTATGTGTTAACCTCATAAAAAATGAAATGAGGTAAACTTCTGCAATTTACATATGGTAAA
 30 TTGTTTCTAGAGCTAAAAGACCTGCAACAAGGTGATTCAATCTTCTTCTTCGACATTTAACAAGTCGGAAG
 TTCATGCTACAAATATCAGTACAAAAATCACTCTATCCATTTCAAATTAATTTAGTTCAAGTGTATA
 CGTAAATTTAAAAAATGAACGCATTTTAGATTTTCAAAATCTGAGATCAAATACCTAATTTAACCTTATCA
 AAATCAAGAGTCATCTAGATTGTAAGGGTATAATAGAAATTATAATGTTTTTAAATAATTTTTTGTAATAAT
 35 TTTAAATGACACTTAAAGTAAACGGAGAGAAGATAACTTAACAGCCACGAAATCGCGACTTGAGATTTC
 AAGAGATAAAGTATTCATCTATGTACTTTGGCACATCAATACTCTTAAATTTACCAAAATATGTAATATA
 ACATCCCTAACCATCAACAACATCAACATAAATTTAATATATATGTTTTTGTAATTTTCGTAAAAATGT
 TAAAAACAACACTTATAGTAAACAAAGAGAGGATAACTTAACAGCCAAAGAATTGAGATTTGAGATTTGGA
 AGAGATAAGATATTCATCTATATATCTTGACACATCAGCACTCTAAAAATTTACCAAAAGATGTATTTTAA
 40 AATCTCTAAACTCAATAACTCCACAAAAATTTTCAGAATCAATGATTGTAGAAACACATGATTTCTGGTTC
 AGAATTTACACACTCCACCCAAAAAATACCTTAAAAAGTTATAATTGTATTGATTAGCTGATAAAATC
 AATTTATTGGAAGAAATCCTAATAATAACGCTGTAATAGAAGAGAAGAGAAGAGAGAGGGAGACGTGAGA
 TCGTGAATT

Ejemplo 4

Metilación de ADN desencadenante de casiARNs de los genes relacionados con la defensa de la planta para reprimir su activación transcripcional por PAMP.

[0080] Los análisis fenotípicos anteriores indicaron que los activadores de la respuesta de defensa de la planta son reprimidos por RdDM. Para identificar dichos activadores, se aíslan los genes que aumentan en el péptido flg – 22, se extraen 2 Kb en las regiones aguas arriba y se realiza un análisis de Blast de estas secuencias de ADN contra las bases de datos disponibles públicamente de ARN pequeños que contienen los casiARNs conocidos. Este análisis en tres etapas permite la identificación de los genes que están potencialmente reprimidos por los casiARNs. Entre los genes candidatos, se identificó al At4g01250, un factor de transcripción de WRKY ya caracterizado que regula positivamente la respuesta de defensa de *Arabidopsis*. Un grupo de casiARN cubrió una región de 278 bp en la región promotora At4g01250 y la metilación del ADN se produjo en la parte superior del grupo de casiARN (véase la página web epigenomics.mcdb.ucla.edu/DNA meth/ de Jacobsen Lab, UCLA). Estas moléculas de ARN pequeño tienen mayoritariamente de 24 nt a 22 nt y por lo tanto, son productos del procesamiento de DCL2 y DCL3, consistente con la resistencia mejorada a patógenos observada en el mutante *dcl2 – dcl3* (Figura 4).

[0081] La región del ADN metilado del promotor At4g01250 contiene 2 copias de elementos de *box W* que son conocidos sitios de unión para los factores de transcripción de WRKY relacionados con la defensa de las plantas (véase, a continuación, la secuencia promotora At4g01250). La presencia de casiARNs que coinciden con la región promotora sugieren que el mecanismo RdDM reprime la activación transcripcional de At4g01250 por la inhibición de la accesibilidad del aún desconocido activador de la transcripción At4g01250.

[0082] Para comprobar esta hipótesis, se provocó a los mutantes *dcl2* – *dcl* deficientes de casiARN con flg – 22 y se analizó si el ARNm de At4g01250 estaría hiperinducido en estos mutantes. Se descubrió que el flg – 22 tratado con los mutantes *dcl2* – *dcl3* mostró una hiperinducción del transcrito At4g01250 en comparación a las plantas de semillero inducidos en el tipo salvaje. Esta hiperinducción se correlaciona con la pérdida de metilación asimétrica en la región promotora At4g01250 de los mutantes naive *dcl2* – *dcl3* (se examinó mediante el análisis de secuenciación por bisulfito, los datos no se muestran).

[0083] Se obtuvieron resultados similares con el gen At3g56710 (codificación para SIB1, proteína 1 de unión al factor sigma), en el que un grupo de casiARNs cubre una región promotora de 273 bp que se encuentra metilada frente al grupo de siRNA (véase la página web epigenomics.mcdb.ucla.edu/DNA meth/ de Jacobsen Lab, UCLA). Esta región de ADN contiene también elementos cis reguladores clave como el elemento *box W* que contribuye a la activación transcripcional de genes sensibles a patógenos (véase, a continuación, la secuencia promotora SIB1).

[0084] Los resultados indican que los casiARNs específicos regulan negativamente la activación transcripcional de un subconjunto de genes sensibles a PAMP.

> Región promotora At4g01250 que transporta un grupo de casiARN dirigido por RdDM:

```
CGAGATAAACTTTGAATGGTTACAGCGATCCAAGCGGACAAACCATCTACAAACCGAACCGCTTTTATTT
ATCATTCACAATCTATAGTTCGTAATGAAGCAGAACCAAAAAACAAATAAATTTGATGCGGATTGACTTT
AAACTAAGTTTGCAGCGGTTTGTCTCTGTCCTAAAAAATAGTATAGATTGGACCGTTGACGGATTAGTTC
GCACTAACCAACATATCCGTCTCAAAAAATAGTATAGACTGTACTGCTGACGGATTATTCCGG
```

>Región promotora At3g56710 que transporta un grupo de casiARN dirigido por RdDM:

```
GGACATGGTTAGGTCCTTGTTCCTCAAGAGTACTCGACGAAGTTTATTATTGTTTCATGCGGAATTTGAT
TCCTTGCTATAGACAATGGAATACATGATCTATATTGACGATACCTTCTGGCGCTTTTGCTTCCGACTGTTT
AGATCTGATTTTTATCATTGACAATCAAGAAGATTGGCCGACATTCGCAGCGGAATTGGCATCCTATCGCT
CCTTAGTTTGTTCCTTCTTTCGTAATTAGATTCTTCTTCGTAGTTCTAATACTCGAGCAGA
```

[0085] En negrita se encuentra el motivo central del elemento regulador de la defensa *box W*.

[0086] En contraste con los resultados observados, cuando se estimulan las condiciones de flg – 22 ningún nivel de ARNm de At4g01250 o At3g56710 se vio afectado significativamente en el antecedente de mutación naive *dcl2* – *dcl3* en comparación al control de tipo salvaje no provocado (los datos no se muestran). Esto sugiere que los activadores transcripcionales aún no conocidos no están activos o presentes en las condiciones naives.

Ejemplo 5

Asociación con transposones

[0087] Se sabe que una gran proporción de casiARNs de *Arabidopsis* se deriva de las secuencias relacionadas con transposones. A continuación, se analizó si el conjunto promotor candidato podría contener tales secuencias repetidas. Se volvió a anotar la mayoría de los transposones de *Arabidopsis* y se volvieron a colocar los del genoma de *Arabidopsis*, se descubrió que el 23 % de los genes inducidos en flg – 22 contenían transposones remanentes en sus regiones promotoras. En su mayoría son transposones no autónomos ya que carecen de elementos clave necesarios para su transcripción y / o transposición. La distribución de los grupos de casiARN coincide precisamente con las secuencias de transposón remanente ejemplificado en la región promotora At3g56710 en el que un retrotransposón LINE remanente da lugar a un grupo de casiARN.

[0088] Estas moléculas de ARN pequeño pueden producirse en *cis* por transposones remanentes o por unos pocos transposones autónomos “madre” localizados en cualquier parte del genoma de *Arabidopsis* que podría dirigir RdDM en *trans* hacia cualquier transposón remanente en el genoma que analizaría las secuencias de alta homología con las secuencias de transposón “madre”.

[0089] Se interfieren los transposones remanentes ubicados en algunas regiones promotoras que dirigen una regulación epigenética involucrada en la represión transcripcional de los genes próximos. La presencia de los transposones remanentes proporciona también promotores crípticos para los genes próximos en condiciones de estrés bióticas y abióticas. El mecanismo de regulación de genes no parece restringirse a las regiones promotoras como se observa en los grupos de casiARN en las regiones de ADN correspondientes a las regiones codificadoras. Se descubrió que varios activadores clave de respuesta de defensa son ligera pero reproduciblemente, más elevados en el mutante doble *dcl2* – *dcl3* no provocado (los datos no se muestran). Los genes candidatos incluyen algunos genes de resistencia del grupo RPP5 (por ejemplo RPP4) y la quinasa BAK1 receptora que podría

desempeñar un papel en la potenciación de la respuesta de defensa observada en los antecedentes de mutación *dcl2 – dcl3* (Figura 4E).

Ejemplo 6

Identificación de genes hiperinducidos por PAMP

[0090] Para identificar el conjunto de genes hiperinducidos en antecedentes de mutación *dcl2 – dcl3* tratado en flg – 22 y potencialmente regulados por casiARNs, primero se realizó un perfil de ARNm de gran escala utilizando un microarray estándar de *Arabidopsis*. Para tal propósito, se trataron las plantas de semillero *dcl2 – dcl3* y Col – 0 durante 30 minutos con el péptido flg – 22 y los genes seleccionados (i) hiperinducidos en el mutante obtenido *dcl2 – dcl3* se compararon al control obtenido Col – 0 (ii) o genes que solo aumentan en las plantas de semillero del mutante *dcl2 – dcl3* (estas últimas se inducen anteriormente en el antecedente de mutación *dcl2 – dcl3*). Para este análisis en particular, solo se seleccionó el subconjunto de genes hiperinducidos por flg – 22 en el mutante *dcl2 – dcl3*. Se descubrió que 337 genes se hiperindujeron en el mutante obtenido *dcl2 – dcl3* en comparación al control obtenido en Col – 0.

[0091] Entre ellos, se identificó el control interno de At3g56710 analizado anteriormente. Los análisis bioinformáticos mostraron además la presencia de algunos grupos de casiARN de las diversas regiones promotoras, codificadoras y 3' UTR que desempeñan un papel en el silenciamiento génico transcripcional de los genes sensibles a PAM como se muestra en las figuras que representan los grupos de casiARN disponibles en la web nups.gsf.de/cgi-bin/proj/plant/gbrowse/gbrowse/siRNA.

[0092] No obstante, diversos genes que transportan grupos de casiARN en sus promotores no están hiperinducidos en el antecedente de mutación *dcl2 – dcl3* tratado en flg – 22, aunque se metilaron las correspondientes regiones de ADN (los datos no se muestran). Esto indica que un solo RdDm no es suficiente para desencadenar el silenciamiento transcripcional de estos genes endógenos.

[0093] Al mejorar constitutivamente la expresión de cada uno de estos genes candidatos (utilizando los procedimientos descritos anteriormente), se consigue una resistencia mejorada en un amplio espectro de patógenos en diversas plantas, incluyendo especies de cultivo. El enfoque permite identificar los genes no caracterizados que se involucran en la resistencia de amplio espectro a patógenos. El enfoque anterior puede también aplicarse a los genes reprimidos a la regulación negativa mediada en casiARN involucrados en la respuesta a los virus así como al estrés no biótico, incluyendo de manera no limitante, la sequía, salinidad y frío.

Ejemplo 7

casiARNs que desencadenan la metilación de ADN de algunas secuencias de ADN promotoras de pre – miRNA / pre – siRNA y que reprimen la activación transcripcional por PAMP.

[0094] Se demostró recientemente que miR393, un miRNA canónico que regula receptores de auxinas, se induce transcripcionalmente en el tratamiento de flg – 22 en el que miRNA contribuye a la resistencia bacteriana. La sobreexpresión de miR393 eleva la resistencia a la Pto DC3000 virulenta, mientras que la sobreexpresión de AFB1, un receptor de auxinas resistente parcialmente al clivaje dirigido en miR393, promueve la susceptibilidad a la misma bacteria (Navarro, *et al.*, *supra*). Más adelante, se describe que algunos transcritos adicionales de miRNA primario (pri – miRNA) inducido en flg – 22 contribuyen también a la resistencia de la enfermedad en la planta. Se ha tratado identificar aquellos genes que expresan miRNA que fueron reprimidos por el silenciamiento génico transcripcional como se observó en algunos genes codificadores de proteínas (por ejemplo, At3g56710). Las largas secuencias de 2 Kb se ubican aguas arriba en los precursores de miRNA sensibles a PAMP y estas se sometieron a un análisis BLAST contra varias bases de datos de ARN pequeño disponibles públicamente, descubriéndose que varios pre – miRNA contenían grupos de siRNA en sus regiones promotoras putativas. Un ejemplo es la región promotora precursora de miR416 que transporta casiARNs y la secuencia de transposones remanentes. Estos casiARNs tienen de 24 a 22 nt, consistente con un proceso de DCL2 y DCL3, así como la resistencia mejorada de la enfermedad observada en el mutante *dcl2 – dcl3* (Figura 4). La metilación de la citosina de ADN (RdDM) se produce a menudo en la parte superior de estos grupos de casiARN (véase la página web epigenomics.mcdb.ucla.edu/DNAmeth/ de Jacobsen Lab, UCLA).

[0095] Se descubrió también que muchos miRNAs o pri – siRNAs (que representan estructuras de horquillas endógenas casi perfectas) se desarrollan de forma precoz dando lugar a una población de siRNAs. Esto indica que tanto los genes de miRNA como siRNA pueden también reprimirse por el silenciamiento génico transcripcional.

[0096] Se muestran en la Tabla 2 las secuencias de pre – miRNAs / siRNAs sensibles a PAMP potencialmente reguladas por RdDM.

Tabla 2

Secuencia miRspot506:

5 CGAAACTGAACCCGGTTTGTACGTACGGACCGCGTCGTTGGAATCCAAAAGAACCG**gggttcgtacgtacgc**
tgttcaTCG

Secuencia miRspot418:

10 AGGGTTTAGGGTTTAGGGTTTGGTTTAAAGGGTTAGGGTTAAAAGTTtatggtttagggtttacggttTT
 GGGTTTGGGATTTAGGGTATAGGGTTAGGGTAAAGAATTTATGATTTTATGTGTAGGATTGAATATAAAA
 CTAGAACCTCAACAAGATAACCGAAGAGTGGACCGAACTGTCTCACGACGTTCTAAACCCAGCTCA

Secuencia miRspot730:

15 TTAGATCATCATCCATGGCACTGACGCCGTTACGGCAACTGCCGTAGACGTTGTTGTTGCCGTGAACGGC
 20 GTGAGTGCCGTAGATTATTGGCTTAT

Secuencia miRspot29:

25 TCAAAATGGCTAACCCAACTCAACTCAACTCATAATCAAATGAGTTTAGGGTTAAATGAGTTATGGGTTGA
 CCCAACCCATTAAACAAAATGAGTTGGGTCAACCCATAACTCATTTAATTGATG

Secuencia miRspot18:

30 TAAATGGTTAACCCATTAAACAATTCAACCCATCAAATGAAATGAGTTATGGGTTAGACCCAACTCATTTA
 ACAAAtgagttgggtctaaccataaactCATTTAATTATAAACTCATTTGATTATGAGTTGGGTTGGGTT
 GGGTTACCCATTTTGA

Secuencia miRspot43:

35 TCAAAATGGGTAACCCAACTCAACTCAACTCATAATCAAATGAGTTTAGGGTTAAATGAGTTATGGGTTGA
 TCCAACCCATTAAACAAAATGAGTTGGGTCAACCCATAACTCATTTAATTG

Secuencia miRspot1204:

40 AGAATTGAAGATGCATGGAATGGTGTGTGGGAAAGGCAAAGCACCATGACTTCACAAGTTGCGTGAGGGCA
 45 AAGTATCTATTTTGGGTGAAACCATTTGCCCTCTCAGCCGTTGGATCTCTTTCTTCCTTCatcatcattc
 cgtcatcctcttTGTTG

Secuencia miRspot107:

50 TCTCGCTAGAGCTCTTCTCTCCCGGCTGTCTCCTGCTCCTGCCTAAGCGATGGCCTGGAGAGTGCTCTAGT
 GGTG

Secuencia miRspot199:

55 TCTCTTAACCTTTGATGAAACCTAGGCAATTGTCTCTTAGTTAAGAGATAAttgggtcttggtttcaccaaat
 tTAAGAGA

Secuencia miRspot1047:

60 TCGAAACGAACACAAAACCTGCGGTTGCGACAGCGGCTGCGGCAACGTTGGCGGCGACGAAACGAACAACA
 ACCTGCGGCAGtggtaccggtgccgctgccgcAACCAGCCGCTGCCGC

65

Secuencia miRspot711:

CTGTCACTGGACCGCAAGAACATTGATAGGGCACACTCCATCTCTAATGTCTCATGAGGGTCAATGACAC

5 Secuencia miRspot326:

CTGGACCGCAAGAGCATTGATAGGGGTCACTCCATCTCCAATGTCTCATGATGCTCCATGA

[0097] El conjunto de pre – miRNAs o pre – siRNAs puede utilizarse para elevar la resistencia a patógenos. Los pre – miRNAs / siRNAs individuales o en grupo se expresan de forma transgénica en plantas utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la disciplina que utilizan promotores que no se someten por RdDM. Por tanto, un promotor sensible a patógenos o constitutivo (incluye pero no se limita a, por ejemplo, el promotor WRKY6, el promotor PR1 y similares), se une operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica una o más secuencias de pre – miRNA o pre – siRNA de la Tabla 2. La expresión de las secuencias anteriores (+40 nt aguas arriba y aguas debajo de horquillas de miRNA o siRNA) se constituye, o preferiblemente, se impulsa por los promotores conocidos que son ampliamente sensibles a los patógenos víricos, fúngicos y bacterianos. Ejemplos de dichos promotores incluyen, pero no se limitan al WRKY6 y PR1. Esto minimiza el detrimento al desarrollo de la planta y de la fisiología en condiciones de no infección.

Ejemplo 8

ADN metiltransferasas que regulan negativamente la respuesta de defensa de la planta.

[0098] Los resultados del Ejemplo 7 indican que la metilación del ADN dirigida en casiARN regula negativamente la respuesta de defensa de la planta. Por tanto, los mutantes de *Arabidopsis* que bloquean los componentes clave de la vía de RdDM son más resistentes a los patógenos virulentos. La Pto DC3000 virulenta se inoculó en los mutantes de la ADN metiltransferasa deteriorados en la metilación del ADN *de novo* (por ejemplo, DRM2) o se mantuvo en la no metilación de CG (CMT3). No se observó una resistencia mejorada de esta bacteria en los mutantes únicos *drm1*, *drm2* o *cmt3* (los datos no se muestran), aunque los mutantes triples *drm1* - *drm2* - *cmt3* mostraron títulos bacterianos ~ 20 veces menores y síntomas de enfermedad bacteriana significativamente menores en comparación a las plantas infectadas de tipo salvaje. Por tanto, DRM1, DRM2 y CMT3 actúan de forma redundante como represores de la defensa de la planta y de la muerte celular programada.

[0099] Se comprobó si los genes reprimidos por TGS como At4g01250 y At3g56710 se hiperindujeron en el antecedente de mutación *drm1* - *drm2* - *cmt3* tratado en PAMP. Se provocó al mutante *drm1* - *drm2* - *cmt3* durante 30 minutos con el péptido flg – 22 y se controló los niveles transcritos de At4g1250 y At3g56710 por el análisis de PCR en tiempo real cuantitativa. Se descubrió que los dos genes se hiperindujeron en el mutante observado *drm1* - *drm2* - *cmt3* en comparación a las plantas de semilleros provocadas en La – er. Las plantas de semilleros de diez días se observaron con 100 nM de flg – 22 o flg – 22^{A.tum} durante 30 minutos y se realizó una PCR en tiempo real en los ARNms de At4g01250 y At3g56710. La represión transcripcional de los dos genes implica a DRM1, DRM2 y CMT3.

[0100] Debido a los resultados anteriores se realizó un análisis de la resistencia de los mutantes de *Arabidopsis* disminuidos en la función de MET1, la ADN metiltransferasa restante de *Arabidopsis* se involucró en el mantenimiento de la metilación simétrica de CG así como en RdDM. Se comprobó también la resistencia de las plantas alteradas en la dismunición de la función de la metilación 1 de ADN (DDM1). DDM1 codifica una proteína relacionada con las enzimas de remodelación de la cromatina SWI2 / SNF2 involucrada también en la metilación de CG. Los mutantes *met1* y *ddm1* (1^a - 5^a generación) fueron significativamente más resistentes a la Pto DC300 como se indica por el título bacteriano inferior y los síntomas de la enfermedad atenuada que desencadenan bacterias. El Col – 0 de cinco semanas y las plantas del mutante *ddm1* (2^a - 5^a generación) se inocularon con una concentración de Pto DC3000 de 10⁵ cfu / ml y se fotografiaron en 4 dpi. Se inocularon Col – 0 de cinco semanas y las plantas del mutante *ddm1* (2^a - 5^a generación) y el crecimiento bacteriano se midió en 4 dpi. Por lo tanto, DDM1 y MET1 actúan como reguladores negativos de la defensa de la planta. Se llegó a la conclusión que tales experimentos de la citosina de metilación simétrica y no simétrica de ADN regulan negativamente la respuesta de defensa de la planta.

[0101] Por tanto, el *knock – out* o *knock - down* de los genes DDM1, MET1, DRM1, DRM2 y CMT3 en diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos, son capaces de mejorar la resistencia a patógenos. Se puede realizar, por ejemplo, mediante el foco en lesiones locales inducidas en genomas (TILLING) de los genes *MET1* y *DDM1* de las especies de plantas no transgénicas (*MET1* y *DDM1* se conservan en la mayoría de las especies de plantas, incluyendo los cultivos), el ARNi de todos los ARNms de MET1, DRM1, DRM2 y CMT3 utiliza un constructo de horquilla que transporta una parte de 100 bp de cada gen que permite el silenciamiento génico combinatorio de todos estos ARNms, la generación de un microARN artificial que se dirija a los transcritos de MET1, DRM1, DRM2 y CMT3. Las plantas resultantes pueden transformarse opcionalmente con constructos que transportan un promotor fuerte 35S o un promotor que induce patógenos (por ejemplo, WRKY6, PR1) fusionado a la secuencia de codificación de *DCL4* para permitir además, una mayor resistencia contra patógenos virales (véase la introducción).

Se requerirán retrocruzamientos con las plantas de tipo salvaje de 3ª y 4ª generación para evitar los errores transgeneracionales de los genes implicados en el desarrollo / fisiología que se regulan también por RdDM.

[0102] La codificación, así como las secuencias de las proteínas de MET1, DRM1, DRM2, CMT3 y DDM1 de *Arabidopsis* son las siguientes:

- Secuencia de codificación de DRM1 de *Arabidopsis* (At1g28330):

10 ATGGTTCTGCTAGAGAAGCTTTGGGATGATGTTGTGGCTGGACCTCAGCCTGACCGTGGCCTTGGCCGCCT
CCGTAAGATCACCACCCAACCCATTAAATATCCGAGATATAGGAGAAGGGAGCAGCAGTAAGGTGGTGTATGC
ATAGGTCGTTGACCATGCCGGCGGCGAGTGGACCTGGAACCTCAACGACTCCAACCACTCCGACGACGCCA
CGTAAGGATAACGTGTGGAGGAGCGTCTTTAATCCGGGAAGCAACCTCGCCACTAGAGCCATCGGCTCCAA
CATCTTTGATAAAACCCACCCATCCAAATTCTCCCTCCGTCTACGACTGCGTTGATAATGAAGCTCAAAGGA
15 AGGAACATGTGGCACTGTGTTTAGTGGGCGCGTGGATTAAGTGA

- Secuencia de la proteína de DRM1 de *Arabidopsis*:

20 MVLLEKLWDDVVGAPQDRGLGRLRKITTQPINIRDIGEGSSSKVVMHRSLTMPAAVSPGTPPTPTPTTP
RKDNVWRSVFNPGSNLATRAIGSNIFDKPTHNPSPVYDCVDNEAQRKEHVALCLVGAWIK

- Secuencia de codificación de DRM2 de *Arabidopsis* (At5g14620):

25 ATGGTGATTGGAATAACGATGATGATGATTTTTTGGAGATTGATAACTTTCAATCTTCTCCACGGTCATC
TCCAATACATGCAATGCAGTGTAGGGTCGAAAATCTAGCTGGTGTAGCCGTGACAACCTAGTTCTTTGAGCT
CTCCTACTGAGACAACCTGATTTAGTTCAGATGGGCTTCTCAGACGAGGTTTTTGCTACATTGTTTGACATG
30 GGATTTCTGTGATGATGATTTCTAGAGCGATCAAGGAACTGGACCAAATGTAGAACTTCGGTTATAAT
TGATACTATCTCAAATACTCAAGCGACTGTGAAGCTGGTTCTTCCAAGTCCAAGGCTATTGATCATTTCC
TTGCTATGGGATTTGATGAAGAAAAGTTGTCAAAGCCATTCAAGAACATGGAGAAGACAATATGGAAGCA
ATTGCAAATGCATTGCTCTCTTGTCCAGAGGCTAAGAACTGCCAGCAGCAGTAGAGGAAGAAGATGGCAT
TGACTGGTCATCAAGTGATGATGATACCAATTACACCGATATGTAACTCAGATGATGAGAAAGATCCAA
35 ACTCAAATGAAAATGGCAGCAAAATACGGTCTTTGGTGAAGATGGGTTTCTCAGAGCTTGAAGCTTCTTTA
GCTGTGAGAGATGTGGAGAAAATGTGGATATTGCAGAGCTCACAGACTTCCTTTGTGCTGCTCAAATGGC
TAGGGAATTTAGTGAGTTTACACTGAACATGAAGAACAAAAGCCTAGACATAATATTAAGAAAAGGCGGT
TTGAGTCAAAGGAGAGCCAAGATCATCTGTGATGACGAGCCGATTCTGCTACCAAATCCAATGATAGGA
40 TTTGGGGTTCCAAACGAGCCCGGACTCATTACACATAGATCGCTTCCAGAGTTAGCCCGAGGGCCACCTTT
TTTCTACTATGAGAATGTCGCCCTCACACCTAAAGGCGTTTTGGGAGACTATTTCCAGGCACTTGTTGAGA
TCCCACCTGAGTTTGTGGACTCAAAATATTTCTGTGTTGCAGCGAGGAAGAGAGGCTACATCCACAATCTC
CCCATCAACAACAGATTTAGATTTCAGCTCCACCAAAATACACCATCCATGATGCATTTCTTTGAGTAA
45 GAGATGGTGGCCAGAATGGGATAAAAGGACCAAGCTTAATTGCATTTTGACTTGTACAGGTAGTGCTCAGT
TGACTAACAGGATTCTGTGATGCCCTTGAGCCTTACAATGAAGAACCAGAACCAGCTTAAGCATGTACAAAGA
TATGTGATTGACCAGTGCAAAAAATGGAATTTGGTTTGGGTGGGTAAAAACAAAGCTGCCCCACTCGAGCC
AGATGAGATGGAGAGTATTCTGGGATTTCAAAAAATCATACTCGTGGTGGAGGCATGAGTAGAACTGAGC
50 GCTTCAAGTCCTTAGGAAATTCGTTTCAGGTTGATACTGTGGCGTATCATCTGTCTGTCTGAAAGCCATT
TTCCACATGGAATCAATGTTCTCTCTTTTACGGGTATTGGTGGTGGGGAAGTGGCACTTCATCGTCT
CCAAATCAAAATGAAGCTTGTGTTGCTGTTGAGATTTCAAAGTCAACAGAAATATTTGAAGGACTTTT
GGGAGCAAACTAACCAGACTGGAGAATTGATCGAGTTTTCAGACATCCAACACTTGACTAATGACACAATC
55 GAAGGGTTGATGGAGAAATATGGTGGATTGATCTTGTAATTGGAGGAAGTCCTTGTAACAACTGCGCAGG
CGGTAATAGGGTAAGCCGAGTTGGTCTTGAAGGTGATCAATCTTCGTTGTTCTTTGAGTATTGCCGTATTC
TAGAGGTGGTACGTGCGAGGATGAGAGGATCTTGA

- Secuencia de la proteína de DRM2 de *Arabidopsis*:

55

60

65

MVIWNNDDDDFLEIDNFQSSPRSSPIHAMQCRVENLAGVAVTSSLSSTETTTDLVQMGFSDEVFATLFDN
 GFPVEMISRAIKETGPNVETSVIIDTISKYSSDCEAGSSKSKAIDHFLAMGFDEEKVVKAIQEHGEDNMEA
 IANALLSCPEAKKLPAAVEEEDGIDWSSDDDTNYTMDLNSDDEKDPNSNENGSKIRSLVKMGFSELEASL
 AVERCGENVDAELTDFLCAAQMAREFSEFYTEHEEQKPRHNKRRFESKGEPRSSVDDEPIRLPNPMIG
 FGVNPNEPLITHRSLPELARGPPFFYYENVALTPKGVWETISRHLFEIPPEFVDSKYFCVAARKRGYIHNL
 PINNRFQIQPPPKYTIHDAFPLSKRWPEWDKRTKLNCILTCTGSAQLTNIRVALEPYNEEPEPPKHVQR
 YVIDQCKKWNLVWVGKNKAAPLEPDEMESILGFKNHTRGGGMSRTERFKSLGNSFQVDTVAYHLSVLKPI
 FPHGINVLSLFTGIGGGEVALHRLQIKMKLVVSVEISKVNRNLIKDFWEQTNQTGELIEFSDIQHLTNDTI
 EGLMEKYGGFDLVIGGSPCNNLAGGNRVSRVGLGDQSSLEFFEYCRILEVVRARMRGS

- Secuencia de codificación de CMT3 de *Arabidopsis* (At1g69770):

ATGGCGCCGAAGCGAAAGAGACCTGCGACAAAGGATGACACTACCAAATCCATTCCCAAACCGAAGAAGAG
 AGCTCCTAAGCGAGCTAAGACGGTGAAAGAAGAGCCGGTGACAGTGGTCGAGGAAGGGGAAAAGCATGTTG
 CGAGGTTTCTAGACGAGCCAATTCCAGAATCTGAAGCGAAGAGTACCTGGCCTGACAGATACAAACCGATT
 GAGGTACAGCCACCTAAGGCTTCGTCAAGAAAGAAGACGAAGGATGACGAAAAAGTTGAGATCATTCTGTG
 TCGATGCCATTATAGACGTGCGATTGTTGATGAGCGTCAGATATATGAGCTGAATGATGATGCTTATGTAC
 AGTCTGGTGAGGGAAAGGATCCCTTCATTTGTAATAATCATTGAAATGTTTGAAGGGGCTAATGGGAAACTG
 TATTTACGGCTCGGTGGTTTTATAGACCTTCTGATACTGTAATGAAAGAGTTCGAGATTCTGATCAAGAA
 AAAGCGTGTGTTTTCTCTGAGATACAAGATACAAATGAATTGGGATTACTTGAAAAGAAGCTGAACATTT
 TGATGATTCCCTTGAATGAAAAATATAAGAGACTATCCCTGCAACAGAAAACTGTGACTTTTTCTGTGAC
 ATGAACTATTTCTTGCCCTTACGATACATTTGAAGCTATACAACAAGAAACCATGATGGCTATAAGTGAAG
 TTCAACAATATCCAGTGATACTGATATAAGAGAAGGAGCTGCTGCCATATCAGAGATTGGAGAATGTTCTC
 AAGAAACAGAAGGTCACAAAAAGGCAACTTTGCTTGACCTTTACTCCGGCTGTGGAGCTATGTCGACAGGG
 TTGTGCATGGGTGCACAACCTGTCTGGTTTGAACCTCGTCACTAAATGGGCTGTTGACATGAATGCACATGC
 ATGTAAAAAGCTTGCAGCATAACCAACCCAGAGACAAACGTGAGAAAACATGACCGCAGAAGATTTCTTGTTT
 TGCTTAAGGAGTGGGAGAAGCTATGCATTCAATTTCTTTGAGAAATAGTCCAAATTCAGAAGAATATGCC
 AACCTTCACGGTTTGAATAATGTTGAGGACAATGAAGATGTCAGCGAGGAGAGTGAAAATGAAGATGATGG
 AGAAGTTTTTACTGTTGACAAGATTGTTGGTATTTTCCCTTCGGAGTCCCTAAAAAGTTATTGAAACGTGGAC
 TTTATTTGAAGGTAAGGTGGCTGAATTATGATGATTCTCATGATACATGGGAGCCTATTGAAGGACTCAGT
 AATTGCCGGGGTAAAAATTGAAGAGTTCGTTAACTTGGATATAAATCTGGCATCCTTCCGTTACCAGGAGG
 TGTTGATGTTGTCTGCGGTGGGCCACCATGCCAAGGAATCAGTGGTCACAACCGCTTCAGGAACCTTATTGG
 ACCCTCTAGAAGATCAGAAAAACAAGCAGCTTTTGGTGTATATGAACATTGTAGAATATTTGAAGCCTAAG
 TTCGTTTTGATGGAAAACGTGTTGACATGCTGAAGATGGCTAAGGGCTATCTTGCACGGTTTGCTGTTGG
 ACGCCTTCTACAGATGAATTACCAAGTGAGGAATGGAATGATGGCAGCTGGAGCTTATGGGCTTGCTCAGT
 TTCGTTTGAGGTTCTTTCTATGGGGTGCCTCCCTAGTGAGATAATTCGCGAGTTCCCACTTCCAACACAT
 GATCTAGTTTCATAGAGGAAATATTGTCAAGGAGTTTCAGGGAAACATAGTAGCCTATGATGAAGGACATAC
 TGTGAAGTTAGCAGACAAGCTTTTGTGAAGGATGTGATTCTGATCTTCTGCAAGTTGCCAACAGTGAAA
 AAAGAGACGAGATTACATATGACAAAGATCCACACGCCATTTCAAAAAGTTTCATCAGATTGAGAAAGGAT
 GAAGCGTCAGGTTACAAATCAAAGTCCAAGTCCAAAAAGCATGTCTTATATGATCATCACCTCTTAATCT
 TAATATAAATGACTATGAACGGGTTTGTGAGGTCCCCAAGAGAAAGGGAGCGAATTTTAGGGACTTTCTTG
 GTGTTATTGTTGGACCTGGTAATGTAGTCAAGTTGGAAGAGGGAAAGGAAAGGGTCAAACCTGAATCTGGA
 AAAACATTGGTTCCCGATTATGCCTTAACATATGTCGATGGGAAATCATGCAAACCTTTTGGTCTGCTTTG
 GTGGGACGAAATTGTCCCACTGTTGTACACGGGACGAAACCCCAACCCAGGTGATCATTATCCAGAGC
 AAAATCGGGTTTTATCCATTCGAGAAAATGCGAGACTCCAAGGCTTTCTGATGACTACAACTCTTTGGC
 CCACCCAAACAGAAGTACATTCAAGTAGGTAACGCTGTAGCTGTGCCAGTAGCGAAGGCCCTTGATATGC
 TTTGGGAACAGCTTTCCAGGGACTCGCAGTTGGGAAAGATCCACTTCTTACTCTGCCTGAAGGTTTGCAT
 TCATGAAGCCAACCTTCTTCTCCGAGCTTGATGA

- Secuencia de la proteína de CMT3 de *Arabidopsis*:

MAPKRRKRPATKDDTTKSIKPKPKRAPKRAKTVKEEPVTVVEEGEKHVARFLDEPIPESEAKSTWPDYKPI
 EVQPPKASSRKKTKDDEKVEIIRARCHYRRAIVDERQIYELNDDAYVQSGEGKDPFICKI IEMFEGANGKL
 YFTARWFYRPSDTVMKEFEILIKKKRVFFSEIQDTNELGLLEKKLNILMIPLNENTKETIPATENCDFPCD
 MNYFLPYDTFEAIQQETMMAISESSTISSDTDIREGAAAISEIGECSQETEGHKKATLLDLYSGCGAMSTG
 LCMGAQLSGLNLVTKWAVDMNAHACKSLQHNHPETNVRNMTAEDFLFLLEKEWELCIHFSLRNSPNSEYYA
 NLHGLNNVEDNEDVSESENEEDDGEVFTVDKIVGISFGVPPKLLKRGLYLKVRWLNYYDDSHDTWEP IEGLS
 NCRGKIEEFVKLGYSKILPLPGGVDDVCGGPPCQGISGHNRFRNLLDPLEDQKNKQLLVYMNIVEYLPKPK
 FVLMEVVDMLKMAKGYLARFAVGRLLQMNQVRNGMMAAGAYGLAQFRLRFFLWGALPSEIIPQFPLPTH
 DLVHRGNIVKEFQGNIVAYDEGHTVKLADKLLKDVISDLPVANSEKRDEITYDKDPTTFFQKFIRLRKD
 EASGSQSKSKSKKHVLYDHHPLNLNINDYERVCQVPRKRGANFRDFPGVIVGPGNVVKLEEGKERVKLESG
 KTLVPDYALTYVDGKSKPFGRLWDEIVPTVVTRAEPHNQV I IHPQNRVLSIRENARLQGFDDYKLF
 PPKQKYIQVGNVAVPVAKALGYALGTAFQGLAVGKDP LLTLPEGFAFMKPTLPSELA

- Secuencia de codificación de MET1 de *Arabidopsis* (At5g49160):

ATGGTGGAAAATGGGGCTAAAGCTGCGAAGCGAAAGAAGAGACCACTTCCAGAGATTCAAGAGGTAGAAGA
 TGTACCTAGGACGAGGAGACCAAGGCGTGCTGCAGCGTGTAACAGTTTCAAGGAGAAATCTATTGAGTCT
 GTGAGAAAATCTGCTACTATTGAAGTAAAGAAACAGCAGATTGTGGAGGAAGAGTTTCTCGCGTTACGGTTA
 ACGGCTCTGGAACTGATGTTGAAGATCGTCCAACCAGGAGACTGAATGATTTGTTTTGTTTGATTGATTGAG
 TGGAGTTCCACAACCTCTGGAGATGTTGGAGATTGATGACATATTCGTTTCAGGTGCTATCTTACCTTCAG
 ATGTGTGTACTGATAAGGAGAAAGAGAAGGGTGTGAGGTGTACATCGTTTGGACGGGTTGAGCATTGGAGT
 ATCTCTGGTTATGAAGATGGTTCCCTGTTATTGATCTCAACGGAATTGGCGGATTATGATTGTCGTAA
 ACCTGCTGCTAGCTACAGGAAGGTTTATGATTACTTCTATGAGAAAGCTCGTGCTTCAGTGGCTGTGTATA

5 AGAAATTGTCCAAGTCATCTGGTGGGGATCCTGATATAGGTCTTGAGGAGTTACTTGCGGCGGTTGTCAGA
 TCAATGAGCAGTGGAAGCAAGTACTTTTCTAGTGGTGCGGCAATCATCGATTTTGTATATCCCAGGGAGA
 TTTTATATATAACCAACTCGCTGGTTTGGATGAGACAGCCAAGAAACATGAATCAAGCTATGTTGAGATTCT
 10 CTGTTCTTGTAGCTCTCAGAGAGAAGAGTAGTAAGATTGACAAGCCTCTGCAGAGGGAAAGAAACCCATCT
 AATGGTGTGAGGATTAAAGAAGTTTCTCAAGTTGCGGAGAGCGAGGCCCTTGACATCTGATCAACTGGTTGA
 TGGTACTGATGATGACAGAAGATATGCTATACTCTTACAAGACGAAGAGAATAGGAAATCTATGCAACAGC
 CCAGAAAAAACAGCAGCTCAGGTTCTGCTTCAAATATGTTCTACATTAAGATAAATGAAGATGAGATTGCC
 AATGATTATCCTCTCCCATCGTACTATAAGACCTCCGAAGAAGAAACAGATGAACCTATACTTTATGATGC
 15 TTCTATGAGGTTCAATCTGAACACCTGCCTCACAGGATGCTTCACAACCTGGGCTCTTTATAACTCTGATT
 TACGATTCATATCACTGGAACCTTCTACCGATGAAACAATGTGATGATATGATGTCAACATTTTGGGTCA
 GGTGTGGTGAATGATAATGGAAGTTGGATTTCTTTAAACGATCCTGACAGCGGTCTCAGTCACACGA
 TCCTGATGGGATGTGCATATTCCTCAGTCAAATTAAGAATGGATGATTGAGTTTGGGAGCGATGATATTA
 TCTCCATTTCTATACGAACAGATGTGGCCTGGTACCGTCTTGGGAAACCATCAAACTTTATGCCCTTGG
 20 TGGAAACCTGTTCTGAAAACAGCAAGGGTTGGGATAAGCATTCTTACTTTTCTTAGGGTGGAAAGTAGGGT
 TGCTAGGCTTTTCAATTTGCAGATGTCACAAAAGACTGTCTGGGTTACAGGCGAATGATAAAGCTTACATTT
 CTTCAGACCCCTTGGCTGTTGAGAGATATTTGGTCCATGGGCAAATTAATTTACAGCTTTTTCAGTT
 TATCCGGACGACAATGTCAAAGGTGTCCATTTGTTGTTGGTCTTGCAAGCAAATTTGAGGATAGGCACCA
 CACAAAATGGATCATCAAGAAGAAGAAAATTTGCTGAAGGAACGAATCTGAATCCAAGGGCAGGCATGG
 25 CACCAGTAGCATCGAAGAGGAAAGCTATGCAAGCAACAACAACCTCGCCTGGTCAACAGAATTTGGGGAGAG
 TTTTACTCCAATTACTCTCCAGAGGATCCATTGCAGGCGACTGCTGCAGAAAATGGGGAGGATGAGGTGGA
 AGAGGAAGGCGGAAATGGGGAGGAAGAGGTTGAAGAGGAAGGTGAAAATGGTCTCACAGAGGACACTGTAC
 CAGAACCTGTTGAGGTTGAGAAGCCTCATACTCTTAAGAAAATCCGAGGCAAGTTCTGGAAAAAGGGAAATA
 AAATGGGATGGTGAGAGTCTAGGAAAACTTCTGCTGGCGAGCCTCTCTATCAACAAGCCCTTGTGGAGG
 30 GGAATGGTGGCTGTAGGTGGCGCTGTACCTTGGAAAGTTGATGATCCAGATGAAATGCCGGCCATCTATT
 TTGTGGAGTACATGTTTCGAAAGTACAGATCACTGCAAAAATGTTACATGGTAGATTCTTACAAAGAGGATCT
 ATGACTGTTCTGGGGAATGCTGCTAACGAGAGGGAACCTATTCTGACTAATGAATGCATGACTACACAGCT
 CAAGGACATTAAAGGAGTAGCCAGTTTGTAGATTGATCAAGGCCATGGGGGCATCAGTATAGGAAAAAGA
 ACATCACTGCGGATAAGCTTGAAGCTGGGCTAGAGCATTAGAAAGAAAAGTAAAGATTTGCCAACAGAGTAT
 35 TACTGCAAAAGCTTGTACTACCTGAGAGAGGGGGATTCTTTAGTCTTCCACTAAGTGATATTGGTCGCAG
 TTCGAGGTTCTGCATTCATGTAAGATAAGGGAGGATGAAGAGAAGAGGTCTACAATTAACATAAATGTTT
 CAAAGACAGGCTTTTTTCATCAATGGGATTGAGTATTCTGTTGAGGATTTTGTCTATGTCAACCCCTGACTCT
 ATTTGGTGGGTTGAAGGAGGGTAGTAAACTTCTTTTAAGTCTGGGCGAAACATTGGGTTAAGAGCGTATGT
 40 TGTTTGGCAATTGCTGGAAATGTTTCCAAAGGAATCAGAAAGGCTGATTGGGTTTCTTGTATGTTAAAG
 TGAGAAGGTTTTATAGGCCTGAGGATGTTTCTGCAGAGAAGGCCATGCTTCAGACATCCAAGAATTGTAT
 TTCAGCCAGGACACAGTTGTCTCCCTCCAGGTGCTCTAGAGGGAAAATGTGAAGTAAGAAAAGAAAGTGA
 TATGCCCTTATCCCGTGAATATCCAATATCAGACCATATTTTCTTCTGTGATCTTTTCTTTGACACCTCCA
 45 AAGGTTCTCTCAAGCAGCTGCCCCCAATATGAAGCCAAAGTTCTCTACTATTAAGGACGACACACTTTTA
 AGAAAGAAAAAGGGAAAGGGAGTAGAGAGTGAAATTGAGTCTGAGATTGTCAAGCCTGTTGAGCCACCTAA
 AGAGATTGCTCTGGCTACTCTAGATATTTTTGCTGGTTGTGGTGGCCTGTCTCATGGACTGAAAAAGGCGG
 GTGTATCTGATGCAAGTGGGCGATTGAGTATGAAGAGCCAGCTGGGCGAGGCTTTTAAACAAAACCATCCT
 GAGTCAACAGTTTTTTGTTGACAACGTCAATGTGATTCTTAGGGCTATAATGGAGAAAGGTGGAGATCAAGA
 50 TGATTGTGCTCTACTACAGAGGCAAAATGAATTAGCAGCTAACTAACTGAGGAGCAGAAGAGTACTCTGC
 CACTGCCCTGGTCAAGTGGACTTCATCAATGGTGGACCTCCATGTCAGGGATTTTCTGGTATGAACAGGTTT
 AACCAAAGCTCTTGGAGTAAAGTTCAGTGTGAATGATATTAGCATTCTTGTCTTGTGACTATTTCCG
 GCCAAGGTATTTTCTTCTGGAGAACGTGAGGACCTTTGTGTCAATTCAATAAAGGGCAGACATTTTCACTTA
 CTTTGGCTTCCCTTCTCGAAATGGGTTACCAGGTGAGATTGGAATCCTGGAGGCCGGTGATATGGAGTA
 55 TCCCAATCTCGTAAACGAGCTTTTCAATTTGGGCTGCTGCACCAGAAGAAGTTTCCCTGAATGGCCTGAGCC
 GATGATGCTTTTGGTGTTCAAAGTTGAAAATCTCACTATCTCAAGGTTTACATTATGCTGCTGTTCTGTA
 GTACTGCACTTGGTGCCCTTTCCGTCCAATCACCCTGAGAGACACAATTGGTGATCTTCCATCAGTAGAA
 AACGGAGACTCTAGGACAAACAAAGAGTATAAAGAGGTTGCAGTCTCGTGGTTCCAAAAGGAGATAAGAGG
 60 AAACACGATTGCTCTCACTGATCATATCTGCAAGGCTATGAATGAGCTTAACCTCAATTCGATGCAAAATTAA
 TCCCAACTAGGCCCTGGGGCTGATTGGCATGACTTGCCAAAGAGAAAGGTTACGTTATCTGATGGGCGCGTA
 GAAGAAATGATTCTTTTGTCTCCCAAACACAGCTGAGCGCCACAACGGTTGGAAGGGACTATATGGGAG
 ATTAGATTGGCAAGGAACTTTCCGACTTCCGTACGGATCCTCAGCCCATGGGTAAGGTTGGAATGTGCT
 TTCATCTGAACAGCACAGAATCCTTACAGTCCGTGAATGCGCCGATCTCAGGGGTTTCCGGATAGCTAC
 GAGTTTGCAGGGAACATAAAATCACAAGCACAGGCAGATTGGGAATGCAGTCCCTCCACCATTGGCATTGCT
 TCTAGGTCTGAAGCTCAAAGAAGCCCTACATCTCAAGAAGTCTCCTCAACACCAACCCCTAG

- Secuencia de la proteína de MET1 de *Arabidopsis*:

MVENGAKAAKRKRPLPEIQEVEDVPRTRRRRAAACTSFKEKSIRVCEKSATIEVKKQQIVEEF LALRL
TALET DVEDRPTRR LND FVLFDSGVPQPLEMLEIHDIFVSGAILPSDVCTDKEKEKGV RCTSFGRVEHWS
ISGYEDGSPVIWISTELADYDCRKPAAS YRKVDYDFYEKARASVAVYKKLSKSSGGDPDIGLEELLA AVVR

SMSSGSKYFSSGAAI IDFVISQGDFIYNQLAGLDETAKKHESYVEIPVLVALREKSSKIDKPLQRERNPS
NGVRIKEVSQVAESEALTSDQLVDGTD DRRYAILLQDEENRKS MQQPRKNSSSGSASNMFYIKINEDEIA
NDYPLPSYYKTSEEETDELILYDASYEVQSEHLPHRMLHNWALYNSDLRFISLELLPMKQCDDIDVNIFGS
GVVTDNGSWISLNDPDSGSQSHDPDGMCI FLSQIKEMIEFGSDDIISISIRTDVAWYRLGKPSKLYAPW
WKPVLKTARVGISILTF LRVESRVARLSFADVTKRSLGLQANDKAYISSDPLAVERYLVVHGQIILQLFAV
YPDDNVKRCPFVVG LASKLED RHHTKWI IKKKKISLKE LNLNPRAGMAPVASKRKAMQATTTLRVNRIWGE
FYSNYS PEDPLQATAAENGED EEEEEGGNGEEEEVEEENGLE TDTVPEPVEVQKPHTPKKIRGSSGKREI
KWDGESLGKTSAGEPLYQQA LVGGEMVAVGGAVTLEVDDPDMPAIYFVEYMFESTDHCKMLHGRFLQRGS
MTVLGNAANERELFTNECMTTQLKDIKGVASFEIRSRPWGHQYRKKNITADKLDWARALERKVKDLPT EY
YCKSLYSPERGFFSLPLSDIGRSSGFC TSKIREDEEK RSTIKLNVSKTGFFINGIEYSVEDFVYNPDS
IGGLKEGSKTSFKSGRNIGL RAYVVCQLLEIVPKESRKADLGSFDVKVRRFYRPEDVSAEKAYASDIQELY
FSQDTVVLPPGALE GKCEVRKKSDMPLSREYPI SDHIFCDLFFDTSKGSLKQLPANMKPKFSTIKDDTLL
RKKKGKGVSEIESEIVKPVPEPPKEIRLATL DIFAGCGGLSHGLKKAGVSDAKWAIEYE EPAGQAFKQNH
ESTVFDNCNVILRAIMEKGGDQDDCVSTTEANELAAKLT EEQKSTLP LPGQVDFINGGPPCQGFSGMNR
NQSSWSKVQCEMILAFLSFADYFRPRYFLLENV RTFVSFNKGQTFQLTLASLLEMGYQVRFGILEAGAYGV
SQSRKRAF IWAAPPEEVLPEWPEPMHVFGVPKLKISLSQGLHYAAVRSTALGAPFRPITVRDTIGDLP SVE
NGDSRTNKEYKEVAVSWFQKEIRGNTIALTDHICKAMNELNLRCKLIPTRPGADWDHDLPRKRVTLSDGRV
EEMIPFCLPNTAERHNGWKGLYGRLDWQGNFPTSVTD PQPMGKVGMCFHPEQHRILTVRECAR SQGFPDSY
EFAGNINHKKHRQIGNAVPPPLAFALGRKLKEALHLKKSPQHQP

- Secuencia de codificación de DDM1 de *Arabidopsis* (At5g66750):

ATGTTAGTCTGCGCTCCAGAAAAGTTATTCCGGCTTCGGAAATGGTCAGCGACGGGAAAACGGAGAAAGA
TGCGTCTGGTGATTACCCACTTCTGTTCTCAACGAAGAGGAAAAC TGTGAGGAGAAAAGTGTACTGTTG
TAGAGGAAGAGATACTTCTAGCCAAAAATGGAGATTCTTCTCTTATTTCTGAAGCCATGGCTCAGGAGGAA
GAGCAGCTGCTCAAAC TCGGGAAGATGAAGAGAAAGCTAACAATGCTGGATCTGCTGTTGCTCCTAATCT
GAATGAAACTCAGTTTACTAACTTGATGAGCTCTTGACGCAAAC TCACTCTGAGTTTCTCCTTG
AGAAAATGGAGGATATCACAATTAATGGGATAGAAAAGTGAGAGCCAAAAGCTGAGCCCGAGAAGACTGGT
CGTGGACGCAAAAAGAAAGGCTGCTTCTCAGTACAACAATACTAAGGCTAAGAGAGCGGTTGCTGCTATGAT
TTCAAGATCTAAAGAAGATGGTGAGACCATCAACTCAGATCTGACAGAGGAAGAAACAGTCATCAAAC TGC
AGAATGAAC TTTGCTCTTCTCACTGGTGACAGTTAAAGTCTTATCAGCTTAAAGGTGTCAAATGGCTA
ATATCATTGTGGCAGAAATGGTTTGAATGGAATATTAGCTGATCAAATGGGACTTGGAAGACGATTCAAAC
GATCGGTTTCTTATCACA TCTGAAAGGGAATGGGTTGGATGGTCCATATCTAGTCATTGCTCCACTGTCTA
CACTTTCAAATTTGGTTCAATGAGATTGCTAGGTTACGCTTCCATCAATGCAATCATCTACCATGGGGAT
AAAACTCAAAGGATGAGCTCAGGAGGAAGCACATGCC TAAACTGTTGGTCCCAAGTTCCCTATAGTTAT
TACTTCTTATGAGTTGCCATGAATGATGCTAAAAGAAATCTGCGGCACTATCCATGGAATATTGTTGTA
TTGATGAGGGCCACAGTTGAAAAACCACAAGTGTAAATGTTTGAGGGAAC TAAAGATGGAATGGAAT
AACAAACTTCTGCTGACAGGAACACCTCTGCAAAATAATCTTTCTGAGCTTTGGTCTTTGTTAAATTTTAT
TCTGCCTGACATCTTTACATCAGATGAATTTGAATCATGGTTTGATTTTCTGAAAAGAACAAAAACG
AAGCAACCAAGGAAGAAGAGAGAAAAGAGCTCAAGTTGTTTCCAAACTTCATGGTATACTACGACCA
TTCATCCTTCGAAGAA TGAAATGTGATGTTGAGCTCTCACTTCCACGGAAAAAGGAGATTATAATGTATGC
TACAATGACTGATCATCAGAAAAAGTTCCAGGAACATCTGGTGAATAACACGTTGGAAGCACATCTTGGAG
AGAATGCCATCCGAGGTCAAGGCTGGAAGGGAAAGCTTAACAACCTGGTCATTCAACTTCGAAAGA ACTGC
AACCATCTGACCTTCTCCAGGGGCAAATAGATGGTTTATATCTCTACCTCCTGTTGAAGAGATTGTTGG
ACAGTGTGGTAAATTC CGCTTATTGGAGAGATTACTTGTTCGGTTATTGCAATAATCACAAAGTCCTTA
TCTTCTCCCAATGGACGAAACTTTTGACATTATGGATTACTACTTCAGTGAGAAGGGGTTTGAGGTTTGC
AGAATCGATGGCAGTGTGAAGCTGGATGAAAGGAGAAGACAGATTAAAGATTTCACTGATGAGAAGAGCAG
CTGTAGTATATTTCTCTGAGTACCAGAGCTGGAGGACTCGGAATCAATCTTACTGCTGCTGATACATGCA
TCCTCTATGACAGCGACTGGAACCTTCAAATGGACTTGCAAGCCATGGACAGATGCCACAGAATCGGGCAG
ACGAAACCTGTTTATGTTTATAGGCTTTCCACGGCTCAGTCGATAGAGACCCGGGTTCTGAAACGAGCGTA
CAGTAAGCTCAAGCTGGAACATGTGGTTATTGGCCAAGGGCAGTTTCATCAAGAACGTGCCAAGCTTTCAA
CACCTTTAGAGGAAGAGGACATACTGGCGTTGCTTAAGGAAGATGAACTGCTGAAGATAAGTTGATACAA
ACCGATATAAGCGATGCGGATCTTGACAGGTTACTTGACCGGAGTGACCTGACAATTACTGCACCGGGAGA
GACACAGCTGCTGAAGCTTTTCCAGTGAAGGGTCCAGGTTGGGAAGTGGTCTTGCTTAGTTCCGGAGGAA
TGCTGTCTTCCCTGAACAGTTAG

- Secuencia de la proteína de DRM1 de *Arabidopsis*:

```

MVSLSRSKVIPASEMVSDGKTEKDASGDSPTSVLNEEENCEEKSVTVVVEE ILLAKNGDSSLISEAMAQEE
EQLLKLREDEEKANNAGSAVAPNLNETQFTKLDELTTQTQLYSEFLLEKMEDITINGIESESQKAEPEKTG
RGRKRKAASQYNNTKAKRAVAAMISRSKEDGETINSDLTEEETVIKQLQNELCPLLTGGQLKSYQLKGVKWL
ISLWQNGNLNGILADQMGLGKTIQTIGFLSHLKGNGLDGPYLVIAPLSTLSNWFNEIARFTPSINAI IYHGD
KNQRDELRRKHMPKTVGPKFPIVITSYEVAMNDAKRILRHYPWKYVVIDEGHRLKNHKCKLLRELKHLKMD

NKLLLTGTPLQNNLSELWSLLNFILPDIFTSHDEFESWFDSEKNKNEATKEEEEKRAQVVS KLHGILRP
FILRRMKCDVELSLPRKKEIIMYATMTDHQKKEHLVNNTLEAHLGENAIRGQGWKGKLN LVIQLRKNC
NHPDLLQGQIDGSYLYPPVEEIVGQCGKFRLLERLLVRLFANNHKVLIFSQWTKLLD IMDYFSEKGFVC
RIDGSVKLDERRRQIKDFSDEKSSCSIFLLSTRAGGLGINLTAADTCILYDSDWNPQMDLQAMDRCHRIGQ
TKPVHVYRLSTAQSIETRVLKRAYSKLLEHVIGQGQFHQERAKSSTPLEEEDI LALLKEDETAEDKLIQ
TDISDADLDRLLDRLDRLTITAPGETQAAEAFPVKGPGEVVLPSGGMLSSLNS

```

Ejemplo 9

Identificación de represores para metilasas

[0103] Los constructos que presentan la transcripción de DRM1, DRM2, CMT3 y MET1 se generan por el acoplamiento de las mismas secuencias de control a un indicador como una proteína fluorescente. Estas líneas transgénicas además se someten a mutagénesis y los genes represores candidatos se aíslan por la clonación basada en mapas. Dichos represores de la transcripción de la ADN metiltransferasa se expresan en un promotor fuerte 35S o promotores inducibles a patógenos (por ejemplo, WRKY6 o PR1) y las líneas transgénicas estables generadas para conferir mayor resistencia de la enfermedad a patógenos. Esto se consigue al mejorar constitutivamente la expresión de los represores de la transcripción de la ADN metiltransferasa de la resistencia mejorada a los patógenos fúngicos y bacterianos en diversas plantas, incluyendo los cultivos. Los reguladores positivos de la transcripción de DCL4, obtenidos como se ha descrito anteriormente, se sobreexpresan de manera adicional, condicional o constitutivamente, en estas líneas transgénicas para conferir, además, una mayor resistencia contra los virus virulentos.

[0104] Además, las mismas líneas transgénicas que presentan las actividades transcripcionales de las ADN metiltransferasas se utilizan para cribar los compuestos químicos que desencadenan la disminución del ARNm de GFP, tal y como se ha descrito anteriormente. Las moléculas que reprimen los niveles del ARNm de GFP se utilizan para conferir resistencia antifúngica y antibacteriana en una variedad de especies de plantas, incluyendo los cultivos. Los cócteles de agentes químicos que promueven la transcripción de DCL4 (véase el Ejemplo 2) e inhiben la transcripción de las ADN metiltransferasas se utilizarán para conferir un amplio espectro de resistencia para los patógenos no relacionados.

[0105] Las secuencias de los promotores DRM1, DRM2, CMT3 y MET1 son:

Secuencia promotora de DRM1:

AGCTATGTAATTTAATAGAATTTGGGTTGTACATAACTACATATGTTCAAGTATGAAGAAATAGATATAAA
ATCAAGCATGAAAGACAACACAAATGTTAAATGAGCAAAACCAAGAAGGCAAGAACAAATATAGGGCCTTC
GTGGAAACCTTTTGTGCGACATATGGAAACCCATTAGGCTAGCGATGTAGTTGGCCCAAGAAACCGGCTTT
GACTCAGAAGATATAGTTATTGATTTTCGGCTTCGTCAATCAACAACACTGTAATTGTAATGACAATAGTT
GGTGCCGACAAAAATAATAATGACAATAGTTGGGCTTAGGTTTATAAGTTCATTTTTCTAAAAGTTAATT
GGTGAAATCAATTGCAAACAATATATTACTCTCTTTTCTTAGTAGTCTTCTATATAAGATTCTGTTTGAT
CATGAGATAAAAAATAAAAAATAAATACTCTTTTTAATCTGTGGGTAAAAGGTAAAAGAGACATGTTATGGTT
GGATCTGACGGCCACGTGTCGCTCGCACTCCGATCTCTTTTCACTTTTGGTCCCAGTAAGGCTGTCCGTA
TGGAGACATCTTCCCATGCCCTTTGGACATTTGTGAAAACAAGATATTATTATTAGAACAACCTGAACAAGAT
ATTGCAAGTGTTACTTTTTATTAAATTTCACTGTGGTAAGATAAAAATTTGAAAATTTACTTGTGTCTGAT
CTTGATGCAAGTAACCTCAAGTTTTGCCCATTCTTGGAGAATGTAAATATAACTTCGATCCCCAAATGTG
CCTCCTGTCTATGTTGGAATAACTGGTCAGATTTTCAAAGGTGACCATTGTCTGTCCATAATCATCAATC
CCTTATATTCTATTCCACTTCTTAAAGTTTTTGTCTATTGTTAAACGAGTTGGTTTGGTTTGGATCATT
TGAAATGAATGGGTGAATGCATGAATCTAAGAGTTGTCTATGATACTTAGGCTTCACATAAAATTCTACA
TATGGTTAAGAAGAAATTAGGTATTCTGAATTTGACGATATTTCAATAATTACCAATTTGTTACCTTGTGA
TAAATTCACGAAGCTCGAGGCTAGAATACTTTATTTTATAGGTCCCACTTCAATGACTCATCATCCTTATC
TAGATTTGTGTACATTCCATCTAGCACTTTTTTTTATTGTCACACCCCTCCCACTCCTTTTCTTTTGTGA
TCCTAAAATTAAGTTCAAAAATTTATTTAAATTTTGGAAATCTTCAGATTATAAGAAGAAAAAACATTGAA
TCTTACATAAATACTTAAGTAGATTGGGATTACCGGATTAGTAGTGACAAAATTAATAAGAAATATTAT
TCAATAATAAAACAACCAGTAAATAAAGTCACCAAACCTTTTAAATGGCGTGGCCGGTAGTGAAAAACA

AGAAAAAATTAATAATGTAAATAAAATCAAGATATTTTGATAAGGTGTCTATAAAAGTCATATGCCACC
ACCAAAAGT

Secuencia promotora de DRM2:

AGTTATATATTACCAATCTTTGGCTTGTCCAACCTTTGGTTAGCCTCTATTTCCAGGTGAGAGTGGAGTTG
ACCAGCTAGTTGAGATAATAAAGGTACTTCAATTTGGTTAAACAAACACACATAATCCTAGCCATTGCTAT
ATTGAACATAGAGTGGATCATTGATTATATGGAATGAAGAGGCTCCATTTCCTGCTATTGATTGCCATCAT
TTTGTTTACTGTGTGTGTACAGTTCTTGGAAACCAACACGGGAGGAAATCAAAATGCATGAATCCAAAC
TACACAGAATTCAAATTCGCCAAATAAAGGCTCATCCTTGGCACAAAGTAAGCAAAACACATCATCAGTTT
TTCTTAAACATTGATCTCCATATATTCTTACGATTGAAAAATCTGTTGTTGGTTCTTAAAGATATTCCATAA
GCGTACACCTCCAGAAGCTGTAGACCTTGTCTCAAGACTTCTCCAGTATCTCCAAACCTCAGATCAACCG
CTGTAAGTCAATGAAGTGATTACCATAATAACATTATGTTTGATATATCTGGTTGGTTGATTCAAACCTTAC
TTGTTATTGTAGATGGAGGCGATAGTTACCCGTTCTTCGATGAGCTACGTGATCCCAATACACGCTCTCC
TAATGGTTCGTGCCTTGCCCTCTCTCTTCAACCTTAAACCTCAAGGTCTGTCTCCTCCAAATATGCTTTTGT
TTGTTTCCCAATGCTCCGTTTAAACAAAGACTAAAAGTGTGTGCTTCTTGTTAAATATGTAGAGCTAAAAG
GAGCAAGTTTAGAGTTGTTGTCCAAGCTTATACCTGACCACGCCCCGAAAACAATGTTCTTCTCGCTCTC
TAAATCTCTTCTCTCTCTATATATATGTGTGTGTGTGTATGTACACATGCATATAATATGCTTATC
GTTTCTAAGTAATGGAGATAGCTTCTCAGGATTATCATTAGCTTTCATCTTTCATGTATCTTTGTTGTTA
TTGTCTTATCACAACCTTTGTACTTTATTACATACAATGATTAGTGAATGTATGTGACGGTCTTTGACTC
GCCGGTCGCTACAGTTATGTTGGATACTAAATTATAAAATAAACTTCTCGCTCGTCACGTGTCTTGCATG
CATCCAAAGCTCATGCTTCAAAGCTTAGCCAAACTTATTTTTAAAAAAGCCTATGTTCTGTGTAAAAGTGT
CATTTACGAGAGTTTCTTGTTTAAAGTTTAAACCAATTTCACTTCTCAAACGAAATACGGTAATTGGTAATA
TCCTCTAAACATGAATTATCATTGACTATAAAATTAGTTTCGCAAAATGCTCTAAGCACCACAAGTGTG
ACGTAACGTGTCTATTTATTCATGTTTATTGATTAGTTAATTAAAAACATTGTAGTTTAAATTATTGAAGTA
GTACAAAGAATAGGGACTAAATTGCAATACTCTGAATTTGTTTTTTCTTTTTTAGAATCATCCGACTTTT
TGTTTCACG

Secuencia promotora de CMT3:

ACATAGTGGACCATGACAAAGAAATAAGGCCCAAAGTTGGGCTAATTTACGCCATCACGACAAAGGCTAC
TTCTCATTTTCGACATCCATATTATTCTATTCTTGTACACTTCTCTTTTCATTCACTCGTCATTAATATGCCT
TCAATCTAATATATTTAAGGACACAATTATACACACGTCCATATATAAACTTATATTGTTGCCTTGTTGGA
TATATATAAAAGTTATTGTAATTAGTAGTTACTAGTTAGAGTAAATTTTCAGGTCTAATAGTGATGAGATTA
ACGTAATTTCTTCTTTAAATTTTCAGTTATTTGCAAAATAATGTCACTGCTCGATTTCC TGGAAATAAGGAGC
TAATAAGAGTATCATGTTCTCCTTCCTATGTTACCAATTTACGTTTTCGACGTTTTTTTTTTTTTATTATGAA
CAAGATTACGATCACACGTTCCGTTTGTGTTTGTAGTCGTTCCAAGTGTATAGGAGTTTATCCACACAAAA
AAAATTTTGATAGGAATGTGTAATTCATAAAGATTTCATCGTTACACACATAAAGT TTTATCTTACGCGC
CACGCCGTTTGTGGAGTAACCGAGTAACTAATTTACTACTAGTCTTGATGTTGGTAGGATTAATAAAAAGA
ATCATGGAGATAGGATACGATTGTGTTTGAATAATTC AATATGTTTATATCTGGAAAGATCTACAAATTTG
ATATGATCACTAAGATTGTGGGAATTTATTCAAATCCAAAACACATAGTTACAAATCATATACAAATATG
AAAATAAAATAATGTCTAATAACATTTGTGTAACATCATCTTTAATGCGAGTCATTTAGAAATGTAACTTT
TTTCTTTCTGATATGTTTATTCTCGAAATATATACAAATTGACCTGATCACTAAGATTGTGGGAATAAT
TCCAAACCAATATAGAAAGTGATAATTTATTA AAAACGTAACATTTGTGTAATCTTTTTTTTTTTTT
ATAGTAAATGTCAAATTATATTCAA AAAAAACATATACTTTTTTACAACTTGTGCTTCATGTGTAAGAAAGG
GAGAGTGCTAAAAAAAATTCTGAAATTGTCCAAAAATGATTAGATCTTTCGTAGAGTCGATGTTGACTACC
CCGGGAATGAACCCATTTGTGTAATCTTTTAACATTTATTA AAAACAAATCATAGATAGCTAAGATTGTGG
GAAGAATCCAAACGAAATTA AATTCACACTAACACATTTACTAAAAATCATAGATAGATATAGAAAGAAAA
AACTTTTCTACTAATTTTTTTTGACATTTGTGTACTCATTATAGCGAGAGAAAGAGATGGGCCTCAAAACTT
TTATTAGGCCCAAACGTTTTAAATTCATTATAAAAAATAAAACAATTCCACGAAAAATTCGAAACCCATCAC
TTTGCGCCTTATGTGACGCGCTTATTTCCGCCCTCAATCTCAGATTATTTAGTCCTCACACTCGTCACACC
CCGCTTCTT

Secuencia promotora de MET1:

CTAAAAAGAGTATTCAAAAACCCAAACATTAAATTTAATATCCAAAATATTAATTATATGATATTATTTTAT
TTGATTTTAAATATATAGTAAACTGCGAGTTGTATATGTTTTCTTGATATTATTTATATTGTTTAGTGTTT
AAAATTATACACTTGTATTTTGATTGTTAATTTTAGAGTTTCACCTGTAGTATACCATCTTATATTAATAT
CGATTTAAACCCGTCAATTCTAGGATTTTCCAGCTTGATTAATAAATTGAATCACATCATACACATAAAAA
AATCTAATATGTTATTAAATTATTGTTGTATATAAGATTATAAATCTTAAATAATATGCATGAAATTGAA
TATAAATATTTAAATTATGACCCAGTACTTAGTAATAAATTTTTTAAATCTATTTTTGACCCGTTATAAT
ATTTTTTATGTATTGAACAGTTTATATTTCGTTTTAAAAAGTTTAAATTATGGCATATGCGAAAAAACTCT
AATTTATTTTTTATAACGATGATATTATTTTTTCGCAAAAATAGAATCATATAAAGATGAGAGGTGAACTA
TAATAATTAATAAAAAAATTAATATGATAATTTAGATATTAATTAATCTAATTTGTTGATTTTAAATTTGGTTAAAT

TTTTGGAAATTAATAATGTATTTTCATTTTTTAATGAAATTTAATTAATTAAATTAGTATTTGACTTTTTTAA
TTTTTAAAGAGATGAATTACTTTACTCTTTAAATTTTATTCTAATGGCATACATATGTAATTACTTTACAA
AAAGTAAGGTTACATTTAAAATGTACTTCCCAAATAATATAGTAGGATCATGGTAAAATGTTAGTTCTCGA
AAGAAAAAATATTGTTATAAATCATAAACCTAACGAGCTAAC TAAAATAGCGGCATCCTACCAATTTGAGA
TTTTTCGTATATATATATAAAATATCCATTTGATAAACACTTCATGATAAAGTATTAGTTTGGAAAATAAA
AATATTGTTCTTGTATAAGAAAAACACACATAAAAGTATTATTGGAGGATCTCATTGTTAAGTTGTT
AACCCCTCAACATTTTCGTCTAAAAATCAGACTTTTTTCTATCAAAAAAATATCTATACATTTTGAGTCAAAATA
AAAAATCTTAATCAAAATAATACTCGTATACTTTGACTGTTGACTGATGGAAAGATATTAGAATATAAACAT
TAGAGATAGAAACAAATCTGTAAAAATCTTAAATTTAGGATTATTTATACGGAATATCCCCAAAAGATAA
AATCATTGAATCATAAAAAGCCATTTATGGTAGCCCTAAATATTCAGGC GCGGCTTTTTTCTTATTTTCGT
TTTCATTTTAAAAAAGTTTTTAGCGCCGTTTATTGCCGCGCGTCTGTTTTCGCTCCTCGTCTCGTCTCCTTT
TATTATTACCCCTCTCTCTCTCTCCACTCTTCTCTCAAAATCACACATCACTGCTTTCTTCAACCTCTC
TATCTCTCA

Ejemplo 10

ADN desmetilasa ROS1 que regula positivamente la resistencia de la planta a patógenos

[0106] Se comprobó el papel de las ADN glicosilasas en la resistencia a patógenos. La *Arabidopsis* codifica cuatro ADN glicosilasas, entre las más caracterizadas ROS1 y DEMETER (DME). ROS1 y DME se mostraron recientemente para escindir la 5 – metilcitosina *in vitro* cuando se expresa en *E. coli*. Los resultados revelaron que las ADN glicosilasas codifican las desmetilasas activas que pueden dirigirse a la posible desmetilación de ADN de los genes específicos relacionados con la defensa tratados anteriormente. Se provocó a los mutantes únicos de ADN glicosilasa con la Pto DC3000 virulenta. Solo el mutante único *ros1-4* fue más susceptible a este patógeno como revelaron el crecimiento bacteriano mejorado y los síntomas de la enfermedad. Las plantas de los mutantes Col – 0 de cinco semanas, La – er, *dml2-1*, *dml3-1*, *ros1-4* y *dme* se inocularon con Pto DC 3000 en una concentración de 10^5 cfu / ml y el crecimiento bacteriano se midió en 4 dpi. Las plantas del mutante *ros1* mostraron síntomas bacterianos de la enfermedad más pronunciados. Los plantas del mutante Col – 0 de cinco semanas

ros1-4 se inocularon y se fotografiaron en 4 dpi. Además, se descubrió que la inducción del gen marcador *PR1* de la defensa de AS se retrasó en *ros1-4* en comparación a las plantas infectadas en Col – 0. Las plantas de los mutantes Col – 0 de cinco semanas y *ros1-4* se infiltraron con Pto DC3000 en una concentración de 2×10^7 cfu / ml y los niveles de ARNm de *PR1* se analizaron durante las 12 horas de duración del experimento por el análisis de PCR en tiempo real semicuantitativo. Los resultados sugirieron que ROS1 puede desmetilar los genes relacionados con la defensa para favorecer la resistencia a los patógenos.

[0107] Para ello, la sobreexpresión constitutiva o condicional de la proteína ROS1 de *Arabidopsis* se utiliza para elevar la resistencia a los patógenos. La secuencia de codificación ROS1 se expresa transgénicamente en plantas utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la disciplina que utilizan promotores constitutivos o preferiblemente, promotores sensibles a patógenos conocidos por tener una amplia respuesta a patógenos bacterianos, fúngicos y virales. Ejemplos de tales promotores incluyen, pero no se limitan a, WRKY6 y *PR1*. El procedimiento permite una resistencia inducible mejorada, que casi es, o no, nocivo para desarrollo y fisiología de la planta en condiciones de no infección.

[0108] Según la descripción, los expertos en la disciplina apreciarán que los constructos se preparen según esta invención en la que en una realización, un promotor sensible constitutivo o patógeno (incluyendo pero no se limita a, por ejemplo, al promotor WRKY6, al promotor *PR1* y similares) se une operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína ROS1 de *Arabidopsis* para conferir mayor resistencia contra los patógenos no relacionados en las diversas especies de plantas, incluyendo los cultivos.

-Secuencia de codificación de ROS1 de *Arabidopsis* (At2g36490):

ATGGAGAAACAGAGGAGAGAAGAAAGCAGCTTTCAACAACCTCCATGGATTCTCAGACACCCATGAAGCC
 5 ATTTTCACCGATCTGCCCATACACGGTGGAGGATCAATATCATAGCAGTCAATTGGAGGAAAGGAGATTTG
 TTGGGAACAAGGATATGAGTGGTCTTGATCACTTGTCTTTTGGGGATTTGCTTGCTCTAGCTAACACTGCA
 TCCCTCATATTCTCTGGTCAGACTCCAATACCTACAAGAAACACAGAGGTTATGCAAAAAGGTACTGAAGA
 AGTGGAGAGTTTGAGCTCAGTGAGTAACAATGTTGCTGAACAGATCCTCAAGACTCCTGAAAAACCTAAGA
 10 GGAAGAAGCATCGGCCAAAGGTTTCGTAGAGAAGCTAAACCCAAGAGGGAGCCTAAACCACGAGCTCCGAGG
 AAGTCTGTTGTCACCGATGGTCAAGAAAGCAAAACACCAAGAGGAAATATGTGCGGAAGAAGGTTGAAGT
 CAGTAAGGATCAAGACGCTACTCCGGTTGAATCATCAGCAGCTGTTGAAACTTCAACTCGTCTAAGAGGC
 TCTGTAGACGAGTCTTGGATTTTGAAGCCGAAAATGGAGAAAACCAGACCAACGGTGACATTAGAGAAGCA
 15 GGTGAGATGGAATCAGCTCTTCAAGAGAAGCAGTTAGATTCTGGGAATCAAGAGTTAAAGATTGCCTTCT
 TTCGGCTCCTAGCACGCCCAAGAGAAAGCGCAGCCAAGGTAAAAGAAAGGGAGTTCAACCAAGAAAAATG
 GCAGTAATCTAGAAGAAGTCGATATTTTCGATGGCGCAAGCTGCAAAAGAGAAGACAGGACCAACTTGTTGC
 GACATGAATCTATCAGGGATTTCAGTATGATGAGCAATGTGACTACCAGAAAAATGCATTGGTTGTATTCCCC
 AAACCTTGCAACAGGGAGGGATGAGATATGATGCCATTTGCAGCAAAGTATTCTCTGGACAACAGCACAAAT
 20 ATGTTTCTGCCTTTTCACGCTACGTGCTACAGTTCACATCTCAGCTCAGTGCTAATAGAGTCCTAACCGTT
 GAAGAAAGACGAGAAGGTATCTTTCAAGGAAGCAAGAGTCTGAGCTAAATGTTCTCTCGGATAAGATAGA
 CACGCCGATCAAGAAGAAAAACAACAGGCCATGCTCGATTCCGGAATTTGTCTTCAATGAATAAACTTGTGG
 AAGTTCTGAGCATTTAACCTCAGGATATTGTAGCAAGCCACAGCAAAATAATAAGATTCTTGTGTATACG
 CGGGTGACTGTGAGCAAAAAGAAGCCAACCAAGTCTGAGAAATCACAAACCAACAGAAAAATCTTCTTCC
 25 GAATCTTTGCCGTTTTCACCTTCATTTACTGGTCTTTCTCCAGATGAACCTTGGAAACGACGTAACCTCGA
 TCGAAACAATCAGTGAGCTATTGCGTCTATTAGACATCAACAGGGAGCATTCTGAAACTGCTCTCGTTCTT
 TACACAATGAATAGCCAGATTGTACTCTTTGGTGGTGGCGCTGGAGCAATTGTGCCTGTAACCTCTGTTAA
 AAAACCACGCCACGACCAAGGTTGATCTAGACGATGAGACAGACAGAGTGTGGAAACTGCTATTGGAGA
 ATATTAATAGCGAAGGTGTTGACGGATCAGACGAGCAGAAGGCGAAATGGTGGGAGGAAGAACGTAATGTG
 30 TTTTCGAGGACGAGCTGACTCATTTATTGCAAGGATGCACCTTGTACAAGGGGATCGACGTTTACGCTTG
 GAAGGGATCCGTCGTGGATTCTGTTGTTGGAGTATTTCTCACTCAAAATGTTTCAGACCATCTCTCAAGTT
 CGGCTTTTCATGTCGTTGGCTTCCAGTTCCCTGTCCCTTTTGTACCGAGCAGTAACTTTGACGCTGGAACA
 AGCTCGATGCCTTCTATTCAAATAACGTACTTGGACTCAGAGGAAACGATGTCAAGCCCAACCGATCACAA
 TCACAGTTCTGTTACTTTGAAAAATACACAGCCTGATGAGGAGAAGGATTATGTACCTAGCAATGAAACCT
 35 CCAGAAGCAGTAGTGAGATTGCCATCTCAGCCCATGAATCAGTTGACAAAACACGGATTCAAAGGAGTAT
 GTTGATTTCAGATCGAAAAGGCTCAAGTGATAGAGTTGATAAGACGGATGAGAAGTGTGCTGTCTTGAACCT
 GTTTCATCTGAAGATTCTGCACTTACATGTCAACATTCGATGGTGTCTGATGCTCCTCAAAATACAGAGA
 GAGCAGGATCAAGCTCAGAGATCGACTTAGAAGGAGAGTATCGTACTTCTTTATGAAGCTCCTACAGGGG
 GTACAAGTCTCTCTAGAAGATTCCAATCAAGTATCACCAATATGTCTCCGGGTGATTGTAGCTCAGAAAT
 40 TAAGGGTTTCCAGTCAATGAAAGAGCCCAAAAATCCTCTGTTGATAGTAGTGAACCTGGTTGTTGCTCTC
 AGCAAGATGGGGATGTTTTGAGTTGTGCAAAACCTACCTTAAAAGAAAAAGGGAAAAAGGTTTTGAAGGAG
 GAAAAAAAAGCGTTTACTGGGATTGTTTAAGAAGAGAAGCCCAAGCTAGAGCAGGAATTAGAGAAAAAAC
 AAGAAGTACAATGGACACCGTGGATTGGAAGGCAATACGAGCAGCAGATGTTAAGGAAGTTGCTGAAACAA
 TCAAGAGTCGCGGGATGAACCATAAACTTGCAGAACGTATACAGGGCTTCTTGTGCTGACTGGTAAATGAC
 45 CATGGAAGTATCGATCTTGAATGGTTGAGAGATGTTCCACCAGATAAAGCAAAAGAAATATCTTCTGAGCTT
 TAACGGATTGGGACTGAAAAGTGTGGAGTGTGTGCGGCTTCTAACACTTCACCATCTTGCCCTTCCAGTTG
 ATACAAATGTTGGGCGCATAGCCGTCAGACTTGGATGGGTGCCCTTTCAGCCGCTCCAGAGTCACCTCAG
 TTGCATCTTCTGGAAATGTATCCTATGCTTGAATCTATTCAAAAGTATCTTTGGCCCCGTCTCTGCAAACT
 CGACCAAAAAACATTGTATGAGTTGCACTACCAGATGATTACTTTTGGAAAGGTCCTTTGACAAAGAGCA
 50 AACCTAATTGCAATGCATGTCCGATGAAAGGAGAATGCAGACATTTTGCCAGTGCCTTTGCAAGTGCAAGG
 CTTGCTTTACCAAGTACAGAGAAAGGTATGGGGACACCTGATAAAAACCTTTTGCCCTTACACCTGCCAGA
 GCCATTCCAGAGAGAGCAAGGGTCTGAAGTAGTACAGCACTCAGAACCAGCAAAAAAGGTACATGTTGTG
 AACCAATCATCGAAGAGCCTGCTTACCAGGAGCCAGAAACCGCAGAAAGTATCAATAGCTGACATAGAGGAG
 GCGTTTTTTGAGGATCCAGAAGAAATTCCTACCATCAGGCTAAACATGGATGCATTTACCAGTAACCTGAA
 55 GAAGATAATGGAACACAAAGAACTTCAAGACGGAAACATGTCCAGCGCTTTAGTTGCACTTACTGCTG
 AAACCTGCTTCTCTTCCAAATGCCAAGCTCAAGAAATATCAGCCAGTTAAGGACAGAACACCGAGTTTACGAA
 CTTCCAGACGAGCATCTCTTCTAGCTCAGTTGGAAAAAGAGAAACCTGATGATCCATGTTCTTATTTGCT
 TGCTATATGGACGCCAGGTGAGACGGCTGATTCTATTCAACCGTCTGTTAGTACGTGCATATTCCAAGCAA
 ATGGTATGCTTTGTGACGAGGAGACTTGTCTCTCTGCAACAGCATCAAGGAGACTAGATCTCAAAATTGTG

AGAGGGACAATTTTGATTCTTGTAGAACAGCGATGAGGGGTAGTTTTCTCTAAATGGAACGTACTTTCA
 AGTAAATGAGGTGTTTGGCGATCATGCATCCAGCCTAAACCAATCAATGTCCCAAGGAATTGATATGGG
 AATTACCTCGAAGAACGGTCTATTTTGGTACCTCTGTTCTACGATATTCAAAGGTTTATCAACTGAGAAG
 ATACAGGCTTGCTTTTGGAAAGGGTACGTATGTGTACGTGGATTGATCGAAAGACGAGGGGACCGAAGCC
 TTTGATTGCAAGATTGCACTTCCCGGCGAGCAAACCTGAAGGGACAACAAGCTAACCTCGCCTAATCCGTTG
 GCAAGCAAACAAATACAAGCTTATGGTTAAGAGTGAGAGAGCACACTGTTCCAATCTAGTTAATGTAAGAA
 AGTGAAAACGTAAAGTTAACAGTCTTAGAGTTGTACAAGGTTTCTAAATCCATTTTAGTTTCGTCTTAAA
 TTTGTATCAAACACTTGTACAAAAAACAGACCCGTAGCTGTGTAAACTCTCTGTTCCCTTCGTTTGGTTT
 ATATCTGAATTACGGTT

-Secuencia de la proteína de ROS1 de *Arabidopsis*:

MEKQRREESSFQQPPWIPQTPMKPFSPICPYTVEDQYHSSQLEERRFVGNKDMSSGLDHLDFGDLALANTA
 SLIFSGQTPIPTRNTEVMQKGTVEVESLSVSNVVAEQILKTPKPKRKKHRPKVRREAKPKREPAPR
 KSVVDGQESKTPKRYVRKKVEVSKDQATPVESSAAVETSTRPKRLCRRVLDFAENGENTNGDIREA
 GEMESALQEKQLDSGNQELKDCLLSAPSTPKRKRSGQKRKGVPKNGSNLEEVDSMAQAARRQGF TCC
 DMNLSGIQYDEQCDYQKMHWLYSPNLQQGGMRDAICSKVFSGQQHNYVSFAHATCYSSTSQLSANRVLT
 EERREGIFQGRQESLNLVSDKIDTP IKKKTTHGARFNLSSMNKLVEVPEHLTSGYCSKPPQNNKILVDT
 RVTVSKKKPTKSEKSTKQKNLLPNLCRFPF3FTGLSPDELWKRNSIETISELLRLLDINREHSETALVP
 YTMNSQIVLFGGAGAI VPTVPVKKPRPRPKVDLDDDETDRVWKLLENINSEGVDSDEQKAKWEEERNV
 FRGRADSF IARMHLVQGDRRFTPWKGSVVD3VVGVLFTQNVSDHLSSSAFMSLASQFPVPFVPSNFDAGT
 SSMPISQITYLDEETMSSPPDHNSVTLKNTQPDEEKDYVPSNETSRSSSEIAISAHESVDKTTDSKEY
 VSDRKGSSVEVDKTDKCRVLNLFPSSEDSALTCQHSMSVSDAPQNTERAGSSSEIDLEGEYRTSFMKLLQG
 VQVLEDSNQVSPNMSPGDCSSEIKGFQSMKEPTKSSVDSSEPGCCSQQDGDVLSQKPTLKEKGKKVLKE
 EKKAFDWDCLRREAQARAGIREKTRSTMDTVDWKAIRAAADVKEVAETIKSRGMNHKLAERIQQGLDRLVND
 HGSIDLEWLRLDVPDKAKEYLLSFNGLGLKSECVRLTLHHLAAPPVDTNVGRIAVRLGWVPLQPLPESLQ
 LHLLEMPMLESIQKYLWPRCLCKLDQKTLIELHYQMITFGKVFCTKSKPNCNACPMKGECHRFASAFASAR
 LALPSTEKMGTPDKNPLPLHLPEPFQREQGSEVVQHSEPAKKVTCCEPIIEEPASPEPETAEVSIADIEE
 AFFEDPEEIP TIRLNMDAFTSNLKKIMEHNKELQDGNMSSALVALTAETASLPMPKLNISQLRTEHRVYE
 LPDEHPLLAQLKREPDDPCSYLLAIWTPGETADS IQPSVSTCIFIQANGMLCDEETCFSCNSIKETRSQIV
 RGTILIPCRTAMRGSFPLNGTYFQVNEVFADHASSLNP INVPRELIELWELPRRTVYFGTSVPTIFKGLSTEK
 IQACFWKGYVCVRGFRKTRGPKPLIARLHFPASKLKGQQANLA

[0109] Un constructo que presenta la transcripción de ROS1 se genera como se ha descrito anteriormente y se somete a mutagénesis. Los mutantes que exhiben niveles indicadores mejorados se aíslan. Las mejoras de los candidatos de la transcripción de ROS1 se expresan en un promotor fuerte 35S o promotores inducibles en patógenos (por ejemplo, PR1, WRKY6) y la líneas transgénicas estables se generan para conferir una resistencia mejorada de la enfermedad a patógenos. Esto se consigue al mejorar constitutivamente la expresión de los reguladores positivos de la resistencia aumentada de ROS1 a los patógenos bacterianos y fúngicos en una variedad de plantas, incluyendo los cultivos. Los reguladores positivos de la transcripción de DCL4, obtenidos como se ha descrito anteriormente, se sobreexpresan condicional o constitutivamente en las mismas líneas transgénicas para conferir además, una resistencia mejorada a patógenos virales.

[0110] Además, las mismas líneas transgénicas que presentan la transcripción de ROS1 se utilizan para cribar los compuestos químicos que mejoran la expresión de GFP, tal como se ha descrito anteriormente. Las moléculas que mejoran los niveles de ARNm de GFP pueden utilizarse para conferir resistencia antibacteriana y antifúngica en una variedad de especies de plantas, incluyendo los cultivos. Los cócteles de agentes químicos que promueven la transcripción de DCL4, así como la transcripción de ROS1 se utilizan para conferir un amplio espectro de resistencia a patógenos no relacionados.

[0111] Las secuencias del promotor ROS1 son:

Secuencia promotora ROS1:

5 ATAATCCGTTCCCAACTTTTTATCCACTATTATTTCGTCTCAGTTTCTAGGATAGATATGTCCACACAAAAA
AGCTCTTGATTTTTTTTTTTTTTTTTTACAAATTCCAAATTTCTTTGCTCATAACCCAATCATTAGGTTATG
ACCACCATGACTCACTCATAAGTCATAAGTCATAGGCTCATAACCAATCCAACAAGTTGTTAAGATTGAC
AACAACGATTCACTAAGATTCCAACCAAGTCCATGAAATAAATGATTTACAATACTCATTCTCATGTACG
TCTCTTTGAAGGTTTCTTGCAATGACAGGAAATCAAAGTTAGCACACTAATTACTCTTTTTTTCACACACA

10

15 TTCACAGTTTTCACACATATGGTGCAGTATTTTGACTCCTATCGTACTAGACTAAAACATTTGGAATGATCA
AAAACGAAAGACTCGTTGGGCAACTAGCCTAATAATCACTCTACTACACTAGCTCCCATATCAGTGGAATA
TAATAATTCTAAAACGAATCATTTAACTTCTGCATATGTAAACGAAAACGTGTAAATTTATGAGATTACGT
AAAAATTAGCAAAATAATATATTATTGATCAAAATTATAAACGTGGATTACATAACATGTTATTTGTTTAA
ATCATAATTTGATGATAAATTTATAAATAAAGTTC TAATTATTTTATATCTAAAGCAAAATTAAGATTATT
TTATAATTTCTATTAATTATAAAATTAGTTAGTTTCATATAATTTTAAATAGTTACGTAAACGAGAAAAAAT
ACGAAATTTTAAAGAGAAAAAGATAACAGAAAAGACGATGATGACGATGACGATAACAACGACAATATTAT
TAACTTTTTAAATCATCTTTCCCATAGTCTAGGAGATTTTGTAGAAAAGAAATCATTATTTTTAAATAAAA
20 TTCCGTAAAACCTTTCCCGCCAACCAACGAACCTTCGCCCTACATAAACAAACGGTTATGAAAAATAGTG
AAACACACAACAACACATGTTATATCCTCTTCTTTTATACGTTAGGCCAAAAAGCTTTTTCTATATTACTC
TTTAACCTTCATCGATTCCAAGAGAAGAAACGAAGCATCAGTGATCTTATCCTCTCATAGCTACCACCGAAC
TAACCTCTCTCCATCACCACCATAACCATTGATTCTACTGGTAATGAATTTTGTTTTTTCTTACTTTTTTT
25 TACATTTTGTTGTGAATCTAAAAAGTCTCTCTTTTACCTAACGAACGGATTAAATCGTTTCATGTCGCCACTC
ACCCAAAATCAATGACTTCCGGAGATCTCTCTTTCTCTAAACCCCAGAAAAAAGTGGATCTGATCATTTT
ATAAAATCGTGATTTTTAAAAAAATTGGTGATCTCTTTTATTGAAGAAATTATTGAACTTTTTGCAGTGG
AAAAAATAGAAAGTTCCAAGCTTTTTCTCAAATGGTTCTGATTTAAGTAAGAGTGAAGAAAAGTAAAAATA
GAGTCAGAA

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un procedimiento para mejorar la resistencia de la planta a un patógeno cuyo procedimiento comprende la modificación de dicha planta para contener un constructo de ácido nucleico que comprende secuencias de control sensibles a patógenos o constitutivas operativamente unidas a una secuencia de nucleótidos cuya expresión aumenta cuando se observa la respuesta de resistencia a dicho patógeno, en la que la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que codifica de la ADN glicosilasa ROS1.

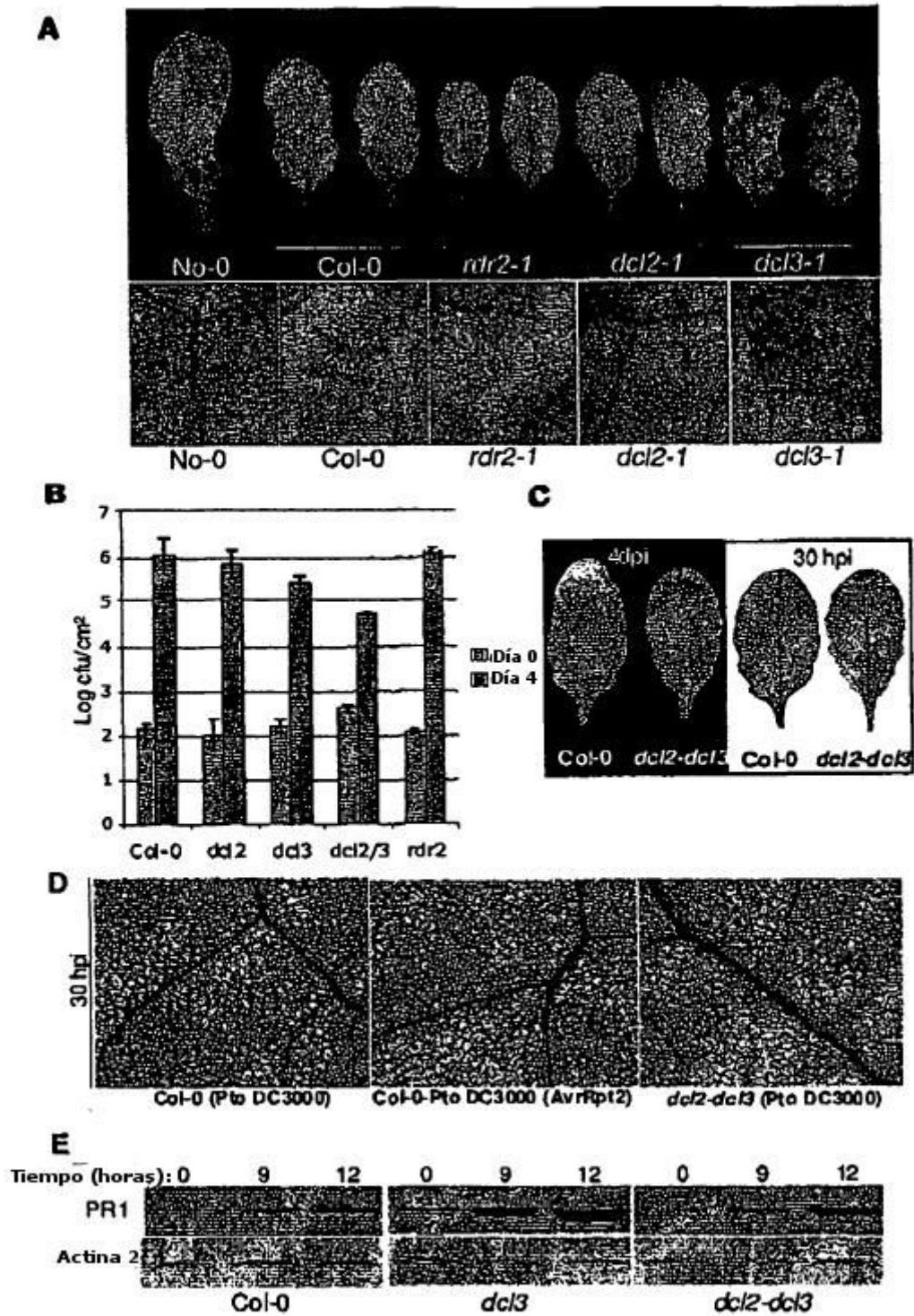


Figura 4

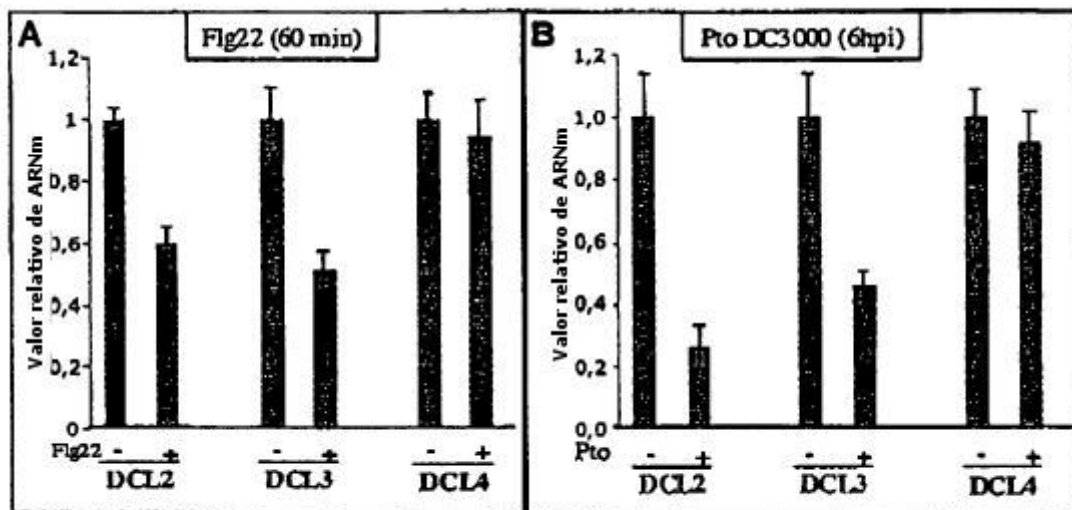


Figura 5