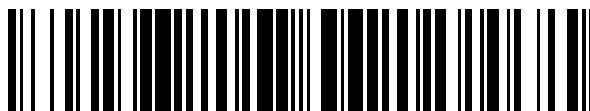


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 932**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2011** **E 11776578 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016** **EP 2627667**

54 Título: **Obtención de plantas que tienen una tolerancia mejorada frente a una carencia de agua**

30 Prioridad:

15.10.2010 FR 1004059

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

19.07.2016

73 Titular/es:

**GENOPLANTE-VALOR (100.0%)
28 rue du Docteur Finlay
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**ROUSTER, JACQUES;
SALLAUD, CHRISTOPHE;
COURSOL, SYLVIE;
ZIVY, MICHEL;
VIRLOUVET, LAETITIA y
WELCKER, CLAUDE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 577 932 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

Obtención de plantas que tienen una tolerancia mejorada frente a una carencia de agua

La presente invención se refiere a un método para obtener plantas tolerantes frente a una carencia de agua.

5 La "carencia de agua" se refiere a una situación en la que la cantidad de agua que transpira la planta es mayor que la cantidad de agua absorbida por dicha planta.

La carencia de agua es uno de los estreses abióticos más importante para las plantas. Puede afectar a su crecimiento y reproducción, lo que conduce a una pérdida de rendimiento.

Por lo tanto, es importante identificar los genes que tienen la capacidad de mejorar la tolerancia de las plantas frente a una carencia de agua.

10 La familia de factores de transcripción R2R3-MYB ("*oncogén myeloblastosis*") cuenta con 126 miembros en *Arabidopsis thaliana* (Stracke et al., Curr. Opin. Plant Biol., 4:447-546, 2001), 84 miembros en el arroz (Jiang et al., Genome Bio., 5:R46, 2004) y 192 miembros en el álamo (Wilkins et al., Plant Physiol., 149:981-993, 2009). Esta familia se caracteriza por la presencia de motivos R2 (con la secuencia X₅WX₁₉WX₁₉WX₇, SEQ ID NO: 2) y R3 (con la secuencia X₂₄WX₁₈WX₇, SEQ ID NO: 3) que se unen al ADN, que regulan numerosos procesos fisiológicos, incluyendo el control del ciclo celular (STRACKE et al., 2001, citado anteriormente, Fornale et al., Plant Mol. Biol., 62:809-823, 2006). La alineación de secuencias de péptidos obtenidas a partir de las secuencias de nucleótidos que codifican estos factores de transcripción ha permitido clasificarlos en diferentes subfamilias (Stracke et al., 2001, citado anteriormente). Los miembros de la misma subfamilia - que tienen sitios de unión similares en el ADN y de interacción proteína-proteína - comparten parcialmente funciones biológicas comunes (Jin y Martin, Plant Mol. Biol., 41:577-585, 1999).

20 Los factores de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4 (Fornale et al., 2006, citado anteriormente) por lo general están implicados en el metabolismo de los fenilpropanoides y la biosíntesis de lignina (Jin et al., EMBO J., 19:6150-6561, 2000). Estos factores de transcripción tienen, además de los dos motivos peptídicos R2 y R3, el motivo peptídico de secuencia LNL[D/E]L; SEQ ID NO: 4) en la parte C-terminal de la proteína (Stracke et al., 2001, citado anteriormente).

25 Los factores de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4 son bien conocidos por el experto en la técnica. A título de ejemplo de factores de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4, se pueden citar los identificados por Fornale et al., 2006 y Wilkins et al., 2009 (mencionados anteriormente) y descritos en la Tabla I a continuación:

Especie	Nombre de la proteína	Número de orden en la bases de datos GenBank o UniProtKB	Referencia: (a): FORNALE et al., 2006 (b): WILKINS et al., 2009
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtMYB7	U26937	(a) y (b)
	AtMYB32	NM_119665	
	AtMYB4	AY519615	
	AtY49	CAA62033	
	AtMYB3	AF062859	
	AtMYB8	NP849749	
	AtMYB6	AL161515	
	AtCAB78069	CAB78069	
<i>Populus trichocarpa</i>	PtrMYB156		(b)
	PtrMYB221		
<i>Populus tremula x Populus tremuloides</i>	PttMYB	CAD98762	(a)
<i>Vitis vinifera</i>	Vv3g1569838 Vv4g15106462		(b)
<i>Zea mays</i>	ZmMYB38	P20025	(a) y (b)
	ZmMYB31	AM156906	
	ZmMYB42	AM156908	
	ZmMYB8	AM156905	

Especie	Nombre de la proteína	Número de orden en la bases de datos GenBank o UniProtKB	Referencia: (a): FORNALE <i>et al.</i> , 2006 (b): WILKINS <i>et al.</i> , 2009
<i>Solanum lycopersicum</i>	S1MYB27 (o LeMYB27)	CAA64614	(a) y (b)
<i>Eucalyptus gunii</i>	EgMYB1	CAE09058	(a) y (b)
<i>Picea glauca</i>	PgMYB5 PgMYB10 PgMYB13 PtMYB14		(b)
<i>Tradescantia fluminensis</i>	TfMYB2 TfMYB6 TfMYB1	AAS19476 AAS19480 AAS19475	(a)
<i>Oryza sativa</i>	OsNP91576 OsT02984 OsAAV59423 OsPTYPE2 OsPTYPE1	NP_91576 T02984 AAV59423 XP_483665 AAL84628	(a)
<i>Hordeum vulgare</i>	HvMYB5 HvMYB1	CAA50221 CAA50224	(a) y (b)
<i>Triticum aestivum</i>	TaMYB1	AAT37167	(a)
<i>Dendrobium sp.</i>	DspMYB8 DspMYB10	AAO49417 AAO49419	(a)
<i>Gossypium hirsutum</i>	GhMYB9 GhMYB1	AAK19619 AAN28270	(a)
<i>Antirrhinum majus</i>	AmMYB308 AmMYB330	JQ0960 JQ0957	(a)

A pesar de que pertenecen a la misma subfamilia, los factores de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4 tienen funciones diferentes. En efecto:

- 5 - las plantas de tabaco transformadas con la secuencia que codifica los genes de *Antirrhinum majus* AmMYB308 o AmMYB330 tienen un fenotipo de reducción del tamaño y de longevidad de las hojas expuestas a la luz, en donde la gravedad se correlaciona con el nivel de expresión del factor de transcripción (Tamagnone *et al.*, Plant Cell, 10:135-154, 1998). Sin embargo, en estas plantas de tabaco transformadas, la sobreexpresión de AmMYB308 conduce a una disminución de la expresión de los genes C4H (cinamato 4-hidrolasa), 4CL (4-cumarato-CoA ligasa), CAD
- 10 (cinamilo alcohol deshidrogenasa) y CHS (chalcona sintasa), pero no tiene ningún efecto sobre la expresión del gen PAL (fenilalanina amonio liasa), mientras que la sobreexpresión de AmMYB330 también conduce a una disminución de la expresión del gen 4CL (4-cumarato-CoA ligasa), pero no tiene ningún efecto sobre la expresión del gen CHS (a diferencia de las plantas que sobreexpresan AmMYB308).
- 15 - la sobreexpresión de la secuencia que codifica el gen AtMYB4 en el tabaco conduce a una disminución de la expresión de los genes C4H, 4CL y CAD. La sobreexpresión de la secuencia que codifica este gen AtMYB4 en *Arabidopsis thaliana* conduce a una disminución de la expresión del gen C4H, 4CL1 (4-cumarato-CoA ligasa 1) y 4CL3 (4-cumarato-CoA ligasa 3) a una inducción de la expresión del gen CCoAOMT (cafeoil-CoA o-metiltransferasa), y no tiene ningún efecto sobre la expresión de los genes PAL2 (fenilalanina amoniaco-liasa 2), F5H (ferulato-5-hidroxilasa), COMT (ácido cafeico o-metiltransferasa) y CAD1 (cinamilo alcohol deshidrogenasa 1) (Jin *et al.*, 2000, citado anteriormente).
- 20 - la sobreexpresión de la secuencia que codifica el gen ZmMYB31 en *Arabidopsis thaliana* conduce a una disminución de la expresión de los genes C3H (4-cumarato 3-hidroxilasa), 4CL1, F5H y COMT, a una inducción de la expresión de los genes CHI (chalcona isomerasa), F3H (flavona 3-hidroxilasa), F3'H (flavonoide 3'-hidroxilasa) y DFR (dihidroflavonol reductasa) y no tiene ningún efecto sobre la expresión de los genes PAL1 (fenilalanina amoniaco-liasa 1), PAL2, C4H, HCT (hidroxicinamoi-CoA shikimato / quinato hidroxicinamoi transferasa), 4CL2 (4-

cumarato-CoA ligasa 2 CCoAOMT, CCR (*cinamoil-CoA reductasa*), CAD, *actina*, CHS, FLS (*flavonol sintasa*) y UGT73B2 (*UDP azúcar glicosiltransferasa*). Esta sobreexpresión también conduce a un aumento de la subunidad H (p-hidroxifenilo) de la lignina en estas plantas transgénicas (Fornalé et al., *The Plant Journal*, 64, 633-644, 2010).

5 - la sobreexpresión de la secuencia que codifica el gen *ZmMYB42* (en donde la proteína codificada presenta un 62,1% de identidad y 70,0% de similitud con la secuencia peptídica de *ZmMYB31*) en *Arabidopsis thaliana* conduce a una disminución de la expresión de los genes *PAL1*, *C4H*, *F5H*, *4CL1*, *HCT*, *COMT*, *ALDH* (*aldehído deshidrogenasa*), *CAD*, *F3H* y *F3'H*, mientras que induce la expresión de los genes *CHS*, y no tiene efecto sobre la expresión de los genes *CHI*, *FLS*, *UGTs* (*UDP azúcar glicosiltransferasa*), *SGT* (*sinapato sinapoil transferasa*) y *SMT* (*sinapoil-glucosa malato sinapoil transferasa*). Esta sobreexpresión también conduce a una disminución de las subunidades S (siringilo) de la línea y a un aumento de las subunidades H (p-hidroxifenilo) y G (guayacilo) de la lignina en estas plantas transgénicas (Sonbol et al., *Plant Mol. Biol.*, 70: 283-96, 2009).

15 El documento de solicitud internacional WO 01/32002 describe un método para aumentar la tolerancia de una planta frente a un estrés abiótico (por ejemplo, sequía, temperatura, salinidad), que comprende la modificación del genoma de dicha planta para que se sobreexpresen en dicha planta un factor de transcripción MYB seleccionado entre los factores de transcripción MYB60 (que pertenecen a la subfamilia 1, según la definición de subfamilia dada por Stracke et al., 2001, citado anteriormente), MYB74 (que pertenece a la subfamilia 11), MYB75 (que pertenece a la subfamilia 6) y MYB90 (que pertenece también a la subfamilia 6) de *A. thaliana*.

20 El documento de solicitud internacional WO 2009/056566 describe un método para incrementar, en una planta, los caracteres ligados al rendimiento (tales como la biomasa) mediante la modulación de la expresión en dicha planta de un factor de transcripción MYB7. Este aumento de los caracteres relacionados con el rendimiento se puede realizar en condiciones de estrés biótico o abiótico. Diversas secuencias de polipéptidos del maíz, que se describen como factores de transcripción MYB7, se dan a conocer en ese documento. Estos factores de transcripción "MYB7" incluyen, en el maíz, el factor de transcripción *ZmMYB31* (identificado como SEQ ID NO: 83 en ese documento) así como varias secuencias polipeptídicas que tienen al menos una identidad del 47% con la secuencia polipeptídica de *ZmMYB31*. Sin embargo, ese documento no muestra que una sobreexpresión de un factor de transcripción de maíz "MYB7" en una planta, aumenta la tolerancia de una planta frente a una carencia hídrica. Además, en la medida en que hay diferencias significativas de la función entre los diferentes factores de transcripción R2R3-MYB de una misma subfamilia, es poco probable que la sobreexpresión, en una planta, de cada uno de los factores de transcripción "MYB7" descritos en ese documento, permita incrementar los caracteres ligados al rendimiento, independientemente de las condiciones de estrés biótico o abiótico, especialmente en condiciones de carencia de agua.

25 Durante sus trabajos, los inventores han demostrado que las plantas transgénicas de maíz (*Zea mays*) que sobreexpresan el factor de transcripción *ZmMYB31* mostraban una mayor tolerancia frente a la carencia de agua, en comparación con las plantas de maíz silvestre (no transgénicas). El factor de transcripción *ZmMYB31* del maíz (disponible en la base de datos GenBank bajo el número de orden GI: 89143144; al cual también se hace referencia en el chip de "Oligonucleotide Array Project" del maíz [<http://www.maizearray.org>] bajo el número MZ00022562), pertenece a la subfamilia 4 de los factores de transcripción R2R3-MYB. También está representado por la secuencia SEQ ID NO: 1.

30 Por otra parte, los inventores también han investigado en el maíz (no transgénico), los genes candidatos asociados con una región del maíz localizada en el cromosoma 2 y que contiene un QTL (locus de caracteres cuantitativos) de sensibilidad del crecimiento de las hojas frente a la carencia de agua edáfica y un QTL de protandria en condiciones de sequía (Welcker et al., *J Exp Bot.*, 58, 339-349, 2007). A continuación, identificaron el gen que codifica el factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4 *ZmMYB31* que se colocaliza con la región contemplada y cuya abundancia relativa en los transcritos está regulada por la carencia de agua y varía entre dos subpoblaciones de líneas recombinantes de maíz que se diferencian genéticamente del resto del genoma en la región diana y heterogénea. De forma inesperada, no se ha podido identificar ningún otro gen que codifica un factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4, tal como los descritos en la tabla I anterior, por medio de este análisis (que combina el análisis del nivel de expresión de los genes entre dos subpoblaciones de líneas recombinantes de maíz que difieren genéticamente del resto del genoma en la región diana y heterogénea, y el cartografiado).

35 La presente invención propone, por tanto, el uso de la proteína *ZmMY31* para aumentar la resistencia de las plantas a la carencia hídrica.

40 La presente invención tiene por objeto un método para aumentar la tolerancia de una planta frente a la carencia de agua, caracterizado por que en dicha planta se sobreexpresa un factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4, que tiene al menos 95% de identidad, y por orden de preferencia creciente, al menos, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad, con la secuencia SEQ ID NO: 1.

45 A menos que se especifique lo contrario, la alineación entre dos secuencias de péptidos y el cálculo de los porcentajes de identidad se llevan a cabo a lo largo de toda la longitud de las secuencias peptídicas con ayuda del programa informático "needle" (Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48, 443-453, 1970), utilizando los parámetros por defecto: "Matriz" EBLOSUM62, "penalización por hueco": 10,0 y "penalización por extensión": 0,5.

Por factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4, se entiende un factor de transcripción R2R3-MYB tal como el que describen Stracke *et al.*, 2001 (mencionado anteriormente) que tiene los motivos conservados R2 (secuencia X₅WX₁₉WX₁₉WX₇, SEQ ID NO: 2) y R3 (secuencia X₂₄WX₁₈WX₇, SEQ ID NO: 3) que se unen a ADN, y el motivo conservado LNL[E/D]L (SEQ ID NO: 4).

5 De acuerdo con una realización ventajosa de la presente invención, dicho factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4 proviene de una planta monocotiledónea y su secuencia peptídica comprende los aminoácidos conservados situados en las posiciones 1-9, 11-13, 15-22, 24-25, 27, 30-41, 43-70, 74-75, 77-78, 80-83, 85-93, 95-111, 113-116, 120-127, 138, 140-141, 197, 202-212, 214, 234, 239, 242, 252, 254-255, 261-263, 267-271 y 274-275 de dicha secuencia SEQ ID NO: 1, cuando se alinea con dicha secuencia SEQ ID NO: 1. Estos aminoácidos conservados han sido determinados por los inventores comparando la secuencia peptídica de los parálogos y de los ortólogos en las plantas monocotiledóneas *H. vulgare*, *O. sativa* y *T. aestivum*, con la secuencia peptídica del factor de transcripción ZmMYB31.

10 Por factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4 obtenido a partir de una planta monocotiledónea, se entiende un factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4 expresado por una planta monocotiledónea o un factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4 sintético, obtenido mediante por mutación de un factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4, expresado por una planta monocotiledónea.

15 La presente invención se aplica a todas las plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas, y especialmente a las plantas sensibles a la carencia de agua. De manera no limitativa, se puede aplicar a las plantas hortícolas, a las plantas ornamentales, a los árboles frutales, a las plantas de grandes cultivos, tales como trigo, maíz o arroz, o a las plantas de cultivos industriales como el algodón, la colza o el girasol, preferentemente el maíz.

20 La sobreexpresión (aumento de la expresión) en una planta de un factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4, tal y como se ha definido anteriormente, se puede efectuar mediante la modificación del genoma de dicha planta. Esta modificación del genoma se puede efectuar en particular, mediante transformación genética de dicha planta con una o varias copias de un polinucleótido que codifica dicho factor de transcripción de la subfamilia 4, asociado con secuencias de regulación en *cis* de su expresión. La sobreexpresión de dicho factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4 también se puede obtener mediante la modificación de las secuencias de regulación en *cis* de la expresión de dicho factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia de 4, por ejemplo, mediante la sustitución de su promotor endógeno por un promotor más fuerte, lo que permite un mayor nivel de transcripción, o mediante la adición al promotor endógeno de secuencias que activan la transcripción, de tipo "amplificadoras", o la traducción.

25 Para la aplicación del método de acuerdo con la presente invención, se utiliza una casete de expresión recombinante, que comprende un polinucleótido que codifica un factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4, tal y como se ha definido anteriormente, sometido al control transcripcional de un promotor adecuado.

Dicho promotor puede ser un promotor heterólogo. En ese caso, se puede utilizar, por ejemplo:

35 - promotores constitutivos, tales como el promotor de glutenina de alto peso molecular, específico del endospermo (Verdaguer *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 31:1129-1139, 1996), el promotor de ARN 35S (Odell *et al.*, *Nature*, 313:810-812, 1985) o 19S (Kay *et al.*, *Science*, 236:1299-1302, 1987) de CaMV, el promotor de la actina 1 del arroz (McElroy *et al.*, *Plant. Cell* 2: 163-171, 1990), el promotor de la ubiquitina 3 del arroz o del maíz (Sivamani y Qu, *Plant Mol. Biol.*, 60:225-239, 2006),

40 - promotores específicos del floema tales como el promotor del virus del enanismo del trigo (Dinant *et al.*, *Physiologia plantarum* 121:108-116, 2004; documento de solicitud PCT WO 03/060135) o el promotor de *AtPP2-A1* (Dinant *et al.*, *Plant Physiol.*, 131:114-128, 2003),

- promotores específicos de las hojas, tales como el promotor de la subunidad pequeña de Rubisco, el promotor de la fosfoenolpiruvato carboxilasa,

45 - promotores específicos de las raíces, tales como el promotor RCc3 del arroz (documento de solicitud internacional WO 2009/016104), el promotor antiquitina del arroz (documento de solicitud internacional WO 2007/076115), o

- promotores inducibles localmente mediante estrés (sequía, salinidad), tales como el promotor *rd29 de Arabidopsis* (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, *Mol. Gen. Genet.*, 236: 331-340, 1993),

preferentemente el promotor de la glutenina de alto peso molecular específico del endospermo.

50 También se puede utilizar el promotor de un factor de transcripción R2R3-MYB de una subfamilia distinta a la subfamilia 4.

Para la aplicación del método de acuerdo con la presente invención, también se pueden utilizar vectores recombinantes, dando como resultado la inserción de un casete de expresión tal y como se ha descrito anteriormente en un vector hospedador.

Los casetes de expresión y los vectores recombinantes, tales como los que se han descrito anteriormente, por

supuesto pueden comprender además otras secuencias, empleadas normalmente en este tipo de construcciones. La elección de esas otras secuencias se llevará a cabo de manera convencional, a través de una persona experta en la técnica, en particular, de acuerdo con criterios tales como las células hospedadoras seleccionadas, los protocolos de transformación propuestos, etc.

5 Se hará mención, a título de ejemplos no limitantes, a los terminadores de la transcripción, las secuencias líderes y los sitios de poliadenilación. Estas secuencias pueden ser las que están asociadas naturalmente con el gen que codifica el factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4, tal como se ha definido anteriormente, o bien pueden ser secuencias heterólogas. Estas secuencias no tienen efecto sobre las propiedades específicas del promotor o del gen al que están asociadas, pero pueden mejorar globalmente de forma cualitativa o cuantitativa la transcripción, y en su caso, la traducción. Ejemplos de secuencias de este tipo empleadas frecuentemente en las plantas, se pueden citar entre las más comunes, el terminador del ARN 35S de CaMV y el terminador del gen de la nopalina sintasa. También dentro del objetivo de aumentar el nivel de expresión, se pueden utilizar secuencias amplificadoras (secuencias "potenciadoras" de la transcripción y la traducción).

15 Entre las otras secuencias empleadas comúnmente en la construcción de casetes de expresión y vectores recombinantes, también se citan las secuencias que permiten la supervisión de la transformación, y la identificación y/o selección de células u organismos transformados. Se trata generalmente de genes informadores, que proporcionan a las células o a los organismos transformados un fenotipo fácilmente reconocible, o bien genes marcadores de la selección: solo las células o los organismos que expresan un gen marcador de selección específico son viables en las condiciones dadas (condiciones selectivas). Los genes informadores utilizados con frecuencia son, por ejemplo, el de la beta-glucuronidasa (GUS), el de la luciferasa o el de la "proteína fluorescente verde" (GFP). Los genes marcadores de la selección son generalmente genes de resistencia a un antibiótico, o también, en el caso de plantas o células vegetales, a un herbicida. Existe una amplia variedad de genes marcadores de la selección entre los cuales el experto en la técnica puede hacer su elección en función de los criterios que habrá determinado el mismo.

25 Para la realización del método de acuerdo con la presente invención, también se pueden utilizar células hospedadoras transformadas con un polinucleótido que codifica un factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4, tal y como se ha definido anteriormente, lo que incluye en particular las células hospedadoras transformadas con un casete de expresión o un vector recombinantes, tales como los que se han descrito anteriormente.

30 Por célula u organismo transformado con un polinucleótido, se entiende cualquier célula u organismo cuyo contenido genético se ha modificado mediante la transferencia de dicho polinucleótido a dicha célula u organismo, independientemente del método de transferencia que se haya utilizado, y que la información genética proporcionada por dicho polinucleótido se integra en el ADN cromosómico o permanece extracromosómica.

35 Las células hospedadoras pueden ser células procariotas o eucariotas. En el caso de células procariotas, se puede tratar especialmente de agrobacterias tales como *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizobium*. En el caso de células eucariotas, se puede tratar especialmente de células vegetales procedentes de plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas.

Las plantas transgénicas se pueden obtener mediante transformación genética con al menos un polinucleótido, un casete de expresión o un vector recombinante, tal como se ha definido anteriormente.

40 Dichas plantas transgénicas incluyen las plantas transgénicas monocotiledóneas, preferiblemente una planta de maíz transgénica que comprende al menos un transgén que comprende un casete de expresión recombinante que contiene un polinucleótido que codifica un factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4, tal como se ha definido anteriormente.

45 En esta memoria se define como planta transgénica a una planta transformada en la que la información genética exógena proporcionada por un polinucleótido transformante se integra de forma estable en el ADN cromosómico, en forma de transgén, y se puede transmitir entonces a la progenie de dicha planta. Esta definición también incluye la progenie de plantas que son el resultado de la transgénesis inicial, ya que contienen en su genoma una copia del transgén.

50 Diversos métodos de obtención de plantas transgénicas son bien conocidos en sí mismos por el experto en la técnica. En general, estos métodos implican la transformación de células vegetales, la regeneración de plantas a partir de células transformadas y la selección de las plantas que han integrado el transgén.

Están disponibles muchas técnicas de transformación de células vegetales somáticas o germinales (aisladas, en forma de cultivos de tejidos o de órganos o como la planta completa), y de regeneración de las plantas. La elección del método más adecuado depende en general de la planta de que se trate.

55 A título de ejemplos no limitativos de métodos utilizables en el caso de las plantas mencionadas anteriormente, es posible citar los protocolos descritos por Guis et al. (Scientia Horticulturae 84: 91-99, 2000) para el melón, por Hamza y Chupeau (J. Exp. Bot. 44: 1837-1845, 1993) para el tomate, por Shoemaker et al. (Plant Cell Rep. 3: 178-

181, 1986), por Trolinder y Goodin (Plant Cell Rep. 6: 231-234, 1987) para el algodón, por van der Mark et al. (J. Genet Breeding 44: 263-268, 1990) o Marchant et al. (Ann. Bot. 81: 109-114, 1998) para los rosales. En el caso de plantas monocotiledóneas, se pueden citar, por ejemplo, los protocolos descritos por Hiei et al. (The Plant Journal, 6, 271-282, 1994) o Ishida et al. (Nature biotechnology, 14, 745-750, 1996) para el maíz, o por Rasco-Gaunt et al. (J. Exp. Bot. 52: 865-874, 2001) para el trigo.

A título de ejemplo adicional, la obtención de *A. Thaliana* que sobreexpresa el factor de transcripción ZmMYB31 fue descrita por Fornale *et al.*, 2006 (citado anteriormente).

La presente invención tiene también por objeto el uso de un polinucleótido aislado que codifica un factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4, tal y como se ha definido anteriormente, preferiblemente el factor de transcripción ZmMYB31 con la secuencia SEQ ID NO: 1, para inducir tolerancia frente al estrés hídrico en una planta.

La presente invención se entenderá mejor con ayuda de la descripción adicional que sigue, que se refiere a unos ejemplos no limitativos que ilustran la obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan el factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4 ZmMYB31 y la puesta en evidencia de su papel en el aumento de la resistencia frente a la carencia hídrica, así como la figura 1 adjunta que representa el mapa de los vectores binarios pBIOS1977 (A) y pBIOS1978 (B).

Ejemplo 1: Obtención de maíz transgénico que sobreexpresa el factor de transcripción ZMMYB31

1) Clonación y transformación genética del maíz

Dos vectores de transformación diferentes (pBIOS 1562 y pBIOS 1958) se utilizaron para la transformación genética del maíz. Estos vectores contienen el gen bar de *Streptomyces hygroscopicus* que confiere resistencia al herbicida bialafos (White et al., Nucleic Acids Res., 18:1062, 1990), útil para la selección de transformantes de maíz, y un gen que codifica una GFP (proteína verde fluorescente, del inglés "Green Fluorescent Protein") como un marcador visual para el seguimiento de la presencia del transgén en plantas y semillas. La diferencia entre estos dos vectores reside en la estrategia de clonación utilizada para introducir el casete de expresión que contiene el gen de interés (clonación a través del sistema Gateway[®] o clonación por restricción) y el promotor para la expresión de la GFP (el promotor del virus del mosaico de las nervaduras de la yuca (CsVMV), seguido por el intrón FAD2 de *Arabidopsis* o el promotor de la glutenina de alto peso molecular específico del endospermo).

De acuerdo con una primera estrategia de clonación, el gen sintético que codifica ZmMYB31 (SEQ ID NO: 5; secuencia sintética optimizada para la expresión en el maíz) que contiene los sitios de restricción *attL1* y *attL2* se introdujo mediante una reacción de recombinación LR en el vector binario de destinación GATEWAY pBIOS 1562, generando de ese modo el vector pBIOS1977 (véase la Figura 2A). El vector pBIOS 1562 se obtiene a partir del vector pSB12 (Komari et al., J. Plant., 10: 165-174, 1996) que contiene el gen bar bajo el control del promotor pActina, el gen que codifica una GFP bajo el control del promotor CsVMV seguido del intrón FAD2, el promotor y el primer intrón de la ubiquitina 3 del arroz (Sivamani y QU, Plant Mol Biol., 60: 225-239, 2006) seguido de un casete GATEWAY y una secuencia de poliadenilación que proviene del gen Sac66 de *Arabidopsis* (Jenkins et al., Plant Cell Environ., 22 :159-167, 1999).

De acuerdo con una segunda estrategia de clonación, el gen sintético que codifica ZmMYB31 (SEQ ID NO: 5) fue introducido mediante clonación por restricción (presencia de sitios de restricción *SapI* entre la región codificante y los sitios *attL*) en el vector binario de destinación pBIOS 1958 digerido con *SapI*, generando de este modo el vector pBIOS1978 (véase la Figura 2B). pBIOS 1958 se obtiene también a partir del vector pSB12, pero tiene el gen que codifica una GFP bajo el control del promotor de la glutenina de alto peso molecular específico del endospermo (promotor HMWG).

Los vectores pBIOS1977 o pBIOS1978 se transfirieron a continuación a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pSB1) de acuerdo con el método descrito por Komari *et al.*, 1996 (citado anteriormente).

La variedad cultivada de maíz A188 se transformó después con esta cepa de agrobacteria que contiene el vector pBIOS1977 o el vector pBIOS1978, de acuerdo con el método descrito por Ishida *et al.*, 1996 (citado anteriormente).

Se seleccionaron los transformantes primarios (T0), utilizando métodos de rutina en función de los cuatro criterios siguientes:

- (i) *número de copias insertadas*: Esta determinación se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa. Todos los eventos de transformación que poseían más de 2 copias del transgén se eliminaron.
- (ii) *integridad del ADN-T insertado*: Se verificó por una reacción de PCR en las primeras etapas de desarrollo de la planta transformada.
- (iii) *ausencia de terminación prematura de la transcripción del transgén*: Cada uno de los genes diana que están bajo el control de un promotor constitutivo, es posible medir su expresión a partir de tejidos foliares. Los

ARNs de las hojas de plantas T0 se extrajeron de este modo y la integridad de los transcritos se verificó por RT-PCR, usando un cebador directo situado en el intrón ubicuitina3 del arroz y un cebador inverso situado en el terminador AtSac66.

(iv) *número de granos T1 cosechados.*

- 5 Después de la selección de los transformantes, se obtuvieron 52 líneas transgénicas, de las cuales 21 tenían un transgén único e integrado.

2) Evaluación de la tolerancia de las plantas transgénicas frente a la carencia de agua

- 10 Las plantas de la primera generación (cruce del transformante primario con la línea recurrente A188) se valoran en una plataforma de fenotipado. Estas plantas transgénicas son por tanto hemicingotas para el transgén (carácter dominante de la transformación genética). Los testigos ("RRS" y "RCP) utilizados en el experimento, se corresponden a los segregantes silvestres de ese misma cruzamiento.

2.1 Compartimento de cultivo

- 15 Las plantas estudiadas se cultivaron en un fitotrón. Este último, con una superficie de 30 m² tiene dos cámaras de cultivo independientes. En estas cámaras, la iluminación, la temperatura y la humedad están reguladas (véase el apartado 2.2. a continuación).

Las siembras se realizan en terrinas con las dimensiones 44 x 28,5 x 7 cm (L x A x P). Se siembran cinco genotipos por terrina a razón de diez semillas por genotipo. Se utilizan solo cinco plantas por genotipo para medir la cinética de desecación.

2.2 Condiciones de cultivo

- 20 Dentro del compartimento de cultivo, la temperatura, la humedad y la iluminación están reguladas.

Las condiciones aplicadas son las siguientes:

Fotoperiodo:

- Día durante 16 h (6 h a 22 h) con complemento fotosintético (lámpara de sodio de 400 W) cuando la radiación externa es inferior a 100 W/m².
25 - Noche durante 8 h (22 h a 6 h).

Termoperiodo: 24°C / 20°C.

El cumplimiento de estas condiciones se garantiza mediante calentamiento cuando la temperatura es inferior a 20°C durante la noche y 24°C durante el día, enfriamiento cuando la temperatura supera los 25°C.

Humedad: 75% de humedad relativa regulada por nebulización nocturna.

- 30 Estas condiciones diversas garantizan un crecimiento óptimo del maíz.

2.3 Medición de la cinética de desecación

Relevancia del carácter medido:

- 35 El comportamiento de las plantas frente a la transpiración se estudia gracias a una monitorización continua de la disminución del contenido relativo en agua (RWC: del inglés "Relative Water Content") de plántulas en una etapa temprana (4 hojas visibles). El objetivo es estudiar la respuesta en términos de control estomático de las plantas durante una interrupción repentina del suministro de agua.

- 40 Un control estomático muy rápido cuando tiene lugar la aparición de una carencia de agua, permite ahorrar el agua disponible, pero limita la capacidad de asimilación del CO₂ y por tanto el potencial de producción de la planta. En contraste, un cierre relativamente lento de los estomas permite el mantenimiento de la actividad fotosintética de la planta, asegurando el mantenimiento del potencial de producción con riesgo de desecarse más rápidamente (Khalfaoui, 1991, En: L' amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides [Improvement of plants for adaptation to arid environments]. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, págs. 51-63).

Método:

- 45 Las mediciones se realizan sobre plántulas T1 completas en el estado de 3-4 hojas visibles. Las plantas utilizadas a lo largo de esta medición son plantas que provienen de una siembra en exceso en relación con las necesidades de la plataforma (3 semillas plantadas por maceta). Las cantidades para la medición del desecamiento son 5 plantas por cada evento de transformación y testigos silvestres.

Las plantas se cortan a nivel del cuello, se sumergen durante 24 horas a 4°C en la oscuridad (para saturar de agua las células) y después se colocan en una cámara climática luminosa, regulada a 30°C.

A continuación, se realiza un seguimiento del peso de las plántulas de acuerdo con la pauta detallada en la Tabla II a continuación:

- 5 Tabla II: Pauta de los pesajes de las plántulas condicionadas a 30°C a plena luz. El peso a H0 se corresponde con el peso con plena turgencia. Al final del día 3, las plántulas se colocan en una incubadora a 80°C durante 24 h, con el fin de obtener con un pesaje final el valor del peso seco.

Día	Duración	
1	H0	← Peso con plena turgencia (P_{Turg})
1	H0+2	} ← Peso en el instante t (P_t)
1	H0+6	
1	H0+8	
4	H0+96	← Peso en seco (P_s)

- 10 En el instante t, el contenido relativo en agua de las plantas se calcula entonces utilizando la siguiente fórmula matemática: $(P_t - P_s) / (P_{Turg} - P_s) \times 100$.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> GENOPLANTE-VALOR
 ROUSTER, Jacques
 SALLAUD, Christophe
 COURSOL, Sylvie
 ZIVY, Michel
 VIRLOUVET, Laetitia
 WELCKER, Claude

10 <120> OBTENCION DE PLANTAS QUE TIENEN UNA TOLERANCIA MEJORADA FRENTE A UNA CARENCIA DE AGUA

15 <130> MJP/XRN/cc-F1516/38/PCT
 <150> FR 1004059
 <151> 15-10-2010

20 <160> 5
 <170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> Zea mays

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

ES 2 577 932 T3

Val Ala Ala Ala Ala Arg Asp Asp Lys Lys Gly Ala Val Phe Arg Leu
 145 150 155 160

Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Arg Asn Lys Ala Thr Met Val Val Gly
 165 170 175

Arg Asp Arg Gln Ser Gln Ser His Ser His Ser His Pro Ala Gly Glu
 180 185 190

Trp Gly Gln Gly Lys Arg Pro Leu Lys Cys Pro Asp Leu Asn Leu Asp
 195 200 205

Leu Cys Ile Ser Pro Pro Cys Gln Glu Glu Glu Glu Met Glu Glu Ala
 210 215 220

Ala Met Arg Val Arg Pro Ala Val Lys Arg Glu Ala Gly Leu Cys Phe
 225 230 235 240

Gly Cys Ser Leu Gly Leu Pro Arg Thr Ala Asp Cys Lys Cys Ser Ser
 245 250 255

Ser Ser Phe Leu Gly Leu Arg Thr Ala Met Leu Asp Phe Arg Ser Leu
 260 265 270

Glu Met Lys
 275

- 5 <210> 2
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Zea mays
- 10 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 15 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (7)..(25)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 20 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (27)..(45)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 25 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (47)..(53)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 2
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50

5 <210> 3
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Zea mays

10 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(24)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

15 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (26)..(43)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

20 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (45)..(51)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 3
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

25 **Xaa Xaa Xaa**
50

30 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Zea mays

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /Sustituir = Glu

<400> 4
Leu Asn Leu Asp Leu
1 5

ES 2 577 932 T3

<210> 5
 <211> 828
 <212> DNA
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> secuencia sintética que codifica ZmMYB31

<400> 5

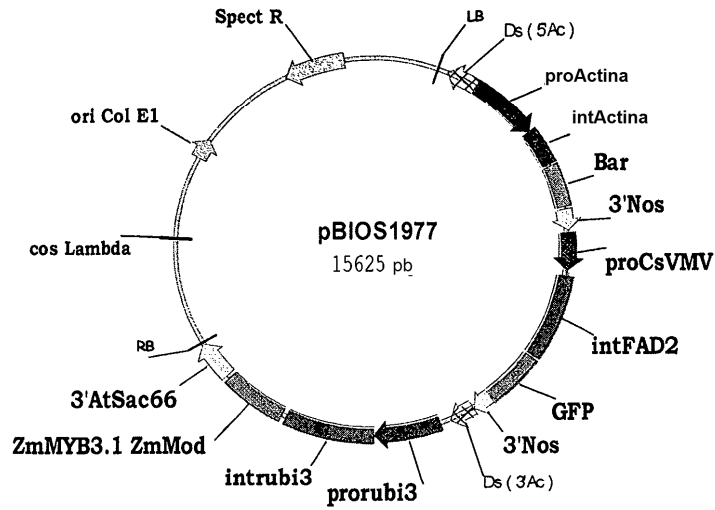
atgggtagaa	gtccctgctg	cgaaaaggca	catactaata	aaggagcgtg	gacgaaggaa	60
gaggacgaga	gactggtggc	acatattcgg	gcgcacggcg	aaggatgctg	gcgctccctc	120
cctaaggccg	ctggtttgct	gcggtgcggc	aagtcttgcc	gcctccggtg	gatcaactac	180
ttgaggccgg	acttgaagcg	cggtaatctc	acggaagagg	aggacgagct	tatcgtcaag	240
cttcacagtg	tctcggtaa	taagtggctc	ttgatcgccg	gcaggctgcc	aggtaggact	300
gataacgaga	taaagaatta	ctggaatacc	catatccgca	gaaaattgct	tagcagaggc	360
atagatcccg	tgacgcatag	gccagtcaca	gaacaccacg	cctctaacat	caccatctct	420
ttcgagacag	aggtggccgc	agcggcccgt	gatgacaaga	agggcgctgt	gttccggctt	480
gaggacgagg	aggaggaaga	gagaaataag	gccactatgg	tggtgggtcg	ggatagacaa	540
tcccagagcc	atagccattc	gcaccctgct	ggtgaatggg	gccaaaggaa	gcgccctctg	600
aagtgcccg	acctgaacct	ggacttgtgt	attagccac	cctgccaaaga	agaggaggag	660
atggaggagg	ccgccatgcg	tgtcaggcca	gctgtgaagc	gcgaagcggg	cctgtgcttt	720
ggctgctcgc	tggcctgcc	aaggaccgcc	gattgcaagt	gctccagtag	cagcttcctc	780
ggcctgagaa	ccgcgatgct	cgatttccgg	agcctggaga	tgaaatag		828

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la tolerancia de una planta frente a la carencia de agua, caracterizado por que se sobreexpresa en dicha planta un factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4 que tiene al menos 95% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 5 2. El método según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4 se obtiene a partir de una planta monocotiledónea, y comprende los aminoácidos conservados situados en las posiciones 1-9, 11-13, 15-22, 24-25, 27, 30-41, 43-70, 74-75, 77-78, 80-83, 85-93, 95-111, 113-116, 120-127, 138, 140-141, 197, 202-212, 214, 234, 239, 242, 252, 254-255, 261-263, 267-271 y 274-275 de dicha secuencia SEQ ID NO: 1 cuando está alineada con dicha secuencia SEQ ID NO: 1.
- 10 3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado por que dicho factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4 tiene la secuencia SEQ ID NO: 1.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha planta se selecciona entre las plantas hortícolas, las plantas ornamentales, los árboles frutales, el trigo, el maíz, el arroz, el algodón, la colza y el girasol.
- 15 5. El método según la reivindicación 4, caracterizado por que dicha planta es maíz.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que dicha sobreexpresión se obtiene:
 - mediante transformación genética de dicha planta con una o varias copias de un polinucleótido que codifica dicho factor de transcripción, asociado a secuencias reguladoras en *cis* de su expresión, o
- 20 - mediante modificación de las secuencias reguladoras en *cis* de la expresión de dicho factor de transcripción.
7. Uso de un polinucleótido aislado que codifica un factor de transcripción R2R3-MYB de la subfamilia 4 tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para inducir en una planta tolerancia frente al estrés hídrico.

A



B

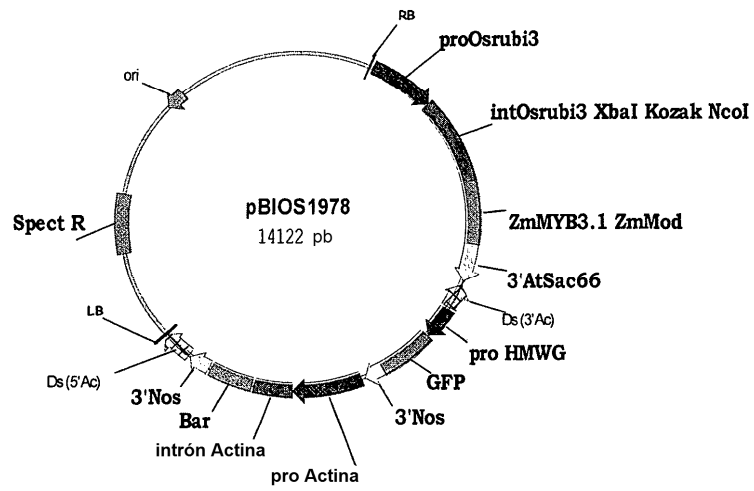


Figura 1