

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 990**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2011 PCT/EP2011/069367**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO2012059559**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2011 E 11781777 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2635104**

54 Título: **Plantas resistentes al estrés y su producción**

30 Prioridad:

04.11.2010 US 410074 P

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

20.06.2017

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) (33.3%)**

**147 rue de l'Université
75007 Paris, FR;**

**CENTRE DE COOPERATION INTERNACIONAL EN
RECHERCHE AGRONOMIQUE (CIRAD) (33.3%) y
UNIVERSITE DE MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**GANTET, PASCAL;
GUIDERDONI, EMMANUEL;
KHONG, NGANGIANG y
MOREL, JEAN-BENOIT**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 617 990 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas resistentes al estrés y su producción

Campo Técnico

5 La presente invención se refiere a genes de plantas implicados en la regulación negativa de la resistencia al estrés biótico y/o abiótico y usos de los mismos. Más particularmente, la presente invención se refiere a plantas que comprenden una función de gen de caja MADS inactivada, y que tienen la resistencia aumentada al estrés biótico o abiótico. La invención también se refiere a los métodos para producir plantas modificadas que tienen una resistencia aumentada a patógenos fúngicos, bacterianos y/o al estrés por sequía. En particular, la invención se refiere a los métodos para producir plantas con genes MADS26 inactivados, o un ortólogo del mismo, y que muestran resistencia al estrés biótico y/o abiótico.

Antecedentes de la invención

15 Las plantas cultivadas se enfrentan continuamente con diversos patógenos. En particular, la infección de las plantas cultivadas con bacterias y hongos puede tener un impacto devastador en la agricultura debido a la pérdida de rendimiento y contaminación de las plantas con toxinas. Otros factores que causan la reducción drástica del rendimiento en la mayoría de los cultivos son los factores de estrés abiótico tales como sequía, salinidad, metales pesados y temperatura.

20 De acuerdo con las estimaciones de la FAO, enfermedades, insectos y malas hierbas causan tanto como un 25% de pérdida de rendimiento en los cultivos de cereales (Khush, 2005). Por ejemplo, solo en China, se estima que 1 millón de hectáreas se pierden anualmente debido a la enfermedad de quemazón (Khush y Jena 2009). Entre 1987 y 1996, los fungicidas representaron, por ejemplo, hasta el 20 y 30% de los costos de cultivo en China (46 Millones de dólares) y Japón (461 Millones de dólares) respectivamente.

Para satisfacer la creciente demanda del suministro mundial de alimentos, será necesario producir hasta un 40% más de arroz en 2030 (Khush 2005). Esto tendrá que ser en una superficie reducida de siembra debido a la urbanización y al aumento de la contaminación ambiental.

25 Por ejemplo, la superficie de siembra en China disminuyó en 8 millones de hectáreas entre 1996 y 2007.

La mejora del rendimiento por planta no es la única manera de conseguir el objetivo; la reducción de las pérdidas por estrés biótico y abiótico es también una solución.

30 Una de las enfermedades fúngicas más devastadoras es la enfermedad de quemazón, que es causada por el ascomiceto *Magnaporthe oryzae*, también conocido como hongo de la quemazón del arroz. Los miembros del complejo *M. grisea/M. oryzae* (que contienen al menos dos especies biológicas: *M. grisea* y *M. oryzae*) son patógenos de las plantas extremadamente eficaces ya que se pueden reproducir tanto sexualmente como asexualmente para producir estructuras infecciosas especializadas conocidas como appressorias que infectan los tejidos aéreos e hifas que pueden infectar los tejidos de la raíz. El hongo *Magnaporthe* puede infectar también una serie de otros cereales de importancia agrícola incluyendo trigo, centeno, cebada, y mijo perlado causando enfermedades llamadas enfermedad de quemazón o enfermedad de tizón. Otros patógenos fúngicos de plantas de importancia económica incluyen patógenos fúngicos de especies seleccionadas de especies *Puccinia*, *Aspergillus*, *Ustilago*, *Septoria*, *Erysiphe*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*. La contaminación por *Fusarium* en los cereales (p.ej., cebada o trigo) puede dar como resultado la enfermedad del tizón de la cabeza. Por ejemplo, las pérdidas totales en los Estados Unidos de los cultivos de cebada y trigo entre 1991 y 1996 se han estimado en 3 billones de dólares (Brewing Microbiology, 3ª Edición. Priest and Campbell, ISBN 0-306-47288-0).

35 Otros patógenos de plantas devastadores para la agricultura son patógenos bacterianos de las especies *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acidovorax*, *Clavibacter*, *Streptomyces*, *Xylella*, *Spiroplasma* y *Phytoplasma*. Las bacterias patógenas de plantas causan muchas clases diferentes de síntomas que incluyen gallas y sobrecrecimientos, marchitez, manchas de las hojas, motas y picaduras, pudriciones blandas, así como costras y chancros. Algunas bacterias patógenas de plantas producen toxinas o inyectan proteínas especiales que conducen a la muerte de la célula huésped o producen enzimas que descomponen los componentes estructurales clave de las células de las plantas. Un ejemplo es la producción de enzimas por bacterias de pudrición blanda que degradan la capa de pectina que mantiene las células de la planta unidas. Otras, tal como *Ralstonia* spp., colonizan los vasos de xilema que conducen el agua causando que las plantas se marchiten y mueran. Las especies *Agrobacterium* tienen incluso la capacidad de modificar genéticamente o transformar sus huéspedes y provocar la formación de sobrecrecimientos cancerígenos llamados galón de la corona. Las enfermedades bacterianas en plantas son difíciles de controlar. El hincapié está en prevenir la expansión de la bacteria más que en curar la planta.

55 Las prácticas culturales pueden o eliminar o reducir las fuentes de contaminación bacteriana, tales como la rotación de cultivos para reducir la hibernación. Sin embargo, el procedimiento de control más importante está garantizado por la resistencia genética del huésped que proporciona variedades, cultivares, o híbridos resistentes.

5 La infección patógena de las plantas de cultivo puede tener un impacto devastador en la agricultura debido a la pérdida de rendimiento y contaminación de las plantas con toxinas. En la actualidad, los brotes de la enfermedad de quemazón se controlan mediante la aplicación de tratamientos químicos fungicidas caros y tóxicos usando por ejemplo probenazol, triclazol, piroquilón y ftalida, o quemando los cultivos infectados. Estos métodos son solo parcialmente exitosos ya que los patógenos de las plantas pueden desarrollar resistencia a los tratamientos químicos.

10 Para reducir la cantidad de pesticidas usados, los criadores de plantas y genetistas han intentado identificar la resistencia a la enfermedad del loci y explotar el mecanismo de defensa natural de las plantas frente al ataque de patógenos. Las plantas pueden reconocer ciertos patógenos y activar las defensas en forma de respuesta de resistencia que puede resultar en la limitación o detención del crecimiento de patógenos. Se han identificado muchos genes de resistencia (R), que confieren resistencia a varias especies de plantas frente a una amplia gama de patógenos. Sin embargo, la mayoría de estos genes R no son normalmente duraderos ya que los patógenos pueden vencer fácilmente este tipo de resistencia.

15 En consecuencia, existe una gran demanda de nuevos métodos eficaces para controlar las enfermedades de las plantas, así como para producir plantas de interés con mayor resistencia al estrés biótico y abiótico.

Compendio de la invención

20 La presente invención proporciona métodos nuevos y eficientes para producir plantas resistentes al estrés biótico y abiótico. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que las plantas mutantes con un gen de caja MADS defectuoso son resistentes a las enfermedades de las plantas. En particular, los inventores han demostrado que el gen MADS26 es un regulador negativo de la respuesta al estrés biótico, y que las plantas con el gen MADS26 defectuoso son resistentes a los patógenos fúngicos y bacterianos mientras que las plantas con una sobre expresión del gen MADS26 son más susceptibles a las enfermedades de las plantas. Además, los inventores han mostrado que inhibir la expresión del gen MADS26 aumenta la resistencia de la planta al estrés por sequía. A nuestro entender, este es el primer ejemplo de regulación de la resistencia biótica y abiótica en plantas por un factor de transcripción de la familia de caja MADS. Además, los inventores han identificado ortólogos de MADS26 en varias plantas, así como otros miembros de la familia de genes de caja MADS, extendiendo así la aplicación de la invención a diferentes cultivos y modificaciones.

30 Un objetivo de esta invención se refiere por lo tanto a plantas que comprenden una función de MADS26 defectuosa. Como se discutirá, dichas plantas muestran una resistencia aumentada o mejorada al estrés biótico y/o abiótico. Preferiblemente, dichas plantas son monocotiledóneas. Más preferiblemente, dichas plantas son cereales seleccionados de la familia Poaceae (p.ej., arroz, trigo, cebada, avena, centeno, sorgo o maíz).

La invención más particularmente se refiere a plantas que tienen una función de MADS26 defectuosa y muestran una resistencia aumentada al estrés biótico y abiótico.

35 Otro objetivo particular de esta invención se refiere a plantas que comprenden un gen de caja MADS defectuoso y muestran una resistencia aumentada al estrés biótico y abiótico.

Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a semillas de plantas de la invención, o a plantas, o descendientes de plantas cultivadas o sino derivados de dichas semillas.

Un objetivo adicional de la invención se refiere a un método para producir plantas que tienen una resistencia aumentada al estrés biótico y abiótico, en donde el método comprende las siguientes etapas:

- 40
- (a) inactivación de un gen o proteína MADS26, o un ortólogo del mismo, en una célula vegetal;
 - (b) opcionalmente, selección de células vegetales de la etapa (a) con la función de MADS26 inactivada;
 - (c) regeneración de las plantas a partir de las células de las etapas (a) y (b); y
 - (d) opcionalmente, selección de una planta de (c) con una resistencia aumentada al estrés biótico y/o abiótico, teniendo dicha planta un gen o proteína MADS26 defectuoso, o un ortólogo del mismo.

45 Como se describirá además en la presente invención, la función del factor de transcripción de caja MADS se puede hacer defectuosa por diversas técnicas tales como, por ejemplo, por inactivación del gen (o RNA), inactivación de la proteína, o inactivación de la transcripción o traducción de los mismos. La inactivación puede estar acompañada de por, p.ej., delección, inserción y/o sustitución de uno o más nucleótidos, mutagénesis específica del sitio, mutagénesis por metanosulfonato de etilo (EMS), lesiones locales inducidas en genomas por direccionamiento (TILLING), técnicas de bloqueo génico, o silenciamiento génico, p.ej., mecanismos de interferencia por RNA, ribocimas, antisentido, aptámeros, y similares. La función de caja MADS se puede hacer también defectuosa por la alteración de la actividad de la proteína de caja MADS, ya sea por la alteración de la estructura de la proteína, o por la expresión de un ligando de la proteína en la célula, o un inhibidor de la misma, por ejemplo.

50

La invención también se refiere a un método para conferir o aumentar la resistencia al estrés biótico y/o abiótico a una planta, que comprende una etapa de inhibición, permanente o transitoria, una función MADS26 en dicha planta, p.ej., por inhibición de la expresión del gen(s) MADS26 en dicha planta.

5 Otro objetivo de esta invención se refiere a un RNAi, como se describe en las reivindicaciones, que inhibe la expresión (p.ej., transcripción o traducción) de un gen MADS26.

Otro objetivo de la invención se refiere al uso de dicho ácido nucleico para aumentar la resistencia de las plantas o células vegetales al estrés biótico y/o abiótico.

Un objetivo adicional de la invención se refiere a plantas transformadas con un vector que comprende dicho RNAi que inhibe la expresión de un gen MADS26.

10 La invención se aplica para producir cereales que tienen una resistencia aumentada al estrés biótico y/o abiótico, y es particularmente adecuada para producir trigo, arroz, cebada, avena, centeno, sorgo o maíz resistentes.

Breve descripción de los dibujos

15 Figura 1: Expresión constitutiva del gen OsMADS26. Análisis QPCR del perfil de expresión de OsMADS26. A: expresión de OsMADS26 en diferentes órganos de plántulas cultivadas en condiciones estándar (MS/2). L: hoja, S: tronco, CR: raíz de corona, SR-A: raíz seminal sin apéndice, SR+A: apéndice de raíz seminal. B-C, patrones de expresión de OsMADS26 en el brote (B) y en la raíz (C) de plántulas de arroz de 7 días cultivadas en condiciones estándar (C), con 150 nM de NaCl (SS), 100 nM de manitol (OS). Los valores representan la media obtenida de dos repeticiones biológicas independientes, siendo las barras el error estándar. *: Diferencia significativa con $p=0,05$.

20 Figura 2: Expresión del vector pANDA usado para clonar cDNA de OsMADS26. El vector pANDA permite la expresión bajo el control del promotor constitutivo del gen ubitiquina del maíz del marcador de la secuencia génica clonada (GST) con orientación en sentido y antisentido separadas por una secuencia de espaciado GUS. La inserción de las GSTs se verificó por secuenciación. Los plásmidos obtenidos se nombraron pANDA-GST1 y pANDA-GST2 (para GST1 y GST2 respectivamente), y se transfirieron a una cepa EHA105 de *A. tumefaciens* para la transformación de la planta.

25 Figura 3: Amplificación de los marcadores de secuencias GST1 y GST2 específicos de cDNA de MADS26 (de la raíz *Oryza sativa*) y predicción de RNAi de MADS26. Se realizó una amplificación PCR con un par de cebadores específicos diseñados en las UTR 5' y 3' de OsMADS26 (PC8 Hacia adelante: 5'-aagcaagagataggataag-3', PC8 Reverso: 5'-attacttgaaatgggtcaac-3'). El cDNA amplificado fue clonado usando el kit de clonación fácil pGEM-T de Promega. El plásmido obtenido se nombró pGEM-T-PC8. A partir de este plásmido se hicieron además reacciones PCR usando cebadores específicos que poseen la secuencia recombinante para la recombinasa BP de la tecnología de clonación de puerta de enlace de Invitrogen en su extremo 5' para amplificar el cDNA de OsMADS26 (PC8 BP Hacia adelante: 5'-ggggacaagttgtacaaaaagcaggctgaagaggaggaagaaggagg-3' y PC8 BP Reverso: 5'-ggggaccacttgtaacaagaagctgggtgctcctcaagagttcttag-3'), un fragmento de 215 bp situado en la UTR 5' de OsMADS26, llamado GST1 (PC8 BP hacia adelante y GST1 reverso: 5'-ggggaccacttgtaacaagaagctgggtgctcctcctcctcctcc-3') y un fragmento de 321 bp que comprende el final del último exón y la mayor parte de la región UTR 3' de OsMADS26, llamado GST2 (GST2 hacia adelante: 5'-ggggacaagttgtacaaaaagcaggctcatgatgtagcagatcaac-3' y PC8 BP reverso).

30 Figura 4: patrón de expresión de genes MADS26 en plantas transgénicas y mecanismo de interferencia por RNA usando un análisis cuantitativo QPCR. A: niveles de expresión de OsMADS26 en sobreexpresión (barras oscuras) y el control correspondiente (barras blancas) de plantas cultivadas en invernadero. B: niveles de expresión de OsMADS26 en el mecanismo de interferencia por RNA (barras grises) y el control correspondiente (barras blancas) de plantas cultivadas en invernadero. C: niveles de expresión de OsMADS26 en el mecanismo de interferencia por RNA (barras grises) y el control correspondiente (barras blancas) de plántulas de 7 días cultivadas en medio MS/2 añadido con 125 mM de manitol. Los valores representan la media obtenida de dos repeticiones biológicas independientes, siendo las barras el error estándar.

35 Figura 5: Las plantas con mecanismo de interferencia por RNA de MADS26 son más resistentes a la infección fúngica mientras que las plantas que sobreexpresan el gen MADS26 son menos resistentes a la infección fúngica. Resistencia de las líneas trasgénicas de OsMADS26 frente a *Magnaporthe oryzae* (*M. oryzae*). Se ensayaron nueve líneas de arroz independientes con sobreexpresión de OsMADS26 (PCA, PCB) (barras negras) o interferidos (PD1, PD2) (barras grises) y las correspondientes líneas de control transformadas con vectores vacíos (PCO, PDO) y plantas de tipo nativo (WT) (barras blancas). A: gravedad de los síntomas en hojas de plantas transgénicas y de control inoculadas con la cepa GY11 de *M. oryzae*. Se tomaron fotografías a los 3 días después de la inoculación. Maratelli, control altamente susceptible. B: Porcentaje de susceptibilidad frente a las lesiones totales observadas en hojas infectadas de *M. oryzae* a los 3 días después de la inoculación. Los valores representan la media obtenida de diez plantas inoculadas por cada línea, siendo las barras el error estándar correspondiente. Los resultados que se muestran son representativos de los datos obtenidos para tres experimentos independientes. *: diferencia significativa con $p<0,05$; **: diferencia significativa con $p<0,01$; ***: diferencia significativa con $p<0,001$.

Figura 6: Las plantas con mecanismos de interferencia por RNA en MADS26 son más resistentes a la infección bacteriana mientras que las plantas que sobreexpresan el gen MADS26 son menos resistentes a la infección bacteriana. Resistencia de las líneas transgénicas de OsMADS26 frente a *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* (Xoo). Se ensayaron nueve líneas de arroz independientes con sobreexpresión de OsMADS26 (PCA, PCB) (barras negras) o interferido (PD1, PD2) (barras grises) y las correspondientes líneas de control transformadas con vectores vacíos (PCO, PDO) y plantas de tipo nativo (WT) (barras blancas). A: gravedad de los síntomas en hojas de plantas transgénicas y de control inoculadas con la cepa POX99 de Xoo. Se tomaron fotografías a los 14 días después de la inoculación. B: longitud de la lesión producida en las hojas Xoo-infectadas a los 14 dpi. Los valores representan la media obtenida de diez plantas inoculadas para cada línea, siendo las barras el error estándar correspondiente. Los resultados que se muestran son representativos de los datos obtenidos para dos experimentos independientes. *: diferencia significativa con $p < 0,05$; **: diferencia significativa con $p < 0,01$.

Figura 7: inducción de MADS26 bajo estrés osmótico. El gen OsMADS26 se induce bajo estrés osmótico.

Figura 8: Patrón de expresión de los genes MADS26 en plantas transgénicas. A: el gen OsMADS26 se silencia en plantas con un mecanismo de interferencia por RNAi (líneas 2PD1-A, 2PD1-B, 2PD2-A, 2PD2-B). B: Bajo estrés osmótico, el gen MADS26 está todavía silenciado.

Figura 9: Las plantas con un mecanismo de transferencia por RNA en MADS26 son más resistentes al estrés por sequía y las plantas que sobreexpresan el gen MADS26 son menos resistentes al estrés por sequía. Cinéticas relativas del contenido de agua en las hojas de plantas con OsMADS26 transgénico durante el estrés por sequía. El estrés por sequía se aplicó en plantas de veinte días que crecen en invernadero en macetas de tierra, mediante la interrupción del riego. Los valores representan la media obtenida de cinco plantas por línea, siendo las barras el error estándar. 4PC1, 4PC2: plantas que sobreexpresan OsMADS26, 4PD1A, 4PD2A: plantas con OsMADS26 interferido, 4PCO, 4PDO: plantas transformadas con vectores vacíos, 4WT: plantas no transformadas.

Figura 10: las plantas con RNAi silenciado de MADS26 son más resistentes al estrés por sequía. En la 6ª etapa de la hoja, las plantas no se regaron más, y se mantuvieron bajo condiciones de estrés por sequía durante 21 días.

Descripción detallada de la invención

La familia de genes de caja MADS codifican factores de transcripción que tienen altamente conservado el motivo de la secuencia llamado caja MADS. Estos factores de transcripción de caja MADS se han descrito para controlar diversos procesos de desarrollo en plantas con flores, que van desde la raíz hasta el desarrollo de flores y frutos (Rounsley y colaboradores, 1995). La parte N-terminal del factor codificado parece ser el mayor determinante de la especificidad de unión al DNA y la parte C-terminal parece ser necesaria para la dimerización.

Hay varios miembros reportados de la familia de genes de caja MADS, incluyendo MADS26, MADS33 y MADS14.

Se ha propuesto recientemente que el gen MADS26, el ortólogo del arroz de AGL12 en *Arabidopsis thaliana*, está involucrado en procesos de senescencia o maduración ya que el nivel de transcripción del MADS26 aumentó de una manera dependiente de la edad en hojas y raíces (Lee y colaboradores, 2008). Sin embargo, las plantas noqueadas con MADS26, que se testaron bajo diversas condiciones de estrés (tales como sequía, elevada sal y mediadores de estrés), no mostraron diferencia en comparación con las plantas de tipo nativo.

Sorprendentemente, los inventores han mostrado ahora que las plantas con el gen MADS26 inactivado son más resistentes al estrés abiótico tal como el estrés por sequía. Además, los inventores han descubierto también que el MADS26 es un regulador negativo de la resistencia de la planta a patógenos, es decir, su inhibición aumenta la resistencia. Este es el primer ejemplo de regulación de la resistencia en plantas por el factor de transcripción de la familia de caja MADS. Por lo tanto, los genes de caja MADS representan objetivos nuevos y altamente valiosos para producir plantas de interés con resistencia aumentada a patógenos.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a métodos para incrementar la resistencia a patógenos en plantas basado en una regulación de la función del gen MADS26.

La invención también se refiere a plantas o células vegetales que tienen la función de un gen de caja MADS inactivada, preferiblemente la función del gen MADS26, o un ortólogo del mismo.

La invención también se refiere a construcciones (p.ej., ácidos nucleicos, vectores, células, etc) adecuados para la producción de tales plantas y células, así como a métodos para producir reguladores resistentes a las plantas.

La presente descripción se entenderá mejor haciendo referencia a las siguientes definiciones:

Definiciones

Como se usa aquí, el término "proteína de caja MADS" designa proteínas que contienen una secuencia de aminoácidos de caja MADS y que tienen una actividad del factor de transcripción. Proteínas típicas de caja MADS se unen a una secuencia de consenso de DNA $CC(A/T)_4NNGG$ (en donde N representa cualquier base de nucleótido), o una secuencia homóloga de la misma. Proteínas de caja MADS preferidas comprenden la siguiente secuencia

de aminoácidos IXXXXXXXXXXKRXXGXXKKXXEXXXL (en donde X representa cualquier aminoácido). Ejemplos específicos de una proteína de caja MADS incluyen, sin limitación, las proteínas MADS26, MADS33 o MADS14. Las cajas MADS se han aislado o identificado en diversas especies de plantas. Ejemplos específicos de proteínas de caja MADS incluyen proteínas de caja MADS de *Oryza sativa* que comprenden una secuencia seleccionada de SEQ ID Nos: 2, 9, o 10, proteínas de caja MADS de *Triticum aestivum* que comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 3, y proteínas de caja MADS de *Hordeum vulgare* que comprenden una secuencia seleccionada de SEQ ID Nos: 11, 12, 13, 14 o 15. El término proteínas de caja MADS también abarca cualquier variante (p.ej., polimorfismo) de una secuencia como se describió anteriormente, así como ortólogos de tales secuencias en distintas especies de plantas.

10 Dentro del contexto de la presente invención, el término “gen de caja MADS” designa cualquier ácido nucleico que codifique una proteína de caja MADS como se definió anteriormente. El término “gen de caja MADS” incluye DNA de caja MADS (p.ej., DNA genómico) y RNA de caja MADS (p.ej., mRNA). Ejemplos de genes de cajas MADS incluyen un DNA o RNA de MADS26, MADS33 o MADS14 de *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Arabidopsis thaliana*. Un ejemplo específico de un gen de caja MADS comprende las secuencias de ácidos nucleicos SEQ ID NOs: 1, 4, 6 o 8.

En la realización más preferida, un gen de caja MADS es un gen MADS26, un gen MADS33, un gen MADS14, u ortólogos de los mismos. Dentro del contexto de la presente invención, el término “ortólogo” designa un gen o proteína relacionados de especies distintas, que tienen un nivel de identidad de secuencia para un gen de referencia de caja MADS por encima del 50% y una actividad similar a un gen de la caja MADS. Un ortólogo de un gen de referencia de caja MADS es lo más preferiblemente un gen o proteína de especies distintas que tienen un antepasado común con dicho gen de referencia de caja MADS, que actúa como un regulador negativo de la resistencia de la planta al estrés biótico o abiótico, y que tiene un grado de identidad de secuencia con dicho gen de referencia de caja MADS superior al 50%. Ortólogos preferidos de un gen de referencia de caja MADS tienen al menos un 60%, preferiblemente al menos un 70%, lo más preferiblemente al menos un 70, 80, 90, 95% o más de identidad de secuencia a dicha secuencia de referencia, p.ej., a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 (*Oryza sativa*). Los genes ortólogos de caja MADS se pueden identificar usando herramientas tales como búsquedas “mejor éxito de explosión” o “mejor éxito de explosión mutuo” (BBMH). Los inventores han identificado ortólogos de MADS26 en diversas plantas, incluyendo trigo, cebada, sorgo o maíz (véase la Tabla 2 y el listado de secuencias). Ejemplos específicos de tales ortólogos incluyen secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4,6 o 8, y secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 5 o 7.

Ejemplos adicionales de genes o proteínas de caja MADS se listan a continuación: Arroz (*Oryza sativa*) Banco de genes:

Os12g10520.1

Os12g10520.2

35 Os03g54160.1

Os03g54160.2

Os07g41370.1

Os07g01820.3

Os07g01820.2

40 Os06g06750.1

Os07g01820.4

Os01g66290.2

Os01g66290.1

Os03g11614.1

45 Os03g03100.1

Os02g45770.1

Os01g52680.1

Trigo (*Triticum aestivum*)

Banco de genes:

- CAM59056
AM502878.1
DQ512350.1
AM502870.1
5 DQ534490.1
DQ512331.1
AM502886.1
AM502877.1
DQ512370.1
10 DQ512334.1
AM502867.1
AB295661.1
AB295660.1
AB295659.1
15 DQ512345.1
AM502903.1
DQ534492.1
DQ512347.1
AM502868.1
20 DQ512351.1
AB295664.1
DQ512356.1
DQ512348.1
AM502901.1
25 AM502900.1
Maíz (Zea Mays)
Banco de genes:
ACG41656.1
ACR35354.1
30 NP_001148873.1
Sorgo (Sorghum bicolor)
Banco de genes:
XP_002443744.1

35 Dentro del contexto de la presente invención, el término “estrés biótico” designa un estrés que se produce como el resultado de un daño causado a las plantas por un organismo vivo, p.ej., patógenos de las plantas. El término “patógenos” designa todos los patógenos de plantas en general tales como bacterias, virus, hongos, parásitos e insectos. Más preferiblemente los patógenos son patógenos fúngicos y/o bacterianos. En una realización particular, los patógenos fúngicos son patógenos fúngicos de los cereales. Ejemplos de tales patógenos incluyen, sin

limitación, las especies Magnaporthe, Puccinia, Aspergillus, Ustilago, Septoria, Erysiphe, Rhizoctonia y Fusarium. En la realización más preferida, el patógeno fúngico es Magnaporthe Oryzae.

5 En otra realización particular, los patógenos bacterianos son patógenos bacterianos de cereales. Ejemplos de tales patógenos incluyen, sin limitación, las especies Xanthomonas, Ralstonia, Erwinia, Pectobacterium, Pantoea, Agrobacterium, Pseudomonas, Burkholderia, Acidovorax, Clavibacter, Streptomyces, Xylella, Spiroplasma y Phytoplasma. En una realización más preferida, el patógeno bacteriano es Xanthomonas oryzae.

Dentro del contexto de la presente invención, el término "estrés abiótico" designa un estrés que se produce como resultado de un daño causado a las plantas por factores medioambientales no vivos tales como sequía, frío o calor extremo, vientos fuertes, salinidad, metales pesados.

10 La invención es particularmente adecuada para crear cereales resistentes a Magnaporthe y/o Xanthomonas y/o resistentes al estrés por sequía. Preferiblemente, el cereal se selecciona de arroz, trigo, cebada, avena, centeno, sorgo o maíz. En la realización más preferida el cereal resistente es arroz, por ejemplo Oryza sativa indica, Oryza sativa japonica.

15 Diferentes realizaciones de la presente invención se describirán a continuación con más detalle. Cada realización así definida puede combinarse con cualquier otra realización o realizaciones a menos que se indique lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa se puede combinar con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

Plantas con función de caja MADS defectuosa

20 Como se describió previamente, la presente invención se basa en el descubrimiento de que el gen MADS26 es un regulador negativo de la resistencia de la planta al estrés biótico y/o abiótico. Los inventores han demostrado que la inactivación del gen MADS26 incrementa la resistencia de la planta a los patógenos fúngicos, patógenos bacterianos y al estrés por sequía.

La presente descripción se refiere por tanto a métodos para aumentar la resistencia a patógenos y la resistencia al estrés abiótico en plantas, basados en una regulación de las vías del factor de transcripción de cajas MADS.

25 La descripción también se refiere a plantas o células vegetales que tiene una función de caja MADS defectuosa.

La descripción también se refiere a construcciones (p.ej., ácidos nucleicos, vectores, células, etc) adecuadas para la producción de dichas plantas y células, así como a los métodos para producir reguladores resistentes a las plantas.

30 De acuerdo con la primera realización, la invención se refiere a una planta o una célula vegetal que comprende una función de caja MADS defectuosa. El término "función de caja MADS" indica cualquier actividad mediada por una proteína de caja MADS en una célula vegetal. La función de caja MADS se puede efectuar mediante la expresión de un gen de caja MADS o por la actividad de una proteína de caja MADS.

35 Dentro del contexto de esta invención, los términos "defectuoso", "inactivado" o "inactivación", en relación con la función de caja MADS, indican una reducción en el nivel de proteínas MADS activas en la célula o planta. Tal reducción es típicamente de aproximadamente 20%, más preferiblemente 30%, en comparación con una planta de tipo nativo. La reducción puede ser más sustancial (p.ej., superior al 50%, 60%, 70%, 80% o más), o completa (es decir, plantas noqueadas).

40 La inactivación de la función de cajas MADS se puede llevar a cabo por técnicas conocidas *per se* en la técnica tales como, sin limitación, por medios genéticos, técnicas enzimáticas, métodos químicos, o combinaciones de los mismos. La inactivación puede llevarse a cabo a nivel de DNA, mRNA o proteína, e inhibir la expresión de los genes de caja MADS (p.ej., transcripción o traducción) o la actividad de proteínas de caja MADS.

Métodos de inactivación preferidos afectan a la expresión y conducen a la ausencia de producción de proteínas de caja MADS funcionales en las células. Debe observarse que la inhibición de la función de cajas MADS puede ser transitoria o permanente.

45 En una primera realización, el gen de caja MADS defectuoso se obtiene por delección, mutación, inserción y/o sustitución de uno o más nucleótidos en uno o más gen(s) de caja MADS. Esto se puede llevar a cabo por técnicas conocidas *per se* en la técnica, tales como p.ej., mutagénesis específica del sitio, mutagénesis por metanosulfonato de etilo (EMS), lesiones locales inducidas en genomas por direccionamiento (TILLING), recombinación homóloga, conjugación, etc.

50 El enfoque TILLING de acuerdo con la invención pretende identificar SNPs (polimorfismo de nucleótido único) y/o inserciones y/o delecciones en un gen de caja MADS de una población mutagenizada. Se pueden proporcionar series alélicas silenciosas, contrasentido, sin sentido, y mutaciones del sitio de empalme para examinar el efecto de diversas mutaciones en un gen.

Otro enfoque particular es la inactivación génica por inserción de una secuencia foránea, p.ej., mediante mutagénesis de transposón usando elementos genéticos móviles llamados transposones, que pueden ser de origen natural o artificial.

5 De acuerdo con otra realización preferida, la función de caja MADS defectuosa se obtiene por técnicas de bloqueo génico.

En la realización más preferida, la función de caja MADS defectuosa se obtiene mediante silenciamiento génico usando un mecanismo de interferencia por RNA, ribocimas o tecnologías antisentido. Dentro del contexto de la presente invención, el término “mecanismo de interferencia por RNA” o “RNAi” designa cualquier molécula de RNAi (p.ej., RNA de cadena sencilla o RNA de cadena doble) que puede bloquear la expresión de los genes de caja MADS y/o facilitar la degradación de mRNA por hidratación con las secuencias mRNA de caja MADS.

10 En una realización particular, una molécula de ácido nucleico inhibitoria que se usa para el silenciamiento génico comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia común para varios genes o RNAs de caja MADS. Tal secuencia puede, en particular, codificar el motivo de caja MADS. En una realización preferida, dicha molécula de ácido nucleico inhibitoria comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia presente en el gen MADS26 y que inhibe la expresión de un gen MADS26. En una realización particular, dicha molécula de RNAi comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia del gen MADS26 que comprende la secuencia GST1 o GST2. En una realización preferida, tal molécula de RNAi comprende una secuencia que produce un RNAi-GST1 o RNAi-GST2 con estructura de horquilla (Figura 2; SEQ ID NO: 16 y 17). En otra realización particular, tal molécula de ácido nucleico inhibitoria comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia presente en un gen MADS33 o MADS14 y que inhibe la expresión de dicho gen MADS33 o MADS14.

Como se ilustra en los ejemplos, las plantas interferidas con MADS26 son todavía viables, no muestran desarrollo de fenotipos aberrantes, y muestran una resistencia aumentada a los patógenos de plantas y al estrés por sequía.

15 La síntesis de las proteínas de caja MADS en una planta se puede reducir también mediante mutaciones o silenciamientos génicos implicados en las rutas de biosíntesis de las proteínas de cajas MADS. Alternativamente, la síntesis y/o actividad de las proteínas de caja de MADS se pueden manipular también mediante la (sobre) expresión de los reguladores negativos de los factores de transcripción de cajas MADS. En otra realización, un alelo mutante de un gen implicado en la síntesis de proteínas de caja MADS se puede (sobre) expresar en una planta.

20 La inactivación de la función de caja MADS se puede también llevar a cabo transitoriamente, p.ej., mediante la aplicación (p.ej., pulverización) de un agente exógeno a la planta, por ejemplo moléculas que inhiben la actividad de las proteínas de caja MADS.

La inactivación preferida es una inactivación permanente producida por la destrucción de uno o más genes de caja MADS, p.ej., por delección o por inserción de una secuencia extraña de un fragmento (p.ej., al menos 50 bp consecutivas) de una secuencia génica.

25 En una realización específica, más de un gen(s) de caja MADS defectuosos se obtienen por técnicas de bloqueo génico.

En otra realización, la función de caja MADS defectuosa se obtiene al nivel de la proteína de caja MADS. Por ejemplo, la proteína de caja MADS se puede inactivar exponiendo la planta a, o expresando en las células vegetales p.ej., elementos reguladores que interactúan con las proteínas de caja MADS o anticuerpos específicos.

30 Por lo tanto, la función de caja MADS en la resistencia de las plantas se puede controlar a nivel del gen de caja MADS, mRNA de caja MADS o proteína de caja MADS.

En una variante, la descripción se refiere a una planta con una resistencia aumentada al estrés biótico y/o abiótico, en donde dicha planta comprende un gen MADS26, MADS33, o MDAS14 inactivado, o un ortólogo de los mismos. En otra realización preferida, diversos genes de caja MADS presentes en la planta son defectuosos.

35 En otra variante, la descripción se refiere a una planta con resistencia aumentada al estrés biótico y/o abiótico, en donde dicha planta comprende al menos una proteína de caja MAD inactivada, p.ej, proteína MADS26, MADS33, o MDAS14.

En otra variante, la descripción se refiere a una planta con resistencia aumentada al estrés biótico y/o abiótico, en donde dicha resistencia aumentada se debe a la inactivación del factor de transcripción del mRNA de caja MAD, preferiblemente mRNA de MADS26, MADS33, o MADS14.

40 En otra realización, la descripción se refiere a plantas o células vegetales transgénicas que se han preparado para ser (más) resistentes al estrés biótico y/o abiótico mediante la inactivación de la función de las proteínas de caja MADS. En una realización particular, la planta modificada es una planta mutante de pérdida de función MADS26, MADS33, o MADS14, con resistencia aumentada al estrés biótico y/o abiótico.

La invención también se refiere a semillas de plantas de la invención, así como a plantas, o descendientes de plantas cultivadas u obtenidas de otra manera a partir de dichas semillas, teniendo dichas plantas una resistencia aumentada a patógenos.

5 La invención también se refiere a material vegetal de una planta de la invención, tal como raíces, hojas, flores, callos, etc.

Producción de plantas resistentes a factores de transcripción de caja MADS defectuosos

La descripción proporciona también un método para producir plantas que tienen una resistencia aumentada al estrés biótico y/o abiótico, en donde el método comprende las siguientes etapas:

- (a) inactivación de la función de un gen de caja MADS en una célula vegetal;
- 10 (b) opcionalmente, selección de células vegetales de la etapa (a) con la función de un gen de caja MADS inactivado;
- (c) regeneración de las plantas a partir de las células de las etapas (a) o (b); y
- (d) opcionalmente, selección de una planta de (c) con resistencia aumentada al estrés biótico y/o abiótico, teniendo dicha planta una función de un gen de caja MADS defectuosa.

15 Como se indicó anteriormente, la inactivación del gen de caja MADS se puede hacer usando diversas técnicas. La alteración genética en el gen de caja MADS se puede llevar a cabo también mediante transformación usando un plásmido Ti y un método de infección por *Agrobacterium*, de acuerdo con los protocolos conocidos en la técnica. En un método preferido, la inactivación se causa mediante mecanismos de interferencia por RNA o técnicas de bloqueo génico.

20 De acuerdo con otra realización preferida, las plantas resistentes al factor de transcripción de caja MADS defectuoso se obtienen por transformación de las células vegetales con un vector recombinante que expresa una molécula de RNAi que silencia el(los) gen(es) de caja MADS. Preferiblemente, dicho vector recombinante contiene una etiqueta de secuencia de genes (GST) específica de secuencia de ácido nucleico que codifica un factor de transcripción de caja MADS. En una realización particular, dicho vector de expresión contiene una secuencia marcada de SEQ ID NO: 16 (GST1) o una secuencia marcada de SEQ ID NO: 17 (GST2) que son ambas específicas de una secuencia cDNA de MADD26. En una realización preferida, el vector de expresión recombinante es pANDA:MADS26, preferiblemente pANDA-GST1 o pANDA-GST2. Típicamente, la molécula expresada adopta una conformación en hebilla y estimula la generación de RNAi frente a la secuencia marcada, p.ej., GST1 o GST2.

25 En la realización más preferida, las plantas resistentes de la invención comprenden una secuencia de ácido nucleico que expresa una molécula de RNAi que inhibe la expresión de un gen MADS26, y muestran una resistencia aumentada al estrés biótico y/o abiótico. Dicha planta puede producir moléculas de RNAi como se describió anteriormente.

30 La invención también se refiere a un cDNA aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de:

- 35 (a) una secuencia de ácido nucleico seleccionada de una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor de transcripción de MADS26 o un ortólogo del mismo, o un fragmento del mismo;
- (b) una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, 4, 6 o 8, o un fragmento de la misma;
- (c) una secuencia de ácido nucleico que hibrida a la secuencia de (a) o (b) bajo condiciones rigurosas, y codifica un factor de transcripción de MADS26 o un ortólogo del mismo; y
- 40 (d) un mutante de una secuencia de ácido nucleico de (a), (b) o (c).

45 Las condiciones de hibridación/lavado rigurosas son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, híbridos de ácido nucleico que son estables después de lavar en 0,1x SSC, 01% SDS a 60°C. Es bien conocido en la técnica que se pueden calcular condiciones de hibridación óptimas si la secuencia del ácido nucleico es conocida. Típicamente, las condiciones de hibridación se pueden determinar mediante el contenido en GC de ácido nucleico sujeto a hibridación. Típicamente, las condiciones de hibridación usan 4 – 6 x SSPE (20x SSPE contiene Xg de NaCl, Xg de NaH₂PO₄ H₂O y Xg de EDTA disueltos a 1 L y el pH se ajustó a 7,4); 5 – 10x solución Denhardtts (50x de solución Denhardtts contiene 5g de Ficoll), 5 g de polivinilpirrolidona, 5g albúmina de suero bovino; X DNA salmón/arenque sonificado; 0,1-1,0% de dodecilsulfato de sodio; opcionalmente 40-60% de formamida desionizada. La temperatura de hibridación variará dependiendo del contenido en GC de la secuencia objetivo de ácido nucleico pero estará típicamente entre 42-65°C.

50 La presente descripción también se refiere a un vector recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico como se describió anteriormente. Dicho vector recombinante se puede usar para transformar una célula o una planta

5 para incrementar la resistencia de la planta a patógenos fúngicos, o para seleccionar moduladores de resistencia. Vectores adecuados se pueden construir, conteniendo las secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Preferiblemente el ácido nucleico en el vector está bajo el control de, y operativamente unido a un promotor apropiado u otros elementos reguladores para la transcripción en una célula huésped tal como una microbiana, (p.ej., bacteriana), o célula vegetal. El vector puede ser un vector de expresión bi-funcional que funciona en múltiples huéspedes. En un aspecto preferido, el promotor es un promotor constitutivo o inducible.

Selección de plantas resistentes

10 La selección de células vegetales que tienen un gen de caja MADS defectuoso se puede hacer por técnicas conocidas *per se* por una persona experta (p.ej., PCR, hibridación, uso de un gen marcador seleccionable, dosificación proteica, transferencia western, etc).

15 La generación de plantas desde células modificadas se puede obtener usando métodos conocidos *per se* para el experto en la materia. En particular, es posible inducir, a partir de cultivos de callos u otras biomazas celulares indiferenciadas, la formación de brotes y raíces. Las plántulas así obtenidas se pueden plantar y utilizar par el cultivo. Métodos para la regeneración de plantas a partir de células están descritos, por ejemplo, por Fennell y colaboradores (1992) *Plant Cell Rep.* 11: 567-570; Stoeger y colaboradores (1995) *Plant Cell Rep.* 14: 273-278.

20 Las plantas resultantes pueden ser criadas e hibridadas de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica. Preferiblemente, se deben cultivar dos o más generaciones para asegurar que el genotipo o fenotipo es estable y hereditario.

25 La selección de plantas que tienen una resistencia aumentada al estrés biótico y/o abiótico puede hacerse aplicando el patógeno a la planta o exponiendo la planta a factores de estrés abiótico, determinando la resistencia y comparándola con una planta de tipo nativo. Dentro del contexto de esta invención, el término "resistencia aumentada" al estrés biótico y/o abiótico significa una resistencia superior a la de una planta de control tal como una planta de tipo nativo, a la que no se le ha aplicado el método de la invención. La "resistencia aumentada" también designa una manifestación reducida, debilitada o prevenida de los síntomas de la enfermedad provocados por un patógeno o un factor de estrés abiótico. Los síntomas de la enfermedad preferiblemente comprenden síntomas que conducen directa o indirectamente a un efecto adverso en la calidad de la planta, la cantidad del rendimiento, su uso para la alimentación, siembra, cultivo, cosecha, etc. Tales síntomas incluyen por ejemplo la infección y lesión de una planta o de una parte de la misma (p.ej., diferentes tejidos, hojas, flores, frutos, semillas, raíces, brotes), desarrollo de pústulas y camas de esporas en la superficie del tejido infectado, maceración del tejido, acumulación de micotoxinas, necrosis del tejido, lesiones de esporulación del tejido, manchas coloreadas, etc. Preferiblemente, de acuerdo con la invención, los síntomas de la enfermedad se reducen al menos en un 5% o 10% o 15%, más preferiblemente al menos un 20% o 30% o 40%, particularmente preferible un 50% o 60%, lo más preferible un 70% o 80% o 90% o más, en comparación con la planta control.

40 El término "resistencia aumentada" de una planta al estrés biótico y/o abiótico también designa una susceptibilidad reducida de la planta hacia la infección con patógenos de la planta y/o hacia el daño de la planta causado por factores de estrés abióticos, o la falta de tal susceptibilidad. Los inventores han demostrado, por primera vez, una correlación entre la expresión de un gen de caja MADS y la susceptibilidad hacia la infección. Como se muestra en la parte experimental, la sobreexpresión del gen MADS26 promueve la enfermedad, mientras que el mecanismo de interferencia por RNA en MADS26 aumenta la resistencia. Por lo tanto, los inventores han propuesto que la señalización del factor de transcripción de caja MADS aumenta la susceptibilidad de las plantas a la infección y favorece el desarrollo de la enfermedad debido a factores bióticos y abióticos.

45 Plantas o células preferidas de la descripción son plantas con mecanismos de interferencia por RNA de caja MADS, preferiblemente plantas con mecanismos de interferencia por RNA en MADS26, MAD 33 o MADS 14.

En la realización más preferida, el método de la invención se usa para producir plantas monocotiledóneas que tienen un gen MADS26 defectuoso, con una resistencia aumentada a patógenos fúngicos, bacterianos y/o estrés por sequía. Ejemplos de tales plantas y su capacidad para resistir patógenos y sequía se describen en la sección experimental.

50 Otros aspectos y ventajas de la invención se proporcionan en los siguientes ejemplos, que se dan con fines ilustrativos y no limitativos.

Ejemplos

1. Materiales y métodos – Material vegetal y condiciones de cultivo

55 Todos los experimentos se hicieron con *Oryza sativa japonica*, cv 'Nipponbare. Para la obtención de plántulas, las semillas de arroz se descascararon y la superficie se desinfectó por inmersión en etanol al 70% durante 1 min, se aclaró con agua destilada estéril y se trató con una solución al 3,84% de hipoclorito de sodio en 30 min. Finalmente

las semillas se aclararon cinco veces con agua destilada estéril. Las semillas se incubaron en agua destilada estéril en cámaras de crecimiento (16 horas de luz por día, 500 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 28°C/25°C día/noche) durante 2 días. Las semillas se transfirieron en placas rectangulares (245 mm x 245 mm, Corning, USA, 7 semillas por placa) que contienen 250 ml de la mitad del medio estándar (MS/2) Muashige and Skoog (Duchefa) solidificado por 8 g/L de agar tipo II (Sigma). Estas placas se transfirieron y se colocaron verticalmente en una cámara de crecimiento. Después de 7 días de cultivo, los órganos de las plántulas se muestrearon y se usaron para RT-QPR. Se aplicaron estrés salino y osmótico mediante la adición en el medio de cultivo de 150 nM de NaCl (Duchefa) o 100 mM de manitol (Duchefa), respectivamente (véase Figura 1). Las plantas se cultivaron en macetas de tierra (3L, Tref, EGO 140 www.Trefgroup.com) en invernaderos de contención (ciclos de 16 h-luz/8 h oscuridad, de 28°C a 30°C). Para el fenotipo del crecimiento de las plantas, las plantas pertenecientes a las diferentes líneas se colocaron arbitrariamente en el invernadero para evitar el efecto de la posición en el crecimiento de la planta. Veinte días después de la germinación (DAG), se midió la altura de la planta identificada desde la base del tallo hasta la punta de la hoja más alta en el vástago principal y el número de vástagos se midió una vez por semana hasta comenzar la floración. El principio de la floración se definió como la fecha en que apareció la primera espiguilla en la planta. La fecha de floración registra la fecha en se observan espiguillas en el 50% de los vástagos de la planta. Después de la cosecha, se determinó el peso en seco de toda la parte de la planta, excepto de la raíz, después de secar las plantas a 70°C durante 96 h. También se pesaron todas las panículas de cada planta después de secarlas a 37°C durante 3 días. Después se midió el porcentaje de fertilidad de las semillas y el peso de 1.000 semillas en la panícula principal. Este experimento se repitió dos veces con tres plantas por línea. El análisis estadístico de los datos obtenidos en estos experimentos se llevó a cabo usando el test ANOVA con un nivel de confianza del 5%.

Las condiciones de cultivo específicas usadas para ensayos de resistencia a patógenos y a sequía se detallan en las secciones correspondientes.

2. Construcción del plásmido para la transformación de la planta

El aislamiento del cDNA del OsMADS26 (Os08g02070) se hizo por RT-PCR. El RNA total se extrajo de 100 mg de plántulas de 7 días de edad puestas en tierra en nitrógeno líquido usando 1 ml de TRIzol (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. RNA (20 μg) fue incubado con 1 unidad de DNAsa RQ1 (Promega), 1,4 unidades de RNAsin (Promega) y MgCl_2 20 mM en agua estéril libre de RNAsa, durante 30 minutos a 4°C. RNA (2 μg) se desnaturalizó durante 5 min a 65°C y se transcribió de manera inversa con 22,5 μM del cebador oligodT(15) (Promega), con 10 u de transcriptasa inversa AMV (Promega) durante 90 min a 42°C. Una amplificación PCR se llevó a cabo con un par de cebadores específicos diseñados en las UTR 5' y 3' de OsMADS26 (PC8 Hacia adelante: 5'-aagcaagagatagggataag-3', PC8 Reversa: 5'-attacttgaatggttcaac-3'). El cDNA amplificado fue clonado usando el kit de clonación fácil pGEM-T de Promega. El plásmido obtenido se nombró pGEMT-PC8. A partir de este plásmido además se hicieron reacciones PCR usando cebadores específicos (véase Figura 3) que poseen la secuencia recombinante para recombinasa BP de la tecnología de clonación de puerta de enlace de Invitrogen en su extremo 5' para amplificar el cDNA de OsMADS26 (PC8 BP Hacia adelante: 5'-ggggacaagttgtacaaaaagcaggctgaagaggagaaggagg-3' y PC8 BP Reverso: 5'-ggggaccacttgtacaagaaagctgggtgctcctcaagagttcttag-3'), un fragmento de 215 bp situado en la UTR 5' de OsMADS26, llamado GST1 (PC8 BP Hacia adelante y GST1 Reverso: 5'-ggggaccacttgtacaagaaagctgggtcctcttctcctcctcc-3') y un fragmento de 321 bp que comprende el final del último exón y la mayor parte de la región UTR 3' de OsMADS26, llamado GST2 (GST2 Hacia adelante: 5'-ggggacaagttgtacaaaaagcaggctcatgatgtagcagatcaac-3' y PC8 BP Reverso) (véase figura 3). Las condiciones de ciclación por PCR fueron: 94°C durante 4 min (1 ciclo) y 94°C durante 1 min, una etapa de recocido a diversas temperaturas dependiendo del T_m de los cebadores usados (típicamente $T_m -5^\circ\text{C}$), durante 1,5 min, y 72°C durante 1 min (35 ciclos) con una etapa de extensión final de 5 min a 72°C. El PCR se realizó en un volumen final de 25 μl con 0,25 unidades de polimerasa *Taq* en tampón libre de MgCl_2 (Promega), MgCl_2 2mM, 200 nM cada dNTP, oligonucleótidos apropiados (1 μM) y cDNA (2 μl) o plásmido pGEMT-PC8 (10 ng). El cDNA de OsMADS26 de cola BP se clonó con la recombinasa BP en un vector binario modificado con sobreexpresión PCAMBIA 5300 denominado PC5300.OE (véase Tabla 1) donde el gen *ccdb* rodeado por los sitios de recombinación BP se clonaron entre el promotor constitutivo del gen ubiquina del maíz y el terminador del gen de la sintasa nopaline de *A. tumefaciens*. Después de la clonación la presencia del cDNA de OsMADS26 se verificó por secuenciación. El plásmido se nombró PC5300. OE-PC8 se transfirió a una cepa EHA 105 de *A. tumefaciens*. GST1 y GST2 con cola BP se clonaron mediante recombinación BP en el plásmido de entrada pDON207 (Invitrogen) y se transfirieron con la recombinasa LR (Invitrogen) en el plásmido binario pANDA (Miki y Shimamoto, 2004).

El vector pANDA (véase Figura 2) permite la expresión bajo el control del promotor constitutivo del gen ubiquitina del maíz del GST clonado con orientación en sentido y antisentido separados por una secuencia separadora GUS. La molécula expresada adopta una conformación de horquilla y estimula la generación de siRNA frente a la secuencia GST. La inserción de los GSTs se verificó por secuenciación. Los plásmidos obtenidos se nombraron pANDA-GST1 y pANDA-GST2, y se transfirieron en una cepa EHA105 de *A. tumefaciens* para la transformación de la planta.

Tabla 1: Lista de líneas transgénicas obtenidas por el método de la invención, líneas de control y vectores clonados.

60

Líneas	Nombre	Vector clonado
Sobreexpresión (PC)	PC-A	pCAMBIA5300.OE
	PC-B	
RNAi (GST1)	PD1-A	pANDA
	PD1-B	
RNAi (GST2)	PD2-A	pANDA
	PD2-B	
Control vacío	PCO	pCAMBIA5300.OE
Control vacío	PDO	pANDA
Tipo nativo	WT	

3. Transformación y selección de plantas

Las plantas transgénicas se obtuvieron mediante co-cultivos de callos derivados de embriones de semillas con la cepa EHA105 de *Agrobacterium* que llevaban los plásmidos binarios adecuados siguiendo el procedimiento detallado en Sallaud y colaboradores, (2003). Las líneas de monolocus y homocigotos se seleccionaron en base a la segregación del gen de resistencia al antibiótico llevado a cabo por el TDNA. Los ensayos de resistencia a los antibióticos se hicieron con plántulas de 5 días incubadas en placas Petri durante cinco días en papel Watman 3MM embebido con 6 ml de 0,3 mg ($5,69 \cdot 10^{-4}M$) de higromicina. La presencia y el número de construcciones transgénicas en el genoma de la planta se analizaron mediante transferencia de Southern. El DNA genómico total se extrajo de 200 mg del tejido de hojas de tierra de plantas transgénicas (generación T0 y T1) y plantas de control usando 900 μ l de un tampón mixto de bromuro de alquil trimetil amonio (MATAB) (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, NaCl 1,5 M, EDTA 20 mM, MATAB 2% (w/v), Polietilenglicol (PEG) 6000 1% (w/v), Na_2SO_4 0,5% (w/v)) e incubado a 72°C durante 1 hora. La mezcla se enfrió después a temperatura ambiente durante 10 min, y se añadieron 900 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v). Después de agitar y sedimentar a 6.000 g durante 10 min, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y 20U de RNasa A se añadieron, la mezcla se incubó a 37°C durante 30 min. La RNasa A se eliminó por un nuevo tratamiento con 900 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v) y el DNA genómico se precipitó finalmente después de la adición de 0,8 volúmenes de isopropanol a la fase acuosa. Para evaluar el número de inserciones de T-DNA en el genoma de las plantas transgénicas, 5 μ g de DNA genómico se escindieron durante la noche a 37°C con 20 unidades de *SacI* o *KpnI* (Biolabs) que cortaron en una sola posición el T-DNA derivado de los vectores PC5300.OE o pANDA, respectivamente. Los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis en 0,8% de gel agarosa con tampón TAE (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001M). Después de la incubación de 15x mn en 1L de HCl 0,25N después en 1L de NaOH 0,4N durante 30 min, el DNA se transfirió por capilaridad en condiciones alcalinas (NaOH 0,4N) en una membrana Hybond N+ (Amersham Biosciences). Las membranas se prehibridizaron durante 4h a 65°C en un tampón que contiene Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, 5X SSC, 0,2% SDS (w/v) (Eurobio, France), solución 1X Denhardt's (Denhardt 50X, Sigma, ref. 2532) y 50 μ g de ADN de esperma de salmón fragmentado. La hibridación se llevó a cabo durante la noche a 65°C en un tampón que contiene Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10mM pH 8, 5X SSC, 0,2% SDS (w/v) (Eurobio, France), solución 1X Denhardt's (Denhardt 50X, Sigma, ref. 2532), 40 μ g de ADN de esperma de salmón fragmentado y 10% de sulfato de Dextrano (w/v). Para comprobar los números de copia de TDNA se desnaturalizaron 80 ng de un fragmento de 550 bp del gen de resistencia a higromicina *hph*, marcado con [α - ^{32}P] con el kit de cebado aleatorio (AmershamTM, UK) 10 min a 95°C y se añadieron a la mezcla de hibridación. Después de la hibridación, las membranas se lavaron a 65°C, durante 15 min en 80 ml de tampón S1 que contiene 2X SSC, 0,5% SDS (Eurobio, Francia) (v/v), durante 30 min en 50 ml de tampón S2 que contiene 0,5X SSC y 0,1% SDS (v/v) y finalmente durante 30 min en 50 ml de tampón S3 que contiene 0,1X SSC y 0,1% SDS (v/v). Las membranas se pusieron en contacto con una pantalla radiosensible (Amersham Bioscience, "Storage Phosphor Screen unmounted 35x43", ref. 63-0034-80) durante 2-3 días. La revelación se llevó a cabo con un escáner phosphoimageur (Storm 820, Amersham). Para comprobar la integración completa de las construcciones que permiten la expresión constitutiva de *OsMADS26* o la expresión de las moléculas en horquilla diseñadas con el GSTs específico de *OsMADS26*, el ADN genómico de las plantas se escindió con *kpnI* y *BamH1* o *SacI* y *KpnI* respectivamente. La transferencia de Southern se hizo usando sondas específicas de ORF8 o GST1 o GST2 marcadas con [α - ^{32}P] dependiendo de la construcción (véase Figura 3). La expresión de *OsMADS26* en las líneas transgénicas seleccionadas se analizó por RT-QPCR.

4. Análisis cuantitativo en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa inversa (RT-qPCR)

El material vegetal se recogió, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, y se almacenó a -80°C. Los tejidos se molieron en nitrógeno líquido. El RNA total se extrajo de 100 mg de los tejidos molidos con 1 ml de TRIzol (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El RNA total se cuantificó de acuerdo con su absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro nanoquant Tecan. Cinco µg de RNA se trataron para eliminar el DNA genómico residual durante 30 min a 37°C con 5U de DNAsa RQ1 (Promega) y 1 µl de tampón de reacción 10X DNAsa RQ1 libre de RNAsa en un volumen final de 10 µl. Después, se añadió 1 µl de solución de parada DNAsa RQ1 para terminar la reacción y la mezcla se incubó a 65°C durante 10 min para inactivar la DNAsa. La primera cadena de síntesis de cDNA se hizo en 20 µl de volumen final usando un kit Superscripts III (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La presencia de DNA genómico en la muestra se comprobó por una reacción PCR usando 1 µl de cDNA como plantilla y cebador: Act-F (5'-ggcttctctcagcaccttccagac-3'), Act-R (5'-cgatatctggagcaaccaaccaca-3') diseñada en dos exones que rodean un intrón de la actina que codifican el gen (Os01g73310.1). La PCR se realizó en un termociclador Techne (TC-512) como sigue: 95°C durante 3 min; 30 a 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 60°C durante 1 min, y 72°C durante 1 min; con una extensión final a 72°C durante 7 min. La PCR se realizó con 0,5 U de polimerasa Taq en un volumen final de 50 µl del correspondiente tampón (Biolab) y MgCl₂ 2 mM (Biolab), 0,08 mM de dNTP (Fermentas) y 0,02 µM de cada cebador específico. Diez µl de los 50 µl del producto de la PCR se separaron en 1% (w/v) de gel de agarosa en tampón 1X TAE y se visualizó bajo UV después de la tinción con (6 gotas/L) bromuro de etidio. Para el análisis RT-qPCR del patrón de expresión génica se diseñaron cebadores específicos primarios (F) e inversos (R) para amplificar un fragmento de 200-400 bp en el sitio 3' no traducido (3'-UTR) de cada gen estudiado usando el software del vector NTI (versión 10.1) con parámetros predeterminados. El RT- qPCR se llevó a cabo con un sistema LightCycler 480 (Roche) usando una mezcla maestra verde SYBR (Roche) que contiene tampón optimizado, dNTP y DNA polimerasa Taq, y se fabricó como se describe en el manual del usuario. La reacción se llevó a cabo en placas de reacción óptica de 96 pocillos (Roche). La mezcla de reacción contenía 7,5 µl de mezcla maestra verde SYBR para QPCR (Roche), 250 nm de cada cebador (F y R), y 3 µl de la plantilla de cDNA diluida 10 veces. Todas las reacciones se calentaron a 95°C durante 5 min, seguido por 45 ciclos de 95°C durante 10 s y 60°C durante 30 s. El análisis de la curva de fusión y la electroforesis en gel de los productos de PCR se usaron para confirmar la ausencia de productos de amplificación no específicos. También se detectaron los transcritos de un gen EP (Proteína expresada, Os06g11070.1) y se usaron como control endógeno para normalizar la expresión de otros genes. EP se eligió como gen de mantenimiento porque su expresión pareció ser la más estable en diferentes tejidos y condiciones fisiológicas (Canada y colaboradores, 2007). El nivel de expresión relativa se calculó restando los valores de C_t (ciclo umbral) para EP de los del gen diana (para dar ΔC_t), después ΔΔC_t y calcular 2^{-ΔΔC_t} (Giulietti y colaboradores, 2001). Las reacciones se realizaron por triplicado para proporcionar las réplicas técnicas y todos los experimentos se replicaron al menos una vez con resultados similares.

Resultados: los inventores han confirmado que se silenció la expresión de MADS26 en las plantas PD1A, PD1B, PD2A y PD2B con mecanismo de interferencia por mRNA en OsMADS26 (Figura 4 B y D) mientras que el nivel de expresión de MADS26 en plantas transgénicas PCA y PCB que sobreexpresan el OsMADS26 es al menos 20 veces más importante que la expresión de MADS26 en las plantas de control (Figura 4A).

5. Ensayos de resistencia frente a *Magnaporthe oryzae*

Además para el estudio de líneas transgénicas, se usó *O. sativa japonica* cv Maratelli como un control susceptible. Las plantas se sembraron en bandejas de 40x29x7 cm llenas con abono de Neuhaus S pH 4-4,5 y Pozzolana (70 litros de Neuhaus S mezclados con 2 palas de Pozzolana). Diez semillas de cada línea se sembraron en filas en una bandeja que contenía 12 líneas cada una. Las plantas se cultivaron hasta la etapa de 4-5 hojas en un invernadero con un termoperiodo de 26/21°C (día/noche), un fotoperiodo de 12 h bajo una intensidad de luz de 400-600 W/m². El riego se realizó todos los días y una vez a la semana se suministró una solución nutritiva compuesta de 1,76 g/L de Algosped (Laboratoire Algochimie, Chateau-Renault, Francia) y 0,125 g/L de Ferge (FERVEG, La Rochelle, Francia). El GUY 11 aislado (CIRAD Collection, Montpellier, Francia) de *M. oryzae* se usó para inoculación. Este aislado es compatible con *O. Sativa* cv Nipponbare y genera síntomas susceptibles parciales. Los hongos se cultivaron en placas Petri que contenían 20 ml de medio compuesto de 20 g/l de harina de semillas de arroz preparadas con arroz con cáscara molido a máquina (Commercial Blendor American) durante 3 min, 2,5 g/l de extracto de levadura (Roth -2363.3), 1,5% de agar (VWP, 20768.292) después de tratar en un autoclave con 500.000 unidades/L de penicilina G estéril (Sigma P3032-10MU). Los cultivos de hongos se llevaron a cabo en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 12 h y una temperatura constante de 25°C durante 7 días. Después de 7 días, se recogieron los conidios de las placas por inundación de la placa con 10 ml de agua destilada estéril y filtrándolo a través de dos capas de gasa para separar el fragmento de micelio de la suspensión. La concentración en conidios de la suspensión se ajustó a 50.000 conidios ml⁻¹ y se suplementó con 0,5% (w:v) de gelatina (Merck). Las inoculaciones se llevaron a cabo en plántulas de 4-5 hojas pulverizando con 30 ml de las suspensiones de conidios en cada bandeja. Las plántulas inoculadas se incubaron durante 16 h en una cámara climática controlada a 25°C, 95% de humedad relativa y se transfirió de nuevo al invernadero. Después de 3 a 7 días, las lesiones en las hojas del arroz se clasificaron en categorías resistentes o susceptibles y se contaron. Los datos presentados son representativos de los datos obtenidos para tres repeticiones independientes de la experimentación.

Resultados: Los inventores han demostrado en la Figura 5 que las plantas PD1A, PD1B, PD2A y PD2B con el mecanismo de interferencia por mRNA en OsMADS26 son más resistentes a los patógenos fúngicos mientras que las plantas PCA y PCB que sobreexpresan el gen OsMADS26 son más susceptibles a las enfermedades fúngicas.

6. Ensayo de resistencia frente a *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Xoo)

Los ensayos de resistencia frente a *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Xoo) se llevaron a cabo con plantas de arroz de 2 meses cultivadas en las mismas condiciones descritas anteriormente para los ensayos de resistencia a *M. oryzae*. Después de 2 meses, las plantas se transfirieron del invernadero a una cámara de cultivo proporcionando luz 12 h a 28°C (5 tubos fluorescentes) y 12 h en oscuridad (0 tubos fluorescentes) a ciclos circadianos de 21°C. Para evaluar la expresión de los genes identificados como marcadores de defensa en las diferentes líneas estudiadas en ausencia de patógenos, un mes antes de la infección, se recogieron las hojas más jóvenes y las más jóvenes antes de ser totalmente expandidas agrupando 3 plántulas en la misma línea. Esta muestra se usó para el análisis QPCR con cebadores específicos de genes de defensa. Se cultivó la cepa PX099 de Xoo, un cepa representativa de la raza 6 de Filipinas (Song y colaboradores. 1995) en un medio PSA (10 g/l de peptona, 10 g/L de sacarosa, 1 g/L de ácido glutámico, 16 g/L de bacto-agar, pH 7,0) durante 3 días a 27°C. La inoculación del tizón bacteriano se llevó a cabo usando el método de recorte de hojas descrito por Kauffman y colaboradores (1973). Las células bacterianas de Xoo se suspendieron en 50 ml de agua estéril para obtener una densidad óptica de 0,5 medido a 600 nm (OD600). La suspensión de células bacterianas se aplicó a las dos hojas más jóvenes totalmente expandidas en el vástago principal de plantas de 2 meses cortando la hoja a 5-6 cm de la punta usando un par de tijeras sumergidas en la solución de Xoo. La longitud de la lesión (LL) se midió 14 días después de la inoculación (dpi) de acuerdo con los criterios descritos previamente (Amante-Bordeos y colaboradores. 1992). Los datos presentados son representativos de los datos obtenidos para dos repeticiones independientes de la experimentación. Después de la medición de los síntomas, las hojas infectadas se recogieron también en nitrógeno líquido y se usaron para la extracción del RNA y el análisis QPCR para medir el nivel de expresión de diferentes genes de defensa.

Resultados: los inventores han demostrado en la Figura 6 que las plantas PD1A, PD1B, PD2A y PD2B con el mecanismo de interferencia por mRNA en OSMADS26 son más resistentes a los patógenos bacterianos mientras que las plantas PCA y PCB que sobreexpresan el gen OsMADS26 son más susceptibles a las enfermedades bacterianas. De hecho, las plantas PCA y PCB tienen muchas más lesiones que las plantas PD1A, PD1B, PD2A y PD2B.

7. Ensayos de resistencia frente al estrés hídrico

Las plantas se germinaron en un medio líquido de fuerza media MS en una cámara de crecimiento durante 7 días y se transplantaron al suelo y se cultivaron en el invernadero en las mismas condiciones descritas anteriormente. Cada maceta se llenó con la misma cantidad de tierra (Tref, EGO 140), plantada con 5 plántulas y regada con el mismo volumen de agua. Después de un mes, las plantas se sometieron a 18 días de retención de agua seguida de 15 días de riego. La tolerancia a la sequía se evaluó determinando el porcentaje de plantas que sobrevivían o continuaban creciendo después del periodo de recuperación. Los valores Fv/Fm de las plantas fueron medidos cada día después de la retención de agua con un fluorómetro modulado por pulsos (Handy PEA, EUROSEP Instruments) como se describió previamente (Jang y colaboradores. 2003; Oh y colaboradores. 2005). Este experimento se realizó en 20 plantas por línea y se repitió tres veces. El análisis estadístico de los datos obtenidos en estos experimentos se llevó a cabo usando el software R a un nivel de confianza del 5%. Durante el estrés al agua, el contenido relativo en agua (RWC), de hojas se midió de acuerdo a Barrs y Weatherly, 1962. Se cortó una sección de media hoja de aproximadamente 1 x 7 cm con tijeras de la parte superior de la hoja más expandida de cinco plantas. Las otras hojas se cosecharon también, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para la extracción del RNA y el análisis RT-qPCR de la expresión de los genes relacionados con el estrés. Para la medida RWC, cada sección de la hoja se prepesó herméticamente para obtener el peso de la muestra de la hoja (W). Después de eso, la muestra se hidrató inmediatamente hasta turgencia total. La parte basal de la hoja se colocó en el fondo de un tubo tapado Stardet de 50 ml que contiene 15 ml de agua desionizada y se incubó a temperatura ambiente. Después de 4h se separó la hoja y se secó rápidamente y ligeramente con un papel de filtro e inmediatamente se pesó para obtener un peso totalmente túrgido (TW). La muestra se secó después a 80°C durante 24 h y se pesó para determinar el peso seco (DW). El RWC se calculó como sigue: $RWC (\%) = [(W-DW) / (TW-DW)] \times 100$. En base a los resultados de este cálculo, se sacaron las muestras almacenadas a -80°C de dos plantas. La extracción de RNA y el RT-qPCR se llevó a cabo a partir de dos plantas de cada línea que tenían el mismo RWC, como se describió anteriormente con los cebadores específicos de los genes identificados como marcadores para el estrés por sequía y alta salinidad en el arroz: rab21, una deshidrina de arroz (número de registro AK109096), salT (proteína inducida por el estrés salino, número de registro AF001395), y dip1 (proteína 1 inducida por el estrés a la deshidratación, número de registro AY587109) genes (Claes y colaboradores. 1990; Oh y colaboradores. 2005; Rabbani y colaboradores. 2003).

Resultados: los inventores han descubierto que el gen OsMADS26 se induce bajo estrés osmótico (Figura 7) y que el perfil de expresión de OsMADS26 es diferente en diversos órganos de las plantas (Figura 1). Los inventores han demostrado también que el gen OsMADS26 se silencia en plantas con el mecanismo de interferencia por RNAi (líneas 2PD1-A, 2PD1-B, 2PD2-A, 2PD2-B) (Figura 8A) y que bajo estrés osmótico, el gen MADS26 está todavía silenciado (Figura 8B). Finalmente, en las Figuras 9 y 10, los inventores han demostrado que las plantas con RNA de transferencia en MADS26 son más resistentes al estrés por sequía y las plantas que sobreexpresan el gen MADS26 son menos resistentes al estrés por sequía.

8. Ortólogos del MADS26

Además, los inventores han llevado a cabo búsquedas de Tblast con la proteína MADS26 a partir del arroz y han identificado mediante la búsqueda blastp varios ortólogos putativos en trigo, sorgo y maíz. Par ver si la homología dejaba patente la relación filogenética y posiblemente la homología funcional, los inventores han probado si los

5 homólogos de los cereales eran a su vez los mejores éxitos de explosión (Mejores éxitos de explosión mutuos = BBMH) en arroz.

Especies	SEQ ID NO MADS26 mejor homólogo	Mejor homólogo Registro (1)	Identidad del aminoácido (%)
Trigo	SEQ ID NO: 3	CAM59056	65%
Sorgo	SEQ ID NO: 5	XP_002443744.1	66%
maíz	SEQ ID NO: 7	ABW84393	85%

Tabla 2. Ortólogos de MADS26

(1) Se buscó las secuencias SEQ ID NO:2 de la proteína MADS26 frente a trigo, sorgo y maíz usando blastp

10 en la base de datos de secuencias del ncbi.

Conclusiones

En conjunto, los datos de expresión y los datos de fenotipo indican que el gen MADS26 es un regulador negativo de la resistencia a Magnaporthe oryzae, a Xanthomonas oryzae y al estrés por sequía. Este es el primer ejemplo encontrado de un factor de transcripción de plantas de la familia de caja MADS que regula negativamente la

15 respuesta al estrés biótico y abiótico.

LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

```
>Os08g02070.1 CDS
ATGGCGCAGGGCAAGGTGCGAGCTCCGTGCGCATCGAGAACCCGGTTACCGTCAGGTCACC
TTCTGCAAGCGCGCTGCCGGCCTGCTGAAGAAGGCCAGGGAGCTCTCCATCCTCTGCGAG
GCCGACATCGGCATCATCATCTTCTCCGCCACGGCAAGCTCTACGACCTCGCCACCACC
GGAACCATGGAGGAGCTGATCGAGAGGTACAAGAGTGCTAGTGGCGAACAGGCCAACGCC
TGCGGCGACCAGAGAATGGACCCAAAACAGGAGGCAATGGTGCTCAAACAAGAAATCAAT
CTACTGCAGAAGGGCCTGAGGTACATCTATGGGAACAGGGCAAATGAACACATGACTGTT
GAAGAGCTGAATGCCCTAGAGAGGTAAGTACTAGAGATATGGATGTACAACATTCGCTCCGCA
AAGATGCAGATAATGATCCAAGAGATCCAAGCACTAAGAGCAAGGAAGGCATGTTGAAA
GCTGCTAACGAAATCTCCAAGAAAAGATAGTAGAACAGAAATGGTCTGATCGACGTAGGC
ATGATGGTAGCAGATCAACAGAAATGGGCATTTTAGTACAGTCCCACTGTTAGAAGAGATC
ACTAACCCACTGACTATACTGAGTGGCTATTCTACTTGTAGGGGCTCGGAGATGGGCTAT
TCCTTCTAA
```

20 SEQ ID NO: 2

```
>Os08g02070.1 PROT
MARGKVQLRRIENPVHRQVTFCKRRAGLLKKARELSILCEADIGIIFSAHGKLYDLATT
GTMEELIERYKSASGEQANACGDQRMDPKQEAMVLKQEIINLLQKGLRYIYGNRANEHMTVEE
MEELIERYKSASGEQANACGDQRMDPKQEAMVLKQEIINLLQKGLRYIYGNRANEHMTVEE
LNALERYLEIWMYNIIRSAKMQIMIQEIQALKSKEGMLKAANEILQEKIVEQNLIDVGM
VADQQNGHFSTVPLLEEITNPLTILSGYSTCRGSEMGSF*
```

SEQ ID NO: 3

TaMADS26 putativo

ES 2 617 990 T3

>CAM59056
MARGKVQLRR IENPVHRQVT FCKRRAGLLK KARELSVLC D ADIGIIIFSA HGKLYDLATT
GTMDGLIERY KSASGEGMTG DCGDQQRVDP KQEAMVLKQE IDLLQKGLRY IYGNRANEHM
NVDELNALER YLEIWMFNIR SAKMQIMIQE IQALKSKEGM LKAANEILQE KIVEQHGLID
VGMTIADQQN GHFSTVPMLE EITNPLTILS GYSTCRGSEM GYSF

La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 deriva de

SEQ ID NO: 4

> AM502878
atggcgagag gcaaggtcca gctccggcgc atcgagaacc cegtccaccg gcaggtcacc
ttctgcaagc gccgcgcagg gctcctcaag aaggccaggg agctctctgt cctctgcgac
gccgacatcg gcatcatcat cttctccgca cacggcaagc tctacgacct cgccaccacc
ggaaccatgg atgggctgat cgagaggtag aagagtgccg gtggagaagg catgaccggc
gacggctgcg gcgaccagag agtggacca aagcaggagg caatggtgct gaaacaagaa
atagaccttc tgcagaaggg actgaggtag atttatggaa acagggcaaa tgagcacatg
aatgttgacg agctgaatgc cctggagagg tacttgaga tatggatggt caacatccgc
tccgcaaaga tgcagataat gattcaagag atccaggcac tgaagagcaa ggagggcatg
ttgaaagctg ccaacgaaat tctccaggaa aagatagtag aacagcatgg actgatcgac
gtaggcatga ctatagcaga tcagcagaat gggcatttta gtacagtccc aatgttagag
gagatcacta acccactgac tatactgagt ggctattcta cttgtagggg ctcagagatg
ggctattcct tctga

5

SEQ ID NO: 5

Sorgo MADS26 putativo

>XP_002443744.1
MARGKVQLRR IENPVHRQVT FCKRRAGLLK KARELSVLC D AHIGIIIFSA HGKLYDLATT
GTMEELIDRY KTASGEAADG SGNRMDPKQ ETMVLQEQIN LLQKGLRYIY GNRANEHMNV
DELNALERYL EIWMYNIRSA KMQIMIQEIQ ALKSKEGMLK AANEILREKI VEQSSLLDVG
MNVADQQNGH FSTVPLIEEI TNPLTILSGY SNCRGSEMGY SF

10

La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 deriva de

SEQ ID NO: 6

> XM_002443699
atggcgcggg gcaaaagtgca gctgcgggcg atcgagaacc cgggtgcaccg gcaggtgacc
ttctgcaagc gccgcgcggg gctgctcaag aaggcaccgg agctctccgt cctctgcgac
gcccacatcg gcatcatcat cttctccgca cacggcaagc tctacgacct cgccaccacc
gggaccatgg aagagctgat cgacaggtag aagactgccg ggggagaagg tgccgacggc
tccggcgaca acagaatgga tccaaaacaa gaaaccatgg tgctgcaaca ggaaatcaat
ctgctccaga aaggactcag gtacatctac gggaacaggg caaatgaaca catgaatggt
gacgaaactga atgcccctga gaggtacttg gagatattga tgtacaacat ccgctctgca
aagatgcaga taatgattca agagatacaa gcactaaaaa gcaaggaagg catggtgaaa
gctgctaacg aaattctccg ggaaaagata gtagaacaga gtatggtgct tgatgtaggc
atggtggtag cggatcaaca gaatggcat ttagtacag tcccactgat agaagagatc
actaaccac tgactatact gagtgatatt tctaactgta ggggctcaga gatgggctat
tccttctaa

15

SEQ ID NO: 7

Zea mays MADS26 Putativo

>ABW84393
MGRGKVKQLKR IENKINRQVT FSKRRSGLLK KAHEISVLCDAEVALIIFST KGKLYEYSTD
SCMDKILDREYRYSAEKVL ISVESETQGN WCHEYRKLKA KVETIQKCQK HLMGEDLETL
NLKELQQLEQ QLESSLKHIR TRKSQMLLES ISELQRKEKS LQEENKVLQK ELAEKQKAQR
KQVQWQQTQQ QTSSSSSCFM IREAAPTTNI SIFPVAAGGR LVEGAAAQFQ ARVGLPPWML
SHLSS

La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 deriva de

SEQ ID NO: 8

> EU012444
atggggcgcg gtaaggtgca gctgaagcgg atcgagaaca agatcaaccg ccaggtgacc
ttctccaagc gccgctcggg gctgctcaag aaggcgcacg agatctccgt gctctgcgac
gccgaggtcg cgctcatcat cttctccacc aaaggggaagc tctacgagta ttccaccgat
tcatgtatgg acaaaaattct tgaccggtag gagcgctact cctatgcaga aaaggttctt
atctcagtag aatctgaaac tcagggcaat tgggtgccag agtatagaaa actaaaggcg
aaggtcgaga caatacaaaa atgtcaaaaag cacctcatgg gagaggatct tgaacggtg
aatctcaaag agcttcagca actagagcag cagctggaga gttcactgaa acatatcaga
accaggaaga gccagcttat gctcgagtca atttcggagc tccaacggaa ggagaagtcg
ctgcaggagc agaacaaggt tctgcagaag gagctcgcgg agaagcagaa agcccagcgg
aagcaagtgc aatggggcca aaccaaacag cagaccagtt cgttctctc gtgcttcatg
ataagggaag ctgccccaac aacaaatc agcatttttc ctgtggcagc aggggggagg
ttggtggaag gtgcagcagc gcagccacag gctcgcggtg gactaccacc atggatgctt
5 agccacctga gcagctga

SEQ ID NO: 9

MADS33
>Os12g10520.1
MVRGKVMRRIENPVHRQVTFCKRRGGLLKKARELSVLCDAADVGVIIIFSSQGLHELATN
GNMHNLVERYQSNVAGGQMEPGALQRQQVAEQGIFLLREEIDLQRGLRSTYGGGAGEMT
LDKLHALEKGLELWIYQIRTKMQMMQEIQFLRNKEGILKEANEMLQEKVKEQQKLYMS
LLDLHSQQPTQPMTYGNRFFSI*

10 SEQ ID NO: 10

MADS14
>Os03g54160.1
MGRGKVKLKR IENKINRQVTFCKRRSGLLKKANEISVLCDAEVALIIFSTKGKLYEYATD
SCMDKILERYERYSAEKVLSAESDTQGNWCHEYRKLKAKVETIQKCQKHLMGEDLES
NLKELQQLEQQLENSLKHIRSRKSQMLLES INELQRKEKSLQEENKVLQKENPCSFLLQLV
EKQKVKQKQVWDQTPQTSSSSSSFMREALPTTNI SNYPAAAGERIEDVAAGQPQHVR
IGLPPWMLSHING*

15 SEQ ID NO: 11

HvMADS26 putativo

>CAB97351
MGRGPVQLRR IENKINRQVT FSKRRSGLLK KAHEISVLCDAEVALIVFST KGKLYEYSSQ
DSSMDVILER YQRYSEFEERA VLDPSTGDQA NWDDEYGS LK I KLDALQKSQ RQLLGEQLDP
LTTKELQQLE QQLDSSLKHI RSRKNQLLFE SISELQKKEK SLKDQNGVLQ KHLVETEKEK
NNVLSNIHHR EQLNEATNIH HQEQLSGATT SSPSPPTPTA QDSMAPPNIG PYQSRGGGDP
EPQPSPAQAN NSNLPPWMLR TIGNR

SEQ ID NO: 12

20 HvMADS26 putativo

> CAB97355
MGRGRVELKR IENKINRQVT FAKRRNGLLK KAYELSVLCD AEVALIVFSN RGKLYEFCST
QSMTKILDKY QKCSYAGPET TVQNRENEQL KNSRNEYLKL KTRVDNLQRT QRNLLGEDLD
SLGIKELES� EKQLDSSLKH IRTRTQHMV DQLTELQRRE QMFSEANKCL RIKLEESNQV
HGQQLWEHNN NVLSYERQPE VQPQMHGGNG FFHPLDAAGE PTLHIGYPPE SLNSSCMTTF
MPPWLP

SEQ ID NO: 13

HvMADS26 putativo

> AAW82994
MGRGKVQLKR IENKINRQVT FSKRRSGLLK KAHEISVLCD AEVGLIIFST KGKLYEFSTE
SCMDKILERY ERYSYAEKVL VSSESEIQGN WCHEYRKLKA KVETIQKQK HLMGEDLESŁ
NLKELQQLEQ QLESŁLKHIR ARKNQLMHES ISELQKKERS LQENKVLQK ELVEKQKAQA
AQQDQTQPQT SSSSSSFMMR DAPPVADTSN HPAAAGERAE DVAVQPQVPL RTALPLWMVS
HING

5

SEQ ID NO: 14

HvMADS26 putativo

> CAB97354
MGRGKVQLKR IENKINRQVT FSKRRNGLLK KAHEISVLCD AEVAVIVFSP KGKLYEYATD
SSMDKILERY ERYSYAEKAL ISAESESEGN WCHEYRKLKA KIETIQKCHK HLMGEDŁDSL
NLKELQQLEQ QLESŁLKHIR SRKSHLMES ISELQKKERS LQENKALQK ELVERQKAAS
RQQQLQQQQQ QQQMWEHQHA QTQHTHTQN QPQAQTSSSS SŞFMMRDQQA HAPQONICSY
PPVTMGGEAT AAAAAPEQQA QLRICLPPWM LSHLNA

10

SEQ ID NO: 15

HvMADS26 putativo

> ACB4530
MGRGRVELKR IENKINRQVT FAKRRNGLLK KAYELSVLCD AEVALIIFSN RGKLYEFCŞG
QSMPKILERY QKCSYGGPDT AIQNKENELV QSSRNEYLKL KARVENLQRT QRNLLGEDŁG
SLGIKDLEQL EKQLDSSLRH IRSTRQHML DQLTDLQRKE QMLSEANKCL RRKLEESSQQ
MQGQMWEQHA ANLLGYDHLR QSPHQQAQH HGGNGFFHPL DPTTEPTLQI GYTQEQINNA
CVAASFMPW LP

15

SEQ ID NO: 16

GST1 (215bp) específico de OsMADS26 (véase Figura 3)

SEQ ID NO: 17

GST2 (321bp) específico de OsMADS26 (véase Figura 3)

20

Referencias

- 5 Alvarez-Buylla, E.R., Liljegren, S.J., Pelaz, S., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Vergara-Silva, R., y Yanofsky, M.F. (2000). MADS-box gene evolution beyond flowers: expresión in pollen, endosperma, guard cells, roots and trichomes. *Plant J* 24, 457-466.
- Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Singh, A.K., Singh, V.P., Tyagi, A.K., y Kapoor, S. (2007). MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. *BMC Genomics* 8, 242.
- 10 Fang, S.C., y Fernandez, D.E. (2002). Effect of regulated overexpression of the MADS domain factor AGL15 on flower senescence and fruit maturation. *Plant Physiol* 130, 78-89.
- Fernandez, D.E., Heck, G.R., Perry, S.E., Patterson, S.E., Bleecker, A.B., y Fang, S.C. (2000). The embryo MADS domain factor AGL15 acts postembryonically. Inhibition of perianth senescence and abscission via constitutive expression. *Plant Cell* 12, 183-198.
- 15 Khush, G.S. (2005) What it will take to Feed 5.0 Billion Rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biologi*, 59(1):1-6.
- Khush, G.S. y Jena, K.K. (2009). Current status and future prospects for research on blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.). In GL Wang (ed.) and B Valent (ed.). *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*, p.1-10, Springer.
- 20 Lee, S., Woo, Y.M., Ryu, S.I., Shin, Y.D., Kim, W.T., Park, K.Y., Lee, I.J., y An, G. (2008). Further characterization of a rice AGL12 group MADS-box gene, OsMADS26. *Plant Physiol* 147, 156-168.
- Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L., y Yanofsky, M.F. (2000). SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* 404, 766-770.
- Mao, L., Begun, D., Chuang, H.W., Budiman, M.A., Szymkowiak, E.J., Irish, E.E., y Wing, R.A. (2000). JOINTLESS is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature* 406, 910-913.
- 25 Messenguy, F., y Dubois, E. (2003). Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* 316, 1-21.
- Montiel, G., Breton, C., Thiersault, M., Burlat, V., Jay-Allemand, C., y Gantet, P. (2007). Transcription factor Agamous-like 12 from Arabidopsis promotes tissues-like organization and alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* suspension cells. *Metab Eng* 9, 125-132.
- 30 Parenicova, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D.S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H.E., Ingram, R.M., Kater, M.M., Davies, B., Angenent, G.C., y Colombo, L. (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. *Plant Cell* 15, 1538-1551.
- Shore, P., y Sharrocks, A.D. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem* 229, 1-13.
- 35 Tapia-Lopez, R., García-Ponce, B., Dubrovsky, J.G., Garay-Arroyo, A., Perez-Ruiz, R.V., Kim, S.H., Acevedo, F., Pelaz, S., y Alvarez-Buylla, E.R. (2008). An AGAMOUS-related MADS-box gene, XAL1 (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in Arabidopsis. *Plant Physiol* 146, 1182-1192.
- Theissen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J.T., Munster, T., Winter, K.U., y Saedler, H. (2000). A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol Biol* 42, 115-149.
- 40 Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W., y Giovannoni, J. (2002). A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (rin) locus. *Science* 296, 343-346.

ES 2 617 990 T3

Ser Ala His Gly Lys Leu Tyr Asp Leu Ala Thr Thr Gly Thr Met Glu
50 55 60

Glu Leu Ile Glu Arg Tyr Lys Ser Ala Ser Gly Glu Gln Ala Asn Ala
65 70 75 80

Cys Gly Asp Gln Arg Met Asp Pro Lys Gln Glu Ala Met Val Leu Lys
85 90 95

Gln Glu Ile Asn Leu Leu Gln Lys Gly Leu Arg Tyr Ile Tyr Gly Asn
100 105 110

Arg Ala Asn Glu His Met Gly Thr Met Glu Glu Leu Ile Glu Arg Tyr
115 120 125

Lys Ser Ala Ser Gly Glu Gln Ala Asn Ala Cys Gly Asp Gln Arg Met
130 135 140

Asp Pro Lys Gln Glu Ala Met Val Leu Lys Gln Glu Ile Asn Leu Leu
145 150 155 160

Gln Lys Gly Leu Arg Tyr Ile Tyr Gly Asn Arg Ala Asn Glu His Met
165 170 175

Thr Val Glu Glu Leu Asn Ala Leu Glu Arg Tyr Leu Glu Ile Trp Met
180 185 190

Tyr Asn Ile Arg Ser Ala Lys Met Gln Ile Met Ile Gln Glu Ile Gln
195 200 205

Ala Leu Lys Ser Lys Glu Gly Met Leu Lys Ala Ala Asn Glu Ile Leu
210 215 220

Gln Glu Lys Ile Val Glu Gln Asn Gly Leu Ile Asp Val Gly Met Met
225 230 235 240

Val Ala Asp Gln Gln Asn Gly His Phe Ser Thr Val Pro Leu Leu Glu
245 250 255

Glu Ile Thr Asn Pro Leu Thr Ile Leu Ser Gly Tyr Ser Thr Cys Arg
260 265 270

Gly Ser Glu Met Gly Tyr Ser Phe
275 280

<210> 3
<211> 224
5 <212> PRT
<213> triticum aestivum
<400> 3

ES 2 617 990 T3

Met Ala Arg Gly Lys Val Gln Leu Arg Arg Ile Glu Asn Pro Val His
 1 5 10 15

Arg Gln Val Thr Phe Cys Lys Arg Arg Ala Gly Leu Leu Lys Lys Ala
 20 25 30

Arg Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Ala Asp Ile Gly Ile Ile Ile Phe
 35 40 45

Ser Ala His Gly Lys Leu Tyr Asp Leu Ala Thr Thr Gly Thr Met Asp
 50 55 60

Gly Leu Ile Glu Arg Tyr Lys Ser Ala Ser Gly Glu Gly Met Thr Gly
 65 70 75 80

Asp Gly Cys Gly Asp Gln Arg Val Asp Pro Lys Gln Glu Ala Met Val
 85 90 95

Leu Lys Gln Glu Ile Asp Leu Leu Gln Lys Gly Leu Arg Tyr Ile Tyr
 100 105 110

Gly Asn Arg Ala Asn Glu His Met Asn Val Asp Glu Leu Asn Ala Leu
 115 120 125

Glu Arg Tyr Leu Glu Ile Trp Met Phe Asn Ile Arg Ser Ala Lys Met
 130 135 140

Gln Ile Met Ile Gln Glu Ile Gln Ala Leu Lys Ser Lys Glu Gly Met
 145 150 155 160

Leu Lys Ala Ala Asn Glu Ile Leu Gln Glu Lys Ile Val Glu Gln His
 165 170 175

Gly Leu Ile Asp Val Gly Met Thr Ile Ala Asp Gln Gln Asn Gly His
 180 185 190

Phe Ser Thr Val Pro Met Leu Glu Glu Ile Thr Asn Pro Leu Thr Ile
 195 200 205

Leu Ser Gly Tyr Ser Thr Cys Arg Gly Ser Glu Met Gly Tyr Ser Phe
 210 215 220

<210> 4
 <211> 675
 <212> ADN
 <213> triticum aestivum

5

<400> 4

ES 2 617 990 T3

atggcgagag gcaaggtcca gctccggcgc atcgagaacc ccgtccaccg gcaggtcacc 60
 ttctgcaagc gccgcgcagg gctcctcaag aaggccaggg agctctctgt cctctgcgac 120
 gccgacatcg gcatcatcat cttctccgca cacggcaagc tctacgacct cgccaccacc 180
 ggaaccatgg atgggctgat cgagaggtac aagagtgcc aatggagaagg catgaccggc 240
 gacggctgcg gcgaccagag agtggaccca aagcaggagg caatggtgct gaaacaagaa 300
 atagaccttc tgcagaaggg actgaggtac atttatggaa acagggcaaa tgagcacatg 360
 aatgttgacg agctgaatgc cctggagagg tacttggaga tatggatggt caacatccgc 420
 tccgcaaaga tgcagataat gattcaagag atccaggcac tgaagagcaa ggagggcatg 480
 ttgaaagctg ccaacgaaat tctccaggaa aagatagtag aacagcatgg actgatcgac 540
 gtaggcatga ctatagcaga tcagcagaat gggcatttta gtacagtccc aatgttagag 600
 gagatcacta acccactgac tatactgagt ggctattcta cttgtagggg ctcagagatg 660
 ggctattcct tctga 675

<210> 5
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> sorgo bicolor

5

<400> 5
 Met Ala Arg Gly Lys Val Gln Leu Arg Arg Ile Glu Asn Pro Val His
 1 5 10 15

 Arg Gln Val Thr Phe Cys Lys Arg Arg Ala Gly Leu Leu Lys Lys Ala
 20 25 30

 Arg Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Ala His Ile Gly Ile Ile Ile Phe
 35 40 45

 Ser Ala His Gly Lys Leu Tyr Asp Leu Ala Thr Thr Gly Thr Met Glu
 50 55 60

 Glu Leu Ile Asp Arg Tyr Lys Thr Ala Ser Gly Glu Ala Ala Asp Gly
 65 70 75 80

 Ser Gly Asp Asn Arg Met Asp Pro Lys Gln Glu Thr Met Val Leu Gln
 85 90 95

 Gln Glu Ile Asn Leu Leu Gln Lys Gly Leu Arg Tyr Ile Tyr Gly Asn
 100 105 110

10

ES 2 617 990 T3

Arg Ala Asn Glu His Met Asn Val Asp Glu Leu Asn Ala Leu Glu Arg
 115 120 125

Tyr Leu Glu Ile Trp Met Tyr Asn Ile Arg Ser Ala Lys Met Gln Ile
 130 135 140

Met Ile Gln Glu Ile Gln Ala Leu Lys Ser Lys Glu Gly Met Leu Lys
 145 150 155 160

Ala Ala Asn Glu Ile Leu Arg Glu Lys Ile Val Glu Gln Ser Ser Leu
 165 170 175

Leu Asp Val Gly Met Val Val Ala Asp Gln Gln Asn Gly His Phe Ser
 180 185 190

Thr Val Pro Leu Ile Glu Glu Ile Thr Asn Pro Leu Thr Ile Leu Ser
 195 200 205

Gly Tyr Ser Asn Cys Arg Gly Ser Glu Met Gly Tyr Ser Phe
 210 215 220

<210> 6
 <211> 669
 <212> ADN
 <213> sorgo bicolor

5

<400> 6
 atggcgcggg gcaaagtgca gctgcgcgcg atcgagaacc cgggtgcaccg gcaggtgacc 60
 ttctgcaagc gccgcgcggg gctgctcaag aaggcacggg agctctccgt cctctgcgac 120
 gccacatcg gcatcatcat cttctccgcg cacggcaagc tctacgacct cgccaccacc 180
 gggaccatgg aagagctgat cgacaggtac aagactgcca ggggagaagc tgccgacggc 240
 tccggcgaca acagaatgga tccaaaacaa gaaaccatgg tgctgcaaca ggaaatcaat 300
 ctgctccaga aaggactcag gtacatctac gggaacaggg caaatgaaca catgaatggt 360
 gacgaactga atgcccttga gaggtacttg gagatatgga tgtacaacat ccgctctgca 420
 aagatgcaga taatgattca agagatacaa gcactaaaaa gcaaggaagg catgttgaaa 480
 gctgctaacg aaattctccg ggaaaagata gtagaacaga gtagtttgct tgatgtaggc 540
 atggtggtag cggatcaaca gaatgggcat tttagtacag tcccactgat agaagagatc 600
 actaaccac tgactatact gagtggatat tctaactgta ggggctcaga gatgggctat 660
 tccttctaa 669

10

<210> 7
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> zea mays

15

<400> 7

ES 2 617 990 T3

Met Gly Arg Gly Lys Val Gln Leu Lys Arg Ile Glu Asn Lys Ile Asn
 1 5 10 15

Arg Gln Val Thr Phe Ser Lys Arg Arg Ser Gly Leu Leu Lys Lys Ala
 20 25 30

His Glu Ile Ser Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ala Leu Ile Ile Phe
 35 40 45

Ser Thr Lys Gly Lys Leu Tyr Glu Tyr Ser Thr Asp Ser Cys Met Asp
 50 55 60

Lys Ile Leu Asp Arg Tyr Glu Arg Tyr Ser Tyr Ala Glu Lys Val Leu
 65 70 75 80

Ile Ser Val Glu Ser Glu Thr Gln Gly Asn Trp Cys His Glu Tyr Arg
 85 90 95

Lys Leu Lys Ala Lys Val Glu Thr Ile Gln Lys Cys Gln Lys His Leu
 100 105 110

Met Gly Glu Asp Leu Glu Thr Leu Asn Leu Lys Glu Leu Gln Gln Leu
 115 120 125

Glu Gln Gln Leu Glu Ser Ser Leu Lys His Ile Arg Thr Arg Lys Ser
 130 135 140

Gln Leu Met Leu Glu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Arg Lys Glu Lys Ser
 145 150 155 160

Leu Gln Glu Glu Asn Lys Val Leu Gln Lys Glu Leu Ala Glu Lys Gln
 165 170 175

Lys Ala Gln Arg Lys Gln Val Gln Trp Gly Gln Thr Gln Gln Gln Thr
 180 185 190

Ser Ser Ser Ser Ser Cys Phe Met Ile Arg Glu Ala Ala Pro Thr Thr
 195 200 205

Asn Ile Ser Ile Phe Pro Val Ala Ala Gly Gly Arg Leu Val Glu Gly
 210 215 220

Ala Ala Ala Gln Pro Gln Ala Arg Val Gly Leu Pro Pro Trp Met Leu
 225 230 235 240

Ser His Leu Ser Ser
 245

5 <210> 8
 <211> 738
 <212> ADN
 <213> zea mays

10 <400> 8

ES 2 617 990 T3

atggggcgcg gtaaggtgca gctgaagcgg atcgagaaca agatcaaccg ccaggtgacc 60
 ttctccaagc gccgctcggg gctgctcaag aaggcgcacg agatctccgt gctctgcgac 120
 gccgaggtcg cgctcatcat ettctccacc aaaggggaagc tctacgagta ttccaccgat 180
 tcatgtatgg acaaaattct tgaccggtac gagcgtact cctatgcaga aaaggttctt 240
 atttcagtag aatctgaaac tcagggcaat tgggtgccacg agtatagaaa actaaaggcg 300
 aaggtcgaga caatacaaaa atgtcaaaag cacctcatgg gagaggatct tgaaacggtg 360
 aatctcaaag agcttcagca actagagcag cagctggaga gttcactgaa acatatcaga 420
 accaggaaga gccagcttat gctcgagtca atttcggagc tccaacggaa ggagaagtcg 480
 ctgcaggagg agaacaaggt tctgcagaag gagctcgcgg agaagcagaa agcccagcgg 540
 aagcaagtgc aatggggcca aaccaaacag cagaccagtt cgtcttcctc gtgcttcatg 600
 ataaggaag ctgcccac aacaaatc agcatttttc ctgtggcagc aggcgggagg 660
 ttggtggaag gtgcagcagc gcagccacag gctcgcgttg gactaccacc atggatgctt 720
 agccacctga gcagctga 738

<210> 9
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> oryza sativa

5

<400> 9
 Met Val Arg Gly Lys Val Gln Met Arg Arg Ile Glu Asn Pro Val His
 1 5 10 15

Arg Gln Val Thr Phe Cys Lys Arg Arg Gly Gly Leu Leu Lys Lys Ala
 20 25 30

Arg Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Ala Asp Val Gly Val Ile Ile Phe
 35 40 45

Ser Ser Gln Gly Lys Leu His Glu Leu Ala Thr Asn Gly Asn Met His
 50 55 60

Asn Leu Val Glu Arg Tyr Gln Ser Asn Val Ala Gly Gly Gln Met Glu

10

ES 2 617 990 T3

85 90 95

Lys Leu Lys Ala Lys Val Glu Thr Ile Gln Lys Cys Gln Lys His Leu
100 105 110

Met Gly Glu Asp Leu Glu Ser Leu Asn Leu Lys Glu Leu Gln Gln Leu
115 120 125

Glu Gln Gln Leu Glu Asn Ser Leu Lys His Ile Arg Ser Arg Lys Ser
130 135 140

Gln Leu Met Leu Glu Ser Ile Asn Glu Leu Gln Arg Lys Glu Lys Ser
145 150 155 160

Leu Gln Glu Glu Asn Lys Val Leu Gln Lys Glu Asn Pro Cys Ser Phe
165 170 175

Leu Gln Leu Val Glu Lys Gln Lys Val Gln Lys Gln Gln Val Gln Trp
180 185 190

Asp Gln Thr Gln Pro Gln Thr Ser Ser Ser Ser Ser Phe Met Met
195 200 205

Arg Glu Ala Leu Pro Thr Thr Asn Ile Ser Asn Tyr Pro Ala Ala Ala
210 215 220

Gly Glu Arg Ile Glu Asp Val Ala Ala Gly Gln Pro Gln His Val Arg
225 230 235 240

Ile Gly Leu Pro Pro Trp Met Leu Ser His Ile Asn Gly
245 250

<210> 11
<211> 265
5 <212> PRT
<213> hordeum vulgare

<400> 11
Met Gly Arg Gly Pro Val Gln Leu Arg Arg Ile Glu Asn Lys Ile Asn
1 5 10 15

Arg Gln Val Thr Phe Ser Lys Arg Arg Ser Gly Leu Leu Lys Lys Ala
20 25 30

His Glu Ile Ser Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ala Leu Ile Val Phe
35 40 45

Ser Thr Lys Gly Lys Leu Tyr Glu Tyr Ser Ser Gln Asp Ser Ser Met

10

ES 2 617 990 T3

Met Gly Arg Gly Lys Val Gln Leu Lys Arg Ile Glu Asn Lys Ile Asn
 1 5 10 15

Arg Gln Val Thr Phe Ser Lys Arg Arg Ser Gly Leu Leu Lys Lys Ala
 20 25 30

His Glu Ile Ser Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Gly Leu Ile Ile Phe
 35 40 45

Ser Thr Lys Gly Lys Leu Tyr Glu Phe Ser Thr Glu Ser Cys Met Asp
 50 55 60

Lys Ile Leu Glu Arg Tyr Glu Arg Tyr Ser Tyr Ala Glu Lys Val Leu
 65 70 75 80

Val Ser Ser Glu Ser Glu Ile Gln Gly Asn Trp Cys His Glu Tyr Arg
 85 90 95

Lys Leu Lys Ala Lys Val Glu Thr Ile Gln Lys Cys Gln Lys His Leu
 100 105 110

Met Gly Glu Asp Leu Glu Ser Leu Asn Leu Lys Glu Leu Gln Gln Leu
 115 120 125

Glu Gln Gln Leu Glu Ser Ser Leu Lys His Ile Arg Ala Arg Lys Asn
 130 135 140

Gln Leu Met His Glu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Lys Lys Glu Arg Ser
 145 150 155 160

Leu Gln Glu Glu Asn Lys Val Leu Gln Lys Glu Leu Val Glu Lys Gln
 165 170 175

Lys Ala Gln Ala Ala Gln Gln Asp Gln Thr Gln Pro Gln Thr Ser Ser
 180 185 190

Ser Ser Ser Ser Phe Met Met Arg Asp Ala Pro Pro Val Ala Asp Thr
 195 200 205

Ser Asn His Pro Ala Ala Ala Gly Glu Arg Ala Glu Asp Val Ala Val
 210 215 220

Gln Pro Gln Val Pro Leu Arg Thr Ala Leu Pro Leu Trp Met Val Ser
 225 230 235 240

His Ile Asn Gly

- 5 <210> 14
- <211> 276
- <212> PRT
- <213> hordeum vulgare

- 10 <400> 14

ES 2 617 990 T3

Met Gly Arg Gly Lys Val Gln Leu Lys Arg Ile Glu Asn Lys Ile Asn
 1 5 10 15

Arg Gln Val Thr Phe Ser Lys Arg Arg Asn Gly Leu Leu Lys Lys Ala
 20 25 30

His Glu Ile Ser Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ala Val Ile Val Phe
 35 40 45

Ser Pro Lys Gly Lys Leu Tyr Glu Tyr Ala Thr Asp Ser Ser Met Asp
 50 55 60

Lys Ile Leu Glu Arg Tyr Glu Arg Tyr Ser Tyr Ala Glu Lys Ala Leu
 65 70 75 80

Ile Ser Ala Glu Ser Glu Ser Glu Gly Asn Trp Cys His Glu Tyr Arg
 85 90 95

Lys Leu Lys Ala Lys Ile Glu Thr Ile Gln Lys Cys His Lys His Leu
 100 105 110

Met Gly Glu Asp Leu Asp Ser Leu Asn Leu Lys Glu Leu Gln Gln Leu
 115 120 125

Glu Gln Gln Leu Glu Ser Ser Leu Lys His Ile Arg Ser Arg Lys Ser
 130 135 140

His Leu Met Met Glu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Lys Lys Glu Arg Ser
 145 150 155 160

Leu Gln Glu Glu Asn Lys Ala Leu Gln Lys Glu Leu Val Glu Arg Gln
 165 170 175

Lys Ala Ala Ser Arg Gln Gln Gln Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 180 185 190

Gln Met Gln Trp Glu His Gln Ala Gln Thr Gln Thr His Thr His Thr
 195 200 205

Gln Asn Gln Pro Gln Ala Gln Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe Met
 210 215 220

Met Arg Asp Gln Gln Ala His Ala Pro Gln Gln Asn Ile Cys Ser Tyr
 225 230 235 240

Pro Pro Val Thr Met Gly Gly Glu Ala Thr Ala Ala Ala Ala Pro
 245 250 255

Glu Gln Gln Ala Gln Leu Arg Ile Cys Leu Pro Pro Trp Met Leu Ser
 260 265 270

His Leu Asn Ala
 275

5 <210> 15
 <211> 192

ES 2 617 990 T3

<212> PRT
 <213> hordeum vulgare

<400> 15
 Gln Ser Met Pro Lys Thr Leu Glu Arg Tyr Gln Lys Cys Ser Tyr Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Asp Thr Ala Ile Gln Asn Lys Glu Asn Glu Leu Val Gln Ser
 20 25 30
 Ser Arg Asn Glu Tyr Leu Lys Leu Lys Ala Arg Val Glu Asn Leu Gln
 35 40 45
 Arg Thr Gln Arg Asn Leu Leu Gly Glu Asp Leu Gly Ser Leu Gly Ile
 50 55 60
 Lys Asp Leu Glu Gln Leu Glu Lys Gln Leu Asp Ser Ser Leu Arg His
 65 70 75 80
 Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gln His Met Leu Asp Gln Leu Thr Asp Leu
 85 90 95
 Gln Arg Lys Glu Gln Met Leu Ser Glu Ala Asn Lys Cys Leu Arg Arg
 100 105 110
 Lys Leu Glu Glu Ser Ser Gln Gln Met Gln Gly Gln Met Trp Glu Gln
 115 120 125
 His Ala Ala Asn Leu Leu Gly Tyr Asp His Leu Arg Gln Ser Pro His
 130 135 140
 Gln Gln Gln Ala Gln His His Gly Gly Asn Gly Phe Phe His Pro Leu
 145 150 155 160
 Asp Pro Thr Thr Glu Pro Thr Leu Gln Ile Gly Tyr Thr Gln Glu Gln
 165 170 175
 Ile Asn Asn Ala Cys Val Ala Ala Ser Phe Met Pro Thr Trp Leu Pro
 180 185 190

5

10

<210> 16
 <211> 270
 <212> ADN
 <213> oriza sativa

<400> 16
 gtaagcaaga gatagggata aggggaagag gaggaagaag gaggaggtgt agggagaaac 60
 cggagcaacc tcgaagctag tccaaactag tgggaggttg tctttccggc aagccggagc 120
 ccggagctat cgatcatcaa gctttctacc ccgaccgacg aggaagaaga cgactgatca 180
 attgatcaaa ccgatctctc catagctagg tagacaggag gagaggagga agaagagggg 240
 gagaggagac ttatcttgat cgatggcgcg 270

15

20

<210> 17
 <211> 371
 <212> ADN
 <213> oriza sativa

ES 2 617 990 T3

<400> 17
tcgacgtagg catgatggta gcagatcaac agaatgggca ttttagtaca gtcccactgt 60
tagaagagat cactaaccca ctgactatac tgagtggcta ttctacttgt aggggctcgg 120
agatgggcta ttccttctaa cactaataat ggcctggggg atacttgtgt tcattactag 180
tgtaatatgg ttaataatgc ttgtgttgct gtttgctttg ctattctgat gtaccttatt 240
tagacaagtt cccgcaggaa gtgtctttta gtattgtatt tgtcttgggc tgtggtgctt 300
tgtttttccc taaagaactc ttgaggagct ctgttggtga accatttcaa gtaattgaga 360
ctattgtttc c 371

5

REIVINDICACIONES

1. Una planta perteneciente a las monocotiledóneas que tiene una función MADS26 defectuosa como resultado de un silenciamiento génico inducido por un mecanismo de interferencia por RNA, mostrando dicha planta una resistencia aumentada al estrés biótico y/o abiótico.
- 5 2. La planta de la reivindicación 1, en donde dicha planta es un cereal seleccionado de arroz, trigo, cebada, avena, centeno, sorgo o maíz.
3. Una semilla de la planta de la reivindicación 2.
4. La planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha resistencia al estrés biótico es una resistencia a patógenos fúngicos y/o bacterianos.
- 10 5. La planta de la reivindicación 4, en donde dichos patógenos fúngicos se seleccionan de las especies *Magnaporthe*, *Puccinia*, *Ustilago*, *Septoria*, *Erysiphe*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*, preferiblemente el patógeno es *Magnaporthe oryzae*.
- 15 6. La planta de la reivindicación 4, en donde dichos patógenos bacterianos se seleccionan de las especies *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acidovorax*, *Clavibacter*, *Streptomyces*, *Xylella*, *Spiroplasma* y *Phytoplasma*, preferiblemente el patógeno es *Xanthomonas oryzae*.
7. La planta de la reivindicación 1, en donde dicha resistencia al estrés abiótico es una resistencia al estrés por sequía.
- 20 8. Un método para aumentar la resistencia al estrés por patógenos fúngicos y/o bacterianos o al estrés por sequía en una planta monocotiledónea, en donde el método comprende las siguientes etapas:
 - (a) inactivación de la función del gen MADS26 en una célula vegetal o una semilla;
 - (b) opcionalmente, selección de células vegetales de la etapa (a) con la función del gen MADS26 inactivada;
 - (c) regeneración de las plantas de las células de las etapas (a) o (b); y
 - 25 (d) opcionalmente, selección de una planta de (c) con resistencia aumentada a patógenos fúngicos y/o bacterianos o al estrés por sequía, teniendo dicha planta una función del gen MADS26 defectuosa.
- 30 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha función del gen MADS26 se inactiva por delección, inserción y/o sustitución de uno o más nucleótidos, mutagénesis específica del sitio, mutagénesis por metanosulfonato de etilo (EMS), lesiones locales inducidas en genomas por direccionamiento (TILLING), técnicas de bloqueo génico, o por silenciamiento génico inducido por un mecanismo de interferencia por RNA.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, que comprende:
 - (a) inactivación de la función del gen MADS26 en semillas por mutagénesis;
 - (b) generación de plántulas a partir de las semillas de la etapa (a); y
 - (c) selección de una plántula de (b) que tiene una función del gen MADS26 defectuosa.
- 35 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde la planta es una monocotiledónea de la familia *Poaceae*, preferiblemente seleccionada de arroz, trigo, cebada, avena, centeno, sorgo o maíz.
- 40 12. Una molécula de RNAi que se une a una secuencia de mRNA de MAD26 y que inhibe la expresión del gen MAD26, siendo dicho RNAi opcionalmente complementario a una secuencia que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 (GST1) o SEQ ID NO: 17 (GST2).
13. El uso de una molécula de RNAi de acuerdo con la reivindicación 12, para aumentar la resistencia de las plantas o de las células vegetales pertenecientes a las monocotiledóneas al estrés biótico y/o abiótico.
14. Un método para producir una planta monocotiledónea que tiene una resistencia aumentada a patógenos fúngicos y/o bacterianos o al estrés por sequía, en donde el método comprende las siguientes etapas:
 - 45 (a) inactivación de la función del gen MADS26 en una célula vegetal o una semilla como resultado de un silenciamiento génico inducido por un mecanismo de interferencia de RNA;

(b) opcionalmente, selección de células vegetales de la etapa (a) con la función del gen MADS26 inactivada;

(c) regeneración de las plantas a partir de las células de las etapas (a) o (b); y

5 (d) opcionalmente, selección de una planta de (c) con una resistencia aumentada a patógenos fúngicos y/o bacterianos o al estrés por sequía, teniendo dicha planta una función del gen MADS26 defectuosa como resultado de un silenciamiento génico inducido por un mecanismo de interferencia de RNA.

10 15. Una planta perteneciente a las monocotiledóneas transformada con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que expresa una molécula de RNAi que se une a una secuencia de mRNA de MAD26, y es opcionalmente complementaria a una secuencia que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 (GST1) o SEQ ID NO: 17 (GST2), y que inhibe la expresión del gen MADS26.

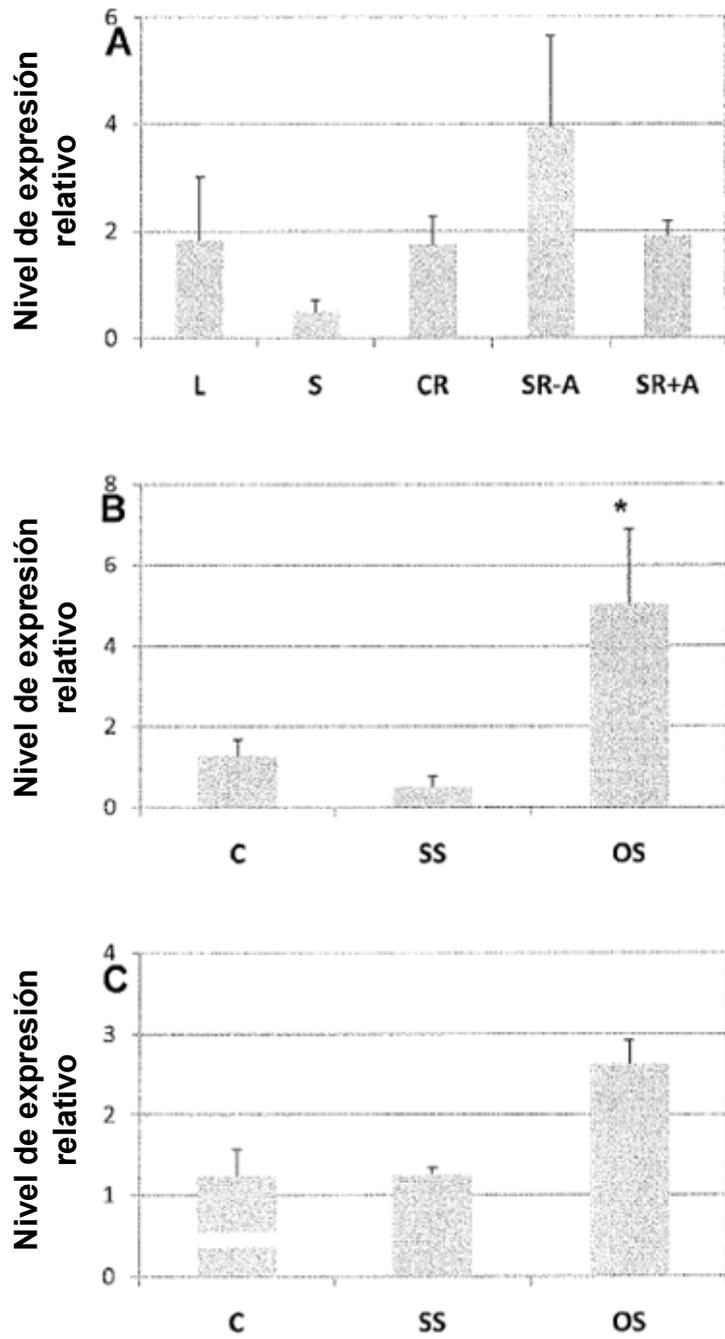
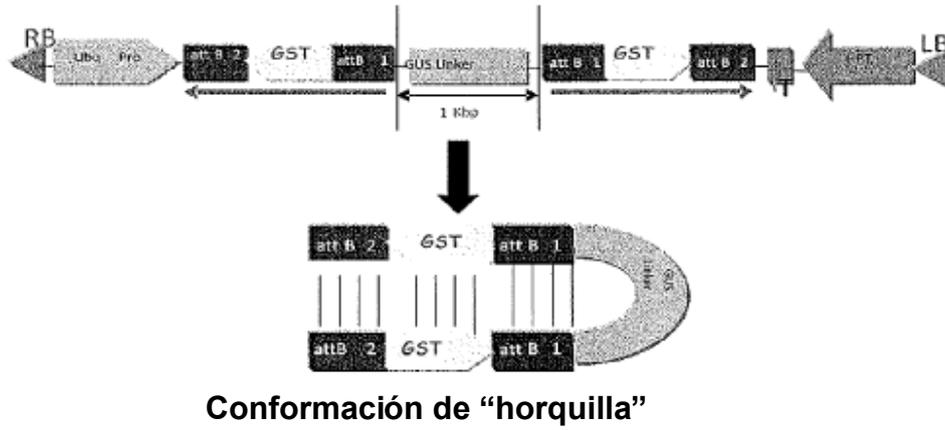


FIGURA 1



Vector pANDA

FIGURA 2

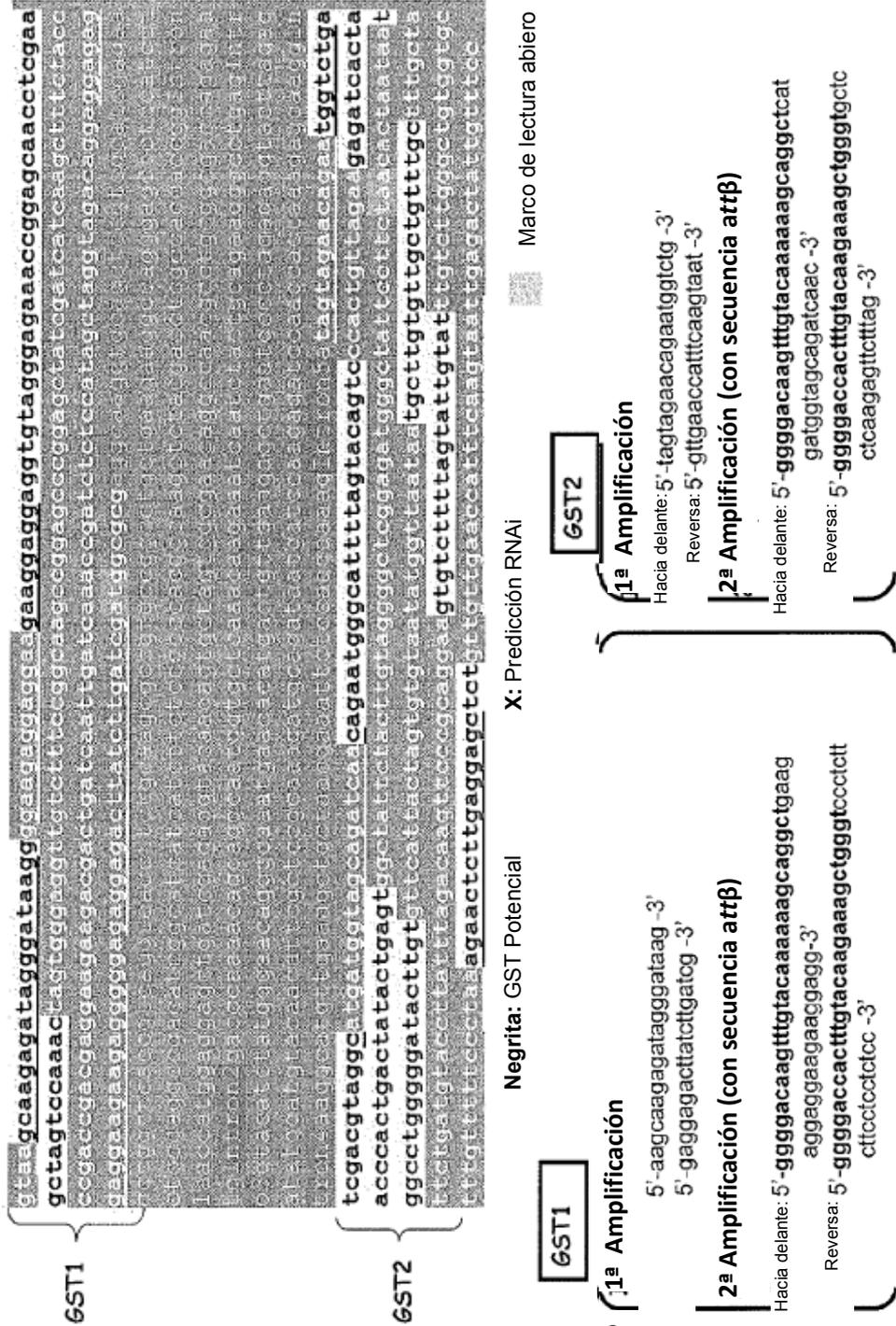


FIGURA 3

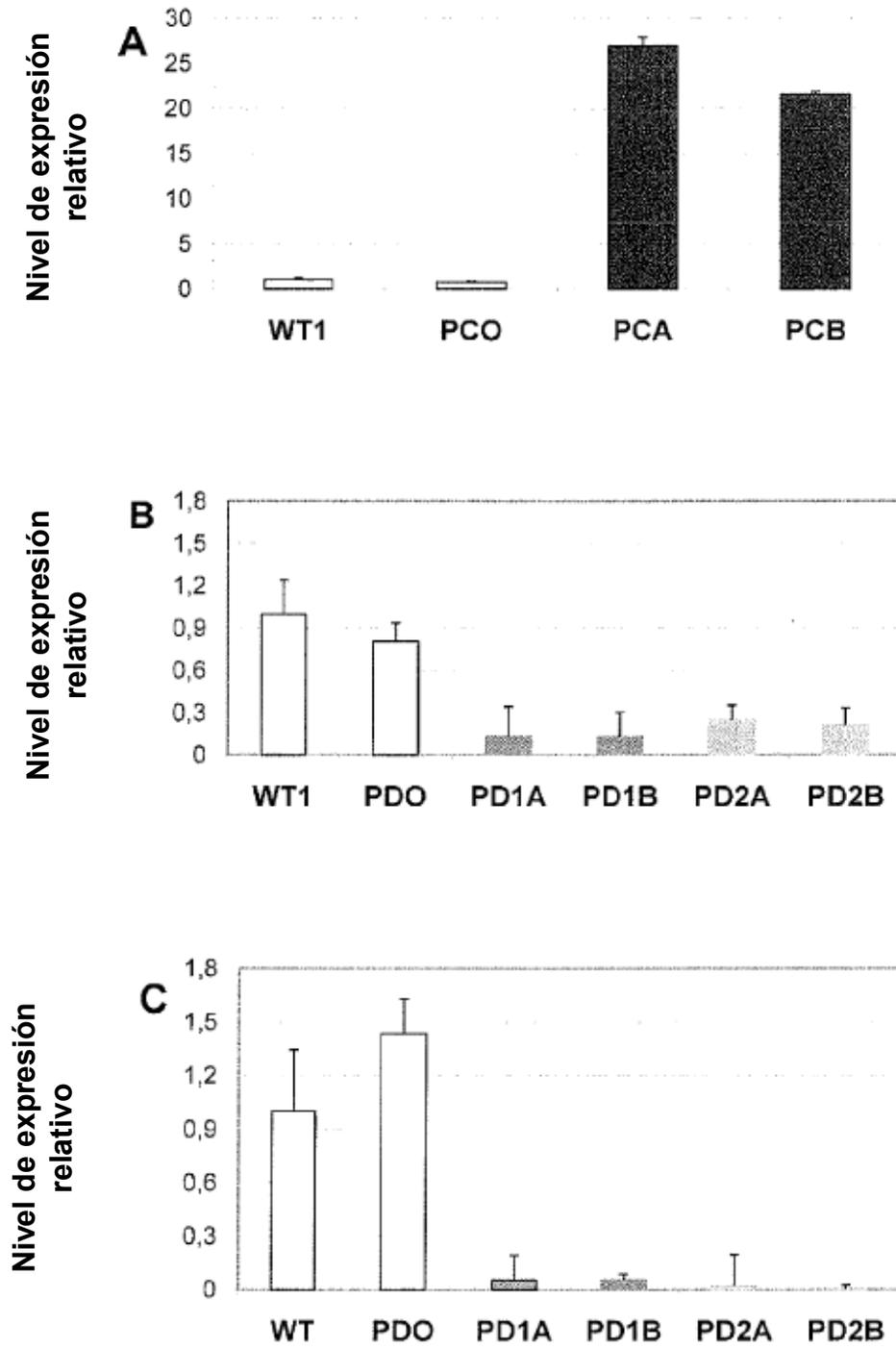


FIGURA 4

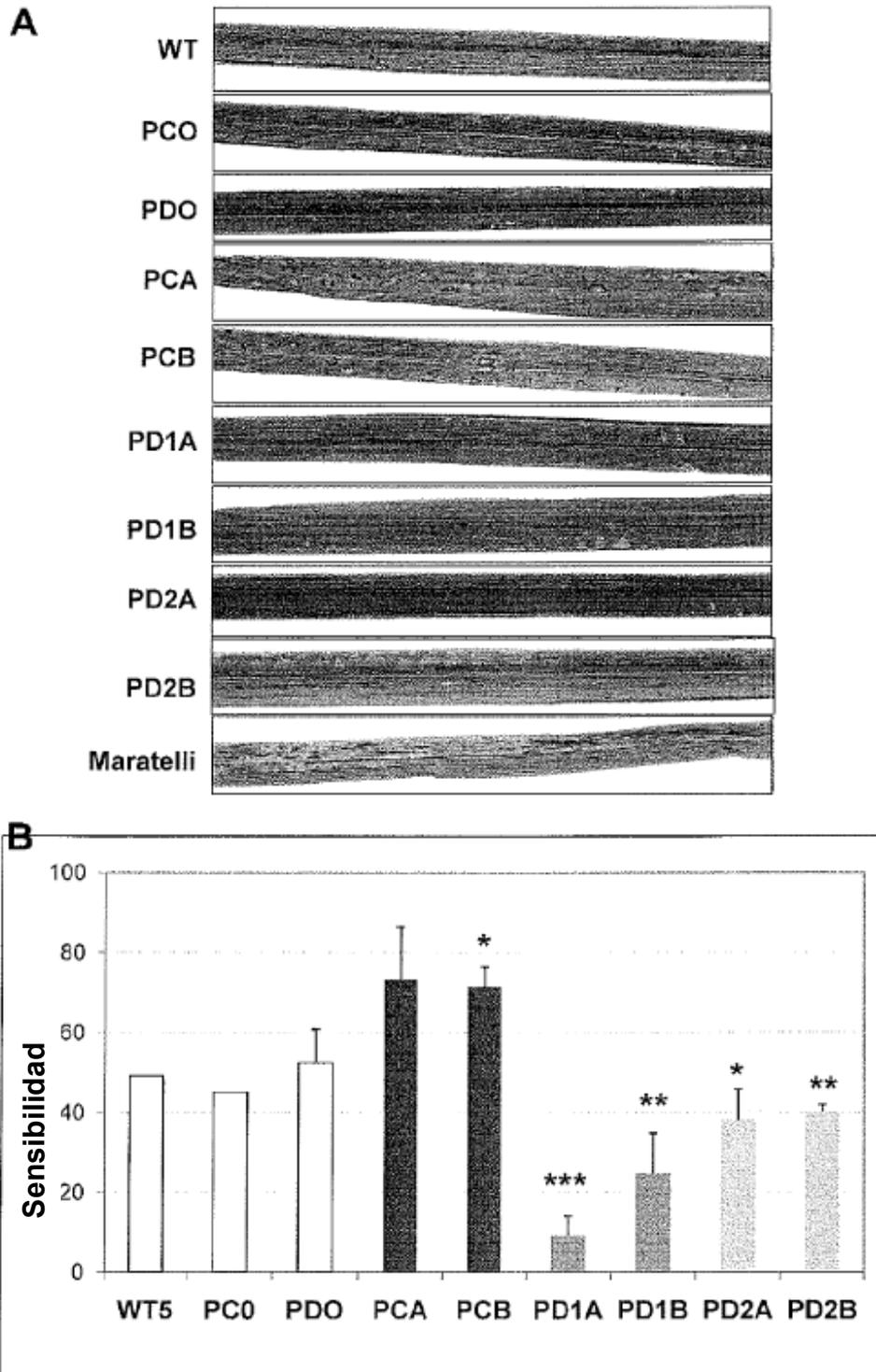


FIGURA 5

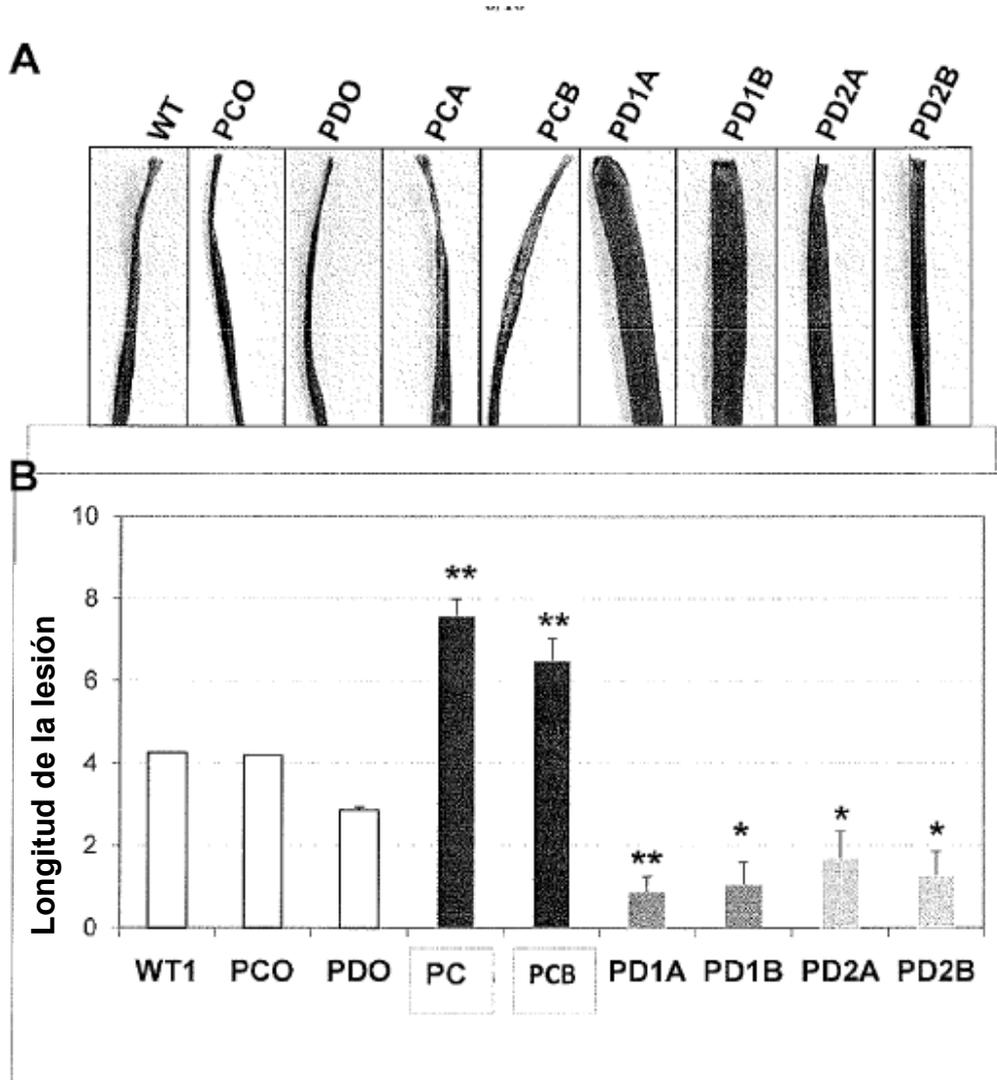


FIGURA 6

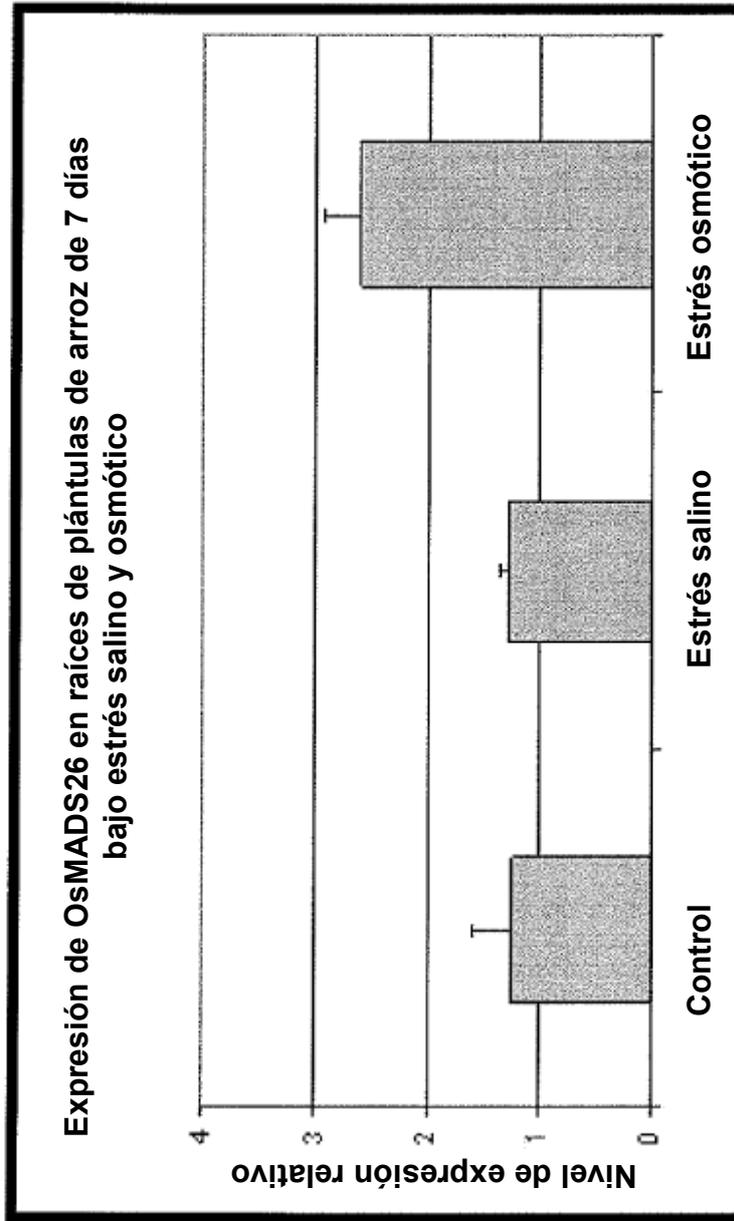
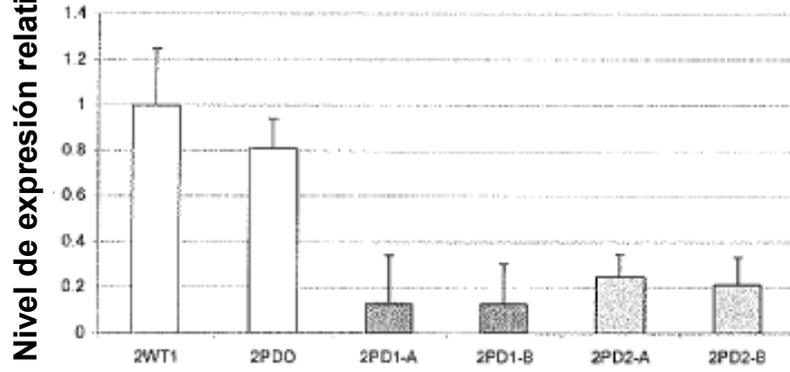


FIGURA 7

A

Expresión de *OsMADS26* en plantas de interferencia



B

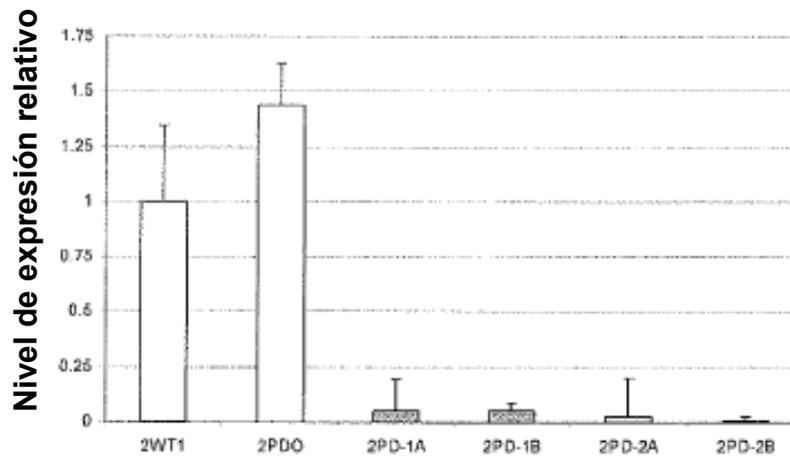


FIGURA 8

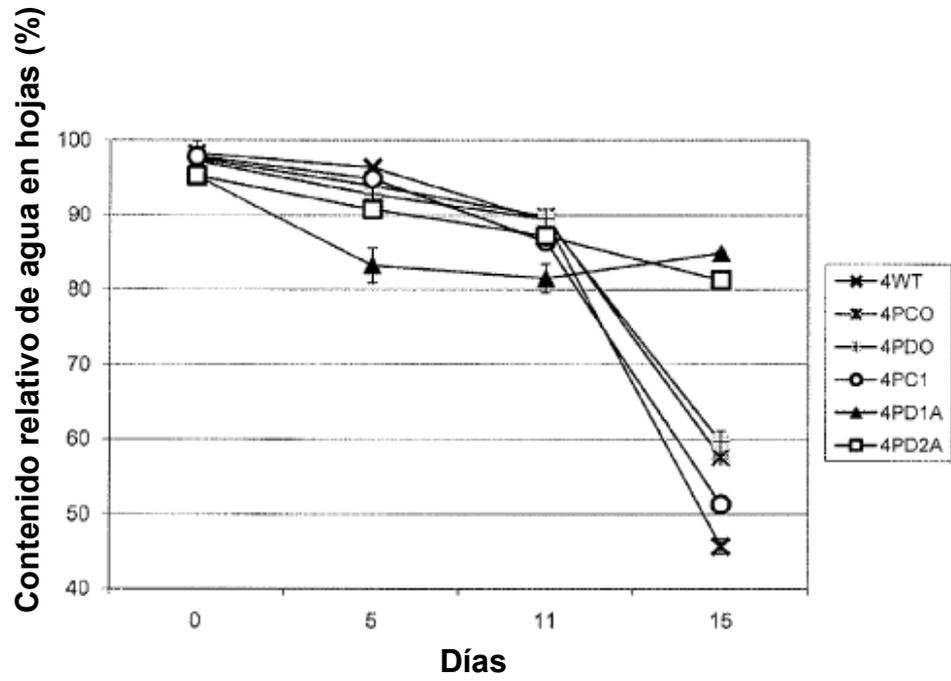


FIGURA 9

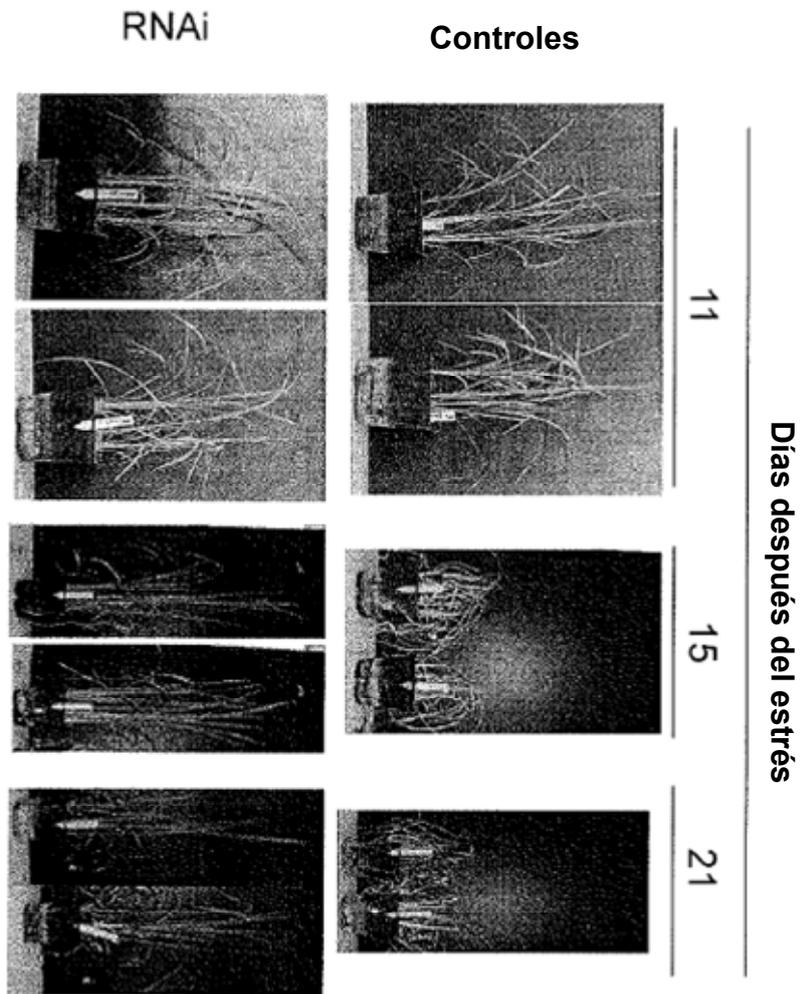


FIGURA 10