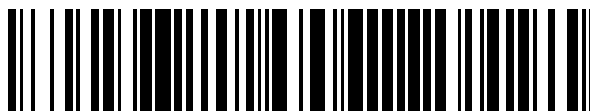


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 857**

51 Int. Cl.:

A01H 4/00 (2006.01)
C12N 15/05 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/10 (2008.01)
C07K 14/415 (2006.01)
A01H 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2011** **PCT/AU2011/001478**
87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012** **WO12065219**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2011** **E 11841328 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018** **EP 2640182**

54 Título: **Plantas tolerantes a la sequía**

30 Prioridad:

15.11.2010 US 413902 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2018

73 Titular/es:

**THE STATE OF QUEENSLAND ACTING
THROUGH THE DEPARTMENT OF
AGRICULTURE AND FISHERIES (50.0%)
80 Ann Street
Brisbane QLD 4000, AU y
THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BORRELL, ANDREW KENNNETH;
JORDAN, DAVID ROBERT;
MULLET, JOHN y
KLEIN, PATRICIA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 692 857 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 tolerantes a la sequía.

5 Campo

La presente memoria descriptiva enseña la generación de plantas tolerantes a la sequía. La presente divulgación permite la manipulación de una característica fenotípica denominada en el presente documento como "permanencia verde" para generar plantas tolerantes a la sequía mediante métodos recombinantes, mutagénicos y/o de cultivo y de selección.

Antecedentes

Los detalles bibliográficos de las publicaciones a las que se hace referencia por el autor en la presente memoria descriptiva se recogen alfabéticamente al final de la descripción.

Una población creciente de seres humanos necesita mejora en la productividad de los cultivos. Esto ha sido un objetivo principal para fitogenetistas y genetistas. Un enfoque para mejorar la productividad de los cultivos implica la selección de rasgos vegetales que facilitan un rendimiento y estabilidad de grano superior (Springer, *Nature Genetics* 42:475-476, 2010). Este enfoque se ha denominado como la "Revolución verde". Otro enfoque incluye el desarrollo de arquitecturas de planta ideales que, por ejemplo, han conducido a la identificación de un locus de caracteres cuantitativos (QTL) que codifica el promotor la proteína de unión al promotor Squamosa de tipo 14 (OsSPL14) en arroz y que facilita un rendimiento del arroz mejorado (Jiao *et al.*, *Nature Genetics* 42:541-544, 2010; Miura *et al.*, *Nature Genetics* 42:545-549, 2010).

La sequía es la única principal limitación de la producción de cereales en todo el mundo. El sorgo es un repositorio de mecanismos de resistencia a la sequía, que incluye la fotosíntesis C₄, raíces profundas y cera de hoja espesa que permite su crecimiento en entornos calientes y secos. La tolerancia a la sequía hace que el sorgo sea especialmente importante en regiones secas tales como África subsahariana, India del centro-oeste, Australia nororiental y las llanuras meridionales de los EE.UU. Con una presión en aumento en la disponibilidad de escasos recursos hídricos, la identificación de los rasgos asociados con el cultivo de grano en condiciones de sequía se vuelve más importante.

El mecanismo de adaptación a la sequía identificado en el sorgo que resulta en la retención de hojas verdes durante períodos más largos durante la formación del grano en sequía se conoce como "permanencia verde". La permanencia verde se ha asociado con un rendimiento de grano elevado en sequía post-antesis en sorgo (Borrell *et al.*, *Crop Sci.* 40:1037-1048, 2000b; Kassahun *et al.*, *Euphytica* 72:351-362, 2010), trigo (*Triticum aestivum* L.) [Spano *et al.*, *J. Exp. Bot.* 54:1415-1420, 2003; Christopher *et al.*, *Aust. J. Agric. Res.* 59:354-364, 2008], arroz (*Oryza sativa* L.) [Kashiwagi *et al.*, *Plant Physiology and Biochemistry* 44:152-157, 2006] y maíz (*Zea mays* L.) [Zheng *et al.*, *Plant Breed* 128:54-62, 2009]. Además, puede afectar indirectamente el rendimiento de grano en sequía mejorando la resistencia a la pudrición del carbón vegetal (*Macrophomina phaseolina* [Tassi] Goid.) (Tenkouano *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 85:644-648, 1993; Garud *et al.*, *Int. Sorghum and Millets Newsl.* 43:63-65, 2002). Esto reduce el encamado (Reddy *et al.*, *Euphytica* 159:191-198, 2008), permitiendo a los fitogenetistas aprovechar la asociación positiva entre la altura de la planta y el rendimiento de grano (Jordan *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 106:559-567, 2003). La permanencia verde ha sido un criterio de selección importante para los programas de cultivo de sorgo dirigidos a su adaptación tanto en EE.UU. (Rosenow *et al.*, *Agric. Water Manag.* 7:207-222, 1983) y Australia (Henzell *et al.*, *Australia Int. Sorghum and Millets Newsl.* 38:1-9, 1997).

Se está fijando una considerable acumulación de pruebas fisiológicas en soporte a este rasgo (Borrell *et al.*, *Crop Sci.* 40:1026-1037, 2000a; Borrell y Hammer, *Crop Sci.* 40:1295-1307, 2000; Harris *et al.*, *J. Exp. Bot.* 55:327-338, 2007; Christopher *et al.*, 2008 *supra*; Van Oosterom *et al.*, *Field Crops Res.* 115:19-28, 2010a and Van Oosterom *et al.*, *Field Crops Res.* 115:29-38, 2010b). Aunque este mecanismo de resistencia a la sequía se ha utilizado por fitogenetistas de sorgo en los EE.UU. y Australia durante aproximadamente 25 años y la amplia base fisiológica del rasgo se está comprendiendo cada vez mejor, los mecanismos causales y los locus genéticos implicados se han desconocido hasta el momento.

En condiciones con agua limitada, el rendimiento de grano es una función de transpiración (T), eficacia de transpiración (TE) e índice de cosecha (HI) [Passioura, *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 43:117-120, 1977]. En este marco, el rendimiento de grano está unido a la post-antesis (Turner, *J. Exp. Bot.* 85:2413-2425, 2004; Manschadi *et al.*, *Funct. Plant. Biol.* 33:823-837, 2006), puesto que el HI aumenta con la fracción de la T de cosecha total usada después de la antesis (Passioura, 1977 *anteriormente citado*; Sadras y Connor, *Field Crops Res.* 26:227-239, 1991; Hammer, *Agric. Sci.* 19:16-22, 2006). La T de post-antesis aumentada se asocia con una resistencia a la sequía reducida alrededor de la antesis, lo que puede afectar de forma positiva la tasa de crecimiento de la cosecha en la antesis de cereales y, por lo tanto, el número de granos (Andrade *et al.*, *Crop Sci.* 42:1173-1179, 2002; Van Oosterom y Hammer, *Field Crops Res.* 108:259-268, 2008). Si la cantidad total de agua disponible es limitada, la T de post-antesis puede aumentarse restringiendo la T de pre-antesis. Esto puede lograrse restringiendo el tamaño del dosel,

bien genéticamente o través de una gestión del cultivo. Sin embargo, un dosel más pequeño solo reducirá la T total si su TE no se ve afectada. Se ha informado de diferencia genotípicas significantes en TE para el sorgo (Hammer *et al.*, *Aust. J. Agric. Res.* 48:649-655, 1997; Henderson *et al.*, *Aust. J. Plant Physiol.* 25:111-123, 1998; Mortlock y Hammer, *J. Crop Prod.* 2:265-286, 1999; Xin *et al.*, *Field Crops Res.* 111:74-80, 2009). Como alternativa, el uso de agua de post-antesis puede aumentarse mediante el aumento de la cantidad total de agua a la que tiene acceso la cosecha, bien a través de un enraizamiento profundo o un límite de extracción de agua reducido (Manschadi *et al.*, 2006 *anteriormente citados*).

El rasgo de permanencia verde afecta a un número de los procesos anteriores en el sorgo. En primer lugar, la permanencia verde reduce el uso de agua durante el período de pre-antesis mediante la restricción del tamaño del dosel (a través de una formación de brotes reducida y hojas más pequeñas).

En segundo lugar, la permanencia verde mejora la accesibilidad de agua aumentando la relación de brote de raíz. Existen algunas pruebas experimentales para una mejor extracción de agua en líneas de permanencia verde, aunque se requiere más investigación. Estas respuestas de raíz también podrían explicarse por un transporte de auxina aumentado (Wang *et al.*, *Molecular Plant* 2(4):823-831, 2009). En tercer lugar, la permanencia verde aumenta el verdor de las hojas en la antesis, aumentando eficazmente la capacidad fotosintética y, por lo tanto, la TE (siempre y cuando la fotosíntesis aumente proporcionalmente más que la conductancia). El aumento en el verdor de las hojas es un efecto indirecto de la masa de hoja reducida, es decir, se concentra el nitrógeno en la hoja.

La producción de más alimentos con menos agua es uno de los retos principales a los que se enfrenta actualmente la humanidad. Existe una necesidad real y urgente tanto en países en desarrollo como en países desarrollados en identificar genes y redes de genes que controlen la adaptación a la sequía en plantas de cultivo. Esto permite una adaptación a la sequía aumentada en una amplia gama de especies de cultivo cosechadas en entornos limitados de agua en todo el mundo.

Sumario

La presente divulgación enseña locus de caracteres cuantitativos (QTL) asociados con y/o que de otro modo facilitan el fenotipo de permanencia verde. Los QTL se denominan en el presente documento como "permanencia verde (Stg) X" en donde X es un número que aumenta a partir de 1 que representa la región sobre un cromosoma asociado con el fenotipo de permanencia verde.

Como se enseña en el presente documento, los QTL identifican regiones genéticas sobre sorgo que llevan locus que codifican un número de proteínas o agentes reguladores tales como microARN que facilitan el fenotipo de permanencia verde. La modulación de la expresión de uno o más de estos locus en una planta de cultivo genera una arquitectura de dosel que facilita un cambio en el uso de agua por la planta en el período post-antesis o accesibilidad aumentada de agua durante el crecimiento de la cosecha o eficacia transpiración aumentada aumentando, de este modo, el índice de cosecha (HI) y rendimiento de grano en condiciones con agua limitada.

Los locus codifican proteínas PIN que están asociadas con las auxinas. Las proteínas PIN son portadores de eflujo de auxina que contiene dominios de transmembrana y se emplazan principalmente en las membranas plasmáticas. El término "PIN" deriva de "inflorescencia tipo pin".

El término "SbPINn" se usa para describir tal gen en sorgo en donde n es un número que tiene el componente del portador de eflujo de auxina y n es de 1 a 11. La referencia a "SbPINn" incluye sus homólogos y ortólogos en otras plantas. Ejemplos de locus de SbPINn incluyen los que se enumeran en la Tabla 1A tal como, aunque no limitados a, SbPIN4 y SbPIN2. Se enseña en el presente documento la modulación de la expresión de un PIN o expresión de un PIN con una variación polimórfica particular para facilitar la exposición del fenotipo de permanencia verde. La presente divulgación también enseña PIN de otras plantas tales como arroz. El prefijo de letra del PIN especifica su fuente (por ejemplo, Sb, sorgo; Os, arroz; etc.). El emplazamiento de un SbPIN en sorgo se determina mediante número de ID del gen (Véase Tabla 1A). A modo de ejemplos, SbPIN4 se corresponde con OsPIN5 y SbPIN2 se corresponde con OsPIN3a.

SbPIN4 y SbPIN2 son ejemplos de SbPINs enseñados en el presente documento por ser los responsables del rasgo de permanencia verde en sorgo asociado con Stg1 y Stg2, respectivamente, resultando en un intervalo de fenotipos que confieren una adaptación a la sequía mediante un uso de agua reducido hasta la antesis (debido a una formación de brotes reducida y hojas más pequeñas), accesibilidad de agua aumentada (debido a una relación de raíz:brote aumentada), eficacia de transpiración aumentada con déficit de agua suave (debido a una concentración de nitrógeno en hoja superior), biomasa aumentada por superficie foliar con déficit de agua terminal (debido a una transpiración aumentada por superficie foliar) y rendimiento de grano aumentado, tamaño de grano y resistencia de encamado. Se enumeran otros ejemplos en la Tabla 1A e incluyen sus equivalentes en otras plantas.

La presente divulgación proporciona un método para generar una planta genéticamente modificada que usa agua de forma más eficaz que una planta no modificada genéticamente de la misma especie, comprendiendo el método la introducción mediante ingeniería genética usando medios recombinantes material genéticos que codifica una

proteína de inflorescencia tipo pin (PIN) 4 de sorgo (Sb) para conferir un fenotipo de permanencia verde, cuyo fenotipo incluye un cambio en el uso de agua al período de post-antesis o accesibilidad aumentada de agua durante el crecimiento de la cosecha o eficacia de transpiración aumentada resultando en un índice de cosecha aumentado y rendimiento de grano en condiciones con agua limitada, en donde dicha proteína SbPIN4 está codificada por el ID del Gen de Sorgo Sb03g037350 desde pb 65310051 a pb 65313194.

También se proporciona en el presente documento el uso de un material genético que codifica una proteína SbpIN4 para generar mediante medios recombinantes una planta genéticamente modificada que usa agua de forma más eficaz que una planta no modificada genéticamente de la misma especie, en donde dicha planta modificada genéticamente tiene un fenotipo de permanencia verde que incluye un cambio en el uso de agua al período de post-antesis o accesibilidad de agua aumentada durante el crecimiento de la cosecha o eficacia de transpiración aumentada resultando en un índice de cosecha aumentado y rendimiento de grano en condiciones con agua limitada y en donde dicha proteína SbPIN4 está codificada con el ID del Gen del Sorgo Sb03g037350 desde pb 65310051 a pb 65313194.

Las siguientes abreviaturas se usan en la memoria descriptiva objeto:

CI,	intervalo de confidencia
CWU,	uso de agua de cultivo
DW,	peso seco
GLA,	superficie foliar verde
HD,	alta densidad
HI,	índice de cosecha
HT,	alta formación de brotes
HW,	alta agua
HWHD,	alta agua, alta densidad (resistencia de agua intermedia)
HWLD,	alta agua, baja densidad (menor resistencia de agua)
LA,	superficie foliar
LD,	baja densidad
LT,	baja formación de brotes
LW,	baja agua
LWHD,	baja agua, alta densidad (mayor resistencia de agua)
LWLD,	baja agua, baja densidad (resistencia de agua intermedia)
NIL,	línea casi isogénica
OsPIN,	PIN de arroz
PAB,	biomasa de post-antesis
PASM,	masa de tallo de post-antesis
PIN,	inflorescencia tipo pin
PPBR,	relación de biomasa pre:post antesis
QTL,	locus de caracteres cuantitativos
ROS,	protección de arrastre por la lluvia
RWC,	contenido de agua relativo

SbPIN,	PIN de sorgo
SLW,	peso de hoja específico
SML,	aprendizaje de máquina estadístico
Stg,	permanencia verde
T,	transpiración
T2,	formación de brotes en la axila de la hoja 2
T3,	formación de brotes en la axila de la hoja 3
T4,	formación de brotes en la axila de la hoja 4
T5,	formación de brotes en la axila de la hoja 5
T6,	formación de brotes en la axila de la hoja 6
TE,	eficacia de transpiración
TS,	resistencia terminal
VPD,	déficit de la presión de vapor
WW,	bien regado

La Tabla 1A proporciona información sobre las PIN del sorgo y el arroz.

Tabla 1A

Detalles de los QTL de Stg del sorgo

ID del gen del sorgo	Homólogo del arroz	Sorgo	Cromosoma	pb (inicio)	pb (final)	Longitud (pb)	cM predicho	LOD	R ²	Aparición	Publicación	Fuente de alelo	Símbolo publicado	Sumario de QTL de Stg
Sb02g029210	OsPIN6	SbPIN1	SBI-02	64347327	64350341	30141144	3023044		1,910,7	B35/TX7000	Subudhi <i>et al.</i> 2000	B35	stg3	Stg3B
									2,54,9	N13/E36-1	Hausmann <i>et al.</i> 2002	N13	% de GL15 n.º 3	
									35,8	N13/E36-1	Hausmann <i>et al.</i> 2002	N13	% de GL30 n.º 5	
									4,99,5	N13/E36-1	Hausmann <i>et al.</i> 2002	N13	% de GL45 n.º 4	
Sb03g029320	OsPIN3a	SbPIN2	SBI-03	57449784	57453744	396088	78882569		2,6310,2	SC56/TX7000	Kebede <i>et al.</i> 2001	SC56	Stg A	Stg2
									2,6514	B35/TX7000	Subudhi <i>et al.</i> 2000	B35	stg2	
									2,656,1	296B/IS18551	Srinivas <i>et al.</i> 2009	296B	QGlaa-sbi03	
									2,97,5	296B/IS18551	Srinivas <i>et al.</i> 2009	296B	QPglam-sbi03	
									3,6619,9	B35/TX7000	Subudhi <i>et al.</i> 2000	B35	stg2	
									5,5229,2	B35/TX7000	Subudhi <i>et al.</i> 2000	B35	stg2	
									5,4422,6	B35/TX7000	Subudhi <i>et al.</i> 2000	Tx7000	stg2	
									5,624,8	B35/TX7000	Xu <i>et al.</i> 2000	Tx7000	Chl2	
									6,2330,3	B35/TX7000	Xu <i>et al.</i> 2000	B35	Stg2	
									6,628,6	B35/TX430	Crasta <i>et al.</i> 1999	B35	SGA	
									2,85,6	N13/E36-1	Hausmann <i>et al.</i> 2002	E36-1	% de GL45 n.º 5	
Sb03g032850	OsPIN1	SbPIN3	SBI-03	61297480	61299969	2489115	1215502		2,6912	B35/TX7000	Xu <i>et al.</i> 2000	Tx7000	Chl1	Stg1 (QTL más amplio)
									4,5919,6	B35/TX7000	Xu <i>et al.</i> 2000	B35	Stg1	

ID del gen del sorgo	Homólogo del arroz	Sorgo	Cromosoma	pb (inicio)	pb (final)	Longitud (pb)	cM predicho	LOD	R2	Aparición	Publicación	Fuente de alelo	Símbolo publicado	Sumario de QTL de Stg
									3,18	15,4	B35/TX7000	Subudhi <i>et al.</i> 2000	B35	Stg1
									3,61	18,1	B35/TX7000	Subudhi <i>et al.</i> 2000	B35	stg1
									14,9	26,3	IS9830/E36-1	Hausmann <i>et al.</i> 2002	IS9830	% de GL15 n.º 1
									6,5	12,4	IS9830/E36-1	Hausmann <i>et al.</i> 2002	IS9830	% de GL30 n.º 2
								Stg1 (QTL de mapeo fino)						Stg1 (QTL de mapeo fino)
Sb03g037350OsPIN5	SbPIN4	SBI-03	65310051	65313194	3143	129,5972557	678		3,63	13,4	SC56/TX7000	Kebede <i>et al.</i> 2001	SC56	Stg C.1
Sb03g043960OsPIN6	SbPIN5	SBI-03	71204119	71206483	2364	152,8989678			3,1	6,1	IS9830/E36-1	Hausmann <i>et al.</i> 2002	IS9830	% de GL15 n.º 2
									2,8	5,5	IS9830/E36-1	Hausmann <i>et al.</i> 2002	IS9830	% de GL30 n.º 3
									2,6	5,1	IS9830/E36-1	Hausmann <i>et al.</i> 2002	IS9830	% de GL45 n.º 4
									4,1	11,5	SC56/TX7000	Kebede <i>et al.</i> 2001	Tx7000	Stg C.2
Sb05g002150OsPIN1b	SbPIN7	SBI-05	2304407	2307630	3223	17,31415415	50	sml	QTL					smlQTL
									2,8	5,6	N13/E36-1	Hausmann <i>et al.</i> 2002	N13	% de GL15 n.º 5
Sb07g026370OsPIN4	SbPIN8	SBI-07	61560708	61563133	2425	123,616344			3,4	6,7	N13/E36-1	Hausmann <i>et al.</i> 2002	N13	% de GL30 n.º 7
									2,9	5,8	N13/E36-1	Hausmann <i>et al.</i> 2002	N13	% de GL45 n.º 8
Sb10g004430OsPIN1	SbPIN9	SBI-10	3915101	3917519	2418	32,96657613			3,6	13,8	SC56/TX7000	Kebede <i>et al.</i> 2001	Tx7000	Stg B
Sb10g008290OsPIN1c	SbPIN10	SBI-10	8438481	8441508	3027	45,84731059			2,7	6,1	2QL39/QL41	Tao <i>et al.</i> 2000	QL41	Stg1

ID del gen del sorgo	Homólogo del arroz	Sorgo	Cromosoma	pb (inicio)	pb (final)	Longitud (pb)	cM predicho	LOD	R2	Aparición	Publicación	Fuente de alelo	Símbolo publicado % de	Sumario de QTL de Stg
Sb10g026300	OsPIN2	SbPIN11	SBI-10	55747009	55751104	4095	82,37617984		2,75,5	N13/E36-1	Hausmann <i>et al.</i> 2002	E36-1	GL30 n.º 8	Hausmann & Crasta QTL
									2,65,2	N13/E36-1	Hausmann <i>et al.</i> 2002	E36-1	GL45 n.º 9	

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación gráfica que muestra la relación entre cañas por m² y superficie foliar verde en antesis en un intervalo de líneas casi isogénicas que contienen diversas introgresiones de Stg.

La Figura 2 es una representación gráfica que muestra la relación entre cañas por m² y superficie foliar verde para un intervalo de introgresiones de Stg en un fondo RTx7000 cultivado con dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

La Figura 3 es una representación gráfica que muestra el histograma de valores predichos para cañas por planta en el mapeo fino de población de *Stg1* promedio durante tres estaciones.

La Figura 4 es una representación tabulada que muestra un histograma de cañas por planta en un DAE 44 para cinco genotipos cosechados con dos regímenes de agua. Los genotipos comprenden RTx7000 (padre recurrente), 6078-1 (padre donador), y tres selecciones de la población de mapeo fino de *Stg1*. HWLD = alta agua, baja densidad (10 plantas/m²). LWLD = baja agua, baja densidad (10 plantas/m²).

La Figura 5 es una representación gráfica que muestra la variación fenotípica en la población de mapeo fino de *Stg1* para la presencia de T2.

La Figura 6 es una representación gráfica que muestra la variación fenotípica en la población de mapeo fino de *Stg1* para la presencia de T3.

La Figura 7 es una representación que muestra un histograma de la presencia de T2 para ocho recombinantes de alta formación de brotes y ocho recombinante de baja formación de brotes a partir de la población de mapeo fino de *Stg1*.

La Figura 8 es una representación que muestra un histograma del número de formación de brotes total por planta para cinco recombinantes de alta formación de brotes y tres recombinantes de baja formación de brotes a partir de la población de mapeo fino de *Stg1*. Se escogió un valor de 2,5 como el corte arbitrario entre la formación de brotes alta y baja.

Las Figuras de 9A a D son representaciones gráficas que muestran la distribución del tamaño de hoja del tallo principal y formación de brotes para RTx7000 and 6078-1 (*Stg1* NIL) cultivados en lisímetros con condiciones de VDP bajas y altas.

La Figura 10 es una representación gráfica que muestra las distribuciones de tamaño de hoja del tallo principal de RTx7000, 6078-1 (*Stg1* NIL) y tres recombinantes a partir de la población de mapeo fino de *Stg1* cultivados en condiciones con agua limitada y de alta densidad en el campo (HD = 20 plantas/m²).

La Figura 11 es una representación gráfica que muestra el tamaño de distribución de hoja (L1-6) para los padres de la población de mapeo fino de *Stg1* cultivados en un iglú.

La Figura 12 es una representación gráfica que muestra la distribución de longitud de hoja (L1-6) para los padres de la población de mapeo fino de *Stg1* cultivados en un iglú.

La Figura 13 es una representación gráfica que muestra la distribución de la amplitud de hoja (L1-6) para los padres de la población de mapeo fino de *Stg1* cultivado en un iglú.

La Figura 14 es una representación gráfica que muestra el tamaño de distribución de hoja (11-11) para los padres de la población de cartografía fina de *Stg1* cultivados en un iglú.

La Figura 15 es una representación gráfica que muestra la distribución de longitud de hoja (L1-10) para los padres de la población de mapeo fino de *Stg1* cultivados en un iglú.

La Figura 16 es una representación que muestra un histograma de variación fenotípica para la longitud L10 en un subconjunto de la población de mapeo fino de *Stg1* cultivado en un iglú.

La Figura 17 es una representación diagramática que muestra que la disponibilidad de agua aumentada en antesis se consigue a través de un uso de agua reducido debido a los dos mecanismos (formación de brotes reducida y hojas más pequeñas) en plantas que contienen la región *Stg1*.

La Figura 18 es una representación que muestra que el tamaño del dosel se modula por tanto respuestas constitutivas como adaptativas controladas por un(os) gen(es) en la región *Stg1*.

La Figura 19 es una representación gráfica que muestra las distribuciones de tamaño de hoja del tallo principal de RTx7000, 6078-1 (Stg1 NIL) y tres recombinantes a partir de la población de mapeo fino de Stg1 cultivados en condiciones con agua limitada y de alta densidad en el campo (HD = 20 plantas/m²).

5 La Figura 20 es una representación gráfica que muestra la relación entre la superficie foliar 12 y la superficie foliar verde total en la antesis para los dos padres (6078-1 y RTx7000) y tres recombinantes a partir de la población de mapeo fino de Stg1.

10 La Figura 21 es una representación gráfica que muestra la relación entre la superficie foliar verde total (cm²/m²) y uso de agua de cultivo (mm) en antesis para los dos padres (6078-1 and RTx7000) y tres recombinantes a partir de la población de mapeo fino Stg1.

15 La Figura 22 es una representación gráfica que muestra la relación entre la superficie foliar verde y el uso de agua (T) en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) en estudios de lisimetría con dos niveles de VPD.

La Figura 23 es una representación gráfica que muestra un histograma de variación fenotípica para la "relación raíz:brote) en la población de mapeo fino de L6 y Stg1 cultivados en un iglú.

20 La Figura 24 es una representación gráfica que muestra el patrón temporal de uso de agua de cultivo acumulativo para RTx7000 y Stg1 cultivados en condiciones de baja agua y baja densidad (20 plantas/m²). La línea vertical marca la antesis.

25 La Figura 25 es una representación gráfica que muestra la relación entre la longitud (mm) y verdor (SPAD) de la hoja 10 en la población de mapeo fino de Stg1 cultivada en un iglú.

La Figura 26 es una representación gráfica que muestra la relación entre el verdor foliar (SPAD) y la fotosíntesis de hoja en un subconjunto de líneas a partir de la población de mapeo fino de Stg1, que incluye los padres.

30 La Figura 27 es una representación gráfica que muestra la relación entre el verdor foliar (SPAD) y WUE (Licor) en un subconjunto de líneas a partir de la población de mapeo fino de Stg1, que incluye los padres.

La Figura 28 es una representación gráfica que muestra la relación entre el verdor foliar (SPAD) y WUE (Licor) en cuatro Stg Nils (Stg1, Stg2, Stg3 and Stg4) y el padre recurrente (RTx7000).

35 La Figura 29 es una representación gráfica que muestra la relación entre la transpiración por superficie foliar y eficacia de transpiración en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) en estudios de lisimetría con dos niveles de VPD.

40 La Figura 30 es una representación gráfica que muestra la relación entre CWU (mm) antes y después de la antesis en un subconjunto de líneas a partir de la población de mapeo fino de Stg1, que incluye los padres, cultivados en condiciones de alta densidad (HD) y baja densidad (HD).

Las Figuras 31A y B son representaciones gráficas que muestran patrones de uso de agua acumulativo para Stg1 y RTx7000 cultivados en condiciones LWHD.

45 La Figura 32 es una representación gráfica que muestra la relación entre CWU (mm) antes y después de la antesis en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivado en condiciones de baja agua (LW) y baja densidad (LD).

50 La Figura 33 es una representación gráfica que muestra la relación entre PPBR y PAB en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

55 La Figura 34 es una representación gráfica que muestra la relación entre GLAA y PPBR en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones de agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

60 La Figura 35 es una representación gráfica que muestra la relación entre GLAA y PASB en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

La Figura 36 es una representación gráfica que muestra la relación entre PPBR y PAB en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

65

La Figura 37 es una representación gráfica que muestra la relación entre PPBR y PASM en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

5 La Figura 38 es una representación gráfica que muestra la relación entre PPBR y rendimiento de grano en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

10 La Figura 39 es una representación gráfica que muestra la relación entre RWC en formación de medio grano (FL-2) y la tasa relativa de senescencia folicular en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

15 La Figura 40 es una representación gráfica que muestra la relación entre la tasa relativa de senescencia folicular y superficie foliar verde en madurez en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

20 La Figura 41 es una representación gráfica que muestra la relación entre el contenido de agua relativo (RWC) en formación de medio grano en formación de medio grano (FL-2) y la masa del tallo en su madurez en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

25 La Figura 42 es una representación gráfica que muestra la relación entre la masa de tallo de post-antesis (PASM) y la biomasa post-antesis (PAB) en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

La Figura 43 es una representación gráfica que muestra la relación entre la biomasa del tallo post-antesis y el rendimiento de grano en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

30 La Figura 44 es una representación gráfica que muestra la relación entre la masa de tallo de post-antesis (PASM) y la biomasa post-antesis (PAB) en cuatro Stg1 QTL y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo cultivadas en un experimento en 2005 (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

35 La Figura 45 es una representación gráfica que muestra la relación entre la masa del tallo post-antesis y el rendimiento de grano en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²) cultivadas en un experimento en 2005.

40 La Figura 46 es una representación gráfica que muestra la relación entre la masa de tallo de post-antesis (PASM) y la biomasa post-antesis (PAB) en diversas líneas de mapeo fino de Stg1 y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

45 La Figura 47 es una representación gráfica que muestra la relación entre el contenido de agua relativo (RWC) en formación de medio grano en formación de medio grano (FL-2) y el rendimiento de grano en diversas combinaciones de QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²) en un experimento cultivado en 2004.

50 La Figura 48 es una representación gráfica que muestra la relación entre el potencial de agua folicular (LWP) de FL-2 en formación de medio grano (barras) y el rendimiento de grano (g/m²) en el Stg1 QTL (6078-1) y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

55 La Figura 49 es una representación gráfica que muestra la relación entre PPBR y CWU durante la formación de grano en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

60 La Figura 50 es una representación gráfica que muestra la relación entre el CWU durante la formación de grano (mm) y rendimiento de grano (g/m²) en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

La Figura 51 es una representación gráfica que muestra la relación entre PPBR y rendimiento de grano en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

65

La Figura 52 es una representación gráfica que muestra la relación entre el CWU durante la formación de grano (mm) y el tamaño de grano (mg) en cuatro Stg QTL y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

La Figura 53 es una representación gráfica que muestra la relación entre PPBR y el tamaño de grano en cuatro QTL de Stg y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

La Figura 54 es una representación gráfica que muestra la relación entre PPBR y CWU durante la formación de grano en diversas líneas de mapeo fino de Stg1 y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

La Figura 55 es una representación gráfica que muestra la relación entre el CWU durante la formación de grano (mm) y el rendimiento de grano (g/m²) en diversas líneas de mapeo fino de Stg1 y el padre recurrente (RTx7000) cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (LD =10 plantas/m²; HD = 20 plantas/m²).

Las Figuras 56A a C son representaciones gráficas que muestran los resultados de llevar a cabo un modelo de simulación de cultivo de sorgo usando la variedad genérica de Buster con los 2 formadores de brotes/planta (HT) frente a un Buster con solo 1 formador de brotes/planta (LT) en un entorno virtual bien regado (WW) y de resistencia terminal (TS). Para ambos entornos virtuales se escogieron los siguientes parámetros: densidad de plantación 5 plantas/m² con 1m de espaciado entre filas; profundidad del suelo = 1.800 mm; PAWC del suelo = 324 mm; N no limitante.

La Figura 57A es una representación gráfica de la expresión diferencial de SbPIN4 (candidato de Stg1) en condiciones bien regadas. En condiciones bien regadas, este gen se regula negativamente en puntas radiculares jóvenes Tx642 y Stg1 NIL en comparación con Tx7000.

La Figura 57B es una representación gráfica de la expresión diferencial de SbPIN4 (candidato de Stg1) en condiciones deficientes en agua. En condiciones deficientes en agua, este gen se regula positivamente en la mayoría de tejidos, pero especialmente en hojas en expansión de Tx642 y Stg1 NIL con comparación con Tx7000.

La Figura 57C es una representación gráfica de la expresión diferencial de SbPIN2 (candidato de Stg2) en condiciones bien regadas. En condiciones bien regadas, este gen se regula ligeramente positivamente en tejidos de la raíz y tallo de Tx642 y Stg1 NIL en comparación con Tx7000.

La Figura 57D es una representación gráfica de la expresión diferencial de SbPIN2 (candidato de Stg 2) en condiciones deficientes en agua. En condiciones deficientes en agua, este gen se regula positivamente en la mayoría de tejidos de Tx642 y Stg1 NIL en comparación con Tx7000.

Descripción detallada

En toda esta especificación, a no ser que el contexto requiera lo contrario, se entiende que la palabra "comprenden" o variantes, tales como "comprende" o "comprender", se entenderá que implica la inclusión de un elemento o número entero o etapa de método o grupo de elementos o de números enteros o de etapas de métodos establecidos, pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero o etapa de método o grupo de elementos o números enteros o etapas de método.

Tal como se usa en la memoria descriptiva objeto, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen los aspectos plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un locus" incluye un único locus, así como dos o más locus; la referencia a "una auxina" incluye una única auxina, así como a dos o más auxinas; la referencia a "la divulgación" incluye un único y múltiples aspectos enseñados por la divulgación.

La presente divulgación enseña QTL asociados con y que facilitan el fenotipo de permanencia verde en cultivos incluidas plantas de cereales. Los QTL se denominan genéricamente como StgX en donde X es un número a partir de 1 y superior que se corresponde con un locus genético o región de locus genético sobre un cromosoma particular en una planta de cultivo. Una subregión se refiere como StgXm en donde m es una denominación alfabética de una región dentro del StgX. La modulación de la expresión de un StgX en todos o en el tejido seleccionado en una planta se enseña en el presente documento como una red fisiológica y genética que induce o promueve un cambio en el uso de agua por la planta de cultivo en el período post-antesis o una accesibilidad aumentada de agua durante el crecimiento del cultivo o una eficacia de transpiración aumentada, aumentando, de este modo, el índice de cosecha (HI) y rendimiento de grano en condiciones con agua limitada. "Expresión" de un StgX incluye niveles de expresión de regulación positiva y de regulación negativa (es decir, modulación de expresión) de un locus así como la selección de una variante polimórfica que se expresa a un nivel superior o inferior o que codifica un producto más o menos activo en todos o en el tejido seleccionado en una planta. El locus puede por sí mismo conferir este fenotipo o un equivalente funcional del mismo tal como un ADNc que codifica la misma proteína codificada por el locus.

Los QTL identifican locus que codifican proteínas PIN. Las proteínas PIN son portadores de eflujo de auxina que contiene dominios de transmembrana y se emplazan principalmente en las membranas plasmáticas. El término "PIN" deriva de "inflorescencia tipo pin". Una PIN de sorgo es una "SbPIN". La presente divulgación desvela el uso de PIN a partir de cualquier planta (por ejemplo, una OsPIN de arroz). Los emplazamientos genómicos de las SbPIN del sorgo se describen en la Tabla 1A.

En el presente documento se proporciona un método para generar una planta genéticamente modificada que usa agua de forma más eficaz que una planta no modificada genéticamente de la misma especie, comprendiendo el método la introducción mediante ingeniería genética usando medios recombinantes de material genético que codifica una proteína SbPIN4 para conferir un fenotipo de permanencia verde, cuyo fenotipo incluye un cambio en el uso de agua al período de post-antesis o accesibilidad aumentada de agua durante el crecimiento de la cosecha o eficacia de transpiración aumentada resultando en un índice de cosecha aumentado y rendimiento de grano en condiciones con agua limitada, en donde dicha proteína SbPIN4 está codificada por el ID del Gen de Sorgo Sb03g037350 desde pb 65310051 a pb 65313194.

Los métodos que se desvelan en el presente documento para generar una planta genéticamente modificada que usa agua de forma más eficaz que una planta no modificada genéticamente de la misma especie más generalmente incluye la introducción a una planta o padre de la planta de un agente genético que codifica una proteína SbPIN de sorgo seleccionada desde SbPIN1 a SbPIN11 o un equivalente en otra planta o que modulan la expresión de una PIN indígena. Ejemplos de PIN incluyen SbPIN4 y SbPIN2 y otras SbPINs enumeradas en la Tabla 1A y sus equivalentes en otra planta así como un PIN que tiene una variación polimórfica particularmente deseada que, por ejemplo, permite un perfil de expresión alterada de niveles elevados de la proteína PIN. Ejemplos de PIN en otras plantas OsPIN5 que se corresponde con SbPIN4 y OsPIN3a que se corresponde con SbPIN2.

El agente genético puede ser un locus o una región genómica o su equivalente funcional tal como ADNc o un fragmento de ADN genómico. El agente puede modular la expresión de un locus PIN indígena en una planta particular, pero tal como se reivindica en el presente documento el agente codifica una proteína SbPIN4. Mediante "introducir" se hace referencia a la intervención recombinante o la mutagénesis o cultivo seguido por la selección, pero tal como se reivindica en el presente documento el agente se introduce mediante ingeniería genética usando medios recombinantes.

Sin pretender limitar la tecnología de la presente memoria descriptiva a cualquier teoría o modo de acción, la modulación de la expresión de una PIN sola o en combinación con una red genética o fisiológica altera la arquitectura de la planta para mejorar o, de otro modo, promover un uso de agua eficaz. En un aspecto, la arquitectura modificada es una arquitectura del dosel de la planta modificada.

El término "progenie" incluye la progenie inmediata así como los parientes lejanos de la planta, siempre y cuando exprese de forma estable el rasgo de permanencia verde introducido en primer lugar a un pariente más temprano.

La referencia a una "planta de cultivo" incluye una planta de cereales. Las plantas de cereales permitidas en el presente documento incluyen sorgo, trigo, avena, maíz, cebada, centeno, arroz, abacá, alfalfa, almendras, manzana, espárragos, plátano, judía-*phaseolus*, mora, haba común, canola, anacardo, yuca, garbanzos, cítrico, coco, café, com, algodón, higos, lino, uvas, de cacahuete, cáñamo, kenaf, lavanda, mano, champiñón, de oliva, cebolla, guisantes, cacahuete, pera, mijo perla, patata, ramio, colza, trigollo, soja, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, boniato, taro, té, tabaco, tomate, triticale, trufa y ñame. En un ejemplo, los mecanismos de tolerancia a la sequía del sorgo se usan para promover la tolerancia a la sequía en el sorgo así como en otras plantas de cultivo. Una planta genéticamente modificada mediante el método de la invención usa agua de forma más eficaz que una planta no modificada genéticamente de la misma especie. Los locus PIN existentes en cada una de las anteriores plantas se refieren como PIN "indígenas". La presente divulgación enseña la regulación positiva y negativa de una PIN indígena o la selección de una PIN que tiene un perfil de expresión particular. Una PIN "indígena" es un locus de PIN en una planta madre antes de cualquier manipulación (recombinación, mutagénesis o cultivo).

Por "tolerancia a la sequía" se incluye la evasión a la sequía, adaptación a la sequía, resistencia a la sequía, sensibilidad reducida a condiciones de sequía, eficacia del uso de agua mejorado así como una capacidad de cambiar el uso de agua al período de post-antesis o accesibilidad aumento de agua durante el crecimiento del cultivo, aumentando, de este modo, el HI y rendimiento de grano en condiciones con agua limitada. Las plantas que muestran tolerancia a la sequía se describen como "plantas adaptadas a la sequía" o "plantas que muestran una sensibilidad reducida a condiciones con agua limitada". En el presente documento se enseña que la tolerancia a la sequía se induce, facilita por o, de otro modo, se asocia con el fenotipo de permanencia verde.

Por "genéticamente modificada", con respecto a una planta, incluye una planta genéticamente modificada originalmente derivada así como cualquier progenie, inmediata o distinta que exprese de forma estable el rasgo de permanencia verde. La presente divulgación enseña el uso de una tecnología de ingeniería genética para introducir el agente genético. Esto queda abarcado por los términos "medios de ingeniería genética" y "medios recombinantes". Los marcadores que definen la permanencia verde también pueden seleccionarse durante los

protocolos de cultivo para controlar la transferencia de regiones genéticas particulares. Además, se inserta genéticamente una región de permanencia verde específica mediante medios recombinantes en una célula vegetal o un callo vegetal y se regenera una plántula. Una planta "genéticamente modificada" incluye un padre o cualquier progenie así como cualquier producto de la planta tal como grano, semilla, material de propagación, polen y ovocito. Además, el locus de la PIN puede expresarse en un tejido vegetal particular pero no expresarse o su expresión puede reducirse en otro tejido. Además, puede someterse a mutagénesis una planta tal como mutagénesis genética, radioactiva o química y seleccionarse las plantas mutadas con una PIN que tenga un fenotipo deseado.

La referencia al "fenotipo de permanencia verde" incluye características seleccionadas entre la plasticidad de la arquitectura del dosel aumentada, tamaño del dosel reducido, biomasa mejorada por unidad de superficie foliar en antesis, eficacia de transpiración superior, uso de agua aumentado durante formación del grano, estado de agua de la planta aumentado durante la formación del grano, relación de biomasa pre:post antesis reducida, senescencia retardada, rendimiento de cosecha aumentado, tamaño de grano más grande y encamado reducido.

Por tanto, en el presente documento se enseña el uso de material genético que codifica un SbPIN4 para facilitar el fenotipo de permanencia verde.

En el presente documento se permiten plantas genéticamente modificadas que muestran el fenotipo de permanencia verde como resultado de la modificación genética así como semillas, frutos, flores y otro material reproductivo u otro material de propagación. También se permite materia prima de raíz y materia prima de propagación. Esto se basa sobre la premisa de que las semillas, frutos, flores, material reproductivo y de propagación muestran o pueden pasar sobre el fenotipo de permanencia verde introducido en el padre(s) final.

La referencia a un "agente que modula los niveles de expresión de una PIN" incluye promotores, microARN, genes y compuestos químicos que facilitan la expresión aumentada o reducida del gen en todos o el tejido seleccionado o la actividad aumentada o reducida de un producto génico así como ADNc y fragmentos genómicos. Un agente también puede ser un intrón de un gen genómico que es parte de una red genética natural para facilitar la modulación de expresión.

Una proteína PIN produce un gradiente de auxina en células y contiene un dominio de transmembrana y está principalmente emplazada en la membrana plasmática. Las proteínas PIN son los factores limitantes de la tasa del transporte de auxina y proporcionan la dirección vectorial para los flujos de la auxina. En el presente documento se enseña que al menos uno de Stg1 o Stg2 codifica una proteína PIN. La introducción de Stg1 o Stg2 *de novo* en una planta o la elevación de su modulación o expresión de un Stg1 o Stg2 indígena se enseña para facilitar la exposición de una o más características o subcaracterísticas asociadas con el fenotipo de permanencia verde.

Tal como se ha indicado anteriormente, Las proteínas PIN son portadores de eflujo de auxina que median el transporte de auxina polar (PAT) de célula a célula a diferencia del transporte de la auxina a través del xilema (Rashotte *et al.*, Plant Cell 13:1683-1697, 2000; Friml *et al.*, Current Opinion in Plant Biology 6:7-12, 2003). El término 'PIN' deriva de la inflorescencia tipo pin que se desarrolla en la Arabidopsis cuando el transporte de auxina es defectuoso.

La presente divulgación enseña que los SbPIN4 y SbPIN2 de sorgo son genes de adaptación a la sequía junto con otros SbPINs así como sus equivalentes en otras plantas. Las diferencias en la señalización de auxinas explican todos los múltiples fenotipos observados en plantas con un perfil de expresión PIN. Los fenotipos expuestos por plantas de SbPIN4 o SbPIN2 se explican, por ejemplo, por cambios en el eflujo de auxinas e incluyen una formación de brotes reducida, hojas más pequeñas (tanto en longitud como amplitud), masa foliar reducida y relación raíz:brote aumentada. Los fenotipos expuestos por las plantas SbPIN4 o SbPIN2, por ejemplo, también pueden explicarse indirectamente (o como consecuencias emergentes de estos efectos directos) e incluyen disponibilidad aumentada de agua en la antesis, una concentración N foliar superior en antesis, una transpiración y biomasa por unidad de superficie foliar aumentadas, eficacia de transpiración superior, retención de superficie foliar verde durante la formación del grano, índice de cosecha aumentado, rendimiento de grano superior, tamaño de grano más grande y resistencia de encamado aumentada. En el presente documento se enseña que los equivalentes de SbPIN4 y SbPIN2 y otros SbPINs son operativos por todas las otras especies principales de cereales y cosecha para mejorar la adaptación a la sequía en localidades en todo el mundo en las que el agua limita el crecimiento de cultivo post-antesis.

De acuerdo con las enseñanzas de la presente memoria descriptiva, la modulación de la expresión de una PIN seleccionada desde SbPIN1 a 11 tal como SbPIN4 (Stg1) y SbPIN2 (Stg2) o su equivalente en otra planta en todos o el tejido seleccionado confiere adaptación a la sequía tanto directa como indirectamente, llevando en última instancia a un rendimiento de grano superior, un tamaño de grano más grande y una resistencia de encamado en condiciones con agua limitada.

El fenotipo de permanencia verde puede implicar la presente de múltiples proteínas tales como dos o más de SbPIN1 a 11 tal como SbPIN4 y SbPIN2.

En el presente documento se enseña un método para generar una planta genéticamente modificada que usa agua de forma más eficaz que una planta no modificada genéticamente de la misma especie, comprendiendo el método la introducción en una planta o padre de la planta un agente genético que codifica dos o más PIN que incluyen SbPIN4 para conferir un fenotipo de permanencia verde, cuyo fenotipo incluye un cambio en el uso de agua al período de post-antesis o accesibilidad aumentada de agua durante el crecimiento de la cosecha o eficacia de transpiración aumentada resultando en un índice de cosecha aumentado y rendimiento de grano en condiciones con agua limitada.

Por "dos o más" se refiere a 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 o 9 o 10 u 11.

En un ejemplo, el material genético codifica (i) SbPIN4 y (ii) un agente que modula los niveles de expresión de SbPIN4 o su equivalente en otra planta, un agente que codifica SbPIN2 o un agente que modula la expresión de SbPIN2 o su equivalente en otra planta.

La disponibilidad de agua aumentada en antesis se consigue a través de un uso de agua reducido debido a los dos mecanismos (formación de brotes reducida y hojas más pequeñas) en plantas que contienen la región Stg1. Ambos mecanismos, individualmente, parecen reducir el tamaño del dosel en aproximadamente un 9 %, en promedio. El mecanismo de 'formación de brotes bajo' domina en entornos con baja densidad cuando el potencial de formación de brotes es elevado. El 'mecanismo de hoja pequeña' domina en entornos con alta densidad cuando el potencial de formación de brotes es bajo. Combinados, estos dos mecanismos proporcionan a las plantas de cultivo con una plasticidad considerable para modificar la arquitectura del dosel en respuesta con la gravedad de la limitación de agua.

La permanencia verde mejora la plasticidad de la arquitectura del dosel a través de respuestas constitutivas y adaptativas. El tamaño del dosel en Stg1 o Stg2 se reduce en aproximadamente un 5 %, incluso cuando el agua no es limitante (respuesta constitutiva). El tamaño del dosel se reduce adicionalmente (respuesta adaptativa) en una sequía suave (~10 %) y una sequía más grave (~15 %). La formación de brotes baja es principalmente una respuesta constitutiva. El tamaño de hoja pequeña es tanto una respuesta constitutiva como adaptativa.

Además, en el presente documento se enseña que la región de Stg1 o Stg2 confiere adaptación a la sequía reduciendo el tamaño del dosel (a través de una formación de brotes reducida y hojas más pequeñas) y reduciendo el uso de agua de cultivo en la antesis. Esto se muestra mediante una alta correlación ($r^2=0,9$) entre el tamaño del dosel y el uso de agua de cultivo en sequía artificial (protección de arrastre por la lluvia [ROS]) y estudios de lisímetros.

La disponibilidad de agua aumentada en la antesis también se consigue a través de una accesibilidad de agua aumentada (mejor extracción de agua y propagación lateral más profunda o superior).

La permanencia verde mejora la biomasa por unidad de superficie foliar en antesis. Asumiendo que la masa de raíz es equivalente (o al menos no significativamente inferior), estas diferencias podrían explicarse mediante diferencias en la transpiración (T) por unidad de superficie foliar [LA] (T/LA) y/o eficacia de transpiración (TE). Los estudios de lisimetría indican que los aumentos en T/LA, en lugar de TE, conducen a los aumentos observados en la biomasa por superficie foliar. Cabe destacar que la T/LA aumentada solo se produjo cuando el déficit de agua era la suficiente para reducir la superficie foliar. Cuando el déficit de agua era menos grave (es decir, no lo suficiente para reducir la superficie foliar), entonces la T/LA disminuyó, resultando en una TE superior.

También se observa una TE superior en líneas StgX tales como líneas Stg1 o Stg2 cuando el déficit de agua es menos grave. Se propone que la TE aumentada a través de la introgresión de Stg1 o Stg2 se debe a) la capacidad fotosintética proporcionalmente superior en comparación con la conductancia estomatal, debido a hojas más pequeñas, más finas y más verdes y/o b) una disminución en la transpiración mientras que se mantiene la biomasa. Los estudios de lisimetría indican que ambos mecanismos contribuyen una TE superior en líneas Stg1, con la reducción en la transpiración del mecanismo primario.

Se enseña en el presente documento que los cambios en la transpiración por unidad de superficie foliar se debe a a) número de estomas, b) tamaño de abertura estomatal, c) cambios en el tiempo de abertura y cierre estomatal con respecto a VPD y/o d) el número de células de base capilar (que afecta a la capa límite y, por lo tanto, la T/LA). La introgresión de Stg1, por ejemplo, en la anatomía de hoja modificada de RTx7000 aumentando el número de células de vaina de haz alrededor del haz vascular.

Las diferencias en la morfología de las hojas son aparentes entre RTx7000 y Stg1 o Stg2. En este caso, hubo más vainas de haz y más pequeñas alrededor del haz vascular en Stg1 o Stg2. También, hubo menos estomas y más células de base capilar por unidad de superficie foliar (hojas 7 y 10) en Stg1 en comparación con RTx7000.

El uso de agua aumentado durante formación del grano se logra a través de (i) disponibilidad de agua aumentada en la antesis y (ii) accesibilidad de agua aumentada (mejor extracción de agua y propagación lateral más profunda o superior) durante la formación del grano.

El uso de agua de cultivo (CWU) antes de la antesis se correlacionó de forma negativa con el CWU después de la antesis en un experimento de sequía artificial (protección de arrastre por la lluvia [ROS]). Por ejemplo, en un experimento, un 25 % de aumento en uso de agua después de la antesis (80 frente a 60 mm) resultó en un aumento del 25 % en el rendimiento de grano (400 frente a 300 g/m²). Esto se tradujo en 50 kg/ha de grano para cada mm adicional de agua disponible.

El uso de agua aumentado durante el período de formación del grano se mostró por Stg1 o Stg2 con tratamiento de densidad tanto baja como alta en un experimento de protección de arrastre por la lluvia (ROS). Esto se debió principalmente a (i) el uso de agua reducido en la antesis con alta densidad y (ii) la accesibilidad de agua aumentada durante la formación del grano con baja densidad.

En el presente documento se enseña que StgX tal como Stg1 o Stg2 confiere una adaptación a la sequía asociándose con la producción de biomasa pre- y post-antesis. La región de Stg1 o Stg2, por ejemplo, reduce la relación de biomasa pre:post antesis por debajo de un nivel crítico, aumentando el rendimiento de grano y la resistencia de encamado.

De acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación, la expresión de StgX tal como Stg1, Stg2, Stg3 y/o Stg4 facilita uno o más de los siguientes fenotipos:

(i) senescencia de hoja retardada (permanencia verde), rendimiento de grano superior y resistencia de encamado son consecuencia de un estado de agua de la planta superior durante la formación del grano (debido al uso de agua aumentado durante formación del grano);

(ii) introgresión de StgX en un, por ejemplo, fondo de RTx7000 aumenta el estado de agua de la planta en la formación de medio grano, tal como se indica por a) un contenido de agua relativo (RWC) y b) un potencial de agua de hoja inferior (LWP);

(iii) un rendimiento de grano superior y un tamaño de grano más grande son consecuencias de una disponibilidad de agua aumentada durante la formación del grano;

(iv) rendimiento de grano superior, tamaño de grano más grande y resistencia de encamado aumentada no son mutuamente exclusivos (es decir, todos los tres rasgos se muestran mediante StgX);

(v) la ventaja de tamaño de grano y rendimiento son relativamente superiores en una sequía terminal grave que en una sequía terminal suave;

(vi) el beneficio de los genes de permanencia verde en un, por ejemplo, fondo de RTx7000 (congénitos) aparece en el intervalo de rendimiento de 1-3 t/ha (12-22 %), seguido por un beneficio inferior pero aún significativo en el intervalo 3-4 t/ha de rendimiento (8-10 %). Hubo, sin embargo, una pequeña penalización asociada con estas regiones (2-4 %) en niveles de rendimiento superiores (5-8 t/ha) debido a condiciones más húmedas. Cabe destacar que estos intervalos de rendimiento serían considerablemente superiores en híbridos. Puesto que el rendimiento de grano del sorgo promedio para híbridos en la franja de granos del norte es de aproximadamente 2,5 t/ha, el beneficio de los genes de permanencia verde deben ser significantes. No se ha observado una reducción en el rendimiento de grano en condiciones más húmedas (agua no limitante) puesto que se ha observado la permanencia verde en híbridos;

(vii) introgresión de StgX en un, por ejemplo, RTx7000 también aumenta el tamaño del grano en un 11 %, en promedio, con una sequía terminal grave. No hubo impacto sobre el StgX QTL sobre el tamaño de grano en una sequía terminal suave o sin sequía; y

(viii) cada uno de los mecanismos clave de StgX mapea una región definida, sugiriendo que la acción de un único gen tiene múltiples efectos pleiotrópicos.

También se describe pero no se reivindica en el presente documento un modelo de negocio para mejorar el rendimiento económico a partir de una producción de cultivo. De acuerdo con estas enseñanzas, se proporciona un modelo de negocio para un rendimiento económico mejora sobre el rendimiento del cultivo, comprendiendo el modelo la generación de plantas de cultivo que tienen un perfil de expresión de PIN que resulta en que la planta de cultivo tiene un cambio en el uso de agua por la planta al período de post-antesis o accesibilidad de agua aumentada durante el crecimiento del cultivo aumentando, de este modo, el HI y rendimiento de grano en condiciones con agua limitada, obteniendo semillas a partir de la planta de cultivo generada y distribuyendo las semillas a productores de granos para producir un rendimiento y beneficios mejorados. La referencia a una PIN incluye SbPIN1 a 11 tal como SbPIN4 y SbPIN2, así como sus equivalentes en otras plantas.

En el presente documento se desvela un sistema de gestión de plantas para reducir la dependencia del cultivo al agua o, de otro modo, mejorar la eficacia de uso de agua y para mejorar el rendimiento de grano o de producto. El

sistema de gestión de plantas incluye la generación de un cultivo adaptado a la sequía que incluye plantas de cereales que usan la selección y expresión moduladas del locus PIN o su equivalente funcional tal como se define en el presente documento solo o en combinación con la introducción de otros rasgos útiles tales como el tamaño de grano, tamaño de raíz, tolerancia a la sal, resistencia herbicida, resistencia a las plagas y similares. Como alternativa o además, el sistema de gestión de plantas comprende la generación de plantas adaptadas a la sequía y procedimientos agrícolas tales como riego, requisitos nutritivos, densidad y geometría del cultivo, control de las malas hierbas, control de insectos, aireación del suelo, formación de brotes reducida, lechos elevados y similares.

La presente memoria descriptiva es instructiva como medio para inducir o mejorar la capacidad de adaptación a la sequía en una planta mediante la introducción *de novo* de una o más características del fenotipo de permanencia verde o mediante la elevación o reducción de expresión de uno o más locus PIN existentes en una planta y/o seleccionando una variante polimórfica de PIN con expresión o actividad de producto mejorada o aumentada. La manipulación del fenotipo de permanencia verde puede realizarse solo o como parte de un sistema de gestión de plantas integrado que puede incluir la selección de rasgo adicional y/o técnicas agrónomas mejoradas. Los cultivos resultantes usan agua de una forma más eficaz y tienen un rendimiento de grano superior y tamaño de grano aumentado.

La presente divulgación es capacitadora con respecto al uso de un agente genético que codifica una proteína PIN en la fabricación de una planta adaptada a la sequía.

Los QTL se identifican en el presente documento como que portan uno o más locus de PIN en el que el nivel de la expresión del cual se selecciona mediante ingeniería genética, para promover un fenotipo de permanencia verde.

Las plantas modificadas genéticamente y su progenie que muestran el rasgo de permanencia verde también se desvelan en el presente documento así como las semillas, frutos y flores y otro material reproductivo o de propagación.

El material genético que codifica una proteína PIN o su homólogo u ortólogo funcional del mismo que se asocia con o facilita un fenotipo de permanencia verde, cuyo fenotipo incluye una arquitectura de dosel que facilita un cambio en el uso de agua al período de post-antesis o accesibilidad aumentada de agua durante el crecimiento de la cosecha o eficacia de transpiración aumentada resultando en un índice de cosecha aumentado y rendimiento de grano en condiciones con agua limitada; y un agente que modula en nivel de la PIN; se desvelan ambos en el presente documento.

En la invención, el material genético incluye un agente que codifica SbPIN4; y opcionalmente un agente que codifica SbPIN2. Sin embargo, un agente también puede modular niveles de expresión de SbPIN4 o SbPIN2 o un equivalente del mismo en otra planta.

El material genético incluye un agente que codifica SbPIN4, que confiere un fenotipo de permanencia verde, cuyo fenotipo incluye una arquitectura de dosel que facilita un cambio en el uso de agua al período de post-antesis o accesibilidad aumentada de agua durante el crecimiento de la cosecha o eficacia de transpiración aumentada resultando en un índice de cosecha aumentado y rendimiento de grano en condiciones con agua limitada. Los genes objeto puede usarse también como marcadores para transferir regiones de genomas que comprenden uno o más de los genes, o sus equivalentes en otras plantas, a una planta en particular para incluir el fenotipo de permanencia verde.

Ejemplos

Aspectos enseñados y capacitados en el presente documento se describen adicionalmente por los siguientes Ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1

Identificación de un gen StgX

Se ha identificado un locus de caracteres cuantitativos (QTL), que se hace referencia en el presente documento como Stg1 que es un ejemplo de un StgX, que aumenta o mejora la eficacia del uso de agua por plantas de sorgo. El Stg1 codifica un miembro bicolor de sorgo de la familia del componente 4 del portador de eflujo de auxinas, PIN4 (o SbPIN4).

Este gen de sequía principal se ha mapeado fino sobre el genoma de sorgo. Los cambios en el eflujo de las auxinas podrían explicar todos los múltiples fenotipos observados en plantas que contienen SbPIN4. El gen candidato (y región promotora) se secuencian en los dos padres de la población de mapeo fino (RTx7000 y Tx642) para identificar un polimorfismo de nucleótido único. La perfilación de la expresión del ARN de la población de mapeo fino de Stg1 también se lleva a cabo para un subconjunto de líneas, tiempo y órganos. Los fenotipos expuestos por plantas de SbPIN4 que podrían explicarse directamente por los cambios en el eflujo de auxinas e incluyen una formación de brotes reducida, hojas más pequeñas (tanto en longitud como amplitud), masa foliar reducida y relación raíz:brote

- 5 aumentada. Los fenotipos expuestos por las plantas SbPIN4 que podrían explicarse indirectamente (o como consecuencias emergentes de estos efectos directos) incluyen disponibilidad aumentada de agua en la antesis, una concentración N foliar superior en antesis, una transpiración y biomasa por unidad de superficie foliar aumentadas, relación de biomasa pre:post antesis reducida, eficacia de transpiración superior, retención de superficie foliar verde durante la formación del grano, índice de cosecha aumentado, rendimiento de grano superior, tamaño de grano más grande y resistencia de encamado aumentada. Se propone que el SbPIN4 trabaja por todas las otras especies principales de cereales y cosecha para mejorar la adaptación a la sequía en localidades en todo el mundo en las que el agua limita el crecimiento de cultivo post-antesis.
- 10 El Stg1 (SbPIN4) confiere adaptación a la sequía tanto directa como indirectamente, llevando en última instancia a un rendimiento de grano superior, un tamaño de grano más grande y una resistencia de encamado en condiciones con agua limitada.
- 15 La disponibilidad de agua aumentada en antesis se consigue a través de un uso de agua reducido debido a los dos mecanismos (formación de brotes reducida y hojas más pequeñas) en plantas que contienen la región Stg1. Ambos mecanismos, individualmente, parecen reducir el tamaño del dosel en aproximadamente un 9 %, en promedio. El mecanismo de 'formación de brotes bajo' domina en entornos con baja densidad cuando el potencial de formación de brotes es elevado. El 'mecanismo de hoja pequeña' domina en entornos con alta densidad cuando el potencial de formación de brotes es bajo. Combinados, estos dos mecanismos proporcionan a las plantas de cultivo con una plasticidad considerable para modificar la arquitectura del dosel en respuesta con la gravedad de la limitación de agua.
- 20 La permanencia verde mejora la plasticidad de la arquitectura del dosel a través de respuestas constitutivas y adaptativas. El tamaño del dosel en Stg1 se reduce en aproximadamente un 5 %, incluso cuando el agua no es limitante (respuesta constitutiva). El tamaño del dosel se reduce adicionalmente (respuesta adaptativa) en una sequía suave (~10 %) y una sequía más grave (~15 %). La formación de brotes baja es principalmente una respuesta constitutiva. El tamaño de hoja pequeña es tanto una respuesta constitutiva como adaptativa.
- 25 Existe una unión entre el tamaño del dosel reducido (a través de una formación de brotes reducida y hojas más pequeñas) y el uso de agua de cultivo en la antesis. Alta correlación ($r^2=0,9$) entre el tamaño del dosel y el uso de agua de cultivo en ROS y estudios de lisímetros.
- 30 La disponibilidad de agua aumentada en la antesis también se consigue a través de una accesibilidad de agua aumentada (mejor extracción de agua y propagación lateral más profunda o superior).
- 35 La permanencia verde mejora la biomasa por unidad de superficie foliar en antesis. Asumiendo que la masa de raíz es equivalente (o al menos no significativamente inferior), estas diferencias podrían explicarse mediante diferencias en la transpiración por unidad de superficie foliar (T/LA) y/o eficacia de transpiración (TE). Los estudios de lisimetría indican que los aumentos en T/LA, en lugar de TE, conducen a los aumentos observados en la biomasa por superficie foliar. Cabe destacar que una T/LA aumentada solo se produjo en condiciones VPD bajas; la T/LA se redujo realmente con condiciones VPD altas, seguramente como mecanismo de conservación de agua.
- 40 También se observó una TE en las líneas de Stg1 en condiciones VDP superiores. La TE aumentada a través de la introgresión de Stg1 puede deberse a a) la capacidad fotosintética proporcionalmente superior en comparación con la conductancia estomatal, debido a hojas más pequeñas, más finas y más verdes y/o b) una disminución en la transpiración mientras que se mantiene la biomasa. Los estudios de lisimetría indican que ambos mecanismos contribuyen una TE superior en líneas Stg1, con la reducción en la transpiración del mecanismo primario.
- 45 Los cambios en la transpiración por unidad de superficie foliar podrían deberse a a) número de estomas, b) tamaño de abertura estomatal, c) cambios en el tiempo de abertura y cierre estomatal con respecto a VPD y/o d) el número de células de base capilar (que afecta a la capa límite y, por lo tanto, la T/LA). La introgresión de Stg1 en RTx7000 redujo el número de estomas y aumentó el número de células de base capilares por unidad de superficie foliar en las hojas 7 y 10; ambos mecanismos pueden conservar agua reduciendo la T/LA.
- 50 La introgresión de Stg1 en la anatomía de hoja modificada de RTx7000 aumentando el número de células de vaina de haz alrededor del haz vascular. El número aumentado de células en la vaina del haz también podría contribuir a la asimilación fotosintética aumentada y, por lo tanto, TE.
- 55 Las diferencias en la morfología de las hojas (por ejemplo, hojas 7 y 10) resultan aparentes entre Tx7000 y Stg1. En este caso, hubo más vainas de haz y más pequeñas alrededor del haz vascular en Stg1. El número aumentado de células en la vaina del haz también podría contribuir a la asimilación fotosintética aumentada y, por lo tanto, TE.
- 60 El uso de agua aumentado durante formación del grano se logra a través de (i) disponibilidad de agua aumentada en la antesis y (ii) accesibilidad de agua aumentada (mejor extracción de agua y propagación lateral más profunda o superior) durante la formación del grano.
- 65

a) Disponibilidad de agua aumentada en antesis

El uso de agua de cultivo (CWU) antes de la antesis se correlacionó de forma negativa con el CWU después de la antesis en un experimento ROS. Por ejemplo, en un experimento, un 25 % de aumento en uso de agua después de la antesis (80 frente a 60 mm) resultó en un aumento del 25 % en el rendimiento de grano (400 frente a 300 g/m²). Esto se tradujo en 50 kg/ha de grano para cada mm adicional de agua disponible.

b) Accesibilidad de agua aumentada durante formación de grano

El uso de agua aumentado durante el período de formación del grano se mostró por Stg1 con tratamiento de densidad tanto baja como alta en un experimento de ROS. Esto se debió principalmente a (i) el uso de agua reducido en la antesis con alta densidad y (ii) la accesibilidad de agua aumentada durante la formación del grano con baja densidad.

La región de Stg1 confiere una adaptación a la sequía a través de un enlace entre la producción de biomasa pre- y post-antesis. La región de Stg1 reduce la relación de biomasa pre:post antesis por debajo de un nivel crítico, aumentando el rendimiento de grano y la resistencia de encamado.

Senescencia de hoja retardada (permanencia verde), rendimiento de grano superior y resistencia de encamado son consecuencia de un estado de agua de la planta superior durante la formación del grano (debido al uso de agua aumentado durante formación del grano).

La introgresión de Stg1 en un fondo de RTx7000 aumentó el estado de agua de la planta en la formación de medio grano, tal como se indica por a) un contenido de agua relativo (RWC) y b) un potencial de agua de hoja inferior (LWP).

Un rendimiento de grano superior y un tamaño de grano más grande son consecuencias de una disponibilidad de agua aumentada durante la formación del grano.

Un rendimiento de grano superior, tamaño de grano más grande y resistencia de encamado aumentada no son mutuamente exclusivos (es decir, todos los tres rasgos se muestran mediante Stg1).

La ventaja de tamaño de grano y rendimiento son relativamente superiores en una sequía terminal grave que en una sequía terminal suave.

Los estudios indican que el mayor beneficio de los genes de permanencia verde en un fondo de RTx7000 (congénitos) aparece en el intervalo de rendimiento de 1-3 t/ha (12-22 %), seguido por un beneficio inferior pero aún significativo en el intervalo 3-4 t/ha de rendimiento (8-10 %). Hubo, sin embargo, una pequeña penalización asociada con estas regiones (2-4 %) en niveles de rendimiento superiores (5-8 t/ha) debido a condiciones más húmedas. Cabe destacar que estos intervalos de rendimiento serían considerablemente superiores en híbridos. Puesto que el rendimiento de grano del sorgo promedio para híbridos en la franja de granos del norte es de aproximadamente 2,5 t/ha, el beneficio de los genes de permanencia verde deben ser significantes. En su conjunto, no se ha observado una reducción en el rendimiento de grano en condiciones más húmedas (agua no limitante) puesto que se ha observado la permanencia verde en híbridos.

La introgresión de Stg1 en RTx7000 también aumentó el tamaño del grano en un 11 %, en promedio, con una sequía terminal grave. No hubo impacto de este QTL sobre el tamaño de grano en una sequía terminal suave o sin sequía.

Cada uno de los mecanismos clave de Stg1 mapea la misma región, indicando que la acción de un único gen con múltiples efectos pleiotrópicos.

EJEMPLO 2

Formación de brotes reducida (estudios fisiológicos de NIL en el campo)

Los datos muestran el impacto de Stg1 sobre la formación de brotes en condiciones de tanto en alta agua (HW) como con baja agua (LW). Las diferencias en el desarrollo del dosel antes del florecimiento fueron en gran medida una consecuencia de la variación en la formación de brotes entre líneas. El número de cañas por m² en la antesis fue la mejor medición en su conjunto del efecto de la formación de brotes sobre la dinámica del dosel. El número de cañas por m² fueron equivalentes en ambos regímenes de agua (12,89), indicando que una formación de brotes reducida es un rasgo constitutivo. Los genotipos variaron significativamente ($P < 0,001$) en este parámetro, variando de 8,59 a 16,67. Sin embargo, el genotipo y el tratamiento no interactuaron significativamente para este parámetro.

Los números de cañas por m² se analizaron en términos de su estado de Stg y los medios de categoría se presentan en la Tabla 1. RTx7000 produjo un 41 % más ($P < 0,05$) de cañas/m² que B35 (14,07 frente a 10,00). La introgresión de la región de Stg1 en RTx7000 (6078-1) redujo las cañas/m² significativamente ($P < 0,05$) en

comparación con RTx7000 (9,40 frente a 14,07). En comparación con Stg1 solo, las introgresiones adicionales de o bien Stg2 o bien Stg4 aumentaron el número de cañas a 10,49 (combinación 1,2) y 10,74 (combinación 1,4). Cabe destacar que las tres cuasi-isolinas que no contenían regiones Stg (2212-3, 2235-11 y 6120-16) también mostraron una formación de brotes alta equivalente a Tx7000. Por lo tanto, la clasificación completa de la formación de brotes en estas líneas es de Stg1 < B35 < Stg4 < Stg2 < Stg3 < ninguno < RTx7000.

En la antesis, los números de cañas se correlacionaron altamente ($r^2=0,71$) con una superficie foliar verde total (GLAA; Figura 1).

Tabla 1

Estado de Stg	N.º de líneas	Cañas/m ² A
<i>Región de Stg1</i>		
1	1	9,40
1,2	2	10,49
1,4	1	10,74
RTx7000	7	14,07
LSD (0,05)		4,06

Cañas por m² en el padre recurrente (RTx7000) y diversas líneas que contienen introgresiones del QTL de Stg1, tanto solas como en combinación con otro QTL de Stg.

Las diferencias en la superficie foliar verde en la antesis (GLAA) fueron principalmente debido a diferencias en la superficie foliar verde de formación de brotes en la antesis (GLAAt), puesto que la GLAAt estaba altamente correlacionada con GLAA ($r^2=0,78$), sin embargo la superficie foliar del tallo principal no lo estaba.

La superficie foliar verde de formación de brotes se analizó en términos de su estado de Stg y los medios de categoría se presentan en la Tabla 2. RTx7000 produjo casi ocho veces más ($P<0,05$) de GLAAt que B35 (15460 frente a 1980). La introgresión de la región de Stg1 en RTx7000 (6078-1) redujo la GLAAt significativamente ($P<0,05$) en comparación con RTx7000 (3121 frente a 15460). En comparación con Stg1 solo, las introgresiones adicionales de o bien Stg2 o bien Stg4 aumentaron la GLAAt a 4187 (combinación 1,2) y 4797 (combinación 1,4). Todas las líneas que contenía Stg1 (en cualquier combinación) no fueron significativamente distintas ($P<0,05$) en GLAAt a partir de Stg1 solo. Cabe destacar que la GLAAt en las tres cuasi-isolinas que no contenían regiones Stg (2212-3, 2235-11 y 6120-16) no fue significativamente distinta de RTx7000. Por lo tanto, las clasificaciones significativamente distintas ($P<0,05$) de GLAAt en estas líneas son B35 = Stg1 = Stg4 < Stg2 = Stg3 < ninguno = RTx7000.

Tabla 2

Estado de Stg	N.º de líneas	Superficie foliar verde de formación de brotes en antesis
<i>Región de Stg1</i>		(cm ² /m ²)
1	1	3121
1,2	2	4187
1,4	1	4797
RTx7000	7	15460
LSD (0,05)		5282

La superficie foliar verde de formación de brotes en antesis en el padre recurrente (RTx7000) y diversas líneas que contienen introgresiones del QTL de Stg1, tanto solas como en combinación con otro QTL de Stg.

La superficie foliar verde y cañas por m² en la antesis se correlacionaron altamente con tratamiento de densidad alta (HD) y baja (LD) en el experimento de protección de arrastre por la lluvia (Figura 2). La introgresión de las regiones de Stg1 o Stg1a en RTx7000 redujo las cañas por m² y la GLAA en ambas densidades.

EJEMPLO 3

Formación de brotes reducida (estudios de mapeo fino)

Se cultivó una población de mapeo fino de Stg1 en el campo en condiciones de densidad alta y baja en tres años consecutivos. Se midió el número de cañas por planta en antesis en cada año y se realizó un análisis combinado en todos los años. En su conjunto, RTx7000 produjo un 47 % más de cañas por planta que 6078-1 (1.85 frente a 1.26; Figura 3).

En estos estudios de campo, se mapeó el rasgo (número de caña por planta). Un valor arbitrario de 1,54 cañas por planta proporcionó la separación óptima entre formación de brotes alta y baja para fines de mapeo (es decir, recombinantes con menos de 1,54 cañas fueron genotipos BB mientras que aquellos con más de 1,54 cañas fueron genotipos TT). Al bajar a través de los marcadores revela que se consiguió una ganancia de función (baja formación de brotes) en tres genotipos (10564-2, 10704-1 y 10620-4). Un recombinante (10568-2) mostró un alto fenotipo de formación de brotes, mientras que otros tres (10620-4, 10704-1 y 10564-2) mostraron fenotipos de baja formación de brotes. Se propuso un gen de componente 5 del portador del flujo de auxinas para que fuera el gen candidato.

EJEMPLO 4

Formación de brotes reducida (estudios de mapeo fino de Stg1 en la ROS)

Se cultivó un subconjunto de población de mapeo fino de Stg1 en el campo en la protección de arrastre por la lluvia (ROS) con condiciones de agua alta y baja, con cada tratamiento de agua separado para densidad alta y baja. Esto creó cuatro regímenes con niveles crecientes de déficit de agua: HWLD (lo menos acentuado) <HWHD<LWLD<LWHD (lo más acentuado). Se midió el número de cañas por planta a los 44 días después de la aparición en cada solar. Las diferencias fueron más obvias en el tratamiento de baja densidad (LD), puesto que la expresión de la formación de brotes se maximizó en este tratamiento. En promedio, RTx7000, 10568-2 y 10709-5 produjo un 27 % más de cañas por planta que 6078-1 y 10604-5 en condiciones LWLD (2,05 frente a 1,62; Figura 4) y un 23 % más de cañas por planta en condiciones HWLD (1,49 frente a 1,22).

EJEMPLO 5

Formación de brotes reducida (estudios de mapeo fino de Stg1 en el iglú)

Se llevaron a cabo tres estudios adicionales de mapeo fino sobre la población de Stg1 en condiciones controladas en un iglú. En estos estudios, se analizó la formación de brotes con más detalle en comparación con los estudios en el campo previos. Se recontó el número total de formación de brotes y, más específicamente, se recontó el número de formación de brotes que aparecieron de la axila de las hojas 2 (T2), 3 (T3) y 4 (T4). La presencia o ausencia de T2 fue el mejor indicador del potencial de formación de brotes completo para un recombinante dado. T2 también fue el mejor rasgo a usar para el mapeo fino del gen.

En este experimento, el número total de formación de brotes fue la suma de T2, T3 y T4, en donde T2 fue la formación de brotes que apareció de la axila de la hoja 2 (y así continuamente para T3 y T4), incluidos la formación de brotes secundarios. Se observó una variación genotípica significativa para todos los rasgos que se refieren a la formación de brotes del presente estudio (Tabla 34) con heredabilidades generalmente por encima de 30.

Tabla 3

rasgo	medio de rasgo	valor de p (Genotipo)	Varianza de error	avSED	% de VC	gen.var	Hsq
Formación de brotes							
nobrotes_max	2,151	0,001	0,656	0,557	37,659	0,081	33,090
presencia_T2	0,408	0,000	0,204	0,316	110,676	0,038	42,715
presencia_T3	0,901	0,001	0,080	0,193	31,351	0,007	24,781
presencia_T4	0,831	0,015	0,132	0,237	43,787	0,004	10,651
ghoja_T	1,658	0,001	0,880	0,656	56,558	0,117	34,700
tallo_T	0,801	0,003	0,226	0,332	59,334	0,027	32,261
bio_T	2,442	0,002	2,006	0,986	58,005	0,242	32,533
relación bio.GLA T	50,259	0,010	39,356	4,716	12,482	4,510	31,429

La Tabla 3 proporciona un resumen de medios predichos, valor de p y heredabilidad de los rasgos de formación de brotes medidos en la cosecha de L11. Las diferencias significativas ($P < 0,05$) se somborean en amarillo mientras que las heredabilidades > 20 se somborean en verde.

- 5 Análisis separados de los datos T2, T3 y T4 encontraron que 6078-1 no produjo brotes T2 en ninguno de los cuatro replicados, mientras que RTx7000 produjo brotes T2 en 2 de 4 replicados (Figura 5).

Las diferencias también resultaron aparentes en los números T3. 6078-1 produjo un brote T3 en 1 de 4 replicados, mientras que RTx7000 produjo brote T3 en todos los 4 replicados (Figura 6).

- 10 Los números del brote T4 también varió entre los genotipos. 6078-1 produjo un brote T4 en 3 de 4 replicados, mientras que RTx7000 produjo un T4 en todos los 4 replicados. De este modo, la introgresión de Stg1 evitó esencialmente el crecimiento de brotes T2 y T3 en un fondo de RTx7000.

- 15 Las líneas se separaron que produjeron un brote T2 en 0-2 replicados (grupo de formación de brotes bajo; 8 recombinante) de los que produjeron un brote T2 en 3-4 replicados (grupo de formación de brotes alto; 8 recombinantes [Tabla 4, Figura 7].

Tabla 4

Geno nombre	presencia_ T2 (L11)	presencia_ T3 (L11)	presencia_ T4 (L11)	nobrotes_max (L11)
NIL10604-1-476-2	1,013	0,714	0,795	2,551
NIL10604-1-502-11-2	0,781	1,006	0,715	2,634
NIL10604-1-318-1	0,770	0,956	0,920	2,628
NIL10604-1-451-7	0,769	0,970	0,930	2,675
NIL10604-1-502-142-1	0,768	0,993	0,956	2,809
NIL10604-1-319-1	0,757	1,043	0,938	2,678
NIL10604-1-110-2	0,752	1,034	0,972	2,761
NIL10604-1-182-1	0,714	1,016	1,001	3,090
NIL10604-1-195-5	0,498	0,914	0,467	2,016
NIL10604-1-8-1	0,487	0,758	1,024	2,235
NIL10604-1-222-1	0,481	0,695	0,917	2,071
NIL10604-1-157-5	0,472	0,527	0,519	1,729
NIL10604-1-56-7	0,419	1,026	0,899	2,296
NIL10604-1-501-327-3	0,259	0,753	0,402	1,377
NIL10604-1-477-4	0,017	1,049	1,038	2,066
NIL10604-1-359-3	-0,045	1,002	0,519	1,523

- 20 La Tabla 4 muestra la presencia de brotes (T1-T3) y el número de brotes total para ocho recombinante de alta formación de brotes (sombreado marrón) y ocho recombinantes de baja formación de brotes (sombreado verde) a partir de la población de mapeo fino de Stg1.

- 25 La ganancia de función (baja formación de brotes) se logra en el recombinante 10604-1-157-5. La ganancia de función (baja formación de brotes) también se logra en tres recombinantes (10604-1-195-5, 10604-1-56-7, 10604-1-477-4).

- 30 Se usó un subconjunto de líneas en este experimento para validar la región de formación de brotes. Se usaron más replicados por recombinante (20) para reducir más la varianza de error y aumentar la potencia de discriminación entre líneas. Los resultados indicaron la presencia de un gen primero de eflujo de la auxina.

- 35 Se llevó a cabo un análisis de punto de interrupción de esas líneas que, de acuerdo con su genotipo (BB o TT), 'intensificado' o 'reducido' a través de la región de interés, para determinar adicionalmente el gen de baja formación de brotes. Una clara ruptura fue aparente, líneas de separación que produjeron un número de formación de brotes total $> 2,5$ (grupo de alta formación de brotes; 5 recombinante) de los que produjeron un número de formación de brotes total $> 2,5$ (grupo de formación de brotes bajo; 3 recombinantes [Tabla 5, Figura 8].

Tabla 5

Genotipo	T1	T2	T2.1	T3	T3.1	T4	n.º total de formación de brotes
10604-1-502-11-2	0,00	0,79	0,00	1,00	0,00	1,00	2,79
10604-1-110-2	0,11	0,67	0,00	1,00	0,00	1,00	2,72
10604-1-359-3	0,00	0,63	0,00	1,00	0,05	1,00	2,68
10604-1-318-1	0,06	0,59	0,00	1,00	0,00	1,00	2,65
10604-1-502-142-1	0,00	0,58	0,00	1,00	0,00	1,00	2,58
10604-1-8-1	0,00	0,53	0,00	1,00	0,00	1,00	2,42
10604-1-157-5	0,00	0,47	0,00	1,00	0,00	0,95	2,42
10604-1-222-1	0,00	0,45	0,00	1,00	0,00	1,00	2,40

La Tabla 5 muestra la presencia de brotes (T1-T4), que incluyen brotes secundarios, y el número de brotes total para cinco recombinante de alta formación de brotes (sombreado marrón) y tres recombinantes de baja formación de brotes (sombreado verde) a partir de la población de mapeo fino de Stg1.

La ganancia de función (baja formación de brotes) se logra en el recombinante 10604-1-157-5. El gen de PIN4 en sorgo bicolor (designado en el presente documento "SbPIN4") es, por lo tanto, un fuerte candidato para el gen de formación de brotes bajo de Stg1.

EJEMPLO 6

Hojas más pequeñas

En su conjunto, la introgresión de la región de Stg1 en RTx7000 redujo el tamaño foliar (longitud y anchura) en condiciones bien regadas y con agua limitada, indicando una acción de gen constitutiva. Sin embargo, la reducción en el tamaño foliar fue generalmente superior en condiciones con agua limitada indicando, hasta cierto punto, una respuesta adaptativa (inducible) además de la respuesta constitutiva. De este modo, Stg1 confiere dos mecanismos para reducir el tamaño del dosel: a) formación de brotes reducida y b) tamaño foliar reducido. Combinados, estos dos mecanismos proporciona un grado razonable de plasticidad para la planta para modificar la arquitectura del dosel en respuesta a factores ambientales y/o de gestión.

Una serie de estudios de lisimetría resultan particularmente instructivos en la evaluación de los patrones del tamaño foliar en niveles variantes de déficit de la presión de vapor (VDP) (Figuras 9A a D). Aunque los tiestos se regaron regularmente en ambos experimentos, el tamaño del dosel difirió entre estaciones, seguramente debido a las diferencias de estaciones en la temperatura y VPD, creando condiciones VDP altas (1,8 kPa) y bajas (1,3 kPa). Para el tallo principal y brote más grande (T3), la reducción en el tamaño foliar fue significativa en tanto condiciones VPD altas como bajas (Figuras 9A a D), aunque la reducción comenzó más tarde con VPD baja en comparación con VPD alta en el tallo principal (L12 frente a L9) y T3 (L7 frente a L5).

Sin embargo, para los brotes restantes (T4-T6), las distribuciones de tamaño difirieron de forma remarcable entre experimentos. Mientras que no hubo diferencia en el tamaño foliar entre RTx7000 ay 6078-1 con VPD alto, las hojas de 6078-1 fueron significativamente más pequeñas en VPD bajo. Esto indica una respuesta adaptativa (inducible) a la reducción del tamaño foliar en determinadas condiciones ambientales para los brotes T4-T6.

Por tanto, con un estrés de agua bajo, la introgresión de Stg1 en RTx7000 resultó en hojas más pequeñas en el tallo principal y brote más grande (T3) pero no en T4-T6. La respuesta podría permitir a la planta maximizar la interceptación lumínica en los últimos brotes cuando las condiciones son favorables. Con un estrés de agua alto, la introgresión de Stg1 en RTx7000 resultó en hojas más pequeñas en todas las cañas. Esta respuesta permitiría a la planta reducir dramáticamente su tamaño de dosel en condiciones con agua limitada.

EJEMPLO 7

Hojas más pequeñas (estudios de protección de arrastre por la lluvia)

Se llevaron a cabo experimentos en la Protección de arrastre por la lluvia (ROS) para evaluar el impacto de la región de Stg1 en dos densidades de cultivo, creando, de este modo, dos niveles de déficit de agua (alta densidad = alto estrés; baja densidad = bajo estrés). En general, la formación de brotes fue baja o ausente en HD (20 plantas/m²) y normal en LD (10 plantas/m²).

El tamaño de dosel fue más pequeño en ambos años con el tratamiento de alta densidad (HD), reflejando el déficit de agua mayor generado por este tratamiento. En ambos años con los déficits de agua más suave (LD) y más

graves (HD), los tamaños foliares fueron significativamente más pequeños en 6078-1 (Stg1) en comparación con RTx7000. La excepción fue en que el patrón de distribución de tamaño foliar fue similar para 6078-1 y RTx7000 en el déficit de agua más suave (LD), sin embargo, las hojas fueron significativamente más pequeñas en 6078-1 (hasta el 18 % más pequeñas) en un déficit de agua superior (HD), sugiriendo una respuesta adaptativa por las plantas de Stg1 a un déficit de agua creciente. De hecho, la introgresión de la región de Stg1 en RTx7000 redujo el tamaño de las cuatro hojas más grandes (L10-L13) por un promedio del 16,5 % en el déficit de agua más grave (HD). Puesto que hubo poca formación de brotes en este tratamiento, el tamaño foliar reducido en 6078-1 debería haber disminuido notablemente el tamaño del dosel y, por lo tanto, el uso de agua de cultivo (asumiendo una transpiración similar por unidad de superficie foliar).

Cabe destacar que el mecanismo de reducción de tamaño foliar asociado con Stg1 parece funcionar tanto en la presencia (LD) como ausencia (HD) de formación de brotes, pero parece expresarse mejor con HD cuando se producen generalmente las condiciones de unicum y de déficit de agua alto.

EJEMPLO 8

Hojas más pequeñas (estudios de mapeo fino de Stg1 en Protección de arrastre por la lluvia)

Se cultivó un subconjunto de población de mapeo fino de Stg1 en el campo en la protección de arrastre por la lluvia (ROS) con condiciones de agua alta y baja, con cada tratamiento de agua separado para densidad alta y baja. Esto creó cuatro regímenes con niveles crecientes de déficit de agua: HWLD (lo menos acentuado) <HWHD<LWLD<LWHD (lo más acentuado). La superficie de cada hoja de tallo principal completamente expandida se midió para todos los genotipos en todos los tratamientos.

La introgresión de la región de Stg1 completa (6078-1) y, más específicamente, la región más pequeña designada 10604-5, resultó en una reducción en el tamaño de las hojas 9-13 en condiciones de baja agua y alta densidad (Figura 10). Por ejemplo, en comparación con RTx7000, L11 fue un 9 % y un 16 % inferior en 10604-5 y 6078-1, respectivamente. Puesto que la formación de brotes resultó negativa en este tratamiento, las diferencias en el tamaño del dosel se debieron esencialmente a diferencias en el tamaño foliar.

Con condiciones de baja densidad, las distribuciones del tamaño foliar se vieron afectadas por la formación de brotes, resultando en algunos cruces en comparación con el tratamiento de alta densidad (véase la Figura 10). Sin embargo, cabe destacar que 10604-5 produjo hojas más pequeñas 9-13 con respecto a 10709-5, 10568-2 y RTx7000 en ambos tratamientos de HD y LD.

El gen de "tamaño foliar pequeño" mapeó el gen candidato, componente 5 de portador de eflujo de auxinas.

EJEMPLO 9

Hojas más pequeñas (estudios de mapeo fino en iglú)

La superficie foliar varió significativamente ($P < 0,001$) entre genotipos con una heredabilidad que se acercaba a 60 hojas para las hojas 4 y 5. La introgresión de la región de Stg1 en RTx7000 redujo la superficie de las hojas 1-6 (Figura 16). Por ejemplo, la superficie de L6 fue el 22 % superior en RTx7000 (67,4 cm²) que 6078-1 (55,3 cm²), aunque esta diferencia no fue significativa en el nivel $P = 0,05$. La superficie de L6 variaba de 47,8 cm² a 93,9 cm² (LSD [0,05] = 21), con una heredabilidad de 42.

Las diferencias en la superficie foliar se debieron más a diferencias en la longitud foliar (Figura 17) que en la anchura foliar (Figura 13). Mientras que la superficie foliar aumentó exponencialmente con el número de hojas (Figura 16), la longitud foliar aumentó linealmente (Figura 12). La relación entre la anchura foliar y el número fue parabólica (Figura 13). De este modo, la divergencia en la superficie foliar entre 6078-1 y RTx7000 con un número de hojas creciente se debió principalmente a la divergencia en la longitud foliar entre estos genotipos. Esto sugiere que la función de los genes que reducen el tamaño foliar está probablemente asociada con la expansión celular (longitud foliar) que con la división celular (anchura foliar).

La relación alométrica en la población de mapeo fino de Stg1 entre la superficie de la hoja (n) y la superficie de la hoja ($n+1$) indica un cambio significativo en aproximadamente la Hoja 8 (simultáneo con el inicio de la floración). Posteriormente, los aumentos en el tamaño foliar se produjeron a una tasa inferior.

La introgresión de la región de Stg1 en RTx7000 redujo la superficie de las hojas 9-11 (Figura 14), así como las hojas 1-6 (descritas previamente). La superficie de L9 varió significativamente ($P = 0,06$) entre genotipos, en un intervalo de 234 a 300 cm², con una heredabilidad de 21 (Tabla 6). La superficie de L9 fue un 8 % superior en RTx7000 (263 cm²) que 6078-1 (244 cm²) [Figura 14]. Tendencias similares fueron aparentes para las hojas 10 y 11.

Tabla 6

rasgo	medio de rasgo	valor de p (Genotipo)	Varianza de error	avSED	% de VC	gen.var	Hsq
Tamaño foliar							
L6_GLA	54,122	0,016	88,256	10,871	17,358	23,256	51,315
L7_GLA	103,157	0,317	213,237	14,083	14,156	16,947	24,122
L8_GLA	178,469	0,179	535,126	19,269	12,962	7,623	5,391
L9_GLA	266,844	0,060	673,230	18,676	9,724	45,684	21,348
L10_GLA	342,756	0,506	1029,389		9,361	1,177	0,455
L11_GLA	383,560	0,374	848,058		7,592	3,098	1,440
L11_DW	1,955	0,522	0,058		12,372	0,000	0,000
SLW_L9_L11	50,083	0,030	17,372	3,073	8,322	0,956	18,041

La Tabla 6 muestra un sumario de los medios predichos, valor de p y heredabilidad de los rasgos de tamaño foliar medidos en la cosecha de L1. Las diferencias significantes ($P < 0,05$) se somborean en amarillo mientras que las heredabilidades > 20 se somborean en verde. GLA = superficie foliar verde. DW = peso seco. SLW L9 L11 = peso de hoja específico.

La mayoría de la variación en la superficie foliar verde en la cosecha de hoja 11 se debió a diferencias en la formación de brotes. Sin embargo, las hojas 9-11 fueron más pequeñas en 6078-1 en comparación con RTx7000. Estas diferencias fueron significantes ($P < 0,05$). Cabe destacar que 'baja formación de brotes' y 'hojas pequeñas' se asociaron ambos con la misma región, indicando la posibilidad de un único gen que controla ambos rasgos de la arquitectura del dosel.

EJEMPLO 10

Hojas más pequeñas (estudios de mapeo fino en iglú)

Se correlacionó linealmente el número y longitud de hoja para los padres de la población de mapeo fino de Stg1 (Figura 15). La introgresión de Stg1 en RTx7000 resultó en una reducción en la longitud de las hojas 8-10, con L10 siendo un 7 % más corta en 6078-1 que en RTx7000 (550 frente a 592 mm).

Con fines de mapeo, se seleccionaron las 'colas' de la población de mapeo fino de Stg1. Dos genotipos mostraron hojas particularmente largas (10604-1-157-5 y 10604-1-318-1) y tres genotipos mostraron hojas particularmente cortas (10604-1-222-1, 10604-1-501-327-3 y 6078-1).

La ganancia de función (hoja corta) se logra en el recombinante 10604-1-222-1. Se propone el gen de hoja pequeña para mapear la misma región como el gen de 'baja formación de brotes'.

Con fines de mapeo, se seleccionaron las 'colas' de la población de mapeo fino de Stg1 (Figura 16). Tres genotipos mostraron hojas particularmente largas (10604-1-157-5, 10604-1-318-1 y RTx7000) y dos genotipos mostraron hojas particularmente cortas (10604-1-222-1 y 6078-1).

Intensificando a través de los marcadores, la ganancia de función (hoja corta) se logra en el recombinante 10604-1-222-1. Por tanto, de nuevo, el gen de hoja pequeña mapea la misma región como el gen de 'baja formación de brotes'. Cabe destacar que la longitud folicular en L9 y L10 mapea la misma región.

Una explicación es un único gen con múltiples efectos pleiotrópicos. La disponibilidad aumentada de la auxina explicaría tanto la formación de brotes bajos y fenotipos de tamaño foliar pequeño observados en plantas que contienen esta región. El gen del componente 5 del portador de eflujo de auxinas en la región diana y se identifica, por lo tanto, como un candidato.

EJEMPLO 11

La permanencia verde mejora la plasticidad de la arquitectura del dosel a través de respuestas constitutivas y adaptativas

La disponibilidad de agua aumentada en anthesis se consigue a través de un uso de agua reducido debido a los dos mecanismos (formación de brotes reducida y hojas más pequeñas) en plantas que contienen la región Stg1 (Figura 17). Ambos mecanismos, individualmente, parecen reducir el tamaño del dosel en aproximadamente un 9 %, en

promedio. El mecanismo de 'formación de brotes bajo' domina en entornos con baja densidad cuando el potencial de formación de brotes es elevado. El 'mecanismo de hoja pequeña' domina en entornos con alta densidad cuando el potencial de formación de brotes es bajo. Combinados, estos dos mecanismos proporcionan a las plantas de cultivo con una plasticidad considerable para modificar la arquitectura del dosel en respuesta con la gravedad de la limitación de agua.

La permanencia verde muestra tanto respuestas constitutivas como adaptativas (Figura 18). El tamaño del dosel en Stg1 se reduce en aproximadamente un 5 %, incluso cuando el agua no es limitante (respuesta constitutiva). El tamaño del dosel se reduce adicionalmente (respuesta adaptativa) en una sequía suave (~10 %) y una sequía más grave (~15 %). La formación de brotes baja es principalmente una respuesta constitutiva, aunque un tamaño foliar inferior en brotes en respuesta a un déficit de agua creciente es una respuesta adaptativa. El tamaño de hoja pequeña es tanto una respuesta constitutiva como adaptativa.

EJEMPLO 12

Una unión entre el tamaño del dosel reducido (a través de una formación de brotes reducida y hojas más pequeñas) y el uso de agua de cultivo en la antesis.

El uso de agua de cultivo en la antesis puede ser causado por a) un tamaño del dosel más pequeño con transpiración equivalente por unidad de superficie foliar, b) un tamaño de dosel equivalente con una transpiración inferior por unidad de superficie foliar o c) un tamaño de dosel inferior y una transpiración inferior por unidad de superficie foliar. Los estudios de ROS y de lisimetría indican que con condiciones de estrés de agua alto, la región de Stg1 y en particular el recombinante que contiene el gen candidato de Stg1 (10604-5), mostraron un uso de agua de cultivo inferior debido a un tamaño de dosel inferior en lugar de una transpiración inferior por unidad de superficie foliar. Se observaron altas correlaciones ($r^2=0,9$) entre el tamaño del dosel y el uso de agua de cultivo en ROS y estudios de lisímetros.

(a) Ahorro de agua debido a tamaño foliar más pequeño

La formación de brotes fue insignificante en este experimento debido a la alta densidad de cultivo. De este modo, las diferencias en el tamaño del dosel se debieron a diferencias en el tamaño foliar (Figura 20) tal como queda evidenciado por la alta correlación entre el tamaño de la Hoja 12 y la superficie foliar verde total en la antesis (Figura 21).

A su vez, la superficie foliar verde en la antesis se correlacionó altamente con el uso de agua de cultivo en la antesis (Figura 22). Con respecto a RTx7000, las dos líneas que contenían el gen candidato de Stg1 (6078-1 y 10604-5) mostraron ambas hojas más pequeñas (L10-L13), una superficie foliar verde inferior en la antesis (GLAA) y un uso de agua de cultivo inferior en la antesis.

(b) Ahorro de agua debido a transpiración reducida por unidad de superficie foliar (estudios de lisimetría)

La transpiración (T) es el producto de la superficie foliar (LA) y la transpiración por superficie foliar (T/LA). En condiciones VPD elevadas, la LA fue similar entre Stg1 y RTx7000 (11795 frente a 11628 cm²), sin embargo T/LA fue inferior en Stg1 que en Tx7000 (2,60 frente a 2.85), resultando en un uso de agua inferior por planta (T) en Stg1 que en RTx7000 (30,7 frente a 32,81). De este modo, el ahorro de agua en Stg1 (en un entorno VPD alto) se consiguió completamente mediante una reducción en la T/LA, sugiriendo que esta es una estrategia de conservación de agua constitutiva conferida por Stg1. En este caso, una eficacia de transpiración (TE) superior en Stg1 fue una consecuencia de biomasa equivalente y transpiración inferior.

Un análisis más amplio que compara los cuatro QTL de Stg (Stg1, Stg2, Stg3 y Stg4) con RTx7000 ayuda a poner la respuesta de Stg1 en perspectiva. En condiciones VPD elevadas, la T/LA se correlacionó positivamente con T. Sin embargo, en condiciones con VPD bajas, la T/LA se correlacionó negativamente con T ($r^2=0.52$). La superficie foliar verde y la transpiración se correlacionaron positivamente con condiciones VPD tanto bajas como altas (Figura 22). En ambos experimentos, los QTL de Stg redujeron la superficie foliar verde y la transpiración en comparación con RTx7000.

(c) Ahorro de agua debido a superficie foliar reducida

La transpiración (T) es el producto de LA y T/LA. En condiciones VPD bajas, la LA fue un 31 % inferior en Stg1 que en RTx7000 (4898 frente a 7082 cm²). Esto apareció ligeramente con un 9 % de aumento en la T/LA en Stg1 en comparación con RTx7000 (5,15 frente a 4,70). El resultado neto fue un 22 % de reducción en uso de agua por planta (T) en Stg1 en comparación con RTx7000 (25,6 frente a 32,71), debido principalmente al tamaño del dosel reducido. El aumento en la T/LA mostrado por el Stg1 puede ser por sí mismo un mecanismo de adaptación a la sequía, enfriando la hoja y permitiendo que continúe la fotosíntesis.

La plasticidad en la T/LA parece resultar particularmente importante en la regulación del estado del agua de una planta. En condiciones VPD elevadas, la T/LA reducida en Stg1 fue el mecanismo clave para reducir la T y aumentar la TE. En condiciones VPD bajas, la T/LA aumentada en Stg1 puede haber contribuido al mantenimiento de la función folicular a través del enfriamiento.

Los estudios de lisimetría sobre un subconjunto de mapeo fino de Stg1 proporcionan una visión adicional en esta región. En condiciones VPD elevadas, la LA por planta fue inferior en 10604-5 (emplazamiento del gen candidato de Stg1) que RTx7000 (10283 frente a 11628 cm²), sin embargo la T/LA fue equivalente en 10604-5 y RTx7000 (~2,86), resultando en un uso de agua inferior por planta en 10604-5 que en RTx7000 (28,0 frente a 32,81). De este modo, el ahorro de agua en 10604-5 se consiguió completamente mediante una reducción en el tamaño del dosel.

En condiciones VPD bajas, la LA por planta fue inferior en todas las líneas de Stg1 en comparación con RTx7000, resultando en un ahorro de agua en todas las líneas de Stg1. Por lo tanto, fue complicado realizar un mapeo fino de esta región, puesto que todos los recombinantes respondieron de forma similar a 6078-1.

(d) Simulación de agronomía

Buster plantado en 5 plantas/m² con 1 m de espaciado entre filas. Profundidad del suelo = 1.800 mm; PAWC del suelo = 324 mm; N no limitante. Los resultados se muestran en las Figura 56A a C.

Tratamientos

HT Alta formación de brotes (2 brotes/planta)

LT Baja formación de brotes (1 brote/planta)

WW Bien regado (Inicio con 100 % de perfil y seco)

TS Resistencia terminal (Inicio con perfil medio completo [162 mm] y sin agua después del establecimiento).

EJEMPLO 13

La disponibilidad de agua aumentada en la antesis también se puede conseguir a través de una accesibilidad de agua aumentada (debido a una mejor extracción de agua y/o propagación lateral más profunda o superior en plantas que contienen la región de Stg1)

La masa de la raíz y la relación raíz:brote (Figura 23) fueron superiores en Stg1 que en RTx7000 en la etapa de la Hoja 6. Hubo una segregación transgresiva considerable para estos rasgos en la población de mapeo fino de Stg1. La relación entre la masa de raíz y la relación raíz:brote remarca la oportunidad para un avance genético adicional en estos rasgos.

La masa de raíz por relación de superficie foliar puede usarse como un índice de adaptación a la sequía en la etapa de plantación de semillas puesto que integra la capacidad de la planta en acceder a agua (masa de raíz) con la capacidad de la planta en utilizar agua (superficie foliar). Un índice superior indica una capacidad superior para acceder al agua por unidad de superficie foliar. La Stg1 mostró una masa de raíz superior por relación de superficie foliar con respecto a RTx7000 debido a tanto una masa de raíz superior como a una superficie foliar más inferior.

La masa de raíz superior por relación de superficie foliar mostrada por Stg1 en la etapa de L6 puede explicar por qué uso más agua tempranamente en el crecimiento del cultivo (20-50 DAE) en comparación con RTx7000 con el tratamiento LWLD (Figura 24). Aún no está claro si la accesibilidad de agua aumentada durante la formación de grano mostrada por la Stg1 en comparación con RTx7000 (Figura 24) se debió a una mejor extracción de agua y/o propagación de la raíz superior.

En un experimento de cámara de raíces en Gatton, Queensland, Australia (Van Oosterom *et al.*, 2010 citado anteriormente), el límite inferior gravimétrico de extracción de agua fue del 0,26 % para A35 (permanencia verde) que en híbridos de AQF39 (senescente). El A35 contiene la región de Stg1 mientras que AQF39 no la contiene. Asumiendo una densidad de volumen de 1,3 g cm⁻³ y una profundidad del suelo de 150 cm, esto podría aumentar potencialmente el agua disponible en el campo por >5 mm en todo el ciclo de vida del cultivo.

EJEMPLO 14

La permanencia verde mejora la biomasa por unidad de superficie foliar en antesis. Asumiendo que la masa de raíz es equivalente (o al menos no significativamente inferior), estas diferencias podrían explicarse mediante diferencias en la transpiración por unidad de superficie foliar y/o eficacia de transpiración

La biomasa de tallo principal por unidad de superficie foliar (B/LA) en la antesis fue del ~24 % superior en Stg1 que en RTx7000 en condiciones de estrés de agua bajo (35,2 frente a 26,2 g/m²/cm²) y condiciones de estrés de agua alto (40,6 frente a 31,4 g/m²/cm²) (Tabla 7). La B/LA del tallo principal en la antesis fue del ~14 % superior en condiciones de estrés de agua alto que en entres de agua bajo tanto para Stg1 como RTx7000, es decir, B/LA

aumentada con déficit de agua. Cabe destacar que la B/IA del brote fue equivalente en Stg1 y RTx7000 en condiciones de estrés de agua alto y bajo.

Tabla 7

Estado de Stg	N.º de líneas	Biomasa de tallo principal por unidad de superficie foliar en antesis ($\text{g/m}^2/\text{cm}^2$)x1000		Biomasa de brote por unidad de superficie foliar en antesis ($\text{g/m}^2/\text{cm}^2$)x1000		Biomasa total por unidad de superficie foliar en antesis ($\text{g/m}^2/\text{cm}^2$)x1000	
		Estrés de agua bajo	Estrés de agua alto	Estrés de agua bajo	Estrés de agua alto	Estrés de agua bajo	Estrés de agua alto
<i>Región de Stg1</i>							
1	1	35,17	40,61	19,42	22,38	31,83	39,73
1,2	2	31,70	34,70	18,40	19,77	28,02	33,16
1,4	1	28,12	30,88	22,68	16,53	28,66	26,69
Sin regiones							
RTx7000	7	26,21	31,36	18,04	20,61	21,20	25,81
LSD (0,05)		6,70	6,70	5,90	5,90	5,96	5,96

La Tabla 7 muestra el tallo principal, brote y biomasa total por superficie foliar para RTx7000 (padre recurrente) y un número de líneas casi isogénicas que contienen diversas introgresiones de Stg1 cultivados en estrés de agua alta y bajo en Biloela, Queensland, Australia.

Las mediciones de uso de agua detalladas sugieren que la biomasa superior por unidad de superficie foliar observada en las líneas de Stg1 en Biloela se debió probablemente a la transpiración superior por unidad de superficie foliar en lugar de la TE.

Estrés de agua bajo

Stg1 y RTx7000 mostraron una B/IA equivalente en estrés de agua bajo. Sin embargo, T fue un ~7 % inferior en Stg1, debido a un ~10 % inferior de T/LA que, a su vez, aumentó la TE en un ~9 % (Figura 45). Por lo tanto, Stg1 mantuvo la biomasa pero usó menos agua en comparación con RTx7000.

Estrés de agua alto

Con un estrés de agua alto, la B/IA fue un ~6 % superior en Stg1 en comparación con RTx7000. La B/IA se correlacionó positivamente con la T/LA pero no con la TE. Por tanto, la B/IA superior mostrada por Stg1 se debió a una T/LA superior. En general, la B/IA se correlacionó positivamente con la T/LA y se correlacionó negativamente con la TE con estrés de agua alto.

En este caso, el Stg1 usó un ~22 % menos de agua que RTx7000 durante el período pre-antesis. Por lo tanto, el Stg1 tendría significativamente más agua disponible para formar grano, a pesar de la biomasa inferior en la antesis.

EJEMPLO 15

La TE aumentada a través de la introgresión de Stg1 puede deberse a a) la capacidad fotosintética proporcionalmente superior en comparación con la conductancia estomatal, debido a hojas más pequeñas, más finas y más verdes, o b) una disminución en la transpiración por superficie foliar mientras que se mantiene la biomasa por superficie foliar

En la población de mapeo fino de Stg1, la longitud y verdor (SPAD) de la Hoja 10 fueron altamente correlacionados negativamente ($r^2=0,72$, Figura 25). Por tanto, la disminución del tamaño de una hoja en esta población aumentó la concentración de nitrógeno en la hoja. La introgresión de Stg1 en un fondo de RTx7000 disminuyó la longitud de L10 en un ~7 % (de 592 a 550 mm) y aumentó el SPAD de L10 en un ~4 % (de 47,1 a 48,9).

Las hojas más verdes pueden aumentar su capacidad fotosintética y, por lo tanto, la eficacia de uso de agua. En un subconjunto de la población de mapeo fino de Stg1, la fotosíntesis aumentó con el valor de SPAD hasta alcanzar un nivel estable en un SPAD de ~48,5 (Figura 26). Sin embargo, la línea (6078-1) con el valor de SPAD más alto (51,6) mostró una tasa relativamente baja de fotosíntesis (32,1 MJ/m²/d). Este resultado es o bien a) anómalo o bien b) indica un declive real en la fotosíntesis en valores de SPAD altos.

El verdor de hoja (SPAD) y WUE (basado en un índice calculado para el software Licor) se correlacionaron positivamente en un subconjunto de la población de mapeo fino de Stg1 (Figura 27). Ninguna de las introgresiones de Stg1 se acercó al valor para 6078-1 (0,8), a pesar de un SPAD relativamente alto en las líneas isogénicas de 10604-5 y 10709-5 (NIL).

En comparación con RTx7000 y otros QTL de Stg, el Stg1 mostró una hoja más verde (valor de SPAD superior) y un WUE superior (basado en un índice calculado para el software Licor) [Figura 28].

EJEMPLO 16

La TE aumentada a través de la introgresión de Stg1 puede deberse a a) la capacidad fotosintética proporcionalmente superior en comparación con la conductancia estomatal, debido a hojas más pequeñas, más finas y más verdes, o b) una disminución en la transpiración por superficie foliar mientras que se mantiene la biomasa por superficie foliar

La eficacia de transpiración (TE) se correlacionó negativamente con la transpiración por superficie foliar (T/LA) en condiciones de VPD bajas y altas (Figura 29) en un conjunto de NIL de Stg, incluido el padre recurrente (RTx7000). Sin embargo, la clasificación del NIL de Stg con respecto a RTx7000 interactuó con condiciones VPD. Por ejemplo, la T/LA en Stg1 fue inferior con respecto a RTx7000 en condiciones VPD elevadas, sin embargo, superior que en RTx7000 con condiciones VPD bajas.

En condiciones VPD elevadas, la pendiente de la correlación negativa entre la T/LA y TE fue pronunciada, de modo que una ligera disminución en la T/LA de 2,9 mm/cm² (Stg4) a 2,6 mm/cm² (Stg1) resultó en un aumento significativo en la TE de 4,2 g/m²/mm (Stg4) a 5,1 g/m²/mm (Stg1) [Figura 29]. El gradiente fue menos pronunciado en condiciones VPD bajas de modo que una disminución de seis veces superior en la T/LA se requirió por aumento de unidad en la TE en comparación con condiciones VPD altas (1,2 frente a 0,2 unidades). Cabe destacar que para una TE equivalente, el Stg1 mostró una T/LA superior que RTx7000 (5,1 frente a 4,6 mm/cm²) con VPD bajo. Esto puede proporcionar un mecanismo para hojas de Stg1 para que permanezcan frías en determinadas condiciones ambientales.

EJEMPLO 17

Los cambios en la transpiración por unidad de superficie foliar podrían deberse a a) número de estomas, b) abertura estomatal, c) cambios en el tiempo de abertura y cierre estomatal con respecto a VPD y/o d) número de células de base capilar (que afecta a la capa límite y, por lo tanto, la T/LA).

La introgresión de Stg1 en RTx7000 afectó de forma variada la T/LA, dependiendo de las condiciones VPD. Con respecto a RTx7000, Stg1 aumentó la T/LA en un ~9 % con VPD baja y T/LA reducida en un ~10 % con VPD alta. La T/LA, entre otras cosas, puede regularse por a) el número de estomas por unidad de superficie foliar, b) el tamaño de la abertura estomatal, c) el tiempo de abertura y cierre estomatal y/o d) el número de células base capilares (que afecta la capa límite y, por lo tanto, la T/LA). Se han realizado mediciones de dos de estos cuatro componentes (a y b). En un experimento de protección de arrastre por la lluvia, se cosecharon hojas individuales a partir del tratamiento de alta densidad dentro del control irrigado, se retiraron las cutículas y se tomaron imágenes de la superficie de la cutícula. Estas imágenes se usaron para determinar a) el número de estomas por unidad de superficie foliar, b) el número de células epidérmicas por unidad de superficie foliar, y c) el número de células base capilares por unidad de superficie foliar.

Al mismo tiempo, se tomaron secciones de hoja transversales. Los análisis preliminares de estos datos indican que la introgresión de Stg1 en RTx7000 modificó la anatomía de la hoja. Las diferencias en la morfología de las hojas (por ejemplo, hojas 7 y 10) resultan aparentes entre RTx7000 y Stg1. En este caso, hubo más vainas de haz y más pequeñas alrededor del haz vascular en Stg1. El número aumentado de células en la vaina del haz también podría contribuir a la asimilación fotosintética aumentada (PNAS 2007) y, por lo tanto, TE.

EJEMPLO 18

El uso de agua aumentado durante formación del grano se logra a través de (i) disponibilidad de agua aumentada en la antesis y (ii) accesibilidad de agua aumentada (mejor extracción de agua y propagación lateral más profunda o superior) durante la formación del grano

a) Disponibilidad de agua aumentada en antesis

El uso de agua de cultivo (CWU) antes de la antesis se correlacionó de forma negativa con el CWU después de la antesis en el experimento ROS (Figura 30). Por ejemplo, ahorrar 20 mm de agua antes de la antesis (165 frente a 185 mm) permitió la utilización de 20 mm adicionales después de la antesis (80 mm frente a 60 mm). De modo que toda el agua conservada antes de la antesis se utilizó por el cultivo después de la antesis. En su conjunto, un 25 % de aumento en uso de agua después de la antesis en este experimento resultó en un aumento del 25 % en el rendimiento de grano (400 frente a 300 g/m²). Esto se tradujo en 50 kg/ha de grano para cada mm adicional de agua disponible. Mientras que estos datos apoyan el concepto de que el uso de agua aumentado durante formación del grano se logra mediante una disponibilidad de agua aumentada durante la antesis, no explica sobre la accesibilidad de agua aumentada durante la formación del grano.

b) *Accesibilidad de agua aumentada durante formación de grano*

El uso de agua aumentado durante el período de formación del grano se mostró por Stg1 con tratamiento de densidad tanto baja como alta en el experimento de ROS. Esto se debió principalmente a (i) la disponibilidad de agua aumentada en la antesis con alta densidad y (ii) la accesibilidad de agua aumentada durante la formación del grano con baja densidad (Figuras 31A y B).

En un estudio de RTx7000 y cuatro NIL de Stg (Stg1, Stg2, Stg3 y Stg4), el CWU antes y después de la antesis se correlacionaron negativamente en un experimento de ROS con condiciones de baja densidad (Figura 32). En este caso, un ahorro de ~25 mm de agua antes de la antesis (168 frente a 191 mm) contribuyó a la utilización de ~50 mm después de la antesis (135 mm frente a 86 mm), indicando que tanto la disponibilidad de agua aumentada (~25 mm) con la accesibilidad (~25 mm) fueron igualmente de importantes. Sin embargo, el Stg1 fue anómalo en este ejemplo, pues que el elevado uso de agua después de la antesis se asoció con un elevado uso de agua antes de la antesis. Las explicaciones para esta anomalía en el Stg1 son a) un error en los datos de agua pre-antesis, b) un error en los datos de agua post-antesis o c) sin errores en la medición de agua (Stg1 respondió simplemente de forma distinta a los otros NIL). Una examinación de los datos de la biomasa revela que, por alguna razón, el Stg1 produjo una biomasa superior antes de la antesis con LWLD en comparación con los otros NIL, sugiriendo que el los patrones de uso de agua pre-antesis simplemente reflejan la producción de biomasa en este experimento. No obstante, este ejemplo no proporciona pruebas de accesibilidad de agua aumentada por Stg1 durante el período de formación de grano.

EJEMPLO 19

Unión entre producción de biomasa de pre- y post-antesis

Con una densidad baja (LD), la reducción de la biomasa de pre-antesis en un 23 % (de 700 a 640 g/m²) aumentó la biomasa de post-antesis más de dos veces (de ~200 a 425 g/m²). Con LD, el Stg1 produjo una biomasa de pre-antesis similar a RTx7000 (~610 g/m²), sin embargo, produjo menos biomasa de post-antesis (265 vs 327 g/m²). Sin embargo con HD, Stg1 y RTx7000 produjeron biomasa de pre-antesis similar (~840 g/m²), sin embargo, Stg1 produjo más biomasa post-antesis (195 frente a 17 g/m²).

La relación entre GLAA y relación de biomasa pre:post antesis resulta crítica en la historia del Stg1. el GLAA debe recortarse a <3 para asegurar la disponibilidad de agua adecuada para la formación de grano y es el papel crítico del gen de Stg1. En este experimento, el Stg1 redujo de forma adecuada el GLAA para lograr una relación de biomasa pre:post antesis de <3 en LD, pero no HD. Con HD, cabe notar que la introgresión de Stg1 en RTx7000 redujo el GLAA de 31200 a 29300 cm²/m², reduciendo la relación de biomasa pre:post antesis de 8,2 a 6,5 (pero aún no a <3). Esto resalta la importancia de estrategias de gestión adecuadas tales como densidad de cultivo en la maximización de recursos de agua limitados.

La relación negativa entre GLAA y la masa de tallo de post-antesis también es crítica con respecto a la historia de Stg1. Un GLAA inferior y, por lo tanto, un uso de agua reducido en la antesis, se asoció con una masa de tallo de tallo de post-antesis superior (un componente de resistencia de encamado). La introgresión de Stg1 en RTx7000 aumentó la masa de tallo de post-antesis en condiciones tanto de LD (aumento marginal) como de HD (aumento significativo).

La relación entre la relación de biomasa pre:post antesis (PPBR) y biomasa post-antesis es instructiva. Los dos tratamientos de densidad proporcionan una continuidad en el intervalo de la PPBR de <2 a >8. La reducción de la PPBR de >8 a ~3 resultó en un aumento gradual en la biomasa de post-antesis. Sin embargo, la reducción adicional de PPBR por debajo de 3 resultó en un aumento relativamente agudo en la biomasa de post-antesis, seguramente debido a que había más agua disponible durante la formación de grano cuando la relación de PPBR descendió por debajo de 3. La introgresión de Stg1 en RTx7000 aumentó la biomasa de post-antesis con HD pero no LD.

La relación entre la relación de biomasa pre:post antesis (PPBR) y masa de tallo de post-antesis es de igual modo instructiva. La masa de tallo de post-antesis es un componente de resistencia de encamado. El análisis de este componente proporciona alguna comprensión sobre cómo las introgresiones de Stg afectan a la resistencia de encamado. La reducción de la PPBR de >8 a ~4 resultó en un aumento gradual en la masa de tallo de post-antesis. Sin embargo, la reducción adicional de PPBR por debajo de 4 resultó en un aumento relativamente agudo en la masa de tallo de post-antesis. La introgresión de Stg1 en RTx7000 aumentó la masa de tallo de post-antesis en condiciones tanto de LD (aumento marginal) como de HD (aumento significativo).

La relación entre la PPBR y el rendimiento de grano fue menos claro en este experimento. Mientras que el rendimiento de grano es superior en Stg1 que en RTx7000 en ambas densidades, el rendimiento superior solo podría explicarse mediante una PPBR inferior en Stg1 con HD.

Se examinaron dos introgresiones de Stg1 en este experimento: a) 6078-1 (la región de Stg1 completa), y b) 10946-5 (un recombinante que cubre aproximadamente 1/3 de la región de Stg1 entre los marcadores Sb03QGM116 y Sb03QGM106).

- 5 La reducción de la biomasa de pre-antesis en un 20 % (de 920 a 735 g/m²) aumentó la biomasa de post-antesis en aproximadamente un 100 % (de 200 a 400 g/m²) [Figura 40]. En general, la biomasa de pre-antesis en RTx7000=Stg2>Stg3=Stg4>Stg1 y biomasa de post-antesis en Stg 1 >Stg3=Stg4>Stg2>RT x7000.

- 10 El tamaño del dosel, tal como se ha comprobado mediante el GLAA, determinó en gran medida la relación de la biomasa de pre:post-antesis (Figura 34). Con tanto el tratamiento de alta como el de baja densidad, la introgresión de Stg1 en un fondo de RTx7000 redujo el GLAA que, a su vez, redujo la relación de la biomasa de pre:post-antesis a < 3, asegurando una disponibilidad de agua adecuada para la formación de grano con estas condiciones de agua limitada.

- 15 El tamaño del dosel, tal como se ha comprobado mediante el GLAA, fue un determinante de la masa de tallo de post-antesis (PASM) [Figura 35]. Con tanto el tratamiento de alta como el de baja densidad, la introgresión de Stg1 o Stg1a en un fondo de RTx7000 redujo el GLAA que, a su vez, aumentó el PASM. Aproximadamente 40 g/m² de más reservas de tallo se utilizaron con HD en comparación con LD, reflejando el estrés superior impuesto por este tratamiento.

- 20 La relación entre la relación de biomasa pre:post antesis (PPBR) y biomasa post-antesis (PAB) fue fuerte (Figura 36). Los dos tratamientos de densidad proporcionan una continuidad en el intervalo de la PPBR de <1,5 a >4. La reducción de la PPBR de ~4,5 a ~3,5 no tuvo impacto sobre la PAB. Sin embargo, la reducción adicional de PPBR por debajo de ~ 3,5 resultó en un aumento relativamente agudo en la PAB, seguramente debido a que había más agua disponible durante la formación de grano cuando la relación de PPBR descendió por debajo de 3,5. La introgresión de Stg1 en RTx7000 disminuyó la PPBR por debajo de 3 con HD y LD, aumentando, de este modo, la PAB con ambos tratamientos de densidad.

- 30 La relación de biomasa pre:post antesis (PPBR) también afectó la resistencia de encamado (Figura 37). En este caso, La masa de tallo de post-antesis (PASM) se usa como un sustituto para la resistencia de encamado. Con densidades altas y bajas, la PPBR se correlacionó negativamente con la biomasa de tallo post-antesis. Es decir, una relación de biomasa pre:post antesis aumentó la cantidad de reservas de tallo desmovilizadas durante la formación de grano, reduciendo, de este modo, la biomasa del tallo y aumentando las probabilidades de encamado. En comparación con RTx7000, el Stg1 redujo significativamente la cantidad de reservas de tallo movilizadas con LD (~5 frente a 65 g/m²) y HD (~80 frente a 140 g/m²). En comparación con RTx7000, Stg1 redujo significativamente la cantidad de reservas de tallo movilizadas con HD ~80 frente a 140 g/m²), pero no con LD. El grado de reservas de tallo movilizadas fue superior con HD que con LD, reflejando el déficit de agua mayor con HD. Por ejemplo, la diferencia en la movilización de reservas de tallo entre HD y LD se dobló en RTx7000 (aproximadamente 140 frente a 70 g/m²).

- 40 El rendimiento de grano permaneció bajo (un punto de referencia de ~4,2 t/ha) hasta que la relación de biomasa pre:post antesis descendió a ~3 (HD) o ~2,5 (LD) [Figura 38]. Por debajo de estos valores críticos, el rendimiento de grano aumentó significativamente para cada reducción incremental en estas relaciones, con la tasa de aumento en rendimiento de grano siendo superior con LD que con HD. Esto sugiere que la disponibilidad de agua post-antesis estuvo estrechamente unida a la GLAA y biomasa pre-antesis y que se necesitó una reducción determinada en GLAA para asegurar una disponibilidad de agua adecuada para la formación de grano. Con ambas densidades, Stg1 redujo la relación de biomasa pre:post antesis por debajo de los niveles críticos, resultando en aumentos de rendimiento del 28 % (LD) y el 22 % (HD), con respecto a RTx7000. Estos datos proporcionan un enlace crítico entre la acción del gen de Stg1 (tamaño del dosel reducido en antesis) y rendimiento de grano con sequía terminal. Cabe destacar que la introgresión de Stg1a tuvo algún impacto en la reducción de la PPBR (HD y LD) y al aumento en el rendimiento de grano (LD solo) con respecto a RTx7000, pero no hasta el mismo grado como Stg1. Por tanto, no existe una prueba fuerte a partir de este experimento de que el gen de Stg1 clave resida dentro de la región de Stg1a. Esto apoya la prueba presentada anteriormente, puesto que el candidato más fuerte para Stg1 (SbPIN4) se emplaza por encima de la introgresión de Stg1a.

- 55 Se examinaron cuatro introgresiones de Stg1 en este experimento: a) 6078-1 (la región de Stg1 completa); b) 10709-5 (una cobertura recombinante de aproximadamente 1/3 de la región de Stg1); c) 10604-5 (una cobertura recombinante de aproximadamente 3/4 de la región de Stg1); y d) 10568-2 (una cobertura recombinante de casi 1/2 de la región de Stg1).

- 60 Con una densidad baja (LD), la biomasa pre-antesis varió en solo un ~5 % (de 522 a 552 g/m²) entre genotipos, sin embargo, la biomasa de post-antesis varió casi el doble (de 173 a 313 g/m²). Esto sugiere que las diferencias considerables en la biomasa de post-antesis se vieron afectadas por algo distinto a la biomasa de pre-antesis, por ejemplo, diferencias en accesibilidad de agua. Por ejemplo, 10709-5 y RTx7000 ambos produjeron ~550 g/m² de biomasa pre-antesis, sin embargo, el recombinante de Stg1 (10709-5) produjo un ~60 % más de biomasa de post-antesis.

Con una alta densidad (HD), la biomasa de pre- y post-antesis estuvieron altamente correlacionadas. La introgresión de Stg1 en RTx7000 redujo la biomasa de pre-antesis en un 9 % y aumentó la biomasa de post-antesis en un 23 %.

El uso de agua de cultivo (CWU) en la antesis discriminó mejor entre los genotipos que la biomasa de pre-antesis. Al combinar los datos de HD y LD, la biomasa de post-antesis (PAB) permaneció baja (en un punto de referencia de ~150 g/m²) hasta que el CWU en la antesis descendió por debajo de ~180 mm. Por debajo de este valor crítico, la PAB aumentó para cada reducción incremental en CWU a un nivel de 175 mm, con un nivel estable de PAB a aproximadamente 310 g/m². Las reducciones adicionales en el CWU en la antesis por debajo de 175 mm no resultaron en una PAB adicional.

El tamaño del dosel, tal como se ha comprobado mediante el GLAA, determinó en gran medida la relación de la biomasa de pre:post-antesis (PPBR). Con tanto el tratamiento de alta como el de baja densidad, la introgresión de Stg1 (o recombinantes particulares tales como 10709-5) en un fondo de RTx7000 redujo el GLAA que, a su vez, redujo la relación de la biomasa de pre:post-antesis, de este modo, aumentando la disponibilidad de agua adecuada para la formación de grano con estas condiciones de agua limitada. El valor de PPBR para 6078-1 parece anómalo (demasiado alto) puesto que este genotipo se colocó bien por encima de la línea de regresión de GLAA/PPBR.

El tamaño del dosel, tal como se ha comprobado mediante el GLAA, fue un determinante de la masa de tallo de post-antesis (PASM). Con el tratamiento de alta densidad, la introgresión de Stg1 (o recombinantes de Stg1 tales como 10604-5 y 10709-5) en un fondo de RTx7000 redujo el GLAA que, a su vez, aumentó el PASM. Aproximadamente, 60 g/m² de más reservas de tallo se utilizaron con HD en comparación con LD, reflejando el estrés superior impuesto por este tratamiento.

La relación entre la relación de biomasa pre:post antesis (PPBR) y biomasa post-antesis (PAB) fue fuerte. Los dos tratamientos de densidad proporcionan una continuidad en el intervalo de la PPBR de <2 a >5, aunque la pendiente de la regresión fue superior para LD que para HD. Con HD, la reducción de PPBR de ~6 a ~3,5 resultó en un aumento gradual en PAB de ~130 g/m² (RTx7000) a ~180 g/m² (10604-5). La reducción adicional de la PPBR por debajo de ~3 con LD resultó en un aumento más pronunciado en la PAB, seguramente debido a que había más agua disponible durante la formación de grano cuando la relación de PPBR descendió por debajo de 3.

La relación de biomasa pre:post antesis (PPBR) también afectó la resistencia de encamado. En este caso, La masa de tallo de post-antesis (PASM) se usa como un sustituto para la resistencia de encamado. Con densidades altas y bajas, la PPBR se correlacionó negativamente con la biomasa de tallo post-antesis. Es decir, una relación de biomasa pre:post antesis aumentó la cantidad de reservas de tallo desmovilizadas durante la formación de grano, reduciendo, de este modo, la biomasa del tallo y aumentando las probabilidades de encamado. En comparación con RTx7000, Stg1 redujo significativamente la cantidad de reservas de tallo movilizadas con HD ~100 frente a 160 g/m²). El grado de reservas de tallo movilizadas fue superior con HD que con LD, reflejando el déficit de agua mayor con HD. Por ejemplo, la diferencia en la movilización de reservas de tallo entre HD y LD fue más del doble en RTx7000 (aproximadamente 160 frente a 60 g/m²). Curiosamente, la PASM aumentó con la disminución de la PPBR sobre el intervalo completo de la PPBR (1,5 - 6), mientras que el rendimiento de grano, a un grado inferior de PAB, solo aumentó cuando la PPBR descendió por debajo de ~3. Esto sugiere que ahorros relativamente pequeños de agua antes de la antesis aún podían mejorar la resistencia al encamado, aunque se necesitaron ahorros de agua superiores antes de que respondiera el rendimiento de grano.

El rendimiento de grano permaneció bajo (un punto de referencia de ~3,1 t/ha) hasta que la relación de biomasa pre:post antesis descendió a ~3. Por debajo de este valor crítico, el rendimiento de grano aumentó significativamente para cada reducción incremental en esta relación. Puesto que ninguna de las introgresiones de Stg1 redujo la PPBR a <3 con HD, no se obtuvo ningún beneficio de rendimiento a partir de Stg1 en este tratamiento. Con LD, algunas de las introgresiones de Stg1 redujo el PPBR por debajo del nivel crítico, resultado en aumentos de rendimiento del 12 % (10568-2) y 5 % (10709-5), con respecto a RTx7000. Estos datos proporcionan un enlace crítico entre la acción del gen de Stg1 (tamaño del dosel reducido en antesis) y rendimiento de grano con sequía terminal.

El CWU durante la formación de grano permaneció bajo (un punto de referencia de 60 mm) hasta que la relación de biomasa pre:post antesis descendió a ~3,5 (Figura 39). Por debajo de este valor crítico, el CWU durante la formación de grano aumentó significativamente para cada reducción incremental en esta relación. Puesto que ninguna de las introgresiones de Stg1 redujo la PPBR a <3,5 con HD, no se obtuvo ningún aumento en el CWU durante la formación de grano a partir de recombinantes de Stg1 en este tratamiento. Con LD, algunas de las introgresiones de Stg1 (y RTx7000) redujo el PPBR por debajo del nivel crítico, aumentando el CWU durante la formación de grano hasta ~80 mm en comparación con el valor basal de HD (~60 mm).

La relación entre el CWU durante la formación de grano y el rendimiento de grano fue positiva (Figura 40). Sin embargo, la correlación entre estos parámetros fue relativamente bajo ($r^2=0,23$), probablemente debido a la naturaleza altamente variable de las mediciones del agua del suelo en el campo.

EJEMPLO 20

La senescencia de hoja retardada (permanencia verde) es una consecuencia del estado de agua de la planta superior durante la formación de grano (debido a un uso de agua aumentado)

El estado del agua de la planta se determinó sobre FL-2 (dos hojas por debajo de la bandera) en la formación de grano medio usando dos metodologías: potencial de agua de hoja (LWP) y contenido de agua relativo (RWC). El LWP se midió en el campo con una bomba a presión. Después de la determinación del LWP en el campo, se colocó una muestra de la misma hoja sobre hielo y, a los pocos minutos, se llevó a un laboratorio a unos 300 m de distancia para la determinación del RWC mediante métodos estándar.

EL RWC del FL-2 se correlacionó negativamente con la tasa relativa de senescencia de hoja en la formación de grano tanto en densidades altas como bajas en un conjunto de NIL de Stg que incluye el padre recurrente. Las correlaciones para HD y LD fueron paralelas, pero la aparición por aproximadamente 0,35 unidades de senescencia de hoja, es decir, para un nivel dado de RWC, digamos 70, las tasas relativas de senescencia de hoja fueron de 2,1 y 2,45 para LD y HD, respectivamente. La introgresión de la región de Stg1 en RTx7000 aumentó el RWC en la formación de grano medio (FL-2) y disminuyó la tasa relativa de senescencia de hoja tanto con HD como LD, aunque el impacto fue superior con HD.

A su vez, la tasa relativa de senescencia de hoja se correlacionó altamente de forma negativa con la superficie foliar verde (GLAM) con HD y LD (Figura 49) con tasas superiores de senescencia de hoja mostradas con HD. El Stg1 produjo más del doble de GLAM que RTx7000 con HD (2106 frente a 859 cm²/m²) y un 19 % más de GLAM con LD (2145 frente a 1725 cm²/m²), véase también Figura 42.

EJEMPLO 21

La resistencia de encamado aumentada es una consecuencia del estado de agua de la planta superior durante la formación de grano (debido a un uso de agua aumentado)

Una masa de tallo superior en la madurez es un componente de resistencia de encamado. El RWC en la formación de grano medio (FL-2) se correlacionó altamente de forma negativa con la masa del tallo en la madurez en un conjunto de NIL de Stg cultivados en condiciones con agua limitada en dos densidades de cultivo (Figura 43). La introgresión de Stg1 en RTx7000 aumentó el RWC en la formación de grano medio (FL-2) y la masa del tallo en la madurez en HD y LD, con un impacto superior con HD. Con respecto a RTx7000, El Stg1 aumentó la masa de tallo en la madurez en un 9 % con LD (224 frente a 203 g/m²) y un 29 % en HD (286 frente a 204 g/m²). De este modo, el beneficio del Stg1, en términos de resistencia a encamado, aumentó con el nivel de déficit de agua.

La biomasa de post-antesis está principalmente comprendida de a) masa de tallo de post-antesis (PASM), una medición de la movilización de la reserva de tallo y un componente de resistencia a encamado y b) rendimiento de grano. Los cultivadores de granos requieren maximizar tanto el rendimiento de grano como la resistencia de encamado, es decir, no quieren una a expensas de la otra. La masa de tallo de post-antesis se correlacionó altamente de forma lineal con la PAB con condiciones HD y LD (Figura 44). Mientras que el Stg1 tuvo poco impacto sobre el PASM con la sequía más suave (LD), la cantidad de masa seca que se translocó desde el tallo durante la formación de grano fue mucho inferior en Stg1 en comparación con RTx7000 (85 frente a 139 g/m²) con la sequía más grave (HD). Esto resultó en una masa de tallo superior en la madurez en Stg1 con respecto a RTx7000 (286 frente a 204 g/m²) que, a su vez, debía haber aumentado la resistencia de encamado.

Mientras que las correlaciones entre PASM y PAB fueron altas con HD y LD (Figura 43), las correlaciones entre el rendimiento de grano y PAB fueron inferiores con ambas densidades (Figura 44). La introgresión de Stg1 en RTx7000 aumentó el rendimiento de grano con HD y LD, aunque la PAB solo fue superior con HD. Cabe destacar que el rendimiento de grano superior en Stg1 en comparación con RTx7000 (290 frente a 184 g/m²) con HD se logró con significativamente menos reservas de tallo por el Stg1 que en RTx7000 (85 frente a 139 g/m²) indicando que la demanda de carbono durante la formación de grano se consiguió en gran medida mediante la actual fotoasimilación y reservas de tallo en Stg1 y RTx7000, respectivamente.

El potencial intercambio entre PASM y rendimiento de grano se destaca en la Figura 45. Con HD, Stg1 logró el rendimiento de grano más alto de cualquier introgresión (290 g/m²) mientras que mantenía las pérdidas de tallo a 85 g/m². Con respecto a RTx7000, el Stg1 optimizó el intercambio entre PASM y rendimiento de grano. Reducciones adicionales en la utilización de reservas de tallo por el Stg1 (38 g/m²) resultó en un rendimiento de grano inferior (263 g/m²). Con LD, Stg1 también logró un alto rendimiento de grano con respecto a RTx7000 (282 frente a 214 g/m²) mientras que utilizaba ligeramente menos reservas de tallo (46 frente a 50 g/m²). Por lo tanto, con ambas densidades, el Stg1 logró un rendimiento de grano y una resistencia de encamado superiores que RTx7000.

La relación entre PASM y la masa de tallo en la madurez fue relativamente plana para las diversas introgresiones de Stg con HD y LD, aunque RTx7000 descendió por debajo de la línea de regresión en ambos casos. Para un nivel dado de utilización de reserva de tallo (por ejemplo, ~140 g/m² con HD o 50 g/m² con LD), la introgresión de una

región de Stg en RTx7000 aumentó significativamente la masa del tallo en la madurez, sugiriendo que algún otro factor (por ejemplo, resistencia del tallo) además de la cantidad de las reservas de tallo utilizadas fue importante.

La masa de tallo de post-antesis (PASM) se correlacionó altamente de forma lineal con la PAB con condiciones HD y LD (Figura 46). Las correlaciones de HD y LD fueron casi paralelas, aunque la aparición por aproximadamente 50 g/m², es decir, para un nivel dado de PAB, digamos 300 g/m², PASM fue de ~50 g/m² inferior en HD que en LD (-100 frente a -50 g/m²). Esto refleja el nivel superior de estrés en el tratamiento de HD. Con HD, tanto Stg1 como Stg1a utilizaron ~80 g/m² de reservas de tallo en comparación con casi 140 g/m² en RTx7000, sin embargo, Stg1 produjo un ~28 % más de PAB que Stg1a para una utilización de reserva de tallo equivalente. Con LD, Stg1 y a menor medida Stg1a, aumentaron ambos la PAB con respecto a RTx7000. Sin embargo, mientras que Stg1a usó ~60 g/m² menos reservas de tallo que RTx7000, Stg1 usó ~20 g/m² más reservas de tallo que RTx7000.

El rendimiento de grano se correlacionó positivamente con PAB con HD y LD. Con HD, Stg1 superó en rendimiento a RTx7000 en un 24 % aunque Stg1 fue equivalente a RTx7000 en rendimiento de grano. Con LD, Stg1 y Stg1a superaron en rendimiento a RTx7000 en un 42 % y un 20 %, respectivamente.

En este experimento, no hubo intercambio entre PASM y rendimiento de grano, puesto que la correlación entre estos parámetros fue positiva y lineal con ambas densidades de cultivo (Figura 47). Con HD, Stg1 mostró la masa de tallo y rendimiento de grano más altas de todas las introgresiones de Stg, destacando que el rendimiento de grano y la resistencia de encamado no son mutuamente exclusivas.

La relación entre PASM y la masa de tallo en la madurez se correlacionó positivamente con HD y se correlacionó negativamente con LD. Con HD, el PASM y la masa de tallo en la madurez fueron ambos significativamente superiores en Stg1 que en RTx7000. Con LD, la masa de tallo en la madurez fue superior en Stg1 que en RTx7000 (314 frente a 271 g/m²), aunque Stg1 utilizó más reservas de tallo en comparación con RTx7000 (87 frente a 66 g/m²). En su conjunto, Stg1 aumentó la masa de tallo en la madurez en un 22 % (HD) y un 16 % (LD) con respecto a RTx7000. También, Stg1a utilizó significativamente menos reservas de tallo que RTx7000 en ambas densidades de cultivo.

La masa de tallo de post-antesis (PASM) se correlacionó altamente de forma lineal con la PAB con condiciones HD y LD (Figura 48). La variación genética en la utilización de las reservas de tallo de post-antesis varió de ~30-110 g/m² con LD, y de ~100-160 g/m² con HD, reflejando el nivel superior de estrés en el tratamiento de HD. Con HD, el padre de Stg1 (6078-1) y dos de los recombinantes de Stg1 (10604-5 y 10709-5) utilizó significativamente menos reservas de tallo en comparación con RTx7000 (~100 frente a 160 g/m²), sin embargo produjo más PAB que RTx7000 (~170 frente a 130 g/m²). Con LD, solo uno de los recombinantes de Stg1 (10568-2) utilizó significativamente menos reservas de tallo que RTx7000 (~30 frente a 60 g/m²), y produjo más PAB que RTx7000 (~310 frente a 230 g/m²).

El rendimiento de grano se correlacionó positivamente con PAB con LD y se correlacionó negativamente con HD, aunque en su conjunto (combinando HD y LD), la relación fue positiva, con RTx7000 (HD) como resultado discrepante.

En este experimento, no hubo intercambio entre PASM y rendimiento de grano, puesto que la correlación entre estos parámetros fue positiva y lineal con ambas densidades de cultivo. Con HD, el padre de Stg1 (6078-1) mostró una masa de tallo y rendimiento de grano altos en comparación con las otras introgresiones de Stg1. RTx7000 estuvo anormalmente por debajo de HD, mostrando una masa de tallo baja y un alto rendimiento de grano. Con LD, 10709-5 y 10568-2 mostraron una masa de tallo y un rendimiento de grano alto con respecto a RTx7000.

La relación entre PASM y la masa de tallo en la madurez se correlacionó positivamente con ambas densidades. Con HD, el PASM y la masa de tallo en la madurez fueron ambos significativamente superiores en 6078-1 y 10709-5 que en RTx7000. Con LD, solo un recombinante de Stg1 (10568-2) superó a RTx7000 en PASM y masa de tallo en la madurez.

EJEMPLO 22

Un rendimiento de grano superior es una consecuencia de un estado de agua de planta superior durante la formación de grano

La introgresión de Stg1 en un fondo de RTx7000 aumentó el estado de agua de la planta en la formación de medio grano, tal como se indica por a) un contenido de agua relativo (RWC) en FL-2 con LD y HD un potencial de agua de hoja inferior (LWP) en FL-2 con LD y HD. En su conjunto, las plantas más estresadas con LD y HD en este experimento, mostraron un RW inferior con LD. Sin embargo, el impacto beneficioso de Stg1 sobre el estado de agua de planta fue más dramático con HD, en donde el RWC fue del 26 % superior en Stg1 que en RTx7000.

El RWC en la formación de medio grano en Fl-2 se correlacionó positivamente con el rendimiento de grano con HD y LD. En niveles superiores de estrés de agua de planta (RWC<73), el rendimiento de grano fue superior con LD que

con HD para un nivel proporcionado de RWC. El RWC y el rendimiento de grano fueron superior en Stg1 que en RTx7000 en ambas densidades de cultivo. Por ejemplo, en Stg1 con HD, un aumento del 26 % en el RWC se asoció con un aumento del 58 % en el rendimiento de grano, con respecto a RTx7000.

El potencial de agua de hoja (LWP) de FL-2 en la formación de medio grano se correlacionó negativamente con el rendimiento de grano con condiciones de HD y LD (Figura 49). Con ambas densidades, STg1 mostró un LWP inferior (menos estresado) y un rendimiento de grano superior con respecto a RTx7000. Estos datos, junto con los datos de RWC, proporcionan pruebas claras de un enlace entre el estado de agua de planta superior durante la formación de grano y un rendimiento de grano aumentado debido a la región de Stg1.

EJEMPLO 23

Un rendimiento de grano superior y un tamaño de grano más grande son consecuencias de una disponibilidad de agua aumentada durante la formación del grano

Resulta crítico a la hipótesis sobre la función de Stg1 el enlace entre el uso de agua pre- y post-antesis y, posteriormente, el enlace entre el uso de agua post-antesis y el rendimiento de grano. El gen de Stg1 tiene poco valor en el nivel de campo no hay enlace entre la disponibilidad de agua aumentada durante la formación de grano ni tampoco en el rendimiento de grano ni tamaño de grano.

En primer lugar, es más importante establecer el enlace entre la relación de biomasa pre:post antesis (PPBR) y el uso de agua de cultivo (CWU) durante la formación de grano. El CWU durante la formación de grano permaneció bajo (un punto de referencia de ~85 y 95 mm para LD y HD, respectivamente) hasta que la relación de biomasa pre:post antesis descendió a ~3 y 2,5 para LD y HD, respectivamente (Figura 50). Por debajo de este valor crítico, el CWU durante la formación de grano aumentó significativamente para cada reducción incremental en esta relación. Con ambas densidades, las introgresiones de Stg1 redujo la PPBR suficientemente para aumentar significativamente el CWU con respecto a RTx7000.

En segundo lugar, es importante mostrar el enlace entre el CWU entre la formación de grano y el rendimiento de grano. En general, estos parámetros se asociaron positivamente con un experimento de ROS, aparte de dos resultados discrepantes distintos con LD (Stg2 y Stg3) [Figura 51]. La introgresión de Stg1 en RTx7000 aumentó tanto el CWU durante la formación de grano y el rendimiento de grano en ambas densidades de cultivo.

Finalmente, el enlace entre la PPBR y rendimiento de grano con condiciones con agua limitada completa la imagen (Figura 51). El rendimiento de grano permaneció bajo (un punto de referencia de ~410 g/m²) hasta que la relación de biomasa pre:post antesis descendió a ~2,7 (Figura 52). Por debajo de este valor crítico, el rendimiento de grano aumentó significativamente para cada reducción incremental en esta relación. Con ambas densidades, las introgresiones de Stg1 redujo la PPBR suficientemente para aumentar significativamente el rendimiento de grano con respecto a RTx7000. Estos datos proporcionan un enlace crítico entre la acción del gen de Stg1 (tamaño del dosel reducido en antesis) y rendimiento de grano con sequía terminal.

El CWU durante la formación de grano se correlacionó positivamente con un tamaño de grano tanto con los tratamientos de HD como LD (Figura 53). La introgresión de Stg1 en RTx7000 aumentó significativamente el tamaño del grano con HD, pero no LD.

La relación entre PPBR y tamaño de grano con condiciones con agua limitada subraya la importancia de la conservación de agua antes de la antesis como un determinante del tamaño de grano (Figura 54). El tamaño de grano permaneció bajo (un punto de referencia de ~17 y 17,5 mg para HD y LD, respectivamente) hasta que la relación de biomasa pre:post antesis descendió a ~2,7 (Figura 54). Por debajo de este valor crítico, el tamaño de grano aumentó significativamente para cada reducción incremental en esta relación. Con HD pero no LD, las introgresiones de Stg1 redujo la PPBR suficientemente para aumentar significativamente el tamaño de grano con respecto a RTx7000. Estos datos proporcionan un enlace crítico entre la acción del gen de Stg1 (tamaño del dosel reducido en antesis) y tamaño de grano con sequía terminal.

El CWU durante la formación de grano permaneció bajo (un punto de referencia de 58 mm) hasta que la relación de biomasa pre:post antesis descendió a ~3,5. Cabe destacar que la PPBR no descendió por debajo del umbral crítico en ningún genotipo con HD, de este modo, el CWU durante la formación de grano permaneció relativamente baja para todos los genotipos en este tratamiento. Sin embargo, según los genotipos descendían por debajo de este valor crítico en el tratamiento de LD, el CWU durante la formación de grano aumentó significativamente para cada reducción incremental en esta relación. Solo un recombinante de Stg1 (10709-5) aumentó el CWU durante la formación de grano con respecto a RTx7000.

En general, el CWU durante la formación de grano y rendimiento de grano se correlacionaron positivamente usando un conjunto de datos combinados a partir de los tratamientos de HD y LD, con genotipos que usan más agua y producen más grano con LD. Sin embargo, la relación entre estos parámetros no fue muy fuerte. Ni los

recombinantes de Stg1 particulares superaron en rendimiento de forma consistente a RTx7000 en tratamientos de HD y LD. Véase la figura 55.

EJEMPLO 24 *Análisis de gen PIN y QTL*

Análisis de QTL

Los datos de QTL de permanencia verde se recogieron a partir de 7 estudios (Crasta *et al.*, 1999; Hausmann *et al.*, 2002); Kebede *et al.*, Theoretical and Applied Genetics 103:266-276, 2001; Srinivas *et al.*, Theor Appl Genet 118:703-717, 2009; Subudhi *et al.*, Theor App Genet 101:733-741, 2000; Tao *et al.*, Theor Appl Genet 100:1225-1232, 2000; Xu *et al.*, Genome 43:461-469, 2000). A partir de los 7 estudios, se identificaron 47 QTL individuales y se proyectaron sobre el mapa de consenso del sorgo (Mace *et al.*, BMC Plant Biol. 9:13, 2009). Cuando se estimaron los Intervalo de confianza (IC) de QTL para el mismo rasgo superpuesto, esos QTL se agruparon en un meta QTL. Se identificaron de este modo nueve meta-QTL para la permanencia verde. Se clasificaron los QTL para el mismo rasgo como QTL separados si su IC no tenía ninguna región en común y el emplazamiento de los QTL medio era inferior o igual a 15cM de distancia entre sí.

Se llevó a cabo el aprendizaje de máquina estadístico (SML) análisis QTL (Bedo *et al.*, BMC Genetics 9:35, 2008) en un conjunto de sobre 500 entradas en el ensayo de machos de pyt de sorgo de DEEDI. Los 23 QTL identificados con una probabilidad de <0,05 también se trazaron sobre el mapa de consenso.

Análisis de gen PIN

Todos los genes PIN disponibles en arroz y Arabidopsis se buscaron a través del NCBI (www.ncbi.org). En total, se identificó la secuencia para 9 genes PIN de arroz (OsPIN1, OsPIN1b, OsPIN1c, OsPIN2, OsPIN3a, OsPIN3b, OsPIN4, OsPIN5, OsPIN6) y 3 genes PIN de Arabidopsis (AtPIN1, AtPIN2, AtPIN4). Todos los genes (secuencia de proteínas) se sometieron a BLAST frente al WGS del sorgo (www.gramene.org) y se identificaron los 100 impactos superiores. La puntuación (valor S: una medida de la similitud de la consulta a la secuencia mostrada), valor E (la probabilidad debido a casualidad, de que hay otra alineación con una similitud superior que la proporcionada en la puntuación S), se cotejó el % de DI y longitud de homología de secuencia para cada uno de los 1.200 impactos. Se analizó la relación entre las 4 medidas y se seleccionó la puntuación S como la medición principal para evaluar la probabilidad de similitud de secuencia. Posteriormente a un análisis de la distribución de los valores de puntuación S, se identificaron 3 categorías de puntuación S (> 1.000; > 499 y < 1000; < 499) y se produjo una lista de 11 genes de sorgo con puntuaciones > 499 (es decir, en las primeras 2 categorías) (Tabla 8).

Tabla 8

ID del gen del sorgo	Gen diana	Anotación JGI
Sb02g029210	OsPIN6	"similar a proteína Os09g0505400"
Sb03g029320	OsPIN3a	"similar a componente de portador de eflujo de auxina probable 3a"
Sb03g032850	OsPIN1	"similar a proteína no caracterizada putativa"
Sb03g037350	OsPIN5	"similar a componente de portador de eflujo de auxina probable 5"
Sb03g043960	OsPIN6	"similar a componente de portador de eflujo de auxina probable 6"
Sb04g028170	OsPIN1	"similar a componente de portador de eflujo de auxina 1"
Sb05g002150	OsPIN1b	"similar a componente de portador de eflujo de auxina probable 1b"
Sb07g026370	OsPIN4	"similar a componente de portador de eflujo de auxina probable 4"
Sb10g004430	OsPIN1	"similar a componente de portador de eflujo de auxina putativo 3b"
Sb10g008290	OsPIN1c	"similar a componente de portador de eflujo de auxina probable 1c"
Sb10g026300	OsPIN2	"similar a componente de portador de eflujo de auxina probable 2"

Comparaciones

De los 11 ortólogos de PIN identificados, 10 (90,9 %) se alinearon con QTL conocidos para la permanencia verde. Solo uno de los 11 genes PIN de sorgo (Sb03g043960 sobre SBI-03, no se alineó con ningún QTL presentado. De los 79 QTL trazados (23 SML-QTL y 56 de la bibliografía/meta-QTL), 30 (38 %) se alinearon con los ortólogos de PIN.

EJEMPLO 25

Análisis de PIN2, PIN3, PIN4 y PIN5

La fuente de permanencia verde BTx642 (B35), y líneas casi isogénicas (NIL) que contenían QTL de Stg1, Stg2, Stg4, así como la línea senescente de contraste Tx7000 se cultivaron en tubos de raíz en un invernadero.

El objetivo del experimento era medir los niveles de expresión de los genes que se identifican en el presente documento como candidatos de permanencia verde con condiciones bien regadas y después de que se haya impuesto un estrés de sequía sobre las plantas para observar si hay alguna diferencia en la expresión de la permanencia verde en comparación con las plantas senescentes.

El experimento se dividió en dos partes: un estrés de sequía temprano (Exp1) y un estrés de sequía tardío (Exp2).

Los resultados del experimento de estrés de sequía temprana se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

Gen	Gene1D	Homólogo del arroz	QTL de Stg	Comentario
SbPIN2	Sb03g029320	OsPIN3a	Stg2	Candidato de Stg2
SbPIN3	Sb03g032850	OsPIN1	Stg1	QTL de Stg1 superior
SbPIN4	Sb03g037350	OsPIN5	Stg1	Candidato de Stg1
SbPIN5	Sb03g043960	OsPIN6	Stg1	QTL de Stg1 inferior

Las principales diferencias en la expresión de estos genes PIN se resumen a continuación (Tabla 10 y Figuras 57A a D).

Tabla 10

Gen	Tejidos principales	Respuesta a WD	Expresión diferencial
SbPIN4 (candidato de Stg 1)	WW: bajo en hojas, alto en raíces WD: bajo en hojas, alto en raíces	Baja expresión en la mayoría de tejidos	WW: Superior en Tx7000 frente a BTx642 y Stg1 en raíces (Fig.1) WD: Superior en Stg1 y BTx642 frente a Tx7000 en hojas, tallos y raíces superiores (Fig. 2)
SbPIN2 (candidato de Stg2)	WW: alto en hojas, bajo en raíces WD: alto en hojas, bajo en raíces	Aumento en raíces, disminución en tallos	WW: Superior en Stg2/BTx642 frente a Tx7000 en tallo y raíces (Fig. 3) WD: superior en BTx642 y en un grano menor Stg2 frente a Tx7000 en la mayoría de tejidos exceptos en raíces viejas (Fig. 4)
SbPIN3	Variación limitada entre tejidos	Respuesta limitada a WD	WD: ligeramente superior en BTx642/Stg1 frente a Tx7000
SbPIN5	WW: alto en hojas, bajo en raíces	Aumento en raíces, no mucho cambio en	WW: Superior en Stg1 (y en un grado mucho menor Tx642) frente a
	WD: alto en hojas, bajo en raíces	hojas	Tx7000 en raíces jóvenes superiores especialmente WD: Superior en Stg1 (y en un grado inferior) BTx642 frente a Tx7000 en tallo

Se identificaron patrones emergentes para SbPIN4 y SbPIN2, Stg1 y Stg2, respectivamente.

En ambos casos la expresión de estos genes fue superior en líneas de permanencia verde en comparación con la línea senescente en respuesta al déficit de agua.

Estos dos genes PIN mostraron las diferencias en la especificidad tisular. SbPIN4 se expresó generalmente (por todas las condiciones) de forma más alta en las raíces y tallos y se expresó menos en hojas, mientras que SbPIN2 generalmente mostró una expresión superior en hojas y tallos y una expresión inferior en raíces).

Bibliografía

Andrade *et al.*, *Crop Sci.* 42:1173-1179, 2002

Bedo *et al.*, *BMC Genetics* 9:35, 2008

Belikova *et al.*, *Cell* 115:591-602, 2003

Borrell *et al.*, *Crop Sci.* 40:1026-1037, 2000a

Borrell *et al.*, *Crop Sci.* 40:1037-1048, 2000b

- Borrell y Hammer, *Crop Sci.* 40:1295-1307, 2000
- 5 Carraro et al., *Plant Physiology* 142:254-264, 2006
- Christopher et al., *Aust. J. Agric. Res.* 59: 354-364, 2008
- Crasta et al., *Molecular and General Genetics* 262:579-588,1999
- 10 Forestan and Varotto, *Plant Physiology*, 2009
- Friml et al., *Current Opinion in Plant Biology* 6:7-12, 2003
- Garud et al., *Int. Sorghum and Millets Newsl.* 43:63-65, 2002
- 15 Hammer et al., *Aust. J. Agric. Res.* 48:649-655, 1997
- Hammer, *Agric. Sci.* 19:16-22, 2006
- 20 Harris u col., *J. Exp. Bot.* 58:327-338, 2007
- Hausmann et al., *Theoretical and Applied Genetics* 106:133-142, 2002
- Henderson et al., *Aust. J. Plant Physiol.* 25:111-123, 1998
- 25 Henzell et al., *Australia Int. Sorghum and Millets Newsl.* 38:1-9, 1997
- Jiao et al., *Nature Genetics* 42:541-544, 2010
- 30 Jordan et al., *Theor. Appl. Genet.* 106:559-567, 2003
- Kashiwagi et al., *Plant Physiology and Biochemistry* 44:152-157,2006
- Kassahun et al., *Euphytica* 72:351-362, 2010
- 35 Kebede et al., *Theoretical and Applied Genetics* 103:266-276, 2001
- Leyser, *Current Biology* 16:R4242-R433, 2001
- 40 Mace et al., *BMC Plant Biol.* 9:13, 2009
- Manschadi et al., *Funct. Plant. Biol.* 33:823-837, 2006
- Miura et al., *Nature Genetics* 42:545-549, 2010
- 45 Mortlock y Hammer, *J. Crop Prod.* 2:265-286, 1999
- Papanov et al., *Trends in Plant Science* 10(4): 170-177, 2005
- 50 Passioura, *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 43:117-120, 1977
- Rashotte et al., *Plant Cell* 13:1683-1697, 2000
- Reddy et al., *Euphytica* 159:191-198, 2008
- 55 Reinhardt et al., *Plant Cell* 12:507-518, 2000
- Rosenow et al., *Agric. Water Manag.* 7: 207-222, 1983
- 60 Sadras y Connor, *Field Crops Res.* 26:227-239, 1991
- Spano et al., *J. Exp. Bot.* 54:1415-1420, 2003
- Springer, *Nature Genetics* 42:475-476, 2010
- 65 Srinivas et al., *Theor Appl Genet* 118:703-717, 2009

- Subudhi *et al.*, *Theor Appl Genet* 101:733-741, 2000
- Tao *et al.*, *Theor Appl Genet* 100:1225-1232, 2000
- 5 Tenkouano *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 85:644-648, 1993
- Turner, J. *Exp. Bot.* 55:2413-2425, 2004
- 10 Van Oosterom *et al.*, *Field Crops Res.* 115:19-28, 2010a
- Van Oosterom *et al.*, *Field Crops Res.* 115:29-38, 2010b
- Van Oosterom y Hammer, *Field Crops Res.* 108:259-268, 2008
- 15 Wang *et al.*, *Molecular Plant* 2(4):823-831, 2009
- Xin *et al.*, *Field Crops Res.* 111:74-80, 2009
- 20 Xu *et al.*, *Genome* 43:461-469, 2000
- Zheng *et al.*, *Plant Breed* 128:54-62, 2009

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar una planta genéticamente modificada que usa agua de forma más eficaz que una planta no modificada genéticamente de la misma especie, comprendiendo el método la introducción mediante ingeniería genética usando medios recombinantes de material genético que codifica una proteína SbPIN4 para conferir un fenotipo de permanencia verde, cuyo fenotipo incluye un cambio en el uso de agua al período de post-antesis o accesibilidad aumentada de agua durante el crecimiento de la cosecha o eficacia de transpiración aumentada resultando en un índice de cosecha aumentado y rendimiento de grano en condiciones con agua limitada, en donde dicha proteína SbPIN4 está codificada por el ID del Gen de Sorgo Sb03g037350 desde pb 65310051 a pb 65313194.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la introducción mediante ingeniería genética usando medios recombinantes de material genético que codifica SbPIN2.
3. El método de la reivindicación 2, en donde dicha proteína SbPIN2 está codificada por el ID del Gen de Sorgo Sb03g029320 desde pb 57449784 a pb 57453744.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la planta genéticamente modificada es una planta de sorgo o se selecciona entre trigo, avena, maíz, cebada, centeno y arroz o se selecciona de abacá, alfalfa, almendra, manzana, espárrago, plátano, judía-*phaseolus*, mora, haba común, canola, anacardo, yuca, garbanzo, cítrico, coco, café, maíz, algodón, higo, lino, uvas, cacahuete, cáñamo, kenaf, lavanda, mano, oliva, cebolla, guisante, cacahuete, pera, mijo perla, patata, ramio, colza, trigollo, soja, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, batata, taro, té, tabaco, tomate, triticale y ñame.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde el fenotipo de permanencia verde incluye adicionalmente un fenotipo seleccionado entre plasticidad de la arquitectura del dosel mejorada, tamaño del dosel reducido, biomasa mejorada por unidad de superficie foliar en antesis, eficacia de transpiración superior, uso de agua aumentado durante formación del grano, producción de biomasa pre- y post-antesis reducida y senescencia retardada o incluye adicionalmente un tamaño de grano más grande.
6. Uso de un material genético que codifica una proteína SbPIN4 para generar mediante medios recombinantes una planta genéticamente modificada que usa agua de forma más eficaz que una planta no modificada genéticamente de la misma especie, en donde dicha planta modificada genéticamente tiene un fenotipo de permanencia verde que incluye un cambio en el uso de agua al período de post-antesis o accesibilidad de agua aumentada durante el crecimiento de la cosecha o eficacia de transpiración aumentada resultando en un índice de cosecha aumentado y rendimiento de grano en condiciones con agua limitada y en donde dicha proteína SbPIN4 está codificada con el ID del Gen del Sorgo Sb03g037350 desde pb 65310051 a pb 65313194.

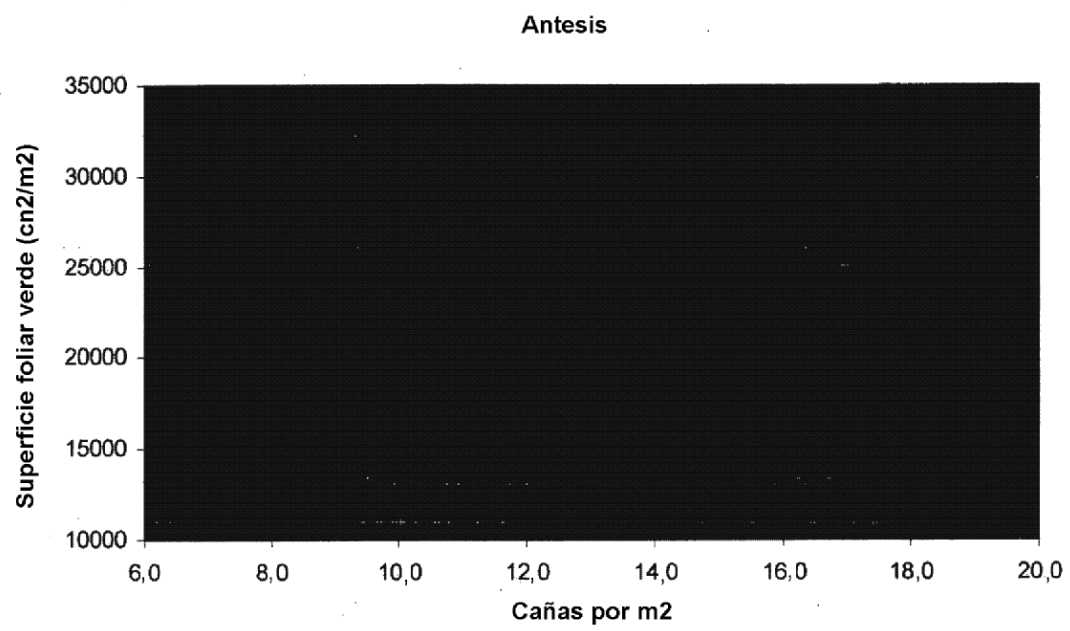


Figura 1

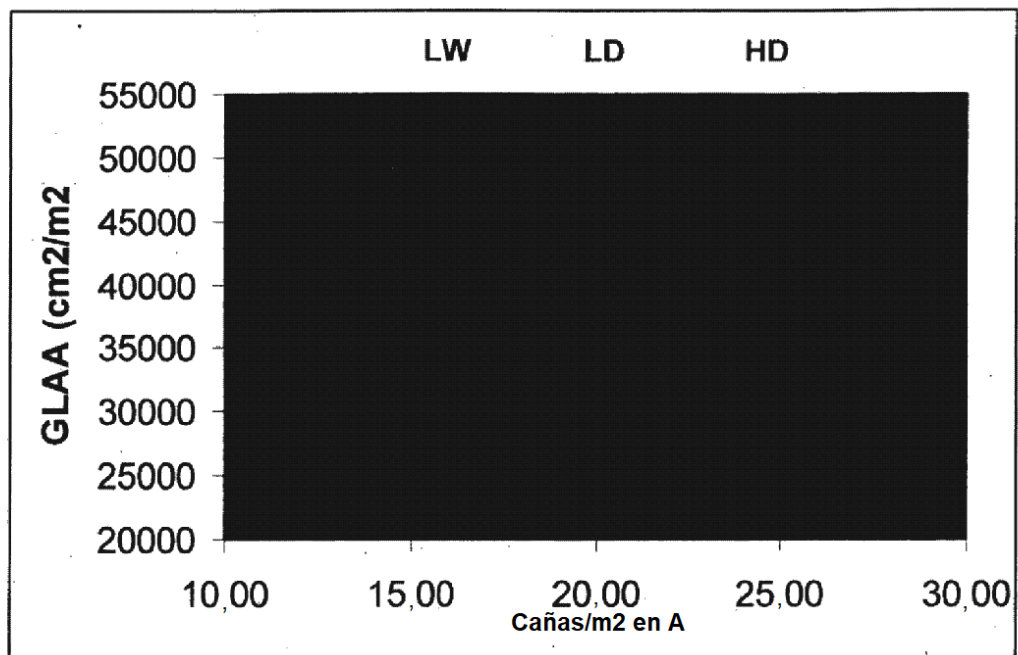


Figura 2

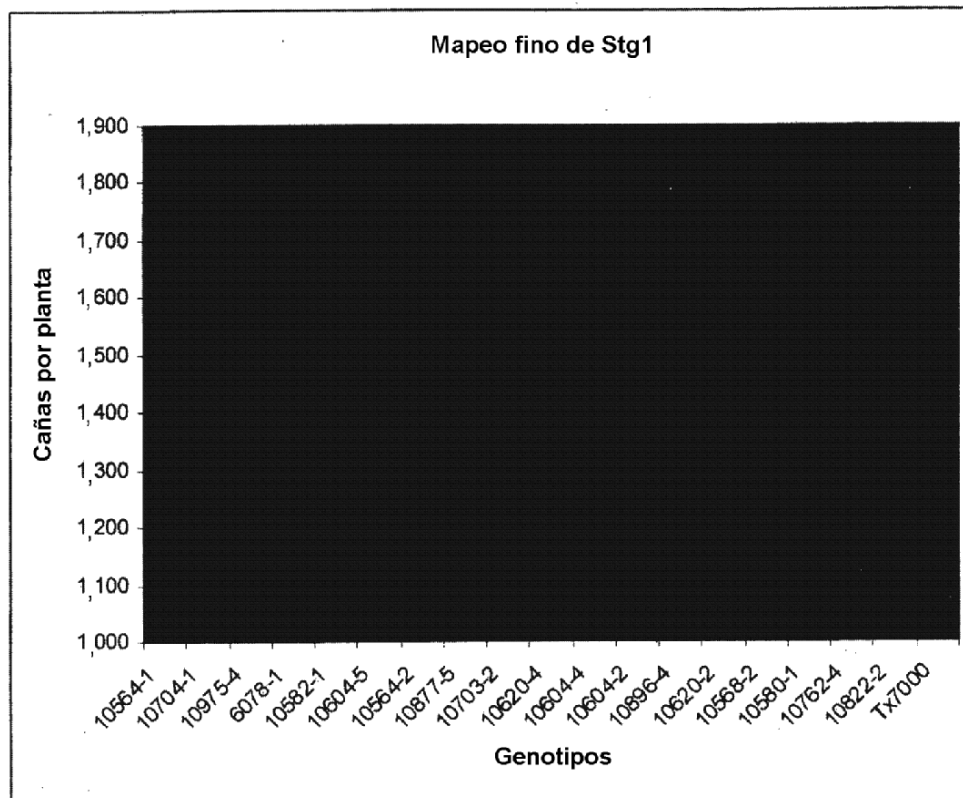


Figura 3

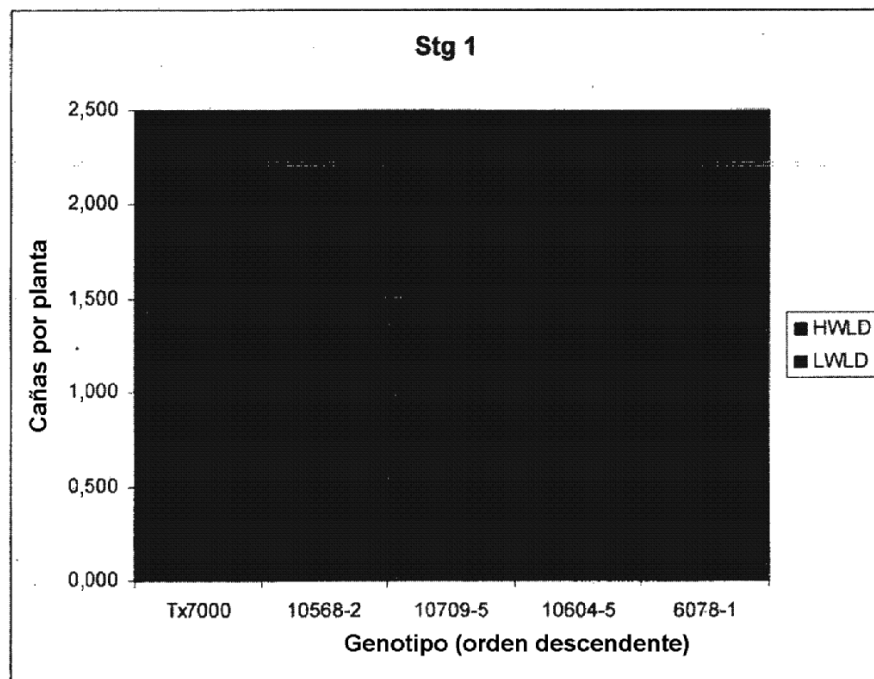


Figura 4

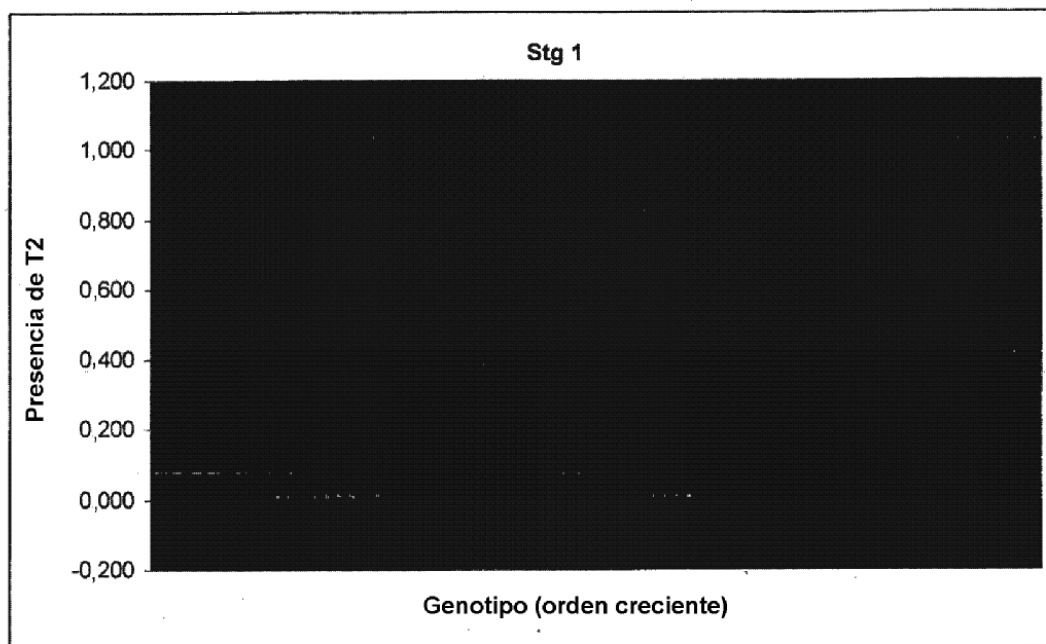


Figura 5

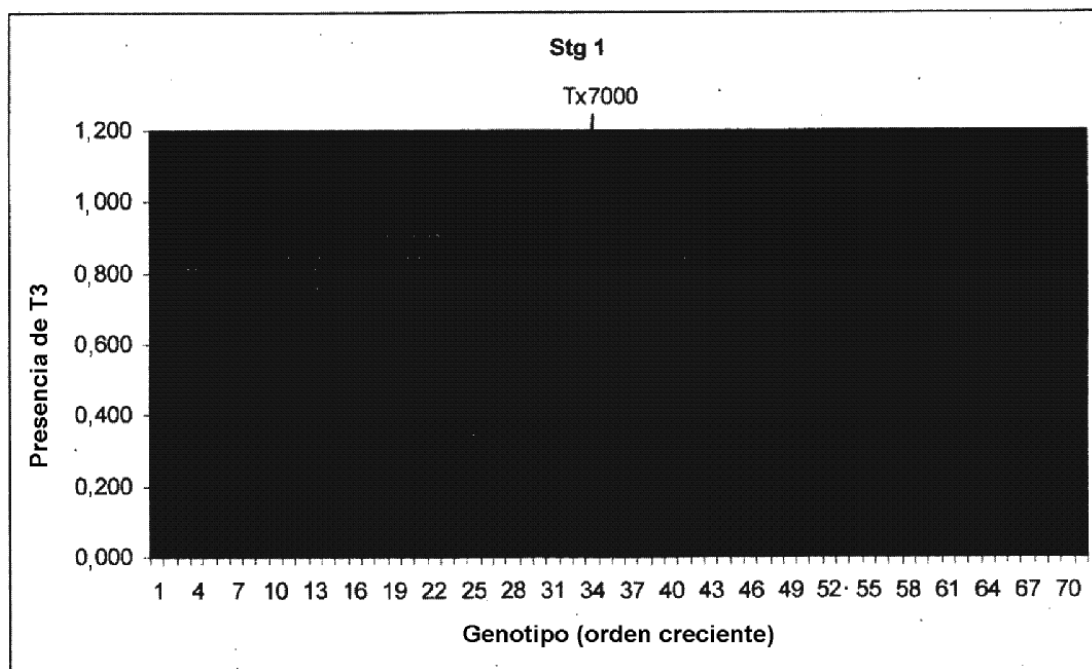


Figura 6

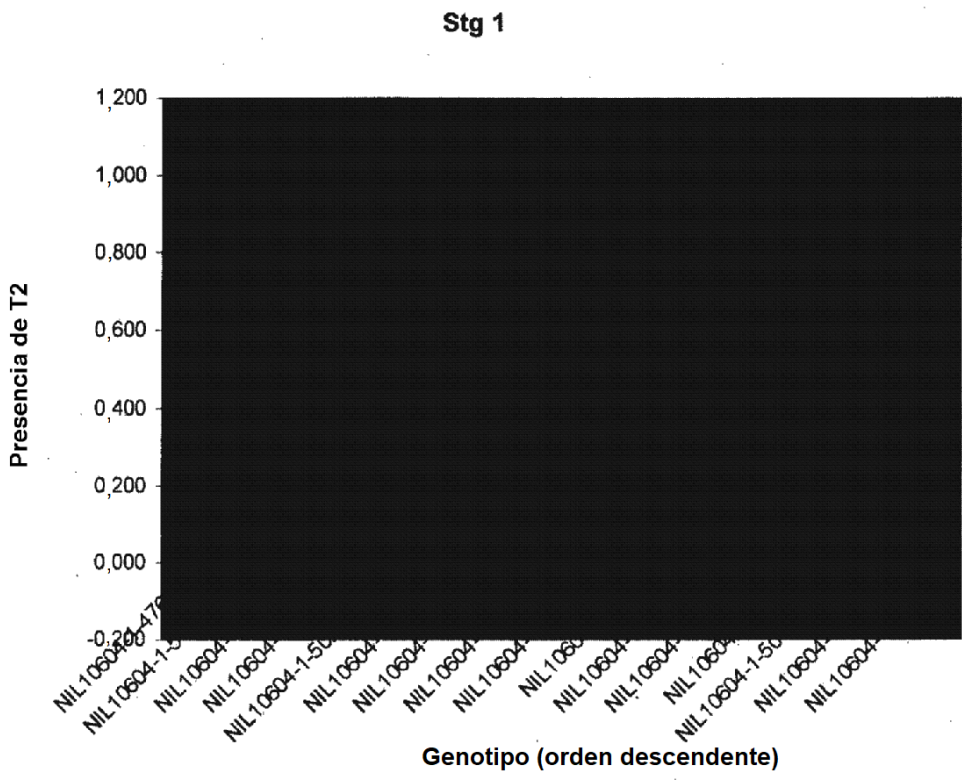


Figura 7

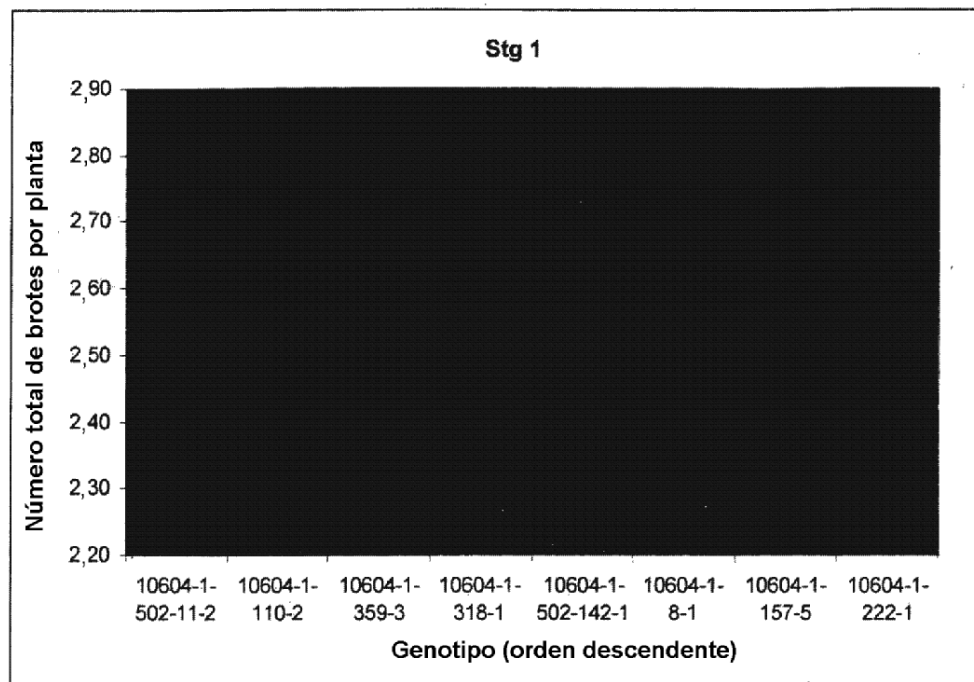


Figura 8

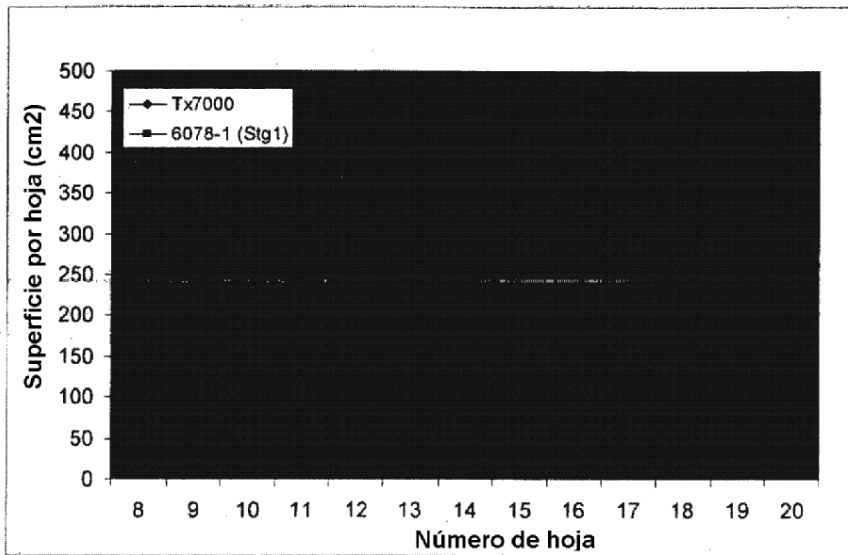


Figura 9A

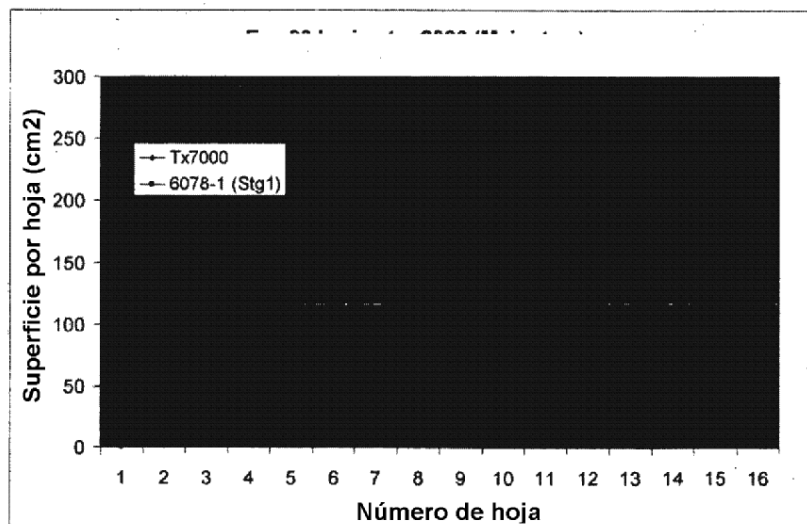


Figura 9B

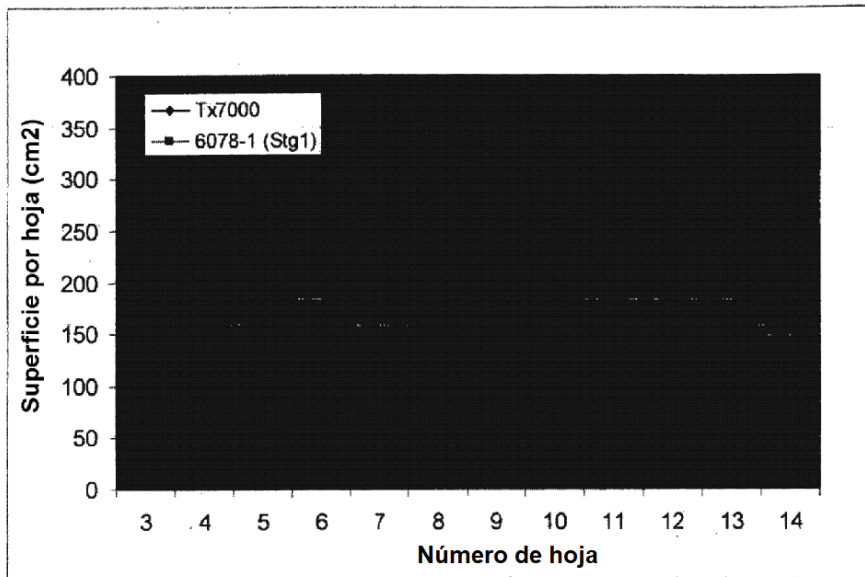


Figura 9C

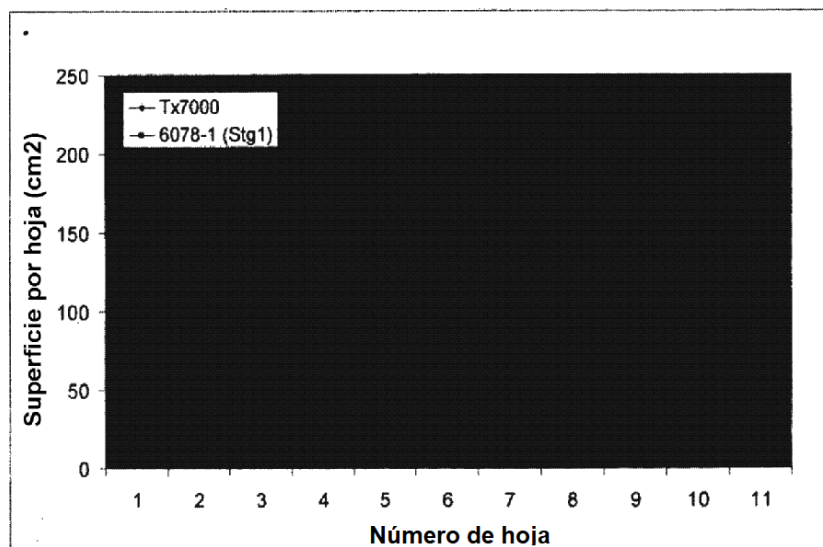


Figura 9D

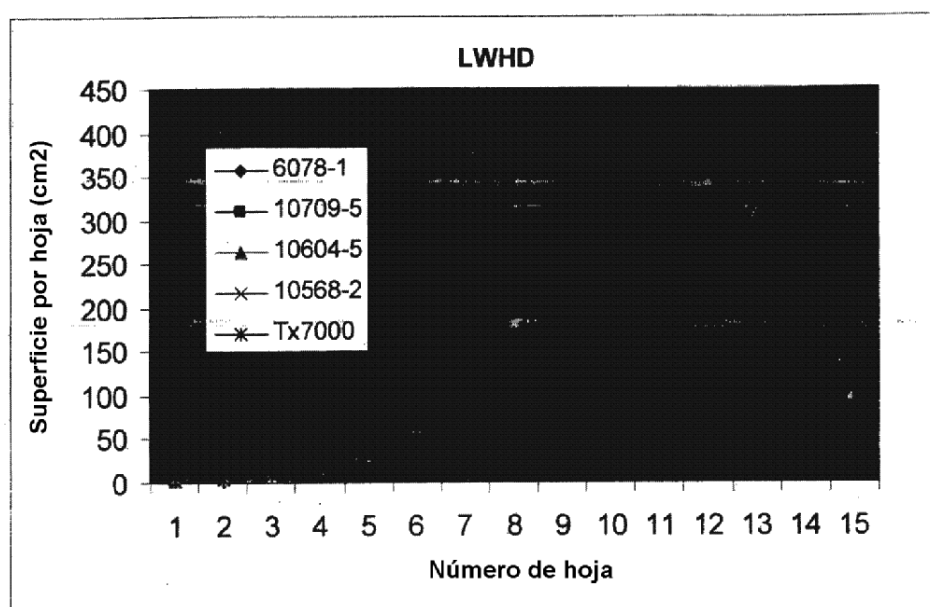


Figura 10

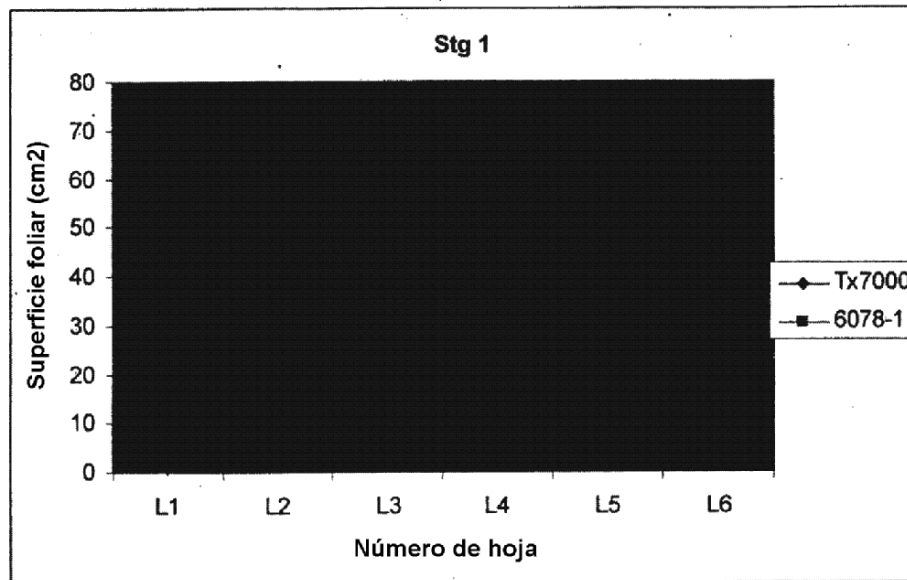


Figura 11

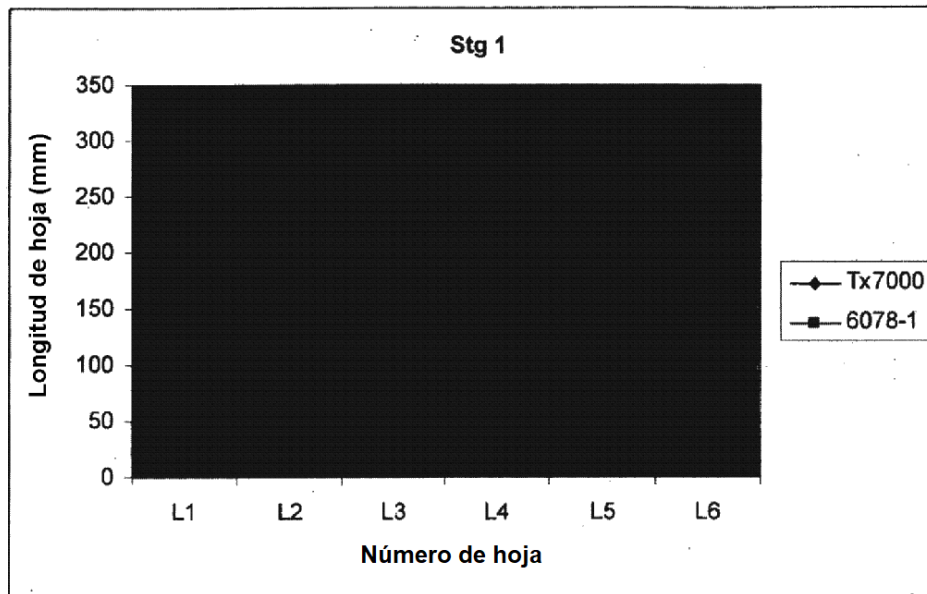


Figura 12

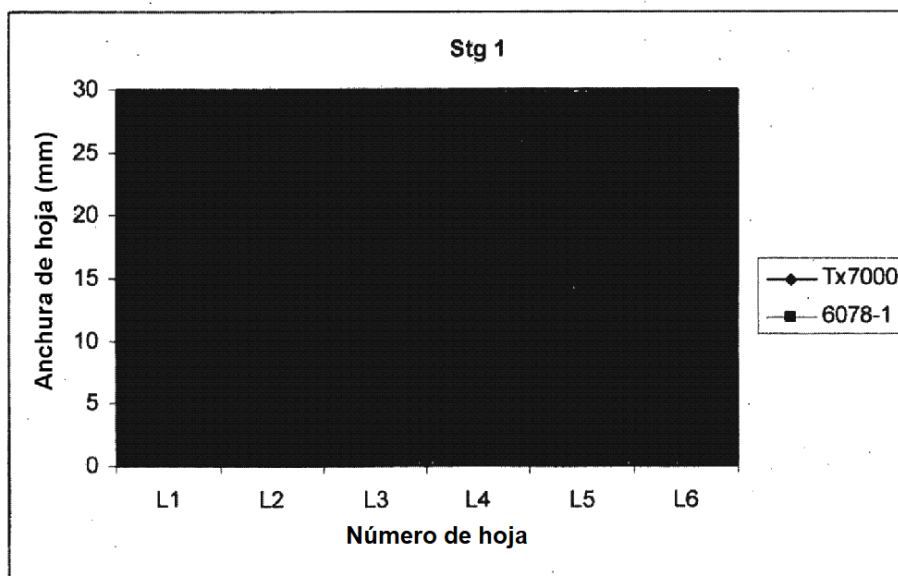


Figura 13

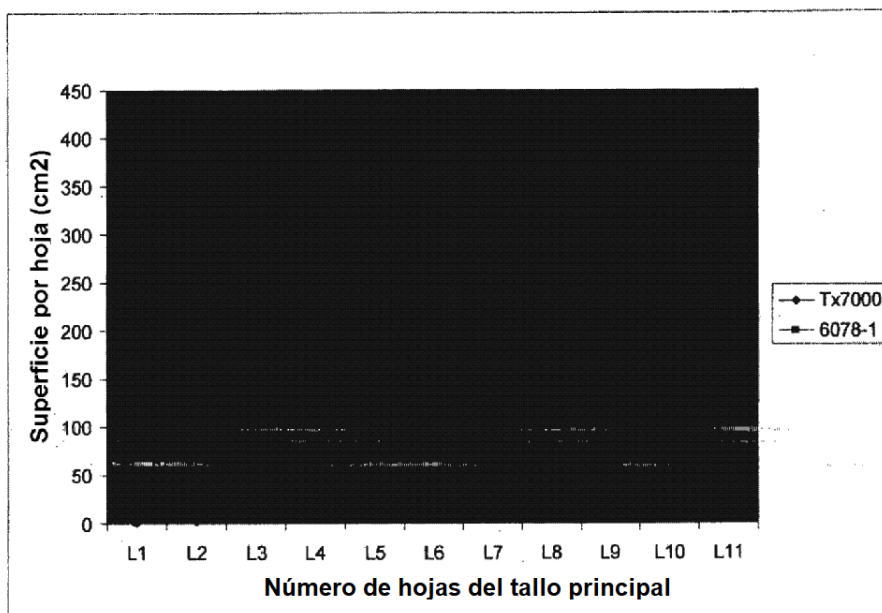


Figura 14

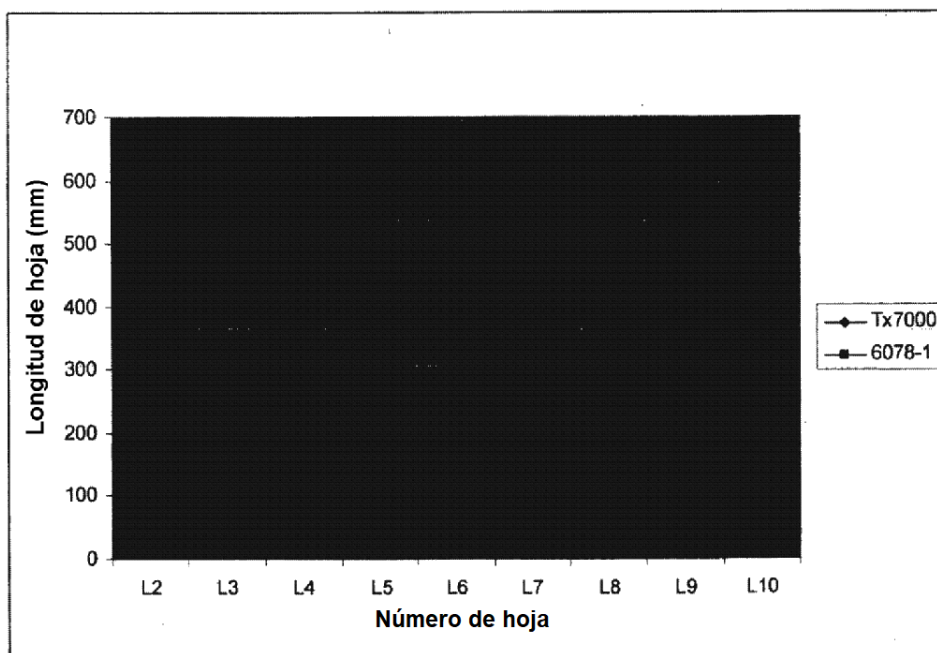


Figura 15

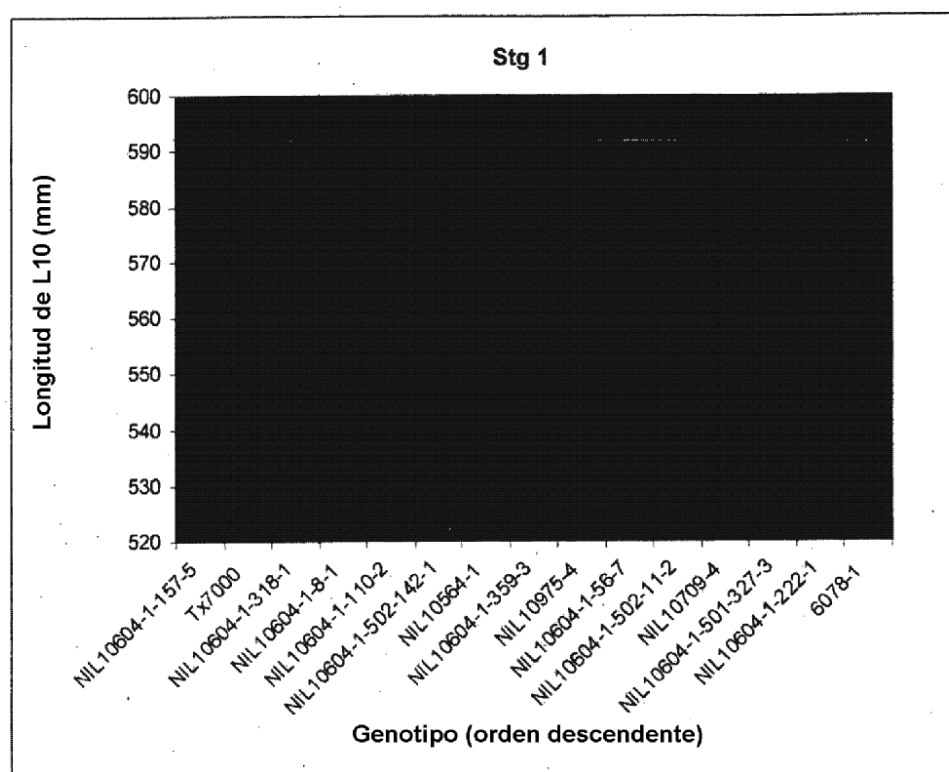


Figura 16

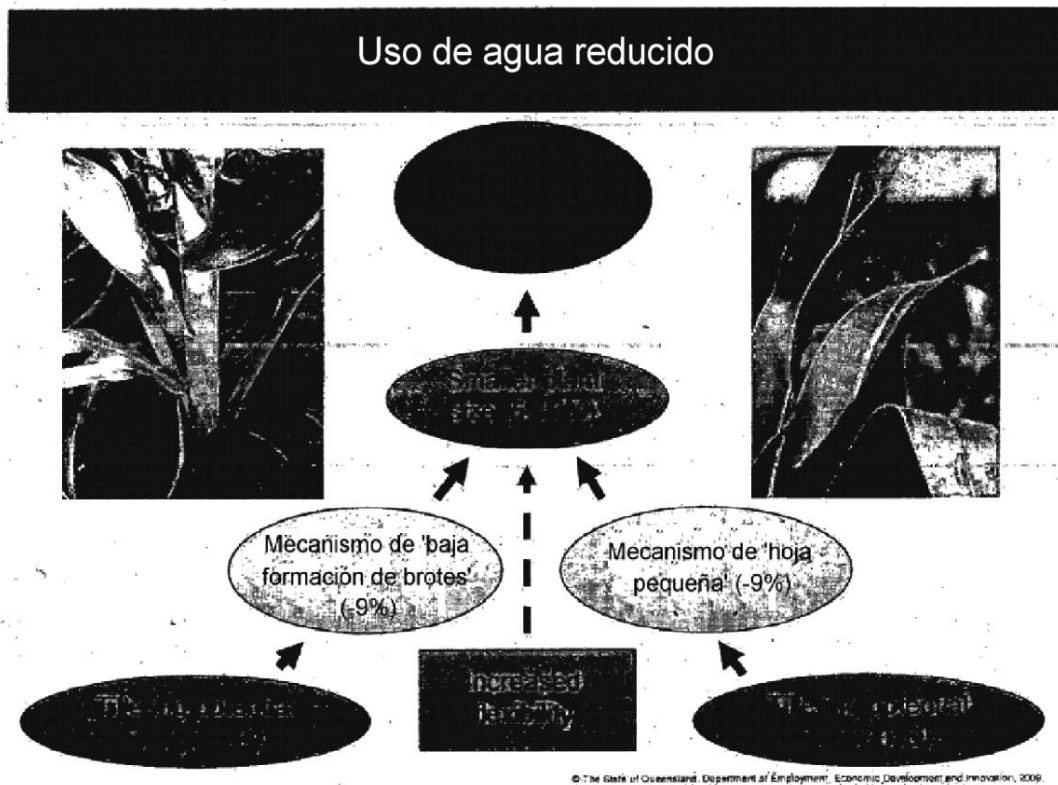


Figura 17

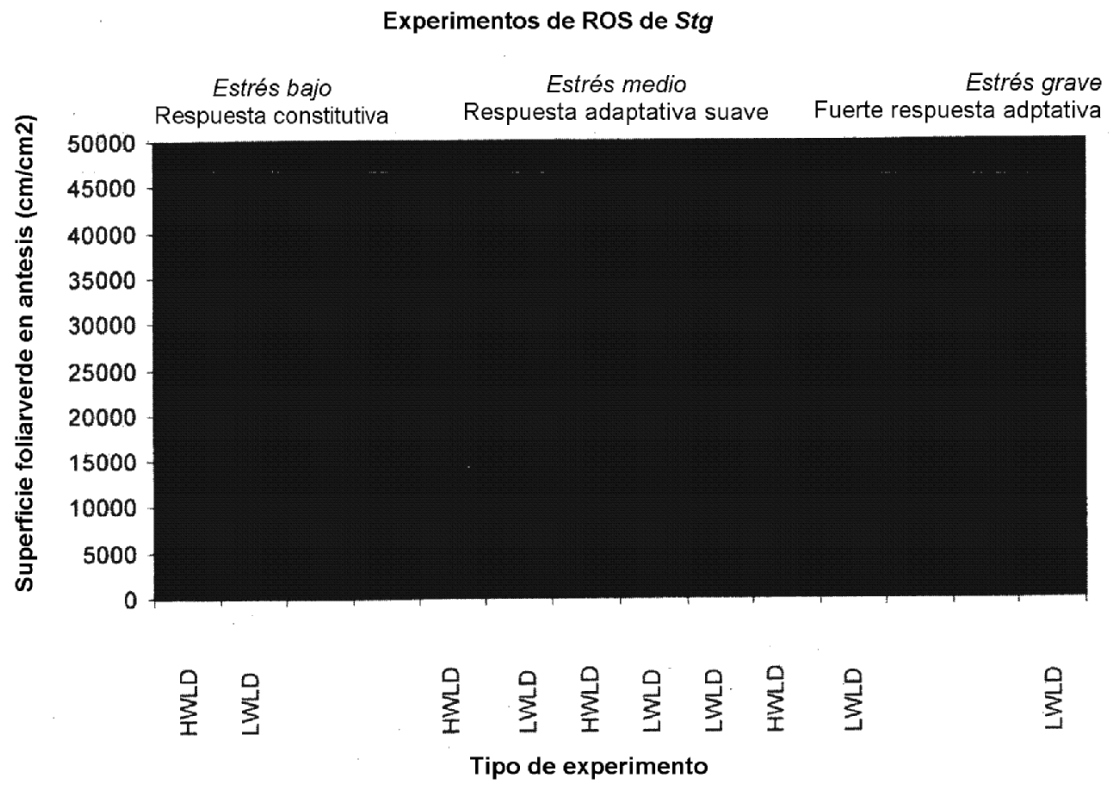


Figura 18

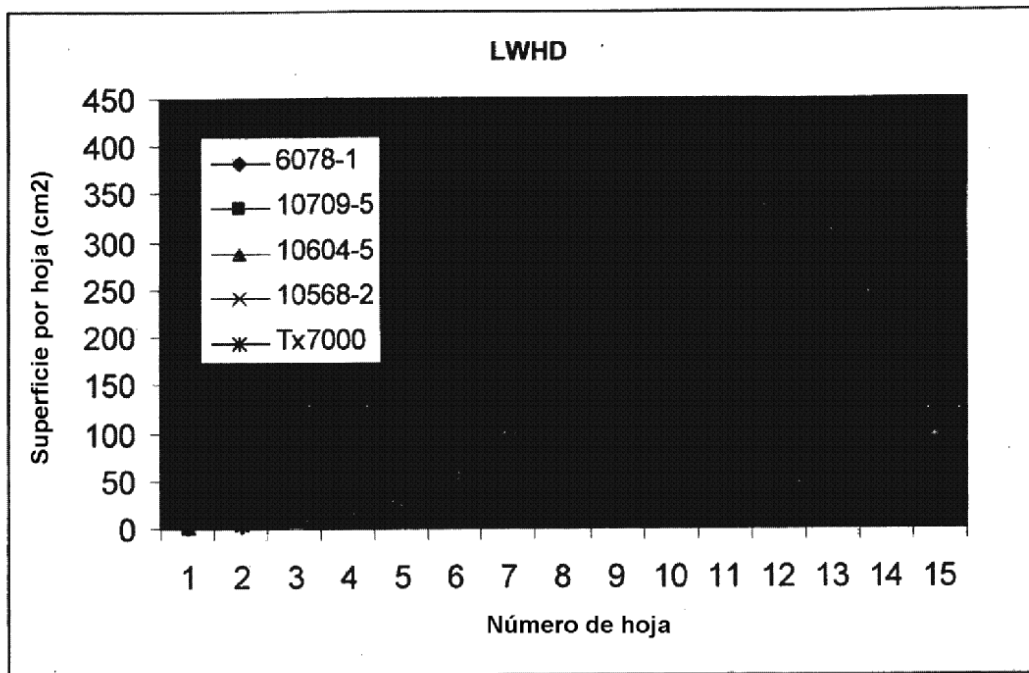


Figura 19

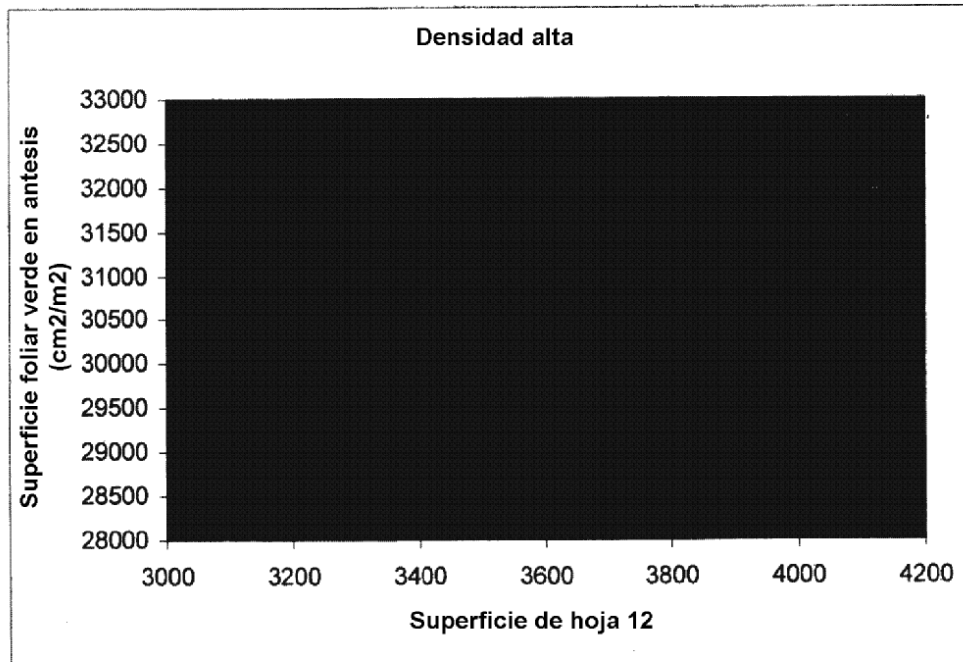


Figura 20

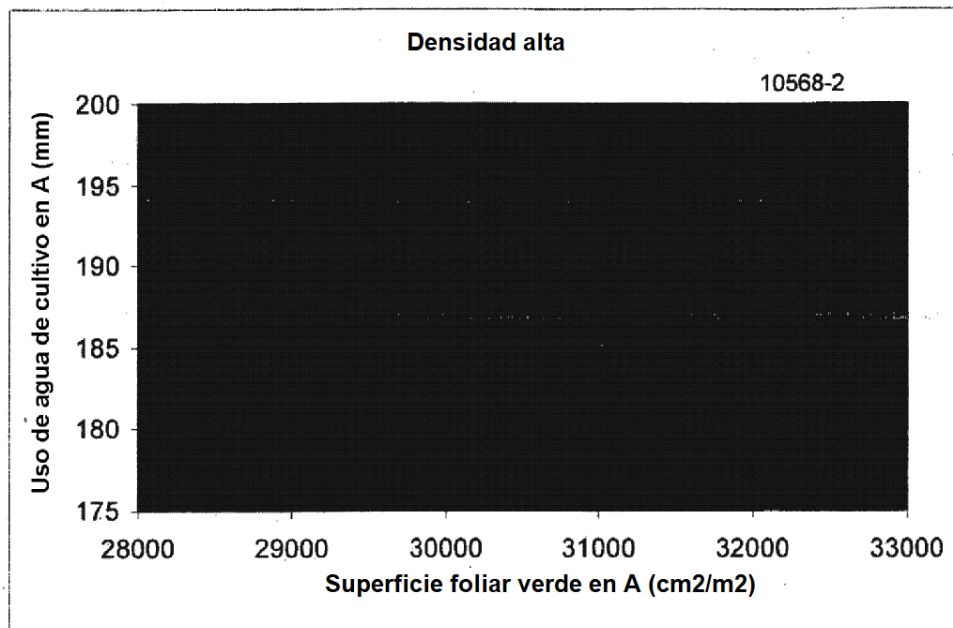


Figura 21

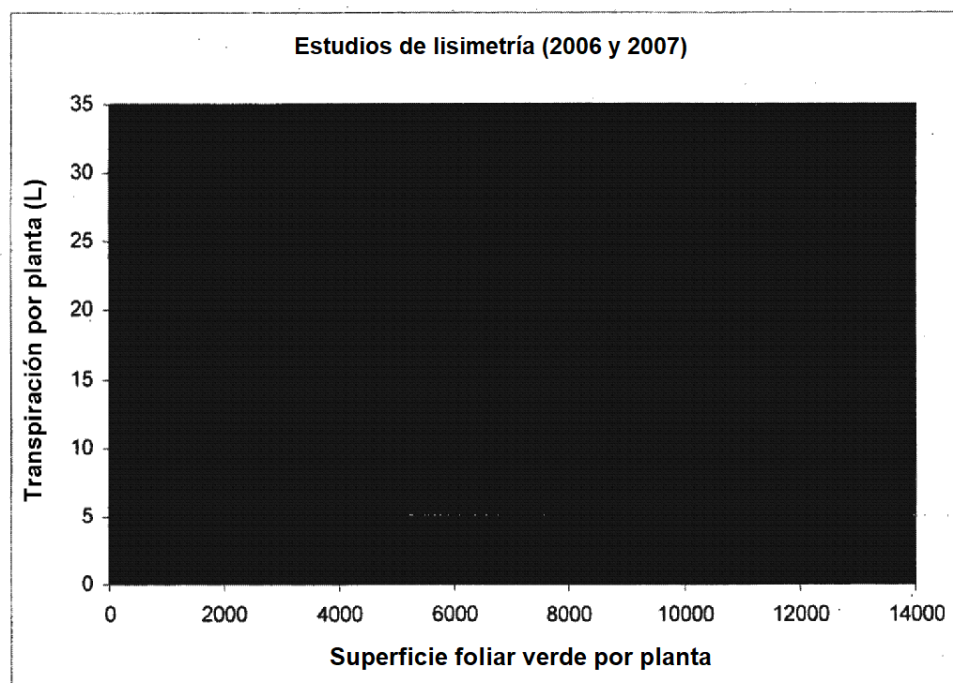


Figura 22

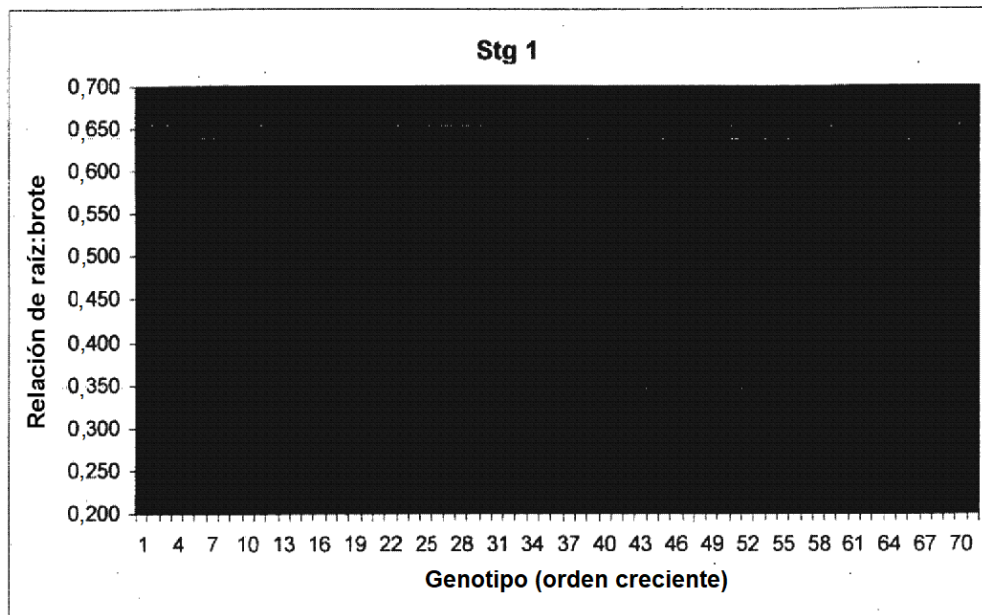


Figura 23

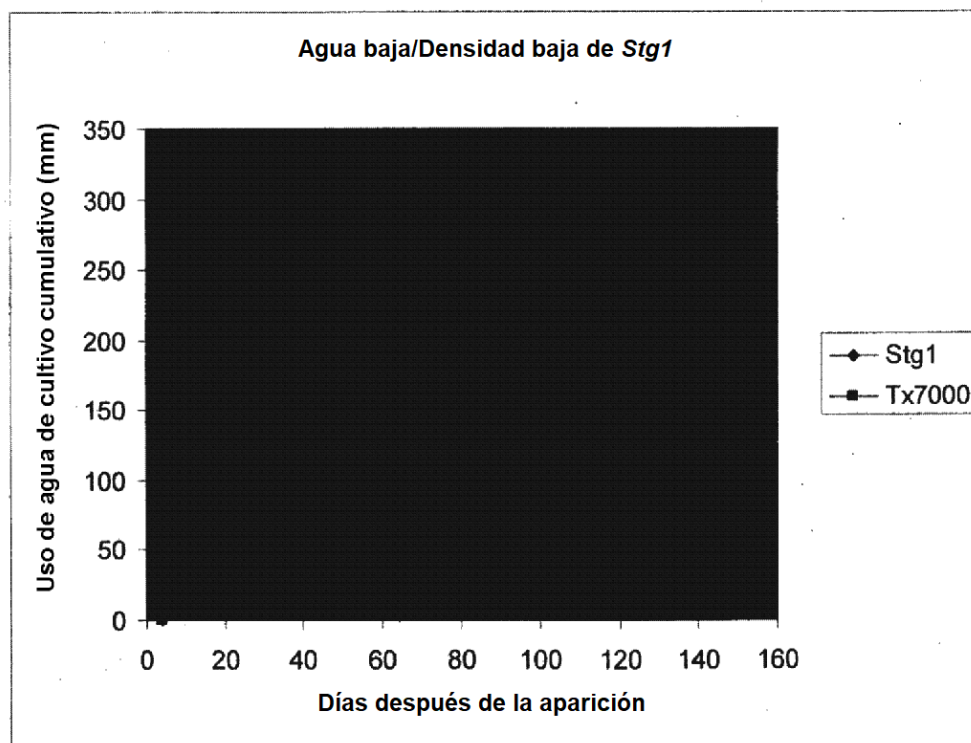


Figura 24

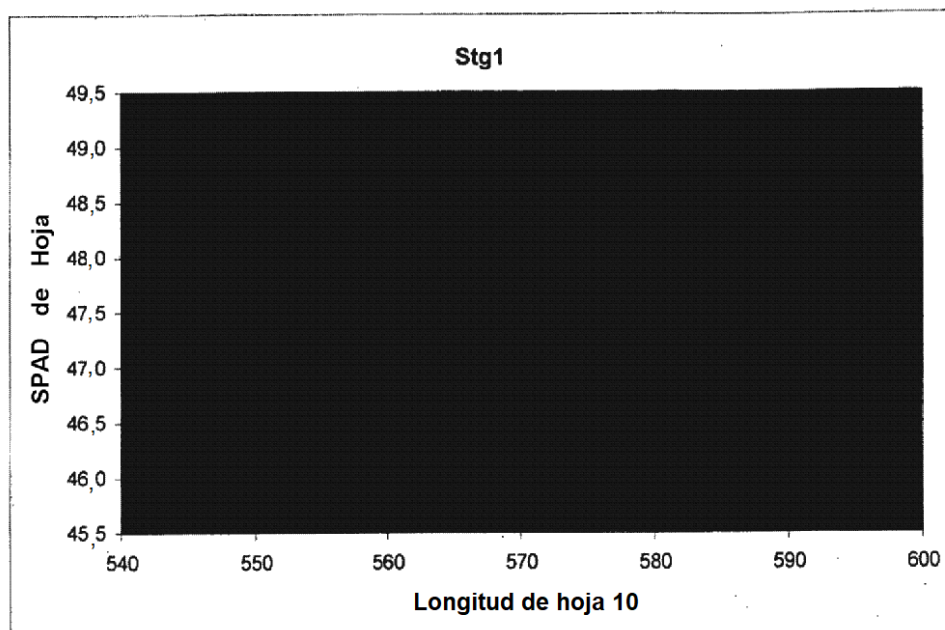


Figura 25

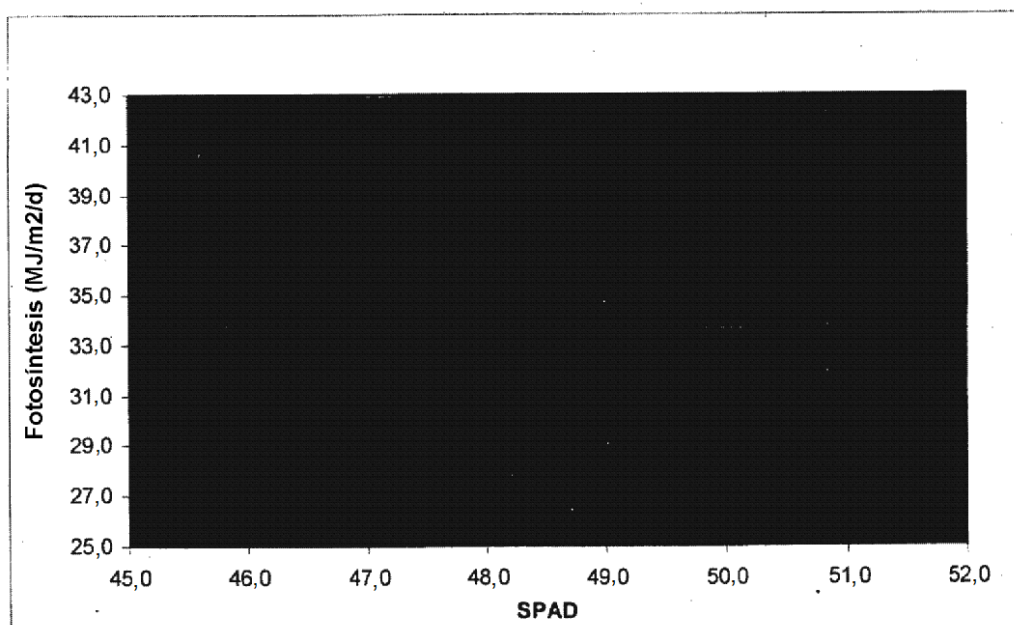


Figura 26

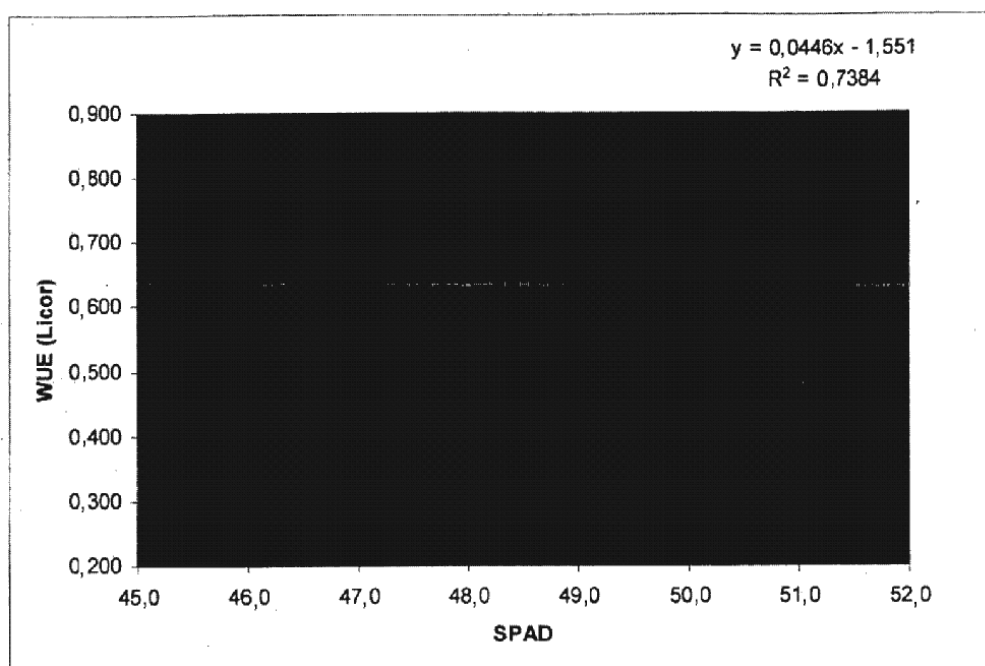


Figura 27

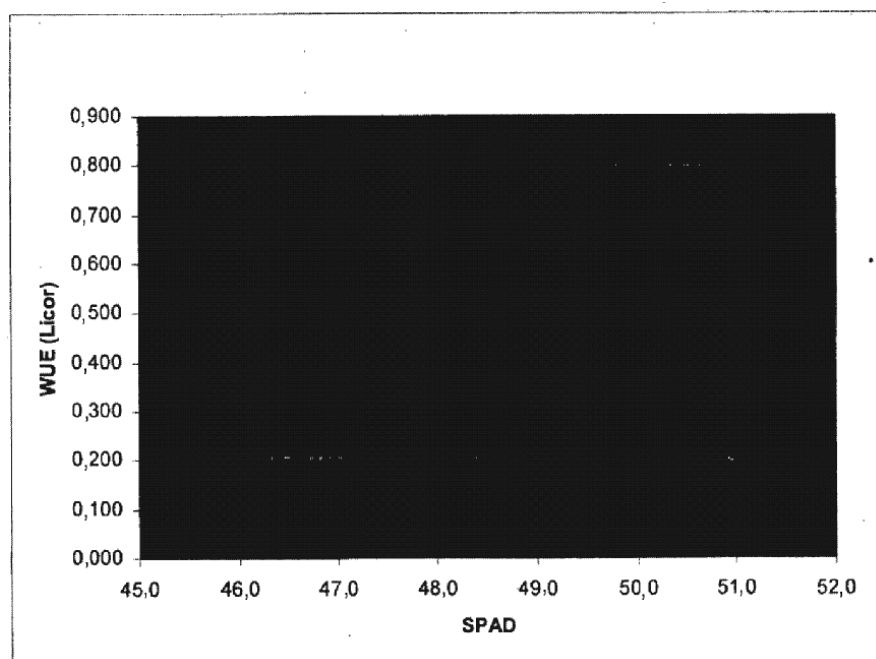


Figura 28

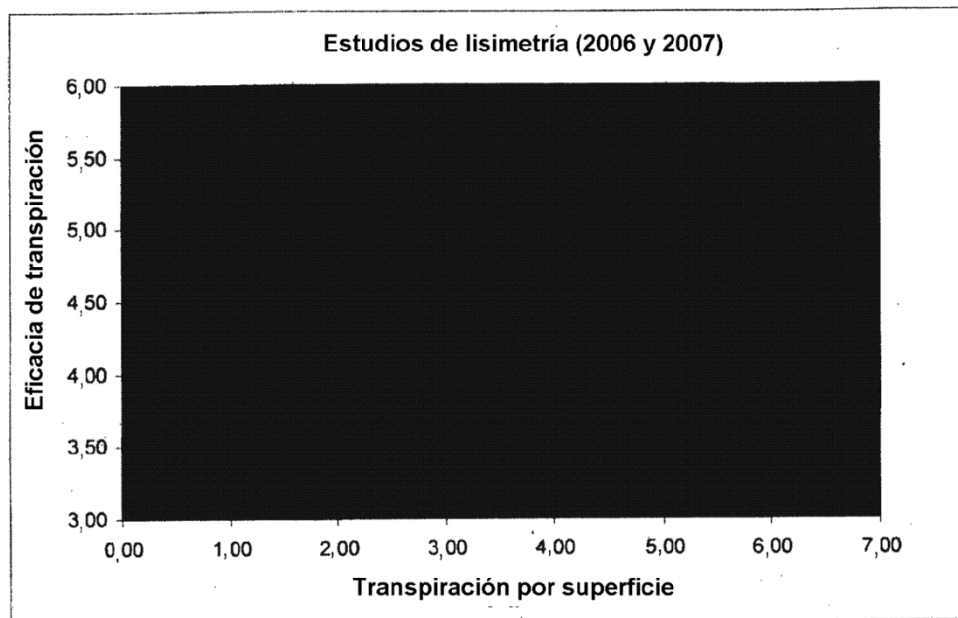


Figura 29

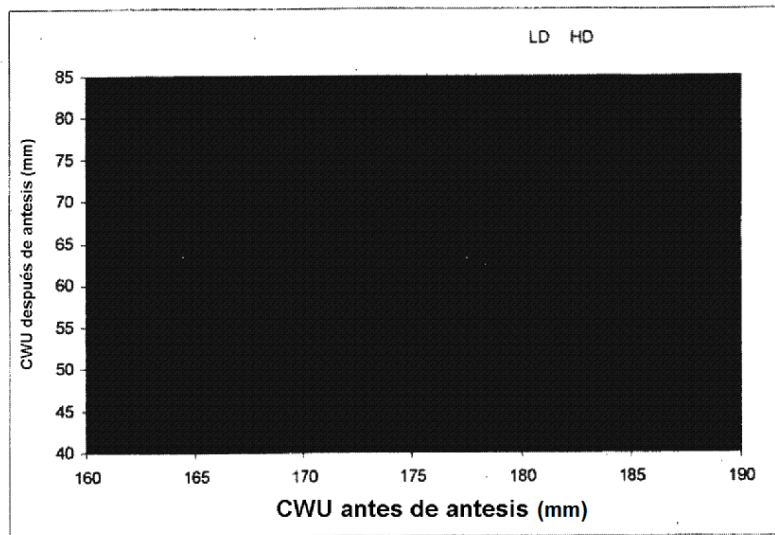
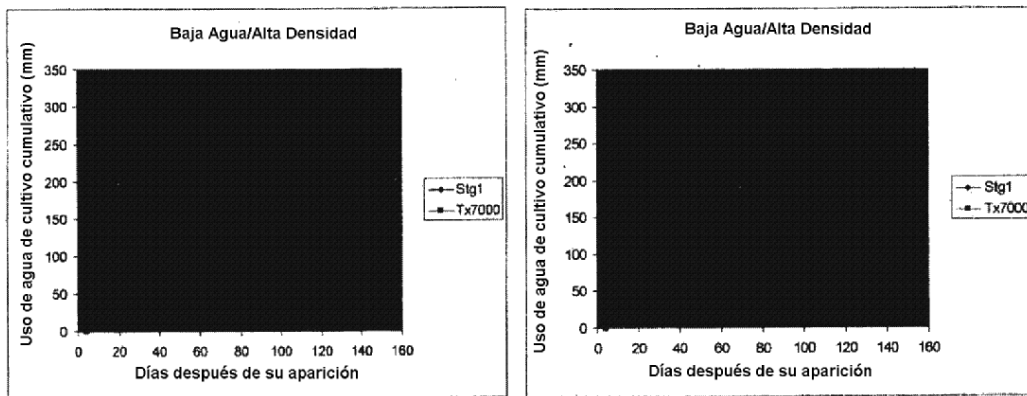


Figura 30



Disponibilidad de agua aumentada
en antesis

A

Accesibilidad de agua aumentada durante
formación de grano

B

Figura 31

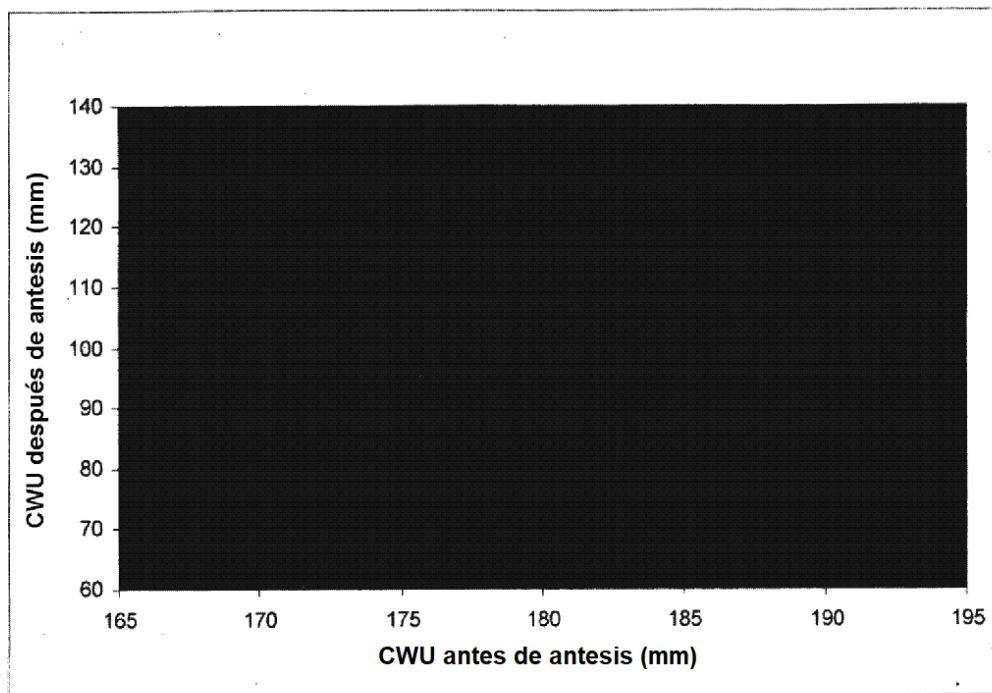


Figura 32

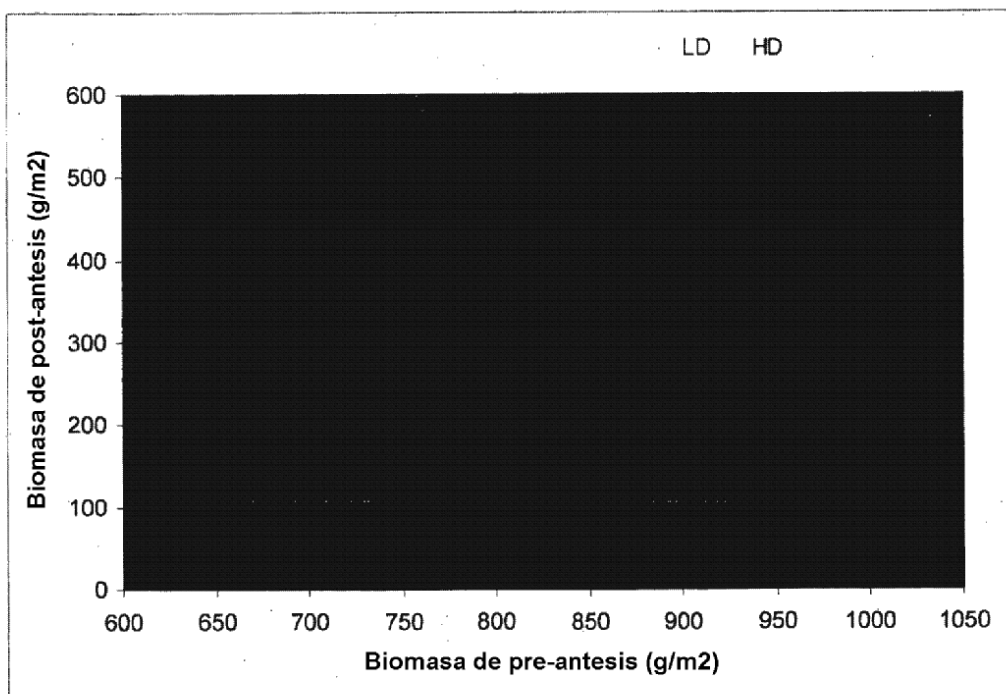


Figura 33

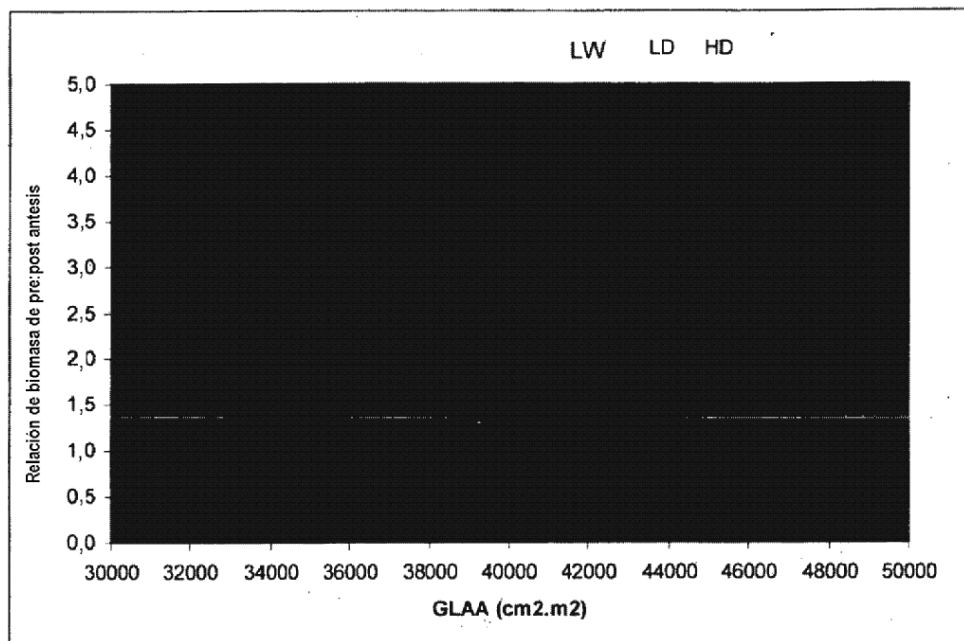


Figura 34

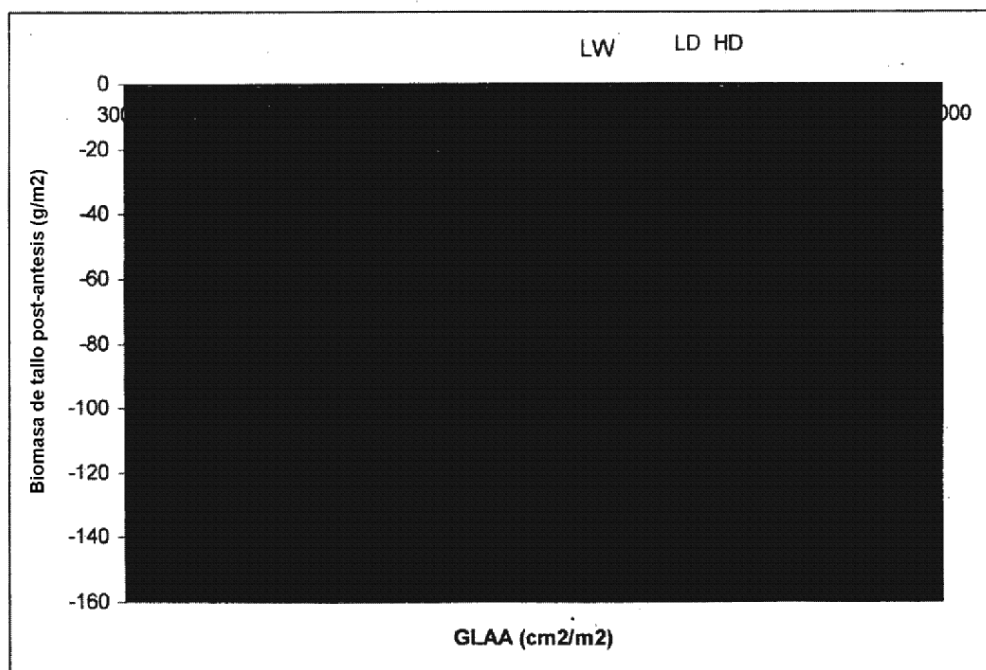


Figura 35

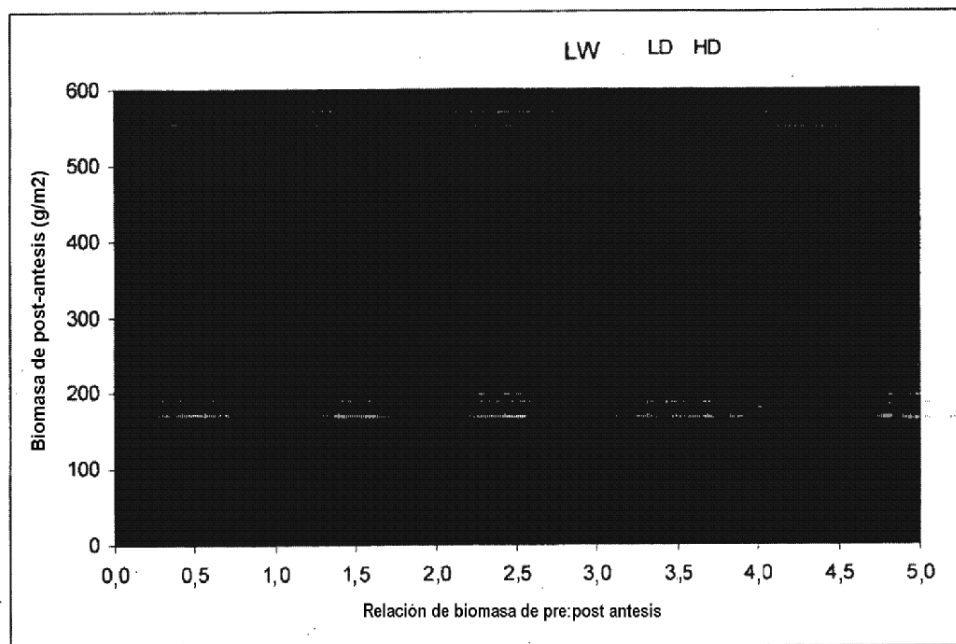


Figura 36

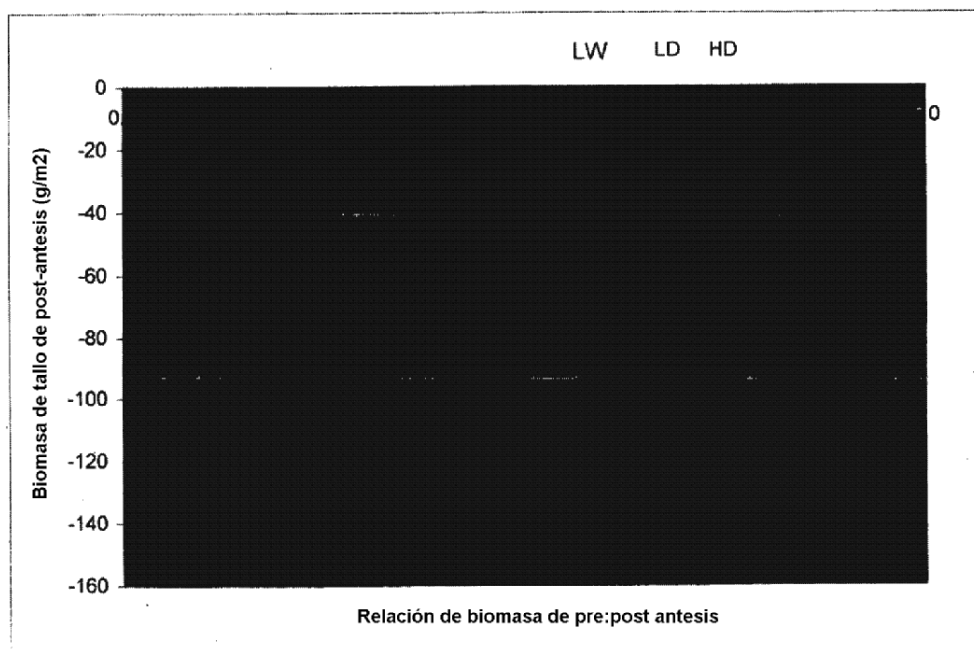


Figura 37

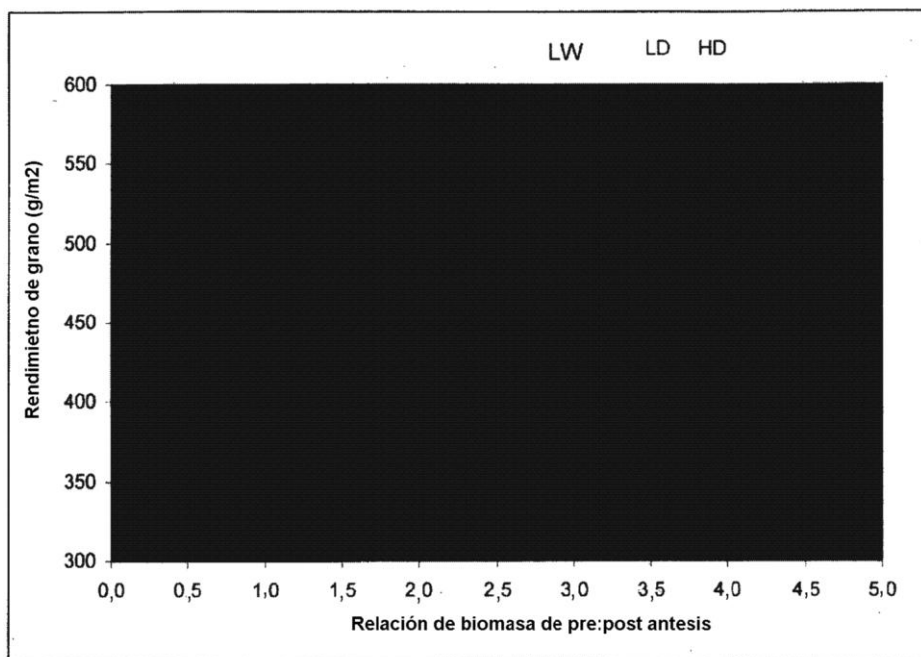


Figura 38

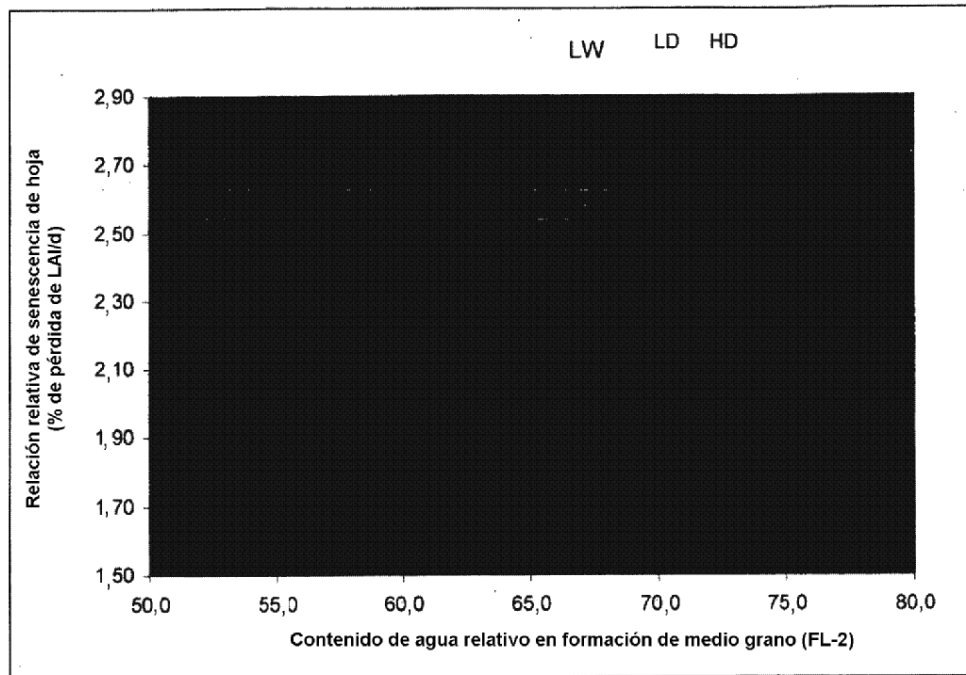


Figura 39

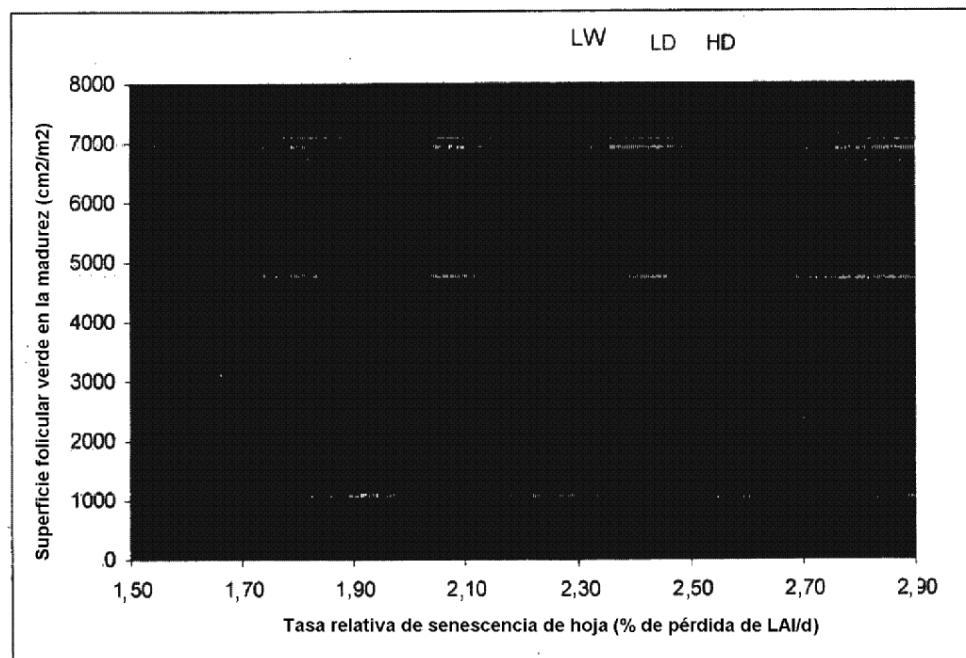


Figura 40

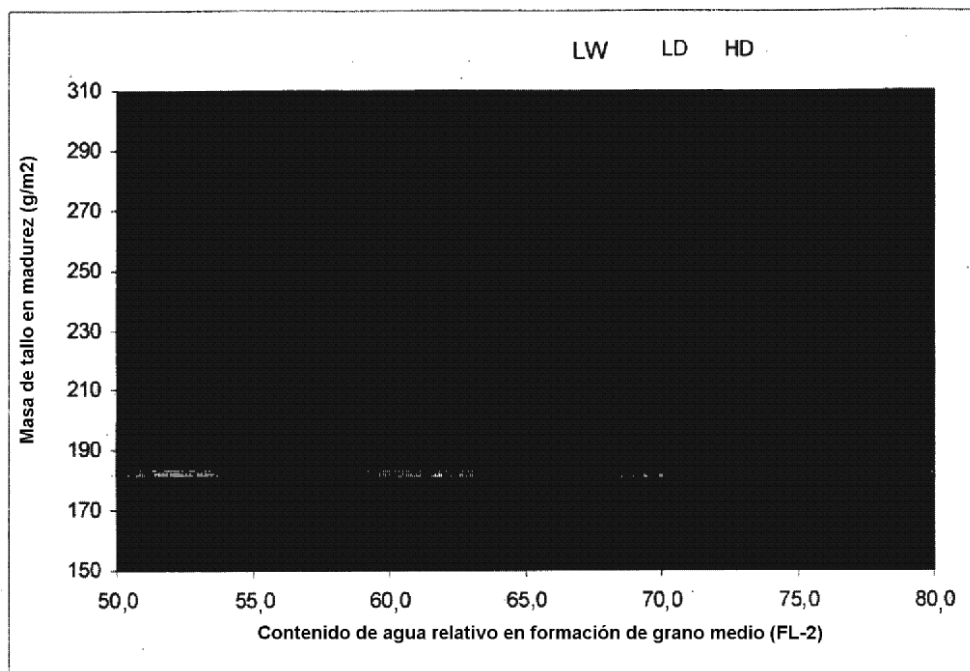


Figura 41

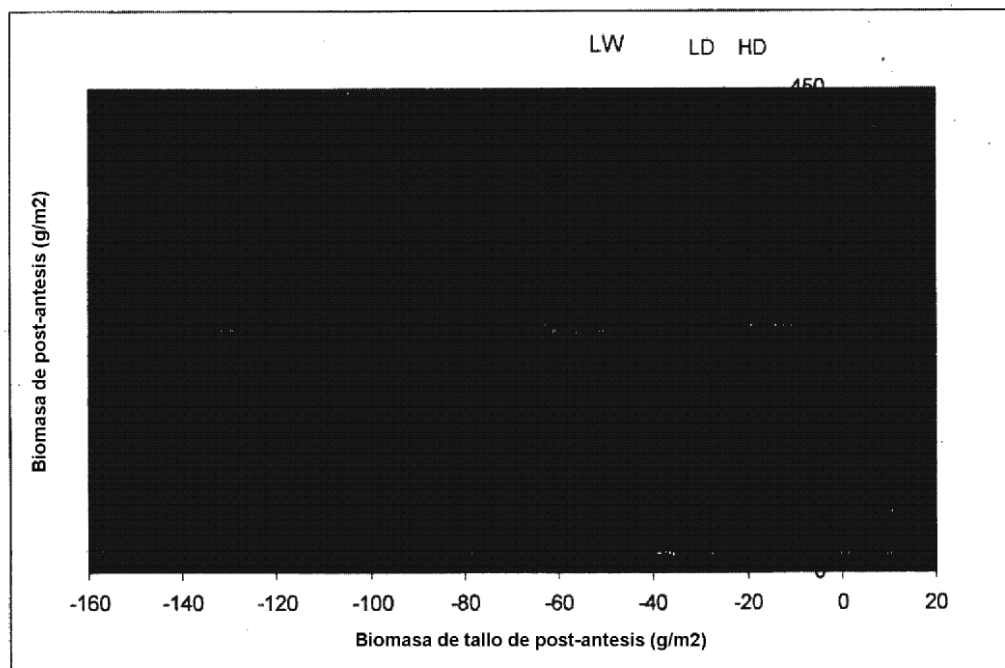


Figura 42

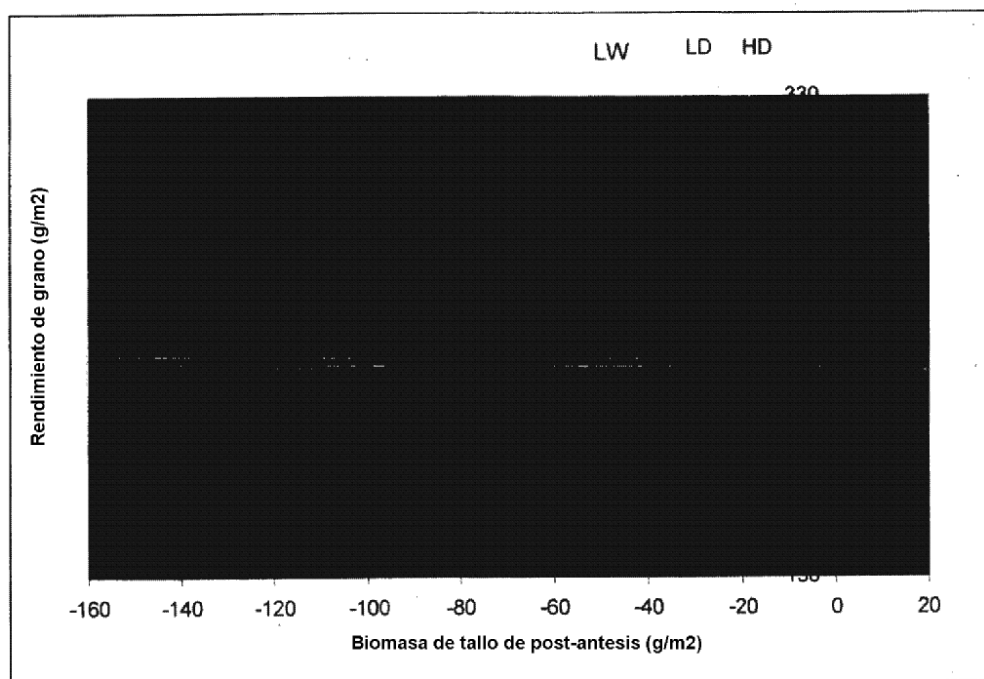


Figura 43

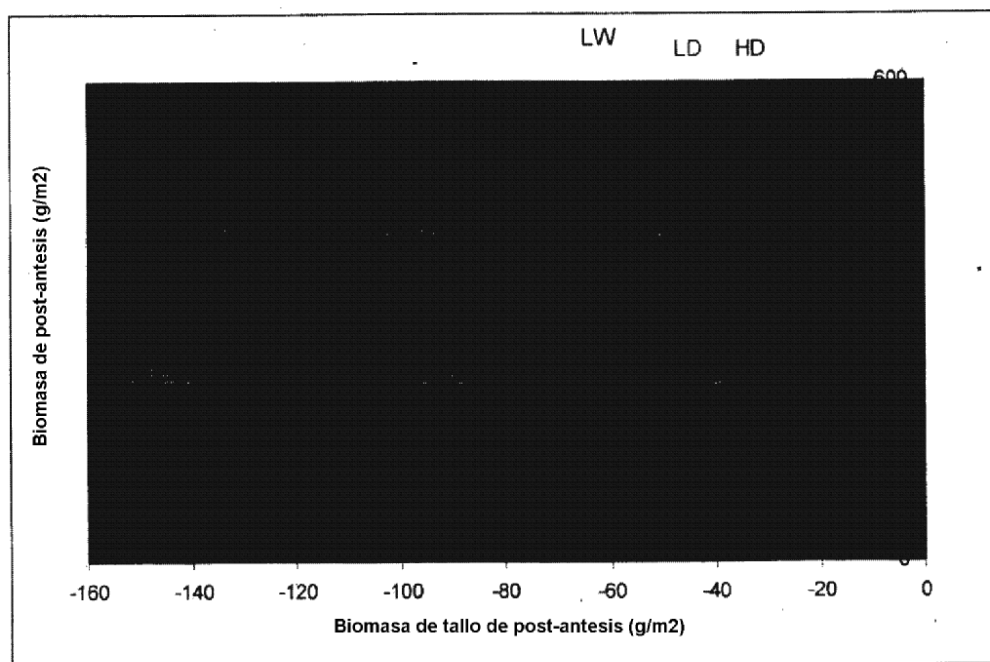


Figura 44

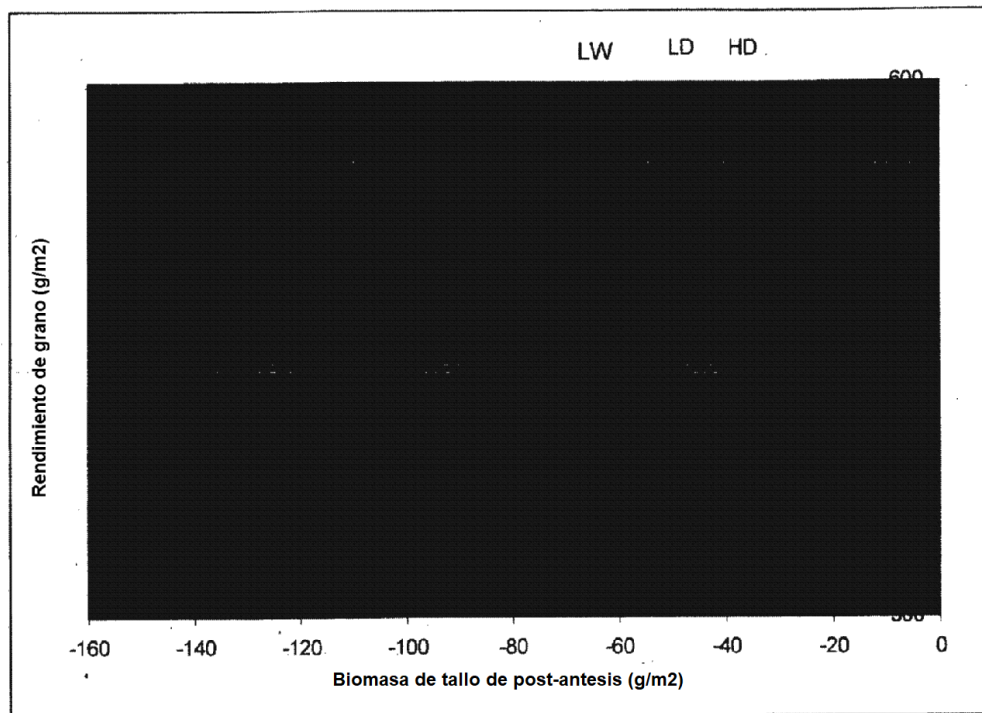


Figura 45

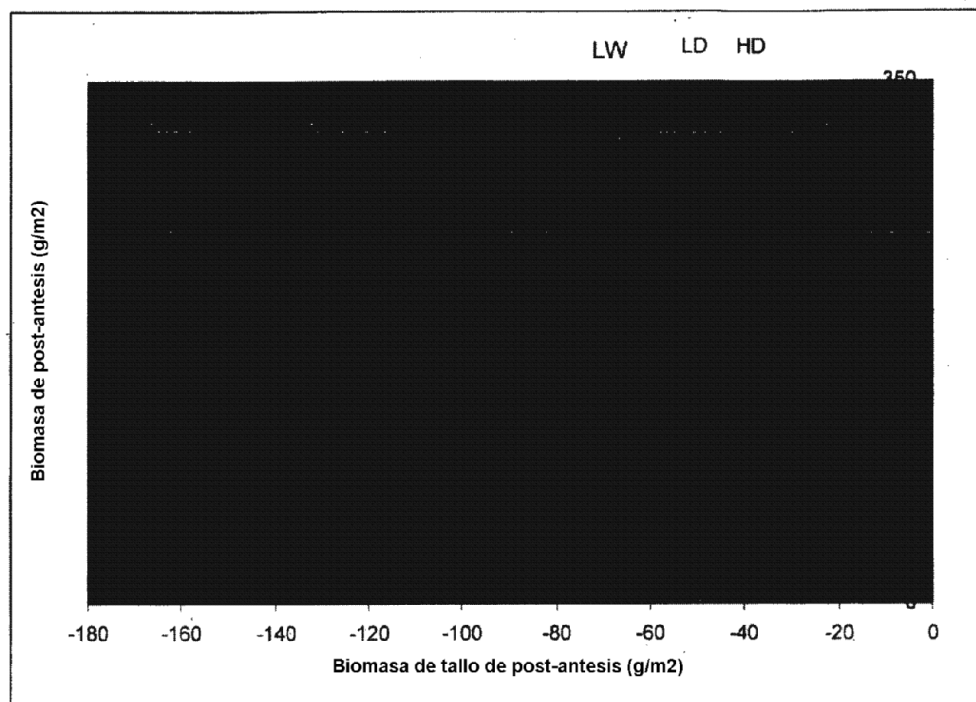


Figura 46

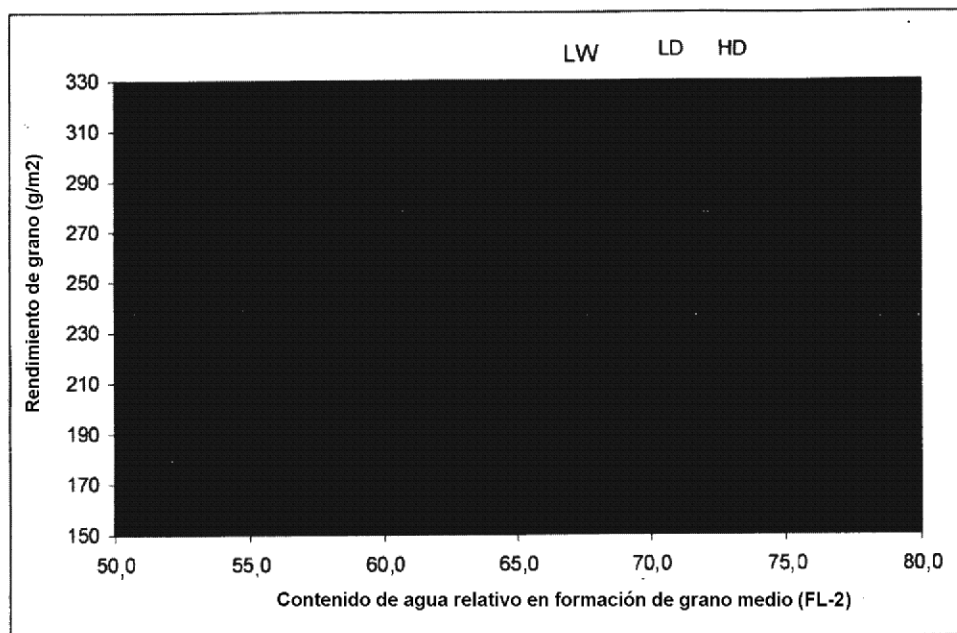


Figura 47

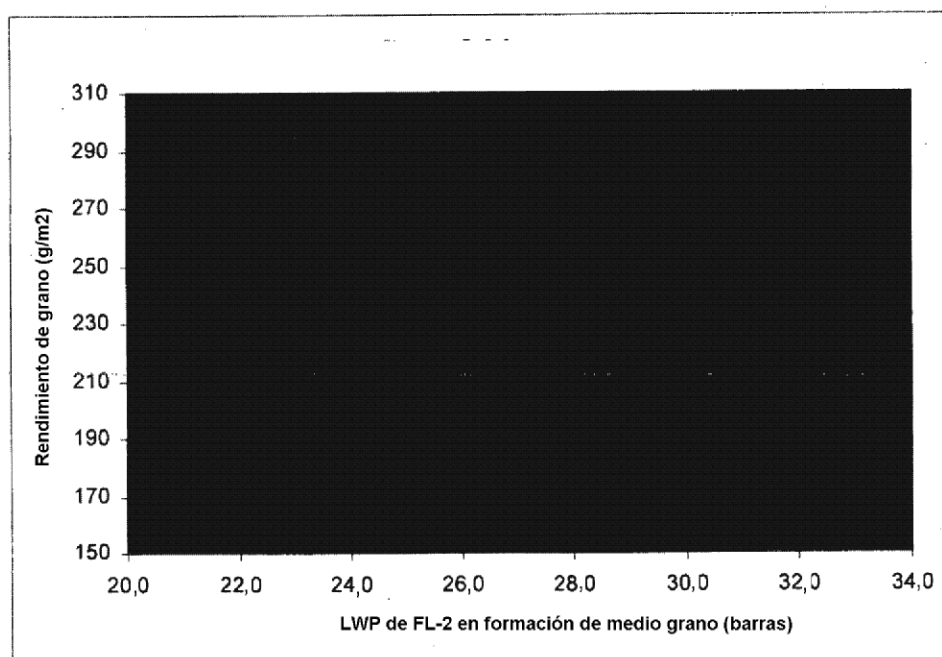


Figura 48

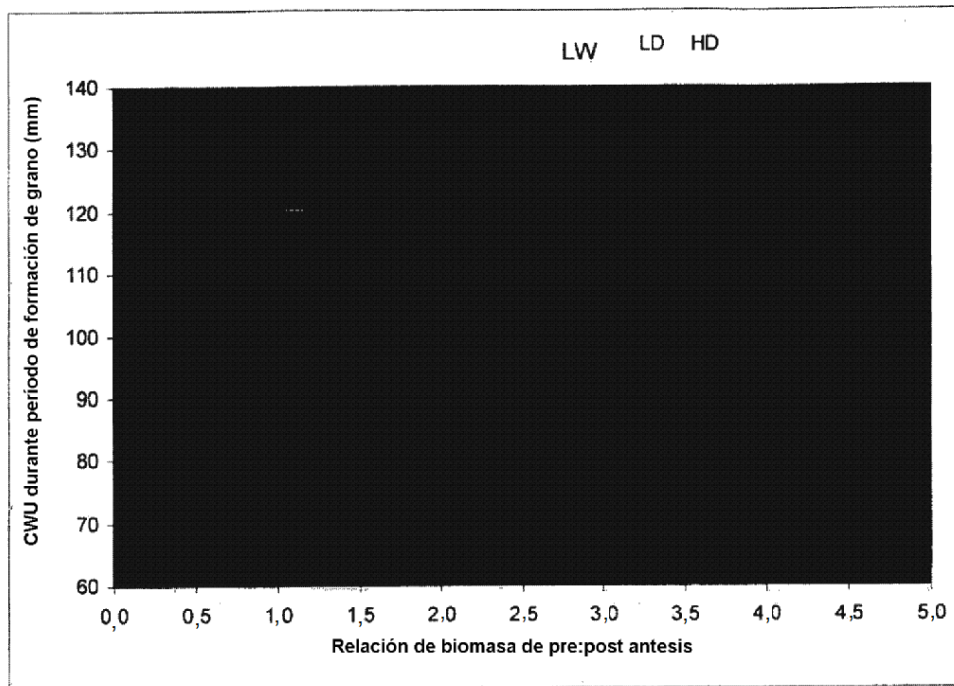


Figura 49

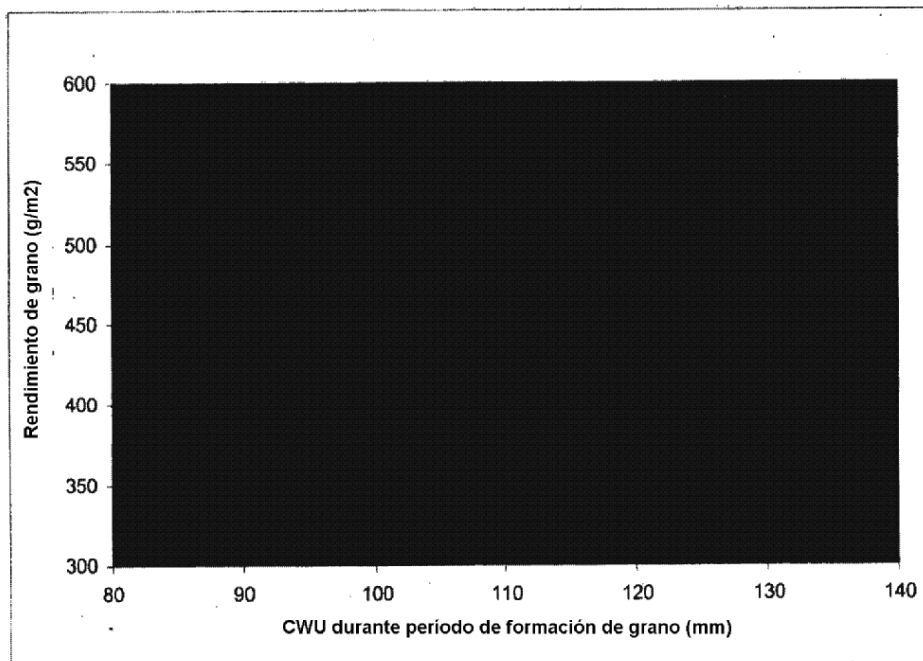


Figura 50

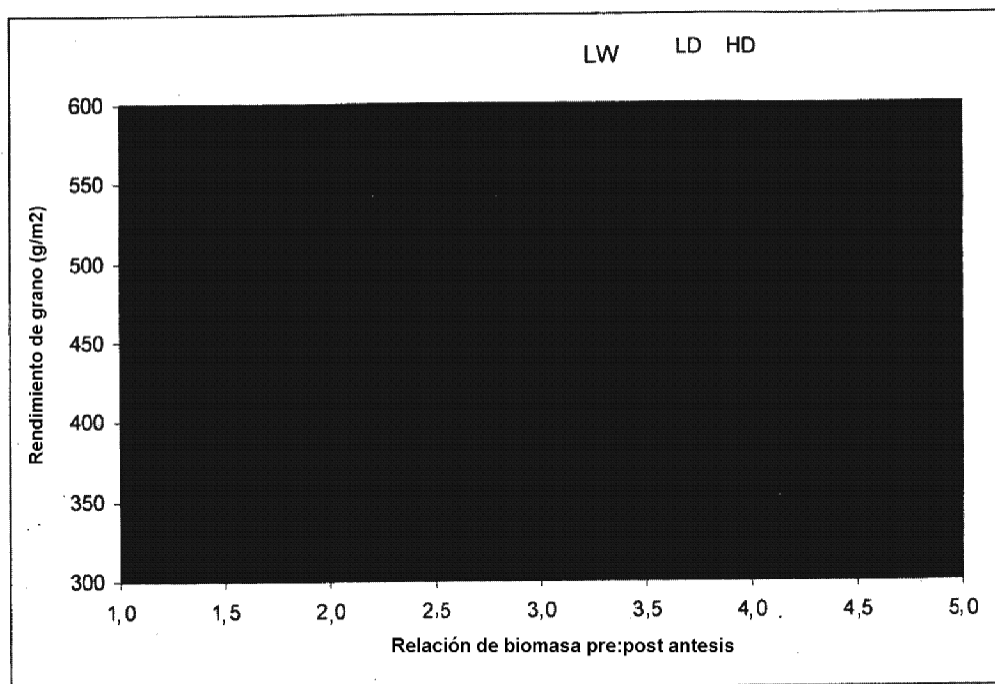


Figura 51

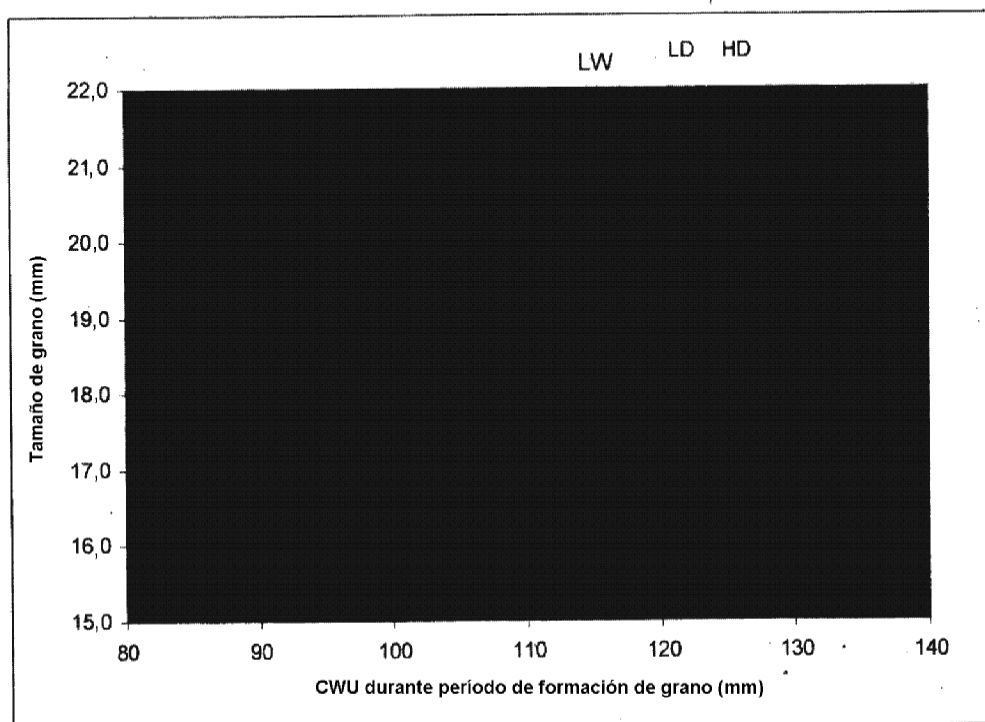


Figura 52

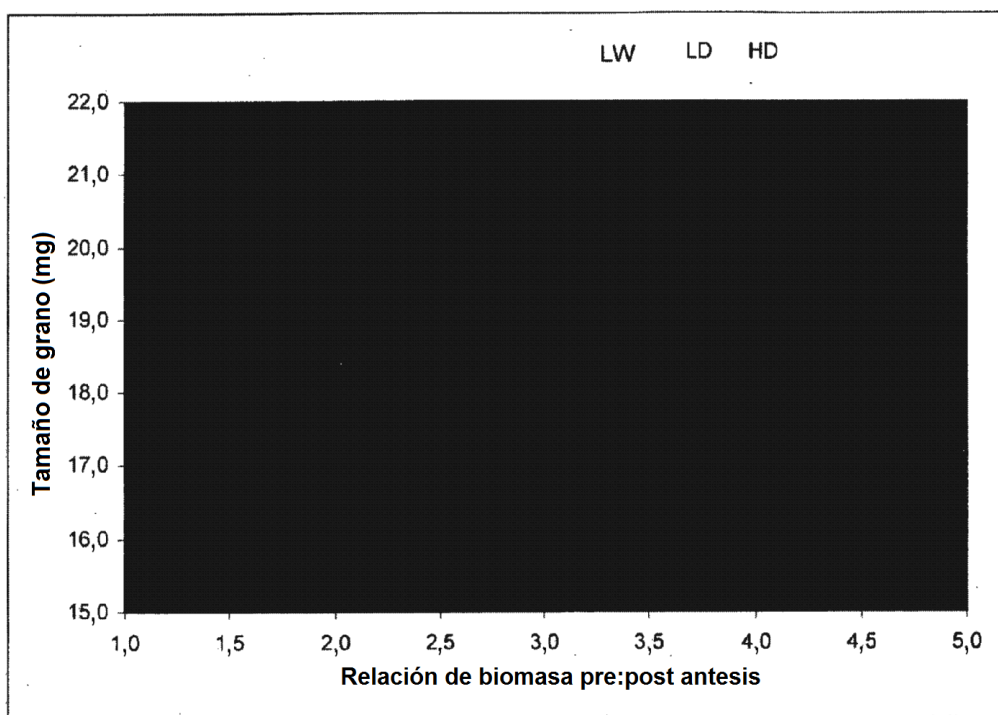


Figura 53

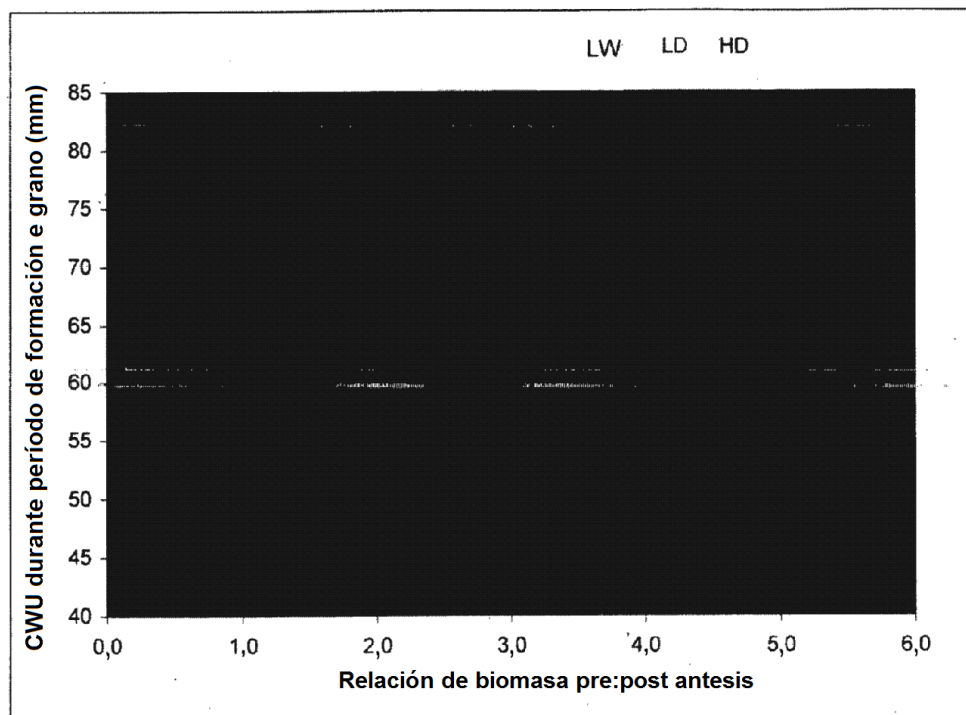


Figura 54

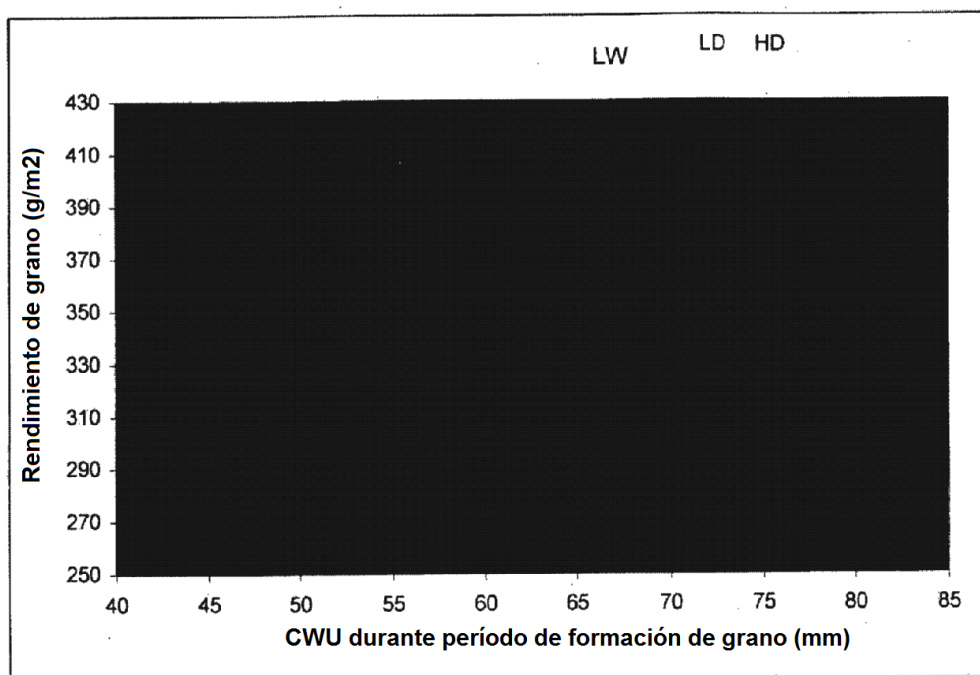


Figura 55

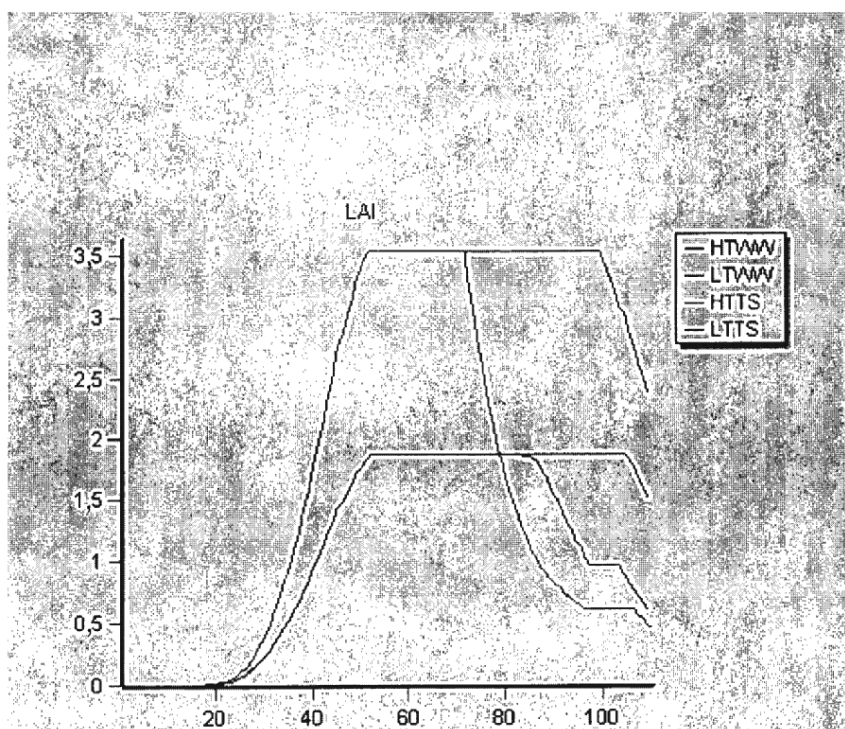


Figura 56A

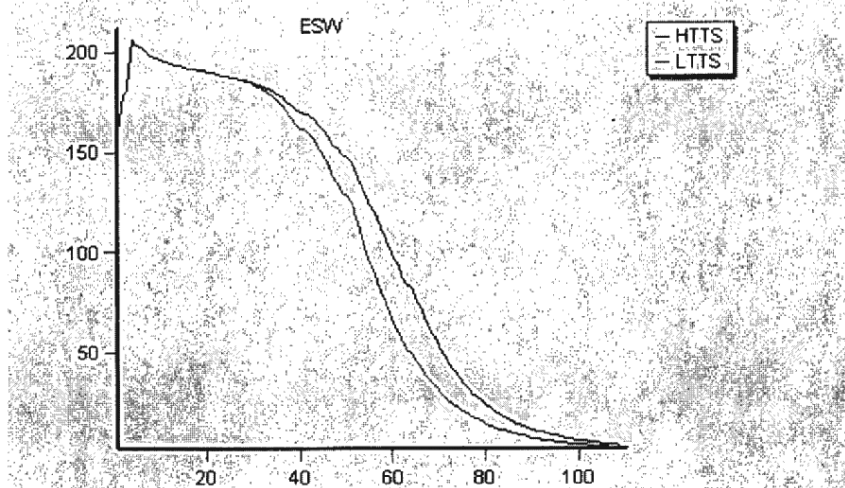


Figura 56B

